

Centre Eau, Terre et Environnement
Institut National de la Recherche Scientifique
Université du Québec

**Perturbation du métabolisme énergétique par le Cd, le Cu et le Ni dans les
mitochondries de poissons**

Par

Nicolas Garceau

Mémoire présenté

pour l'obtention

du grade Maître es sciences (M.Sc.)

Membres du Jury

Directeur de recherche

Patrice Couture

INRS-ETE

Examineur interne

Claude Fortin

INRS-ETE

Examineur externe

Mery Martínez-García

Université Laurentienne

Résumé

Les activités minières et les fonderies ont rejeté énormément de métaux dans les écosystèmes entourant leurs exploitations. Ces métaux se retrouvent dans les lacs avoisinants et affectent tous les niveaux de la chaîne trophique. Plusieurs études précédentes ont suggéré que le métabolisme énergétique aérobie des poissons était particulièrement touché. Plus spécifiquement, des études ont suggéré la mitochondrie comme cible principale de la toxicité des métaux. Mon étude avait donc pour but de compléter les connaissances déjà acquises sur les effets des métaux sur les enzymes mitochondriales. J'ai donc mesuré l'activité des quatre complexes de la chaîne de transport des électrons dans des foies et des muscles de perchaudes (*Perca flavescens*) provenant de cinq lacs présentant un gradient de contamination polymétallique, de la Région de Rouyn-Noranda, Québec. J'ai ensuite essayé de départager les effets directs des métaux des effets indirects en mesurant l'activité de la citrate synthase (CS) et de la cytochrome c oxydase (CCO) dans des homogénats de muscle et de foie de poissons rouges après ajout de Cu, de Cd ou de Ni. Le foie de poisson rouge a servi également pour mesurer la respiration mitochondriale après ajout de Cd, de Cu ou de Ni. Les résultats au niveau des enzymes ne me permettent pas de conclure sur l'effet des métaux. Cependant, le Cd et le Cu ont inhibé la respiration mitochondriale. Avec l'addition de $40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ poids sec de Cu la respiration est inhibée de 79 % vs. 18 % pour le témoin; $n = 5$, $p < 0,0001$. Quant au Cd, $14 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec provoquent une inhibition de $79 \% \pm 28$ vs. $18 \% \pm 15$ pour le témoin ; $n = 7$, $p < 0,0001$. Cependant, le Ni n'a pas significativement affecté la respiration mitochondriale même à de très fortes concentrations, jusqu'à 250 % par rapport aux concentrations environnementales, c'est-à-

dire $38 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec. Ces résultats mettent en évidence l'effet direct que certains métaux ont sur le métabolisme énergétique des poissons. Toute cette dépense en énergie supplémentaire ne peut être utilisée pour la croissance ni la reproduction ce qui peut causer de grave problème aux espèces plus sensibles. Appliquer les techniques développées dans mon étude sur une étude avec des poissons sauvages permettrait certainement d'élucider d'autres zones floues des mécanismes de toxicité des métaux.

Remerciements

C'est avec un mélange de satisfaction et de fierté et je dois l'avouer de soulagement que je dépose ce mémoire, concrétisation de deux ans et demi de travail. Jamais ces pages ne pourront transmettre l'ensemble de ce qu'elles représentent, à quel point elles m'ont fait grandir. Cette aventure m'a permis de rencontrer des gens extraordinaires qui se consacrent tout entier à leur passion et qui ont su me la transmettre.

Je remercie tout d'abord mon directeur de recherche, Patrice Couture, pour tous ses mots d'encouragements et tout ce qu'il a pu m'apprendre tant sur les plan des connaissances que sur moi-même. Véritable mentor et ami, sa patience et sa confiance ont su attiser en moi la volonté de continuer dans cette entreprise. Je remercie aussi Helga Guderley, Pierre Blier et Nicolas Pichaud qui m'ont énormément aidé dans la mise au point de la technique d'isolation des mitochondries. Sans eux, je serais encore en ce moment dans le laboratoire.

Finalement je veux remercier tous ceux, collègues et amis, qui m'ont aidé de près ou de loin, autant par leurs encouragements que par leurs railleries, Dominique, Charles, Isabelle, Hugo, Simon, Kim, Marie-Eve, Alex, Anie, Julie, Jonathan, Mélanie, et ma grande amie Sophie.

Il me reste un merci spécial pour celle dont le support m'a été le plus précieux et qui a su croire en moi lorsque moi je n'y croyais plus. Valérie, ton enthousiasme fera à jamais partie de ces lignes.

Table des Matières

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iv
Table des Matières	v
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations.....	ix
1. Introduction.....	1
1.1 Les métaux essentiels et non-essentiels	3
1.2 Effets des métaux sur les mammifères et les humains.....	4
1.2.1 Le métabolisme énergétique aérobie	5
1.2.2 Les métaux et les mitochondries.....	10
1.3 Les invertébrés et les métaux.....	12
1.4 Toxicité chez les poissons.....	13
1.5 Les modèles utilisés	14
1.5.1 La perchaude.....	14
1.5.2 Le poisson rouge.....	16
1.6 Problématique et objectifs.....	17
2. Mechanisms of metal toxicity in fish mitochondria	19
2.1 Résumé.....	20
2.2 Abstract.....	22
2.3 Introduction.....	23
2.4 Materials and methods	26
2.4.1 Yellow perch sampling	26
2.4.2 Measurement of electron transport chain (ETC) enzyme activity.....	26
2.4.3 Modification of mitochondrial enzyme activities by direct addition of metals	27
2.4.4 Effects of metals on goldfish liver mitochondrial respiration	28
2.4.5 Statistical analysis.....	30
2.5 Results.....	31
2.5.1 Electron transport chain activity in tissues of wild yellow perch along a metal gradient.....	31
2.5.2 Inhibition of CS and CCO by metal addition in goldfish liver homogenate.....	32
2.5.3 Effects of Cu and Cd on goldfish liver mitochondrial respiration.....	33
2.6 Discussion	34
2.6.1 Effects of environmental metal contamination on the activity of ETC complexes in wild yellow perch	34
2.6.2 Direct metal effects on CS and CCO activity in goldfish tissue homogenates	36
2.6.3 Metal effects on mitochondrial respiration in goldfish.....	38
3. Conclusion	51
ANNEXE A	67
ANNEXE B	69

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : Variations in the activity of goldfish liver homogenate citrate synthase (CS) and cytochrome c oxidase (complex iv, CCO) expressed as mean percent activity relative to the activity measured in control homogenates (n = 3 for controls and for metal additions). Negative values indicate an inhibition compared to controls; positive values indicate increased activity (p < 0.05). Data are expressed as mean ± SE. N.S. Not significant. 42

TABLEAU 2 : Activity of goldfish muscle homogenate citrate synthase (CS) and cytochrome c oxidase (complex iv, CCO) expressed as mean percent activity relative to the activity measured in control homogenates at two concentrations of Ni (n = 3 for controls and for Ni additions). Negative values indicate an inhibition compared to controls; positive values indicate increased activity (p < 0.05). Data are expressed as mean ± SE. N.S. Not significant. 42

Liste des figures

- FIGURE 1 : La mitochondrie 7
- FIGURE 2 : La chaîne de transport des électrons..... 8
- FIGURE 3 : Activity of the four complexes of the electron transport chain in the liver of yellow perch from five lakes of Rouyn-Noranda, Québec. Lakes present a gradient of contamination increasing from left to right. Data are expressed as means \pm SE (N = 20). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$). A = complex I (NADH dehydrogenase; EC 1.6.5.3), B = complex II (succinate dehydrogenase (ubiquinone)); EC 1.3.5.1, C = complex III (ubiquinol:ferricytochrome c reductase; EC 1.10.2.2) D = complex IV (cytochrome c oxidase; EC 1.9.3.1)..... 45
- FIGURE 4 : Activity of complexes I and IV of the electron transport chain in the muscle of yellow perch from five lakes of Rouyn-Noranda, Québec. Lakes present a gradient of contamination increasing from left to right. Data are expressed as means \pm SE (N=20). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$). A = complex I (NADH dehydrogenase; EC 1.6.5.3), B = complex IV (cytochrome c oxidase; EC 1.9.3.1)..... 46
- FIGURE 5 : Inhibition of oxygen consumption in goldfish liver mitochondria as a function of A: Cu concentration; or B: Cd concentration (top X scales). Bottom X scales present the equivalent KNO_3 addition in control preparations run in parallel (Cd and Cu are added as NO_3 salts). Inhibition is expressed by the following ratio: State 3 rate (after each addition of metal or KNO_3) over State 4+ (with oligomycin, which triggers the maximal inhibition). The axis also represents time since greater concentrations of metals are obtained by sequential additions of smaller quantities (full X scale represents 25-30 minutes). Data are expressed as mean (\pm SE). Asterisks represent significant differences observed between controls and treatments groups ($p < 0.05$)..... 47
- FIGURE 6 : Fulton's condition factor (FCF) of yellow perch sampled in five lakes of Rouyn-Noranda, Québec. Lakes present a gradient of contamination increasing from left to right. Data are expressed as means \pm SE (N = 25). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$) 48



Liste des abréviations

ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
CCO	Cytochrome c oxydase
CS	Citrate Synthase
DB	Decylubiquinone
DBH ₂	Decylubiquinone (reduced form)
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ETC	Electron transport chain
FADH ₂	Flavin adenine dinucleotide (reduced form)
FCF	Fulton condition factor
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form)
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxyde dismutase

1. Introduction

Depuis un peu plus d'une cinquantaine d'années, nous prenons conscience des conséquences qu'ont nos activités sur l'environnement qui nous entoure. Des mesures pour réduire ces impacts sont maintenant intégrées dès l'extraction de la matière première jusqu'à sa réutilisation ou son recyclage en passant par les différents processus de production. Cette prise de conscience est toutefois récente et les études sur le sujet sont relativement nouvelles. En effet, l'Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis (U.S. EPA) a publié ses premiers guides pour la protection de la santé humaine au cours des années 1970 (Campbell et al. 2006). Des guides semblables, touchant cette fois les répercussions des contaminants sur l'environnement, n'ont connu leurs premiers développements que dans les années 80 pour finalement être publiés en 1992. La publication des guides pour la protection de la santé humaine fut la charpente des premiers guides pour l'analyse de risques environnementaux (ecological risk assessment ou ERA en anglais) US-EPA (1992). L'US-EPA définit l'ERA comme étant : « l'évaluation de la probabilité que des effets écologiques défavorables peuvent arriver ou arrivent suite à l'exposition à un ou plusieurs agents stressants » US-EPA (1992). Ces prises de conscience et le développement de nouvelles approches ont été concomitants avec le développement d'une nouvelle science, l'écotoxicologie, qui fait appel aux connaissances en toxicologie, afin de cerner les impacts des polluants sur l'environnement.

Bien vite, l'obligation de départager les types de polluants sur la base de leurs différentes caractéristiques physico-chimiques s'est fait sentir. Sans contredit, les contaminants organiques ne réagissent pas de la même façon que les contaminants inorganiques (ex. les métaux). Ils diffèrent notamment au niveau de leur origine. Les composés organiques sont majoritairement de source anthropogénique et les métaux sont naturellement présents avec des concentrations naturelles variables (Campbell et al. 2006). De même, leurs destins diffèrent; les métaux sont persistants et rarement bioamplifiés (augmentation de la concentration le long de la chaîne trophique), tandis que les composés organiques se dégradent en composés secondaires et sont très souvent bioamplifiés (Campbell et al. 2006). Finalement, les métaux, souvent essentiels à l'organisme, transitent par des mécanismes de transport cellulaire qui en facilitent leur assimilation, tandis que les composés organiques diffusent au travers des membranes lipidiques des cellules (Campbell et al. 2006). De surcroît, les métaux peuvent changer de forme en fonction du milieu dans lequel ils évoluent. Ces changements sont des variations dans les états d'oxydation ou des complexes formés par les métaux et sont normalement réversibles (Campbell et al. 2006). Par conséquent, les études sur les métaux doivent tenir compte de ces différences en plus des propriétés chimiques des milieux dans lesquels les métaux sont retrouvés.

Depuis sa création, l'écotoxicologie a développé une multitude d'outils et de modèles afin de constater et prévoir les effets des polluants autant au niveau des individus que des espèces et des populations. Ces modèles sont très utiles puisqu'ils permettent de lier les effets physiologiques et toxicologiques de façon quantitative au moyen d'équations

(Paquin et al. 2002). Les études sur la contamination par les métaux possèdent aussi leur modèle central, le modèle du ligand biotique (biotic ligand model ou BLM en anglais). Ce dernier intègre la chimie du milieu influençant les métaux, la physiologie de l'organisme cible ainsi que le site d'action du métal sur l'organisme pour prédire la présence d'effets toxicologiques (Paquin et al. 2002). Un de ses dogmes centraux stipule que le potentiel de toxicité d'un métal n'est pas représenté par sa concentration totale, mais bien par la concentration de sa forme ionique libre (Paquin et al. 2002).

1.1 Les métaux essentiels et non-essentiels

Selon ce qui précède, les métaux eux-mêmes peuvent être classés en deux catégories : les essentiels, ceux nécessaires au bon fonctionnement des organismes et les non-essentiels, ces derniers étant potentiellement toxiques. Il est toutefois important de souligner qu'une carence ou une trop grande absorption de métaux essentiels peut être aussi néfastes. Les organismes ont donc développé des mécanismes homéostatiques pour conserver des concentrations acceptables, soit en accumulant des réserves ou en éliminant les excès (Garrett 2000). Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le fer (Fe), le cobalt (Cb), le manganèse (Mn), le magnésium (Mg), le chrome (Cr) figurent parmi les métaux essentiels, tandis que le cadmium (Cd), le mercure (Hg), ainsi que l'arsenic, un métalloïde (As), ne sont pas nécessaires à l'organisme (Valko et al. 2005). Le nickel (Ni) ne fait pas partie des métaux essentiels pour les poissons, par contre il l'est chez les végétaux et de nombreuses bactéries (Williams et Fraústo Da Silva 2000). Pour illustrer l'action des métaux dans l'organisme, on peut utiliser l'exemple du cuivre, utilisé dans certaines enzymes de la chaîne de transport des électrons. Comme il permet le passage des électrons dans les fils

électriques, le cuivre aide à catalyser le mouvement des électrons dans les molécules biologiques (Valko et al. 2005).

1.2 Effets des métaux sur les mammifères et les humains

Depuis la révolution industrielle et avec le développement des industries, de nombreux cas de contamination par les métaux ont été répertoriés. À titre d'exemple, les chapeliers utilisaient historiquement énormément de mercure dans la fabrication des chapeaux, ce qui leur causait de la neurodégénérescence, des changements de comportement et éventuellement la mort (Dyer 2007). C'était devenu tellement courant chez les chapeliers que Lewis Carroll en a fait une parodie dans *Alice's Adventures in Wonderland*.

Ainsi, les activités minières, de fonderie, des raffineries, des incinérateurs, et la combustion de carburant sont des sources majeures de contamination pour le Ni, le Cd, le Cu et le Zn. En effet, le Cd est rejeté dans l'environnement autant par voie atmosphérique que par voie terrestre et aquatique, ce qui en fait un contaminant très préoccupant (Achard-Joris et al. 2006). Par exemple, la maladie d'Itai-Itai est la forme la plus sévère d'une intoxication au cadmium (Takashi et Yumi 2006). C'est une maladie qui ressemble à une très grave ostéoporose et qui est mortelle. Elle fut reconnue pour la première fois au Japon dans la rivière de Jinzu peu après la Deuxième Guerre mondiale et causa la mort de plus de cent personnes (Miliou et al. 1998; Takashi et Yumi 2006; Dyer 2007). Le cadmium c'était déversé dans la rivière Jinzu à partir d'un effluent contaminé par une mine de zinc en amont du bassin versant, affectant ainsi les rizières avoisinantes (Miliou et al. 1998; Dyer 2007). Les exemples de la contamination des populations humaines par

les métaux sont très nombreux et les symptômes diffèrent d'un métal à l'autre, ainsi que d'une forme chimique d'un métal à une autre forme chimique de ce même métal. Ces contaminations peuvent toucher de vastes populations : plus de 40 millions de personnes consomment de l'eau contaminée à l'arsenic (un métalloïde) dans le bassin du Bengale (Bangladesh et Inde) (Smedley et Kinniburgh 2002). Par contre, il est important de souligner que la contamination des populations humaines comme celle du Bangladesh est due à une concentration naturelle très élevée en arsenic dans le sol de cette région (Mandal et Suzuki 2002). Parallèlement, les contaminations dues à l'activité humaine affectent autant la faune que la flore des différents écosystèmes qui les entourent.

Fait intéressant à signaler, la très grande majorité des études consultées pour cette rédaction, tant au niveau des humains que de la faune, mentionnent que les effets des métaux ont un lien important avec le métabolisme énergétique aérobie de la cellule. Bien que ce ne soit pas le seul mécanisme impliqué dans la toxicité des métaux, il semble que ce soit un des plus importants en ce qui concerne la contamination des poissons (Žikić et al. 2001; Risso-De Faverney et al. 2004; Giguère et al. 2005; Dyer 2007; Couture et al. 2008a), des plantes (Ortega-Villasante et al. 2007) des invertébrés comme les huîtres (Sokolova 2004; Sokolova et al. 2005) et des mammifères (Casalino et al. 1997; Irato et Albergoni 2005; Masso et al. 2007).

1.2.1 Le métabolisme énergétique aérobie

Avant de poursuivre l'analyse, il est important de distinguer le métabolisme énergétique aérobie du métabolisme anaérobie. Dans les deux cas, des enzymes se succèdent pour

effectuer les réactions nécessaires à la formation de l'énergie, principalement sous forme d'ATP. Comme leur nom l'indique, la principale différence est que le métabolisme aérobie utilise l'oxygène comme accepteur d'électron tandis que le métabolisme anaérobie n'en utilise pas. Ce dernier est utilisé pour des actions musculaires rapides comme la chasse ou l'évitement d'un prédateur. Il fournit une grande puissance, mais pour de courtes périodes. Quant au métabolisme aérobie, il est la principale source d'énergie pour la majorité des organismes vivants. Il a l'avantage de fournir beaucoup d'énergie pour beaucoup moins de substrat que la fermentation. De plus, il peut fournir un apport d'énergie suffisant pour permettre des efforts continus sur une grande période, comme la nage soutenue, la course, etc.

La respiration cellulaire est une des principales fonctions de la mitochondrie. Celle-ci est un organelle composé de deux membranes phospholipidiques, la membrane interne et la membrane externe. La membrane interne est formée des crêtes et des creux que l'on nomme cristae où l'on retrouve les cinq complexes de la chaîne de transport des électrons (Lodish et al. 2001). L'espace à l'intérieur de la membrane interne est la matrice et l'espace compris entre les deux membranes est appelé l'espace inter membranaire. Les complexes de la chaîne de transports des électrons sont : le NADH oxydase (complexe I), le succinate déshydrogénase (complexe II), le cytochrome c réductase (complexe III), le cytochrome c oxydase (complexe IV) et l'ATP synthase (complexe V) (Pierrel et al. 2007). Les quatre premiers complexes sont des métalloenzymes, c'est-à-dire qu'elles contiennent des métaux et qu'ils sont essentiels à leur bon fonctionnement (Hatefi 1985). Les complexes I à III contiennent des centres Fe-S. Les complexes II et III possèdent en

plus des hèmes (cofacteur contenant en son centre un atome de fer entouré par un large anneau organique), tout comme le complexe IV, qui lui contient aussi du Cu (Hatefi 1985).

Figure 1 : La mitochondrie

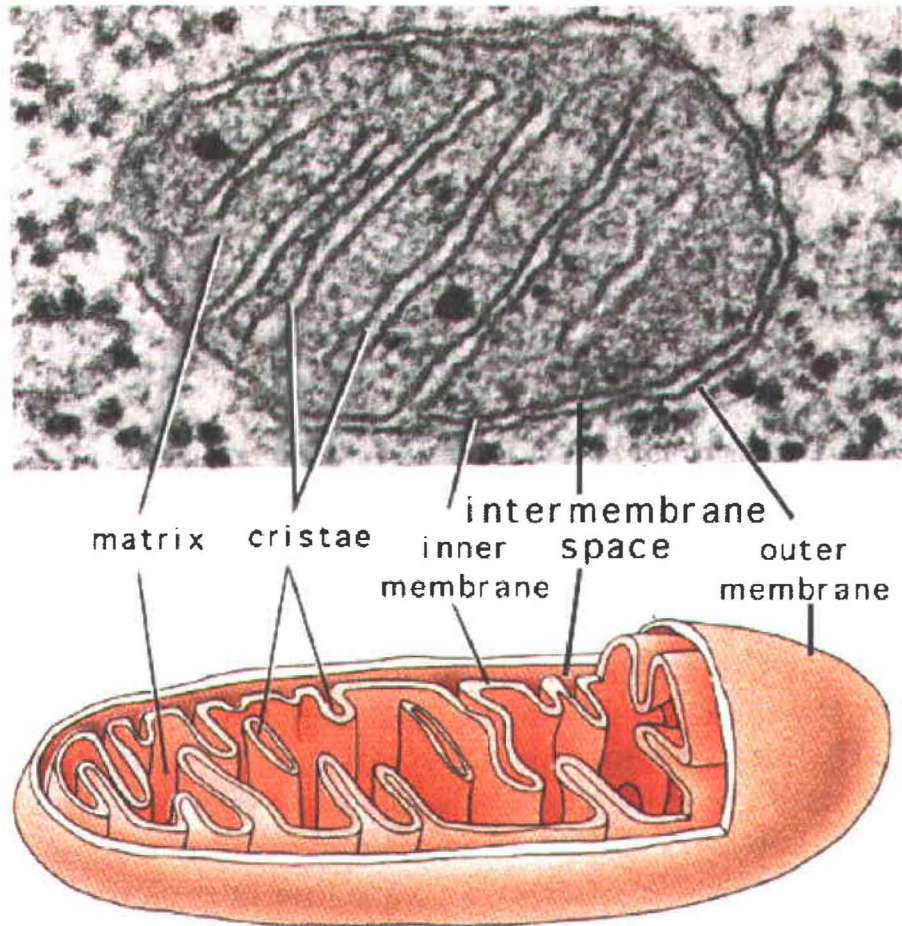


Image tirée de : <http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/mito.htm>

Figure 2 : La chaîne de transport des électrons

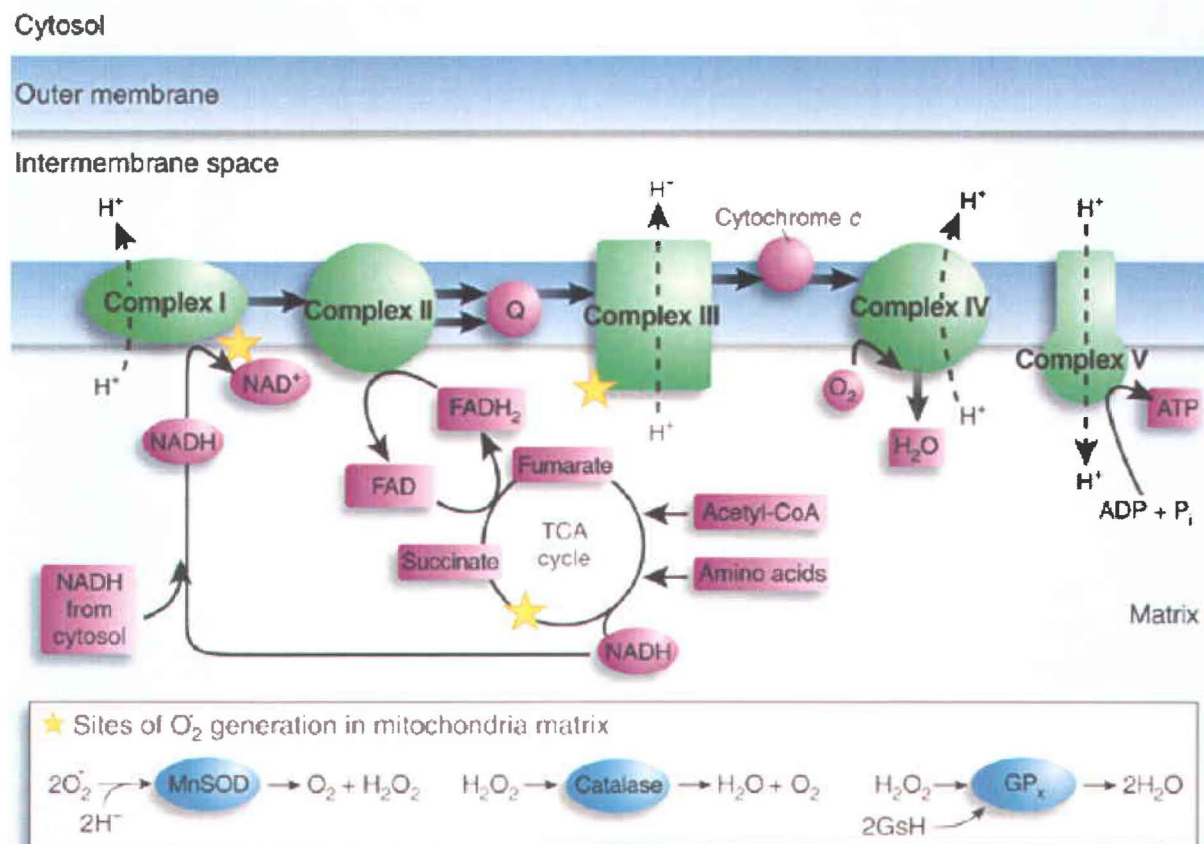


Image reproduite avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Beal MF (2005) *Nature Medicine*, 11: 598-599

Le métabolisme aérobie comprend le Cycle de Krebs, situé dans la matrice et la chaîne de transport des électrons, le tout aboutissant à la création d'ATP par l'ATP synthase. Le cycle de Krebs fournit les substrats nécessaires à la chaîne de transport des électrons (NADH et FADH₂). Grâce à ceux-ci, les complexes de la chaîne pompent des protons (H⁺) de la matrice vers l'espace inter membranaire créant ainsi un gradient, une force (proton-motrice) qui permet à l'ATP synthase de former de l'ATP avec l'ADP. Naturellement, l'organisme possède des points de contrôle pour ajuster la vitesse de la

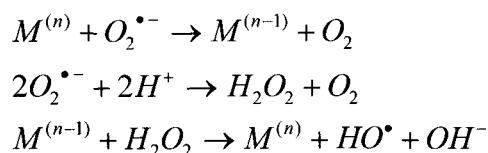
production d'énergie en fonction de la demande (Lodish et al. 2001). Ces points de contrôle sont des réactions non-réversibles (Lodish et al. 2001). En changeant la vitesse de réaction des enzymes catalysant ces réactions, l'organisme peut donc accélérer ou ralentir le processus. La citrate synthase (CS) est l'enzyme catalysant la première réaction du Cycle de Krebs et est aussi un de ces points de contrôle (Lodish et al. 2001). Étant le premier point de contrôle, la CS est souvent utilisée comme indicateur de l'activité du Cycle de Krebs. Le complexe IV (Cytochrome c oxydase) est le site où les électrons transportés depuis le complexe I sont transférés à l'oxygène (O_2) pour former de l'eau (H_2O) (Lodish et al. 2001). Il est donc très souvent lui aussi utilisé comme indicateur de l'activité de la chaîne de transport des électrons. C'est d'ailleurs une raison pour laquelle j'ai mesuré l'activité de ces deux enzymes dans mes expériences sur la contamination des poissons rouges (voir Chapitre 2).

Malgré que ce processus (Cycle de Krebs et chaîne de transport des électrons) semble très rigoureux et fonctionne avec la précision d'un horloger, il n'est pas sans défaut. L'utilisation de l'oxygène en tant qu'accepteur d'électrons permet une meilleure efficacité énergétique que l'utilisation de H_2S ou la fermentation, mais implique que la cellule doit faire face à la très grande réactivité de l'oxygène et prévenir des réactions d'oxydation non voulues (Brand 2000). Parmi ces réactions, la production d'espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species ou ROS en anglais) est soupçonné être la cause du vieillissement (Herrero et Barja 1997; Pamplona et al. 2002; Moghaddas et al. 2003) et de l'apoptose (Kumar et al. 2002) par la peroxydation des lipides membranaires (Halliwell et Gutteridge 1984; Ercal et al. 2001), en plus de causer des dommages aux

protéines et à l'ADN (Ercal et al. 2001). Bien entendu, des mécanismes de protection sont en place pour protéger la mitochondrie des ROS. Tous les antioxydants (par ex : vitamine E et ascorbate), la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et les métallothionéines et quelques autres protègent les cellules des dommages causés par les ROS (Halliwell et Gutteridge 1984; Sato et Kondoh 2002). C'est ici que les métaux entrent à nouveau en jeu.

1.2.2 Les métaux et les mitochondries

Les indices reliant l'action des métaux au métabolisme énergétique sont très nombreux. Un des principaux mécanismes de toxicité des métaux est la production de ROS. En effet, certains métaux comme le Cu, le Cr, le V, le Co et le Fe sont dit des métaux avec cycle redox (Ercal et al. 2001; Valko et al. 2005). Ces métaux peuvent générer la création de ROS, par exemple, par des réactions de type Fenton :



où M représente le métal et n sont état d'oxydation initial (Ercal et al. 2001). Cette boucle de réactions permet la création de HO^{\bullet} . Le H_2O_2 , bien que n'étant pas un ROS à proprement parler est tout est tout de même extrêmement réactif et est connu pour être impliqué dans plusieurs réactions créant d'autres ROS par la suite (Ercal et al. 2001). La génération accrue de ROS va entraîner des dommages aux membranes de la mitochondrie et éventuellement l'apoptose (Ercal et al. 2001). Pour l'arsenic, les mécanismes exacts de générations de ROS sont encore inconnus, par contre la formation d'un intermédiaire,

l'arsenine, semble impliqué dans la formation de superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), d'oxygène singulet (1O_2), de radical peroxyde (ROO^{\cdot}), de radical oxyde nitrique (NO^{\cdot}), de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de radical dimethylarsenic peroxyde ($[(CH_3)_2AsOO^{\cdot}]$) et de radical dimethylarsenic ($[(CH_3)_2As^{\cdot}]$) (Valko et al. 2005). Enfin, pour les métaux qui ne créent pas de cycles redox comme le cadmium, le plomb et le mercure, c'est plutôt la déplétion des réserves cellulaires d'antioxydants et de groupements sulfhydriles qui créent des dommages de façon indirecte (Ercal et al. 2001). En effet, si toutes les molécules servant à la protection contre les effets des ROS sont occupées à protéger la cellule des métaux, les ROS naturellement produit ont le champ libre pour créer des dommages. Plusieurs études ont parlé d'un mécanisme de débordement « spillover » pour la toxicité des métaux, c'est-à-dire que les métaux peuvent s'accumuler sans causer de dommage jusqu'à ce que les mécanismes de défense soient saturés (Ercal et al. 2001; Campbell et al. 2005). Par exemple, le Cd serait ainsi capturé par les métallothionéines, jusqu'à ce que ces dernières ne puissent plus répondre à la demande. C'est là que l'on observe les dommages (Ercal et al. 2001). Cependant, même lorsque lié à la métallothionéine, le Cd peut provoquer des dommages aux mitochondries; beaucoup moins que les ions plus faiblement liés, mais des dommages significatifs (Sokolova et al. 2005). Ainsi, les métaux génèrent des ROS en plus de réduire les capacités de la mitochondrie à se protéger. La production de ROS provoque des dommages sur l'ADN, la peroxydation des lipides, la déplétion des sulfhydriles des protéines en plus d'autres effets (Valko et al. 2005). Les radicaux d'espèces réactives incluent une grande variété de radicaux formés avec l'oxygène, le carbone et le soufre provenant du radical superoxyde, du peroxyde d'hydrogène et de peroxydes lipidiques, mais aussi à partir de chélates formés par des

complexes métalliques d'acides aminés, de peptides et de protéines (Valko et al. 2005). Valko et al. (2005) ont indiqué que les effets toxiques des métaux dans les études sur les mammifères impliquent de la neurotoxicité, de l'hépatotoxicité et de la néphrotoxicité.

1.3 Les invertébrés et les métaux

Les métaux relâchés dans les milieux aquatiques se retrouvent fréquemment dans les sédiments et y restent presque indéfiniment (Peter G.C. Campbell et al. 2006). Les organismes vivant dans ces sédiments doivent donc vivre avec une très grande concentration de métaux. Bien souvent, les espèces les plus sensibles aux métaux (ex. éphémères et certains chironomes) vont disparaître des lacs les plus contaminés et l'on ne retrouvera que des chironomes tolérants aux métaux (Lukin et al. 2003). Ces derniers, lorsqu'ils sont soumis à une contamination, présentent souvent des difformités au niveau de la mâchoire ainsi que des aberrations au niveau des chromosomes (Meregalli et al. 2002). Ces caractéristiques sont utilisées dans plusieurs études comme bio indicateurs de la contamination des sédiments (Meregalli et al. 2002). La diversité des communautés benthiques des lacs contaminés s'en trouve donc réduite aux seules espèces capables de tolérer la présence de métaux dans les sédiments. Ainsi, les métaux peuvent agir en tant que pression de sélection chez les invertébrés (Lukin et al. 2003), mais aussi chez les organismes plus complexes comme les poissons (Maes et al. 2005; Bourret et al. 2008).

1.4 Toxicité chez les poissons

Les mécanismes mentionnés plus haut sont au nombre de ceux qui peuvent avoir lieu chez les poissons. Comme le métabolisme énergétique est assez semblable d'une espèce à l'autre, il est possible de se servir des données rassemblées sur les différentes espèces comme indications pour la recherche sur les poissons.

Les poissons sont particulièrement vulnérables à la contamination par les métaux à cause de leur position très élevée dans la chaîne alimentaire des lacs. En effet, ceux-ci intègrent les effets que les métaux peuvent avoir sur les organismes moins élevés en plus des effets que les métaux peuvent avoir directement sur leur métabolisme (Kövecses et al. 2005). Comme mentionné un peu plus haut, les métaux peuvent altérer la composition de la communauté benthique. Ainsi, même si les poissons ne subissaient aucun effet direct, ils pourraient souffrir d'un apport énergétique moins important soit parce qu'il y a moins de proies et qu'ils doivent se déplacer sur une plus grande distance pour en trouver suffisamment, soit parce que ces proies sont moins nourrissantes, ou finalement une combinaison de ces deux possibilités.

Plusieurs études rapportent les symptômes qu'ils ont observés chez les poissons contaminés. Après un an d'exposition aux métaux, les jeunes perchaudes présentent des déficiences au niveau de l'axe hypothalamohypophysaire-interrénal (HPI) ce qui implique une capacité réduite à la sécrétion de cortisol et de la mobilisation du glycogène pour répondre à un stress (Brodeur et al. 1997; Gravel et al. 2005). Cette déficience est liée à l'accumulation du Cd chez les jeunes perchaudes (Gravel et al. 2005). Une capacité

réduite à répondre à un agent stressant implique une plus grande vulnérabilité des individus. De plus, cette diminution de la production de cortisol est liée à un mauvais fonctionnement du tissu inter-rénal (Brodeur et al. 1997). Selon les études mentionnées dans la section sur les métaux et leur impact sur la mitochondrie, on peut supposer que les reins sont un des organes majeurs où les métaux font leurs dommages.

Étant donné que les métaux semblent agir principalement au niveau des mitochondries, plusieurs groupes ont focalisé leurs investigations aux effets des métaux sur le métabolisme énergétique. Ainsi, Couture et Kumar (2003) et Couture et al. (2008a) ont mesuré une diminution de l'activité de la CS et de la CCO dans le foie et les muscles chez des poissons de lacs contaminés. Mon étude se propose de pousser plus loin les investigations au niveau du métabolisme énergétique et de vérifier si des mécanismes semblables à ceux retrouvés chez les mammifères sont responsables de la toxicité des métaux chez les poissons.

1.5 Les modèles utilisés

1.5.1 La perchaude

La perchaude (*Perca flavescens*) est un poisson d'eaux tempérées qui est le plus abondant dans les eaux libres des lacs présentant une végétation de densité moyenne, des eaux limpides et des fonds boueux, sableux ou graveleux (Pêches-Et-Océans-Canada 2008). Le régime alimentaire de la perchaude varie en fonction la taille de l'individu et de la saison. Autre fait important, la reproduction s'effectue au printemps, ordinairement de la mi-avril à mai (Pêches-Et-Océans-Canada 2008). Normalement, la perchaude se nourrit de

zooplancton lorsqu'elle est jeune, pour ensuite passer à des macro-invertébrés et finalement à des poissons lorsqu'elle atteint une taille suffisante (Pêches-Et-Océans-Canada 2008). Dans certains lacs contaminés, la perchaude ne parvient pas à changer de régime alimentaire. Ceci est très important puisque cela affecte directement les réserves énergétiques disponibles pour la reproduction, la croissance, etc. (Pêches-Et-Océans-Canada 2008).

L'intérêt de l'utilisation de la perchaude réside dans sa capacité à tolérer de grandes concentrations de métaux (Taylor et al. 2003); elle est ainsi présente dans des lacs à faible contamination ainsi que dans des lacs fortement contaminés (Pyle et al. 2005). Par exemple, la région de Rouyn-Noranda dans l'ouest du Québec présente une série de lacs avec un gradient de contamination, principalement par le Cd et le Cu (Couillard et al. 1993). Les activités minières combinées aux émissions de la fonderie pendant plusieurs décennies sont responsables de cette contamination (Couillard et al. 1993). Malgré leur résistance, les communautés de perchaude de cette région ont tout de même été affectées par la présence de métaux dans ce milieu. Leur résistance leur a permis de rester dans ces lacs contrairement à d'autres espèces plus fragiles. Cependant, il y a un coût associé à cette résistance. On peut noter entre autres, des diminutions de la capacité aérobie des poissons et des ralentissements de la croissance et du développement. (Vaglio et Landriscina 1999; Couture et Rajotte 2003; Couture et Kumar 2003; Pane et al. 2004; Peplow et Edmonds 2006).

Les connaissances au niveau des impacts des métaux sur le métabolisme énergétique des perchaudes ont largement évoluées dans les dernières années. La littérature abonde d'exemple (Sherwood et al. 2000; Rajotte et Couture 2002; Gravel et al. 2005; Couture et al. 2008a) pour ne mentionner que ceux-ci; d'autres exemples seront cités dans le Chapitre 2. Ces articles mentionnent l'importance de l'effet des métaux sur les perchaudes. On note, ici aussi, des diminutions de la capacité aérobie, des retards de croissance et dans la reproduction. Ainsi, la région de Rouyn-Noranda présente des lacs 'propres', des lacs intermédiaires et des lacs contaminés. Il est donc possible d'évaluer les effets des métaux sur une même espèce, vivant dans des lacs semblables physico-chimiquement sauf pour ce qui est de la quantité de métaux présents. Ces quelques exemples et les conditions de la région de Rouyn-Noranda démontrent bien la pertinence d'utiliser cette région et la perchaude dans le cadre de cette étude.

1.5.2 Le poisson rouge

Le poisson rouge (*Carassius auratus*) m'a aussi servi de modèle pour cette étude. Il a l'avantage d'être facile à garder en laboratoire contrairement à la perchaude. Gargiulo et al. (1996) ont démontré que l'activité de la Cytochrome c oxydase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la succinate déshydrogénase diminue chez *Carassius auratus* après une exposition de 40 jours à 10 mg/L de Cd, ce qui est près des concentrations que j'ai utilisées. Une autre étude a noté d'importants changements structuraux au niveau des branchies après une exposition au Cd suivi d'une récupération suite à la disparition progressive du métal (Battaglini et al. 1993). Ceci ressemble énormément à une réaction de stress vis-à-vis une substance dangereuse. Au niveau de la

production de ROS et de leur action, Zidic et al. (2001) ont remarqué que le Cd diminuait l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et provoquait l'anémie chez les poissons contaminés. Ces symptômes sont des signes de la production de ROS par le Cd résultant dans la destruction des membranes des érythrocytes (Žikić et al. 2001). Les connaissances sur les mécanismes de toxicité des métaux chez *Carassius auratus* sont ainsi assez bien connus (Murad et Houston 1988; Battaglini et al. 1993; Gargiulo et al. 1996). Son utilisation comme modèle pour des expériences sur les mécanismes de toxicité semble tout à fait appropriée.

1.6 Problématique et objectifs

Plusieurs études essaient de relier les effets des métaux sur les poissons et des indicateurs métaboliques tels que l'activité d'enzymes clés ou l'activation de mécanismes de défense (Brodeur et al. 1997; Audet et Couture 2003; Couture et Rajotte 2003; Giguère et al. 2005). Trouver un indicateur fiable permettant de discriminer les impacts d'une contamination par les métaux des autres facteurs affectant la condition des poissons est le but ultime de ces études et de celle-ci. Ainsi, pour y parvenir, nous devons comprendre les mécanismes de toxicité des métaux. Grâce à ces connaissances, une évaluation plus précise et plus adéquate de la condition des poissons pourra être réalisée et ainsi permettre de mieux répartir l'argent investi dans la protection et la réhabilitation des milieux contaminés. De plus, les poissons d'eau douce représentent à la fois une source d'alimentation et une source de revenu considérable par la pêche récréative. Pour la présente étude, le défi repose principalement sur la mise en place des techniques permettant l'isolation des mitochondries de foies de poissons. Une fois ce défi surmonté,

on peut s'attaquer à une investigation des possibles mécanismes régissant la toxicité des métaux.

Ainsi les objectifs spécifiques de cette étude étaient les suivants : (1) compléter les connaissances déjà acquises sur l'effet des métaux sur les enzymes de la chaîne de transport des électrons sur des poissons sauvages; (2) tester en laboratoire l'effet direct des métaux sur les capacités aérobies des mitochondries; et (3) tester en laboratoire si l'on peut isoler les effets directs des effets indirects des métaux sur les enzymes clés de la respiration cellulaire.

Pour répondre au premier objectif, des perchaudes de la région de Rouyn-Noranda ont été recueillies. Pour les deux autres objectifs, des poissons rouges ont servi comme modèle pour tenter de déterminer l'effet des métaux uniquement sur le métabolisme énergétique des cellules. Comme les perchaudes de la région de Rouyn-Noranda sont principalement en contact avec du Cu et du Cd, les tests en laboratoire ont été effectués avec les mêmes métaux. La région de Sudbury présente aussi une population vivant dans un gradient de contamination où les concentrations en Cu et en Cd sont élevées, mais aussi celles du Ni. C'est pourquoi nous avons décidé de tester ce dernier aussi.

2. Mechanisms of metal toxicity in fish mitochondria

2.1 Résumé

Les activités minières et les fonderies ont rejeté énormément de métaux dans les écosystèmes entourant leur site d'action. Ces métaux se retrouvent dans les lacs avoisinants et affectent tous les niveaux de la chaîne trophique. Plusieurs études précédentes ont suggéré que le métabolisme énergétique aérobie des poissons était particulièrement touché. Plus spécifiquement, des études chez les mammifères ont suggéré la mitochondrie comme cible principale de la toxicité des métaux. Mon étude avait donc pour but de compléter les connaissances déjà acquises sur les effets des métaux sur les enzymes mitochondriales. J'ai donc mesuré l'activité des quatre complexes de la chaîne de transport des électrons dans des foies et des muscles de perchaudes provenant de cinq lacs présentant un gradient de contamination polymétallique, de la Région de Rouyn-Noranda, Québec. J'ai ensuite essayé de départager les effets directs des métaux des effets indirects en mesurant l'activité de la citrate synthase (CS) et de la cytochrome c oxydase (CCO) dans des homogénats de muscle et de foie de poissons rouges après ajout de Cu, de Cd ou de Ni. Le foie de poisson rouge a servi également pour mesurer la respiration mitochondriale après ajout de Cd, de Cu ou de Ni. Les résultats au niveau des enzymes ne nous permettent pas de conclure sur l'effet des métaux. Cependant, le Cd et le Cu ont inhibé la respiration mitochondriale. Avec 40µg/g de poids sec de Cu la respiration est inhibée de 78 % ± 8 vs. 18 % ± 7 pour le témoin ; n=5, p<0.0001. Quant au Cd, 14 µg·g⁻¹ de poids sec provoquent une inhibition de 79 % ± 28 vs. 18 % ± 15 pour le contrôle ; n=7, p<0,0001. Cependant, le Ni n'a pas significativement affecté la respiration mitochondriale même à

de très fortes concentrations. Cette étude permet de conclure que certains métaux ont effectivement un effet direct sur la respiration mitochondriale.

2.2 Abstract

Anthropogenic activities like mining and smelting have led to metal contamination of surrounding ecosystems. Previous studies have shown that fish living in such contaminated environments present many signs of an impairment of the aerobic energy metabolism (Couture et Rajotte 2003). In addition, studies in mammals suggest mitochondria as the prime target for the mechanisms of metal toxicity (Pourahmad et O'brien 2000). Therefore, the purpose of this study was to increase our knowledge of metal effects on mitochondrial enzymes activity and to discriminate between direct and indirect effects of metals. We measured the activity of the four complexes of the electron transport chain (ETC) in liver and muscle homogenate of yellow perch from five lakes presenting a metal contamination gradient from the region of Rouyn-Noranda, Québec. In the purpose of discriminating between indirect and direct effects, we measured citrate synthase (CS) and cytochrome c oxidase (CCO) activity in goldfish muscle and liver homogenate after adding Cd, Cu or Ni directly to the homogenate. We also measured mitochondrial respiration in goldfish liver with the addition of Cd, Cu or Ni in the isolated mitochondria preparation. Enzyme activity measurements did not provide us with sufficient evidence to conclude on metal effects even if our data follow the trends highlighted by other studies. On the other hand, at the addition of $40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight of Cu inhibited mitochondrial respiration by 78 % vs. 18 % for control; $n=5$, $p<0.0001$. Significant inhibition of mitochondrial respiration by Cd compared to controls was achieved by adding $14 \mu\text{g/g}$ dry weight (79 ± 28 vs. 18 ± 15 respectively; $n=7$, $p<0.0001$). Ni did not affect mitochondrial respiration even at very high concentrations. This study confirms that some metals can directly inhibit mitochondrial respiration.

2.3 Introduction

Like other metals, cadmium (Cd), copper (Cu) and nickel (Ni) occur naturally in trace concentrations in all ecosystems. However, in some areas, mining, smelting activities and spill from abandoned mines have resulted in severe environmental contamination and caused adverse biological effects at all levels of biological organization (Draves et Fox 1998; Kraemer et al. 2005; Peplow et Edmonds 2006). Particularly, fish, being at the top of most food webs in lakes, integrate the effects of metal pollutants on lower trophic levels (Kövecses et al. 2005), in addition to any direct toxic effect (Couture et Rajotte 2003). Many studies have demonstrated that fish living in metal contaminated lakes suffer from a range of physiological disorders such as lower aerobic capacities, reduced growth and development (Vaglio et Landriscina 1999; Couture et Rajotte 2003; Couture et Kumar 2003; Pane et al. 2004; Peplow et Edmonds 2006). In addition, metals are known to promote the generation of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation resulting in mitochondrial damage (Stohs et Bagchi 1995; Ercal et al. 2001; Wang et al. 2004; Masso et al. 2007). Indeed, a study by Giguère et al. (2003) suggests that oxidative stress occurs in metal-contaminated wild mussels. Risso-De Faverney et al. (2004) demonstrated that Cd-induced apoptosis was dependant on oxidative stress in rainbow trout. However, a study on yellow perch (Giguère et al. 2005) failed to report conclusive evidence of oxidative stress in metal-contaminated fish. The mechanisms of direct metabolic toxicity in fish at environmentally relevant concentrations remain largely unknown.

Some studies on mammals and on fish pinpoint the mitochondrion as the primary target for metal effects (Pourahmad et O'brien 2000; Belyaeva et al. 2002, 2004). Two other studies mentioned that incubation of isolated hepatocytes with Cd^{2+} in glutathione-depleted mice inhibits mitochondrial respiration and decreases ATP levels (Liu et Liun 1990; Pourahmad et al. 2001).

In a number of recent studies, we have shown that Cd and Cu contamination are negatively correlated to tissue citrate synthase (CS) and cytochrome c oxidase (CCO) activities in yellow perch, but that Ni may be positively affecting the activity of these enzymes (Couture et al. 2008a). However, whether metals affect other components of mitochondrial metabolism in wild yellow perch remains unknown. Therefore, the first objective of this study was to determine whether the activity of the four complexes of the electron transport chain (ETC) also varied in the tissues of wild yellow perch along a metal contamination gradient.

Studies of metabolic impairment on wild fish living in contaminated environments are intrinsically limited by a myriad of other factors which in nature also affect metabolic capacities, such as temperature, feeding, locomotion and fish condition (Perceval et al. 2002). The extent to which the metabolic impairment reported in studies of metal-contaminated wild fish, reviewed above, is due to direct metal toxicity, to the influence of natural factors, or to indirect consequences of metal contamination on aquatic ecosystems (reduced food availability, changes in fish community structure) remains largely unknown. Hence, in this study, we also aimed to investigate direct effects of metals, at

environmentally relevant concentrations, on fish aerobic capacities. Given that wild yellow perch are not easily maintained in captivity and not readily available throughout the year, this component of our study was carried out with goldfish (*Carassius auratus*), a standard lab fish for which metal effects have been reported (Battaglini et al. 1993; Gargiulo et al. 1996; Žikić et al. 2001; Krumschnabel et Nawaz 2004).

The second objective of this study was therefore to determine whether the activities of CS and CCO of clean fish tissues could be directly modified by the addition of Cd, Cu and Ni at concentrations found in tissues of metal contaminated wild yellow perch, for which several studies reviewed above have reported relationships between the activity of these enzymes and metal contamination.

The third objective of our study was to investigate the effects of the same metals at environmentally relevant concentrations on mitochondrial respiration. Effects of Cd on goldfish mitochondrial enzymes and mitochondrial generation of ROS have been already reported (Battaglini et al. 1993; Gargiulo et al. 1996; Žikić et al. 2001), but at concentrations exceeding values found in contaminated wild fish. To our knowledge, the effects of Ni on fish mitochondrial metabolism have not been investigated.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Yellow perch sampling

Twenty-five yellow perch were sampled from each of five lakes in the Rouyn-Noranda area, northwestern Québec, along a polymetallic gradient. Lakes consisted of two reference lakes (Opasatica and Dasserat), one intermediate (Bousquet) and two contaminated lakes (Dufault and Osisko). The location of each lake and details of lake characteristics, water chemistry and metal concentrations are reported elsewhere (Couture et al. 2008b; Couture et al. 2008a; Pyle et al. 2008). Fish were collected from each lake using a seine net or by angling and kept alive in aerated coolers for less than 3 hours. Fish were then killed with a blow to the head, their livers and samples of white muscle were removed, frozen in liquid nitrogen and transported to our laboratory and stored at -80°C until analysis.

2.4.2 Measurement of electron transport chain (ETC) enzyme activity

Yellow perch liver and muscle samples were thawed on ice and homogenized in ice-cold buffer (20 mM HEPES, 1 mM EDTA and 0.1% Triton X-100, pH 7.2) using a Polytron (Janke and Kunkel ultra-Turrax T25). The activity of Complex I (NADH:ubiquinone dehydrogenase; EC 1.6.5.3) was measured according to Moyes et al. (1997). Complex II (succinate dehydrogenase (ubiquinone); EC 1.3.5.1) activity was determined using the method of Krahenbuhl et al. (1991). Complex III (Ubiquinol:ferricytochrome c reductase; EC 1.10.2.2) activity measurement followed the method described by Zheng et al. (1990) with the following modifications of concentrations: 100 µM reduced decylubiquinone (DBH₂), 50 µM Cytochrome C, 5 mM KCN, 3.5 mM rotenone and 18.75 µM Antimycin

A. The preparation of reduced DB (DBH₂) followed the method of Zheng et al. (1990). For the activity of Complex IV (CCO; E.C. 1.9.3.1) we followed the method of Garenc et al. (1999) with the following modifications: 0.1 M phosphate buffer, 0.07 mM Cytochrome C. Enzyme activities were measured by light absorbance using a Varian Cary 100 spectrophotometer at 20°C. Homogenates were not centrifuged.

2.4.3 Modification of mitochondrial enzyme activities by direct addition of metals

Metals (Cd, Cu and Ni) were added to goldfish liver or muscle homogenates (prepared using the homogenization buffer and methods described above for yellow perch liver and muscle except that buffer was exempt of EDTA to minimize chelation). We used metal concentrations representing an environmentally realistic value for wild yellow perch from contaminated environments as a baseline for our experiments. As a second concentration, ten times higher the first value was used. In yellow perch, threshold values of 11 and 39 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight have been reported for Cd and Cu respectively as discriminating between fish from clean and contaminated environments (Couture and Pyle 2008). Therefore, we selected concentrations of 35 and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight of Cd and Cu respectively as environmentally realistic values for contaminated fish in nature. For Ni, 15 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight was selected as representative of values in contaminated fish (Couture et Pyle 2008). Metals added to muscle homogenates were determined using the same approach and were: 13, 7 and 31 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight for Cd, Cu and Ni respectively. A conversion factor of 0.2 g dry weight $\cdot\text{g}^{-1}$ wet weight (Ptashynski et Klaverkamp 2002) was used to calculate the quantities of metals to be added to fresh homogenates. In addition, complexation of metals to buffer chemicals was compensated by calculating

with MINEQL (MINEQL+ version 4.5 May 2001) the concentrations of metals needed to reach the target concentrations as free metal ions which, we assumed, then bound to cellular substrates in a similar fashion as in live, contaminated fish. Controls were also included in which no metal was added.

Liver and muscle homogenates were separated in nine tubes (three metals (Cd, Cu and Ni) at three concentrations (controls, environmentally relevant concentration, and ten times that concentration) and kept on ice. The activity of CCO was measured as described above. Citrate synthase (CS; E.C. 2.3.3.1) activity was measured as described in Rajotte and Couture (2002). Enzyme activities in metal contaminated homogenates were expressed as percentage change in the mean value for each enzyme measured at each metal concentration relative to the controls. The activities of CS and CCO were measured immediately after addition of metals in the homogenate, and again after 30, 60 and 90 minutes. Since incubation time did not significantly affect enzyme activities (data not shown), values for each metal and concentration were pooled (n=3 for each treatment; mean for each treatment and each replicates were made with the four values measured).

2.4.4 Effects of metals on goldfish liver mitochondrial respiration

Concentrations of Cd, Cu and Ni added in mitochondrial respiration measurements were the same as concentrations used for goldfish tissue enzyme activities, above. Livers from two fish were pooled to obtain enough mitochondria. Livers were minced with a razor blade and transferred in a 1.5 mL eppendorf tube with 200 μ L of extraction buffer (140 mM KCl, 20 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 % (w/v) BSA pH 7.2 ; kept at 4°C) and homogenized using a motorized pestle (Kontes). Homogenates were filtered through a

syringe filled with cotton wool and the volume adjusted with addition of extraction buffer to 1200 μL , then centrifuged for 3 min at 150 g at 4°C. The supernatant was then re-filtered and centrifuged for 10 min at 9000 g. Mitochondrial pellets were finally washed with 200 μL of extraction buffer and resuspended in 60 μL of extraction buffer.

Isolated mitochondria were injected simultaneously in two chambers of a Rank Brothers electrodes (Digital model 20 controller). In each chamber, 25 μL of suspended mitochondria were added to 475 μL of respiration buffer (140 mM KCl, 5 mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 3 mM MgCl_2 , 0.5% (w/v) of BSA, pH 7.2). The chambers were maintained at 23°C (fish acclimation temperature). One chamber served as the control and the metal was added to the other one. EGTA was removed in the respiration buffer to limit the complexation of EGTA with metals. Still, EGTA was present in the extraction buffer, but we considered it in complexation calculation with MINEQL and adjusted the total metal concentration added.

After adding mitochondria to the chambers, pyruvate, glutamate and malate were added at a final concentration of 10 mM to spark the Krebs cycle. Then, 400 mM of ADP was added to start the oxidative respiration (State 3). When that first rate was stable and recorded for about 4-5 minutes, metal nitrate ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ or $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) was added to one chamber and an equivalent amount of NO_3^- , in the form of KNO_3 , was added to the other (control). The concentrations of stock metal solutions were adjusted so that the addition of 1 μL in the chamber was equivalent to 10% of the maximal metal concentration targeted. Maximal concentrations of metal were

obtained by sequential additions of smaller quantities. At least two minutes separated each injection of metal. Mitochondria were exposed to metals for approximately 25 or 30 minutes. In order to minimize uncertainty of the addition of 1 μL to the chamber a syringe with a precision of 0.1 μl was used.

Maximal respiration rates (State 3) were achieved after the addition of ADP. State 4 is described as the respiration rate measured after consumption of all added ADP (Chance et Williams 1955). Instead of State 4, we used State 4+, determined as mitochondrial respiration rate after the addition of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ oligomycin, an ATPase inhibitor, to reduce the recycling of ATP into ADP. Measurements of State 3 respiration rate were followed by respiration rate after metal addition. State 4+ was considered as 100% inhibition. Oxygen consumption rates measured after each addition of metals were compared to State 4+ respiration rate and inhibition ratios were calculated.

2.4.5 Statistical analysis

A paired test comparing State 3/State 4+ ratios was used to determine the effects of metal additions on mitochondrial respiration compared to parallel controls. Student's t test was used to examine differences in clean/contaminated ratios of CS and CCO activities measured in goldfish liver and white muscle homogenates. Differences among yellow perch populations in the liver and muscle activities of the four complexes of the ETC were determined using Wilcoxon and Tukey-Kramer HSD tests. In cases where normality was not obtained, Wilcoxon test was used. Correlations between complexes were also

investigated. A *p* level of 0.05 was considered as the threshold for statistical significance. JMP 7.0 software (SAS Institute) was used for all statistical analysis.

2.5 Results

2.5.1 Electron transport chain activity in tissues of wild yellow perch along a metal gradient

The activity of Complex I in the liver of yellow perch from Lake Osisko was significantly higher than the other lakes, but similar to Opasatica (Figure 1A). However, values of Complex I activity in the other contaminated lake, Dufault, did not differ from that measured in fish from other lakes except for Bousquet, where activity was the lowest, but not significantly different than Dasserat. Similarly, Complex III activity in Osisko fish liver was higher than in fish from any other lake, except for Dasserat (Figure 1C). There was no significant difference in the liver activity of complexes II and IV among fish from the five lakes studied, except for a lower activity of Complex IV in Bousquet fish (Figures 1B and D). Overall, the liver activity of the four complexes was higher in fish from the contaminated lake Osisko, and lower in the intermediate lake (Bousquet).

In muscle, the activity of Complex I varied as in liver, with higher values in Osisko compared to other lakes, except for Opasatica (Figure 2A). However, in contrast to liver, in muscle the activity of Complex IV showed the same significant trends of higher values in lakes Osisko and Opasatica than in other lakes (Figure 2B). Muscle activities of complexes II and III were too low to be detected.

There was a positive correlation between liver complex I and muscle complex I ($r = 0.44$; $p < 0.0001$), but the activity of liver complex IV was not correlated with its muscle counterpart.

Within liver, Complex I was positively correlated with Complex II ($r = 0.67$; $p < 0.0001$) and Complex IV ($r = 0.63$; $p < 0.0001$). Complex II was also positively correlated with Complex IV ($r = 0.37$; $p < 0.0004$), but the activity of Complex III was not correlated with that of the other complexes. Finally, within muscle, Complex I was positively correlated with Complex IV ($r = 0.71$; $p < (0.0001)$). No correlation between Fulton condition factor (FCF), an indication of fish condition, and activity of the complexes were found in neither muscle nor liver (Figure 6).

2.5.2 Inhibition of CS and CCO by metal addition in goldfish liver

homogenate

In goldfish liver homogenate, Cd did not affect the activities CS or CCO. However, adding $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight of Cu inhibited CS by 3.9%. In contrast, adding 10 times more Cu had no significant effect (Table 1). There was no effect of Cu on liver CCO activity. In contrast to Cu, there was no effect of Ni on CS activity. However, Ni at a concentration of $15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight inhibited CCO activity by 3.3%; the addition of 10 times that concentration inhibited by 6.4% the CCO activity (Table 1).

In contrast to liver, Ni increased CS activity in muscle homogenates by 2.9% with the addition of $31 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight and by 5.1% with 10 times more, but did not affect CCO activity (Table 2). Neither Cd nor Cu affected muscle CS or CCO activities.

2.5.3 Effects of Cu and Cd on goldfish liver mitochondrial respiration

Maximal (State 3) respiration rate was measured in isolated goldfish liver mitochondria in the presence of increasing concentrations of Cu or Cd (Figure 3). Both Cu and Cd inhibited State 3 respiration. A statistically significant inhibition of respiration compared to controls was obtained at $40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight for Cu (Figure 3A: 78.0 ± 8.4 vs. 17.9 ± 6.5 respectively; $n=5$, $p<0.0001$). Mitochondrial respiration was totally (100%) inhibited only at the highest Cu concentration tested ($50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight).

Significant inhibition of mitochondrial respiration by Cd compared to controls was achieved at $14 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight (79 ± 28 vs. 18 ± 15 respectively; $n=7$, $p < 0.0001$). At that Cd concentration, inhibition was already maximal and did not significantly increase at higher concentrations (Figure 3B). Nickel did not significantly inhibit State 3 respiration even at the highest concentration tested ($37.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight; data not shown).

2.6 Discussion

2.6.1 Effects of environmental metal contamination on the activity of ETC complexes in wild yellow perch

In a concurrent study (Gauthier, INRS-ETE, unpublished data), liver metal concentration was measured in other yellow perch sampled at the same time. Fish from Dasserat were the least contaminated, closely followed by fish from Opasatica. Fish from Dufault were the most contaminated by Cd and Ni, but were less Cu-contaminated than fish from Osisco. This is interesting since in our data, FCF was significantly higher in fish from Dasserat compared to fish from the other lakes; Osisco being the lake where fish had the lowest FCF. Therefore, we expected lower values of ETC enzyme activity reflecting this decrease in fish condition with increased contamination.

In several previous studies, a reduction on the aerobic capacities was reported in metal-contaminated yellow perch (Rajotte and Couture 2002, Audet and Couture 2003, Couture and Kumar 2003). However, only one published study (Couture et al. 2008) examined the relationships between metal contamination and the activity of ETC complexes in these fish. That study, which was limited to Complex IV (CCO), reported that both muscle and liver CCO activities were negatively correlated to Cd and Cu concentrations; but that muscle CCO activity varied positively with Ni concentration. In the present study, we examined the activity of all four complexes of the ETC in liver, and complexes I and IV in muscle, of yellow perch from five lakes along a metal contamination gradient. Overall, the activity of neither complex in either muscle or liver varied predictably with metal contamination. In muscle, the activity of both complexes I and IV were low, except in

Opasatica and Osisko. While the reasons for these trends remain to be explained, it is likely that the causes are different in the clean and the contaminated lake. Further, since values of ETC activities in Lake Dufault, the other contaminated lake, were generally comparable to the activities measured in fish from clean lakes, and since values in lake Bousquet (intermediate contamination) fish were always as low or lower than measured in clean or contaminated fish, our dataset does not provide conclusive evidence of metal effects on ETC activity. Furthermore, this study was conducted in five lakes from one region only, and sampling took place in August. In previous studies, we have demonstrated that yellow perch contamination, condition and physiological capacities vary seasonally and regionally (Couture et al. 2008a; Couture et al. 2008b; Pyle et al. 2008). The decrease in Complex IV activity reported for Cd and Cu contaminated fish (Couture et al. 2008b) was detected in a dataset of 400 fish sampled in ten lakes from two regions in two seasons. The absence, in this study, of tissue metal analysis further limits our capacity to explain the high activities of several complexes in Osisko fish. Another concurrent study in which fish were sampled in the same lakes at the same time (F. Pierron, INRS-ETE, unpublished data) is currently comparing the activity of muscle and liver CCO and gene expression of *cco1*, with tissue metal contamination. This study may help us understand the relationships between metal contamination, fish condition and metabolic capacities observed in this study.

Finally, the positive correlations among complexes I, II and IV in liver and between complexes I and IV in muscle support the fact that the activity of Complex IV, which is

more easily measured than the other complexes, may provide an honest reflection of overall ETC activity.

2.6.2 Direct metal effects on CS and CCO activity in goldfish tissue

homogenates

This experiment, aimed to determine whether the activity of aerobic enzymes could be directly modified by the presence of metals in the intracellular environment. Overall, adding Cd, Cu or Ni at environmentally relevant concentrations based on wild yellow perch studies to goldfish liver and muscle homogenates had limited effects on the activity of CS and CCO. In liver homogenates, we measured only a small (4%) decrease of CS activity when an environmentally relevant concentration of Cu ($50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight) was added, but curiously, this slight inhibition disappeared when adding ten times more Cu. In contrast, the slight decrease in CCO activity with the addition of an environmentally relevant concentration of Ni ($15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight) doubled when a ten-fold higher Ni concentration was added. There is a lack of consistent evidence in the literature about metal effects on liver enzyme activities. Our results do not support a strong inhibition of liver CS and CCO activity by Cd or Cu. However, the significant inhibition of liver CCO by Ni observed in this study is supported by a recent investigation in metal-contaminated fish (Couture et al. 2008b), in which liver CCO activity was negatively correlated with kidney Ni concentration, although the negative relationship with liver Ni was not significant.

Muscle enzyme activities responded differently from liver to metal additions. No decrease in CS or CCO activity was observed with any of the three metals examined. This contrasts with field studies with yellow perch, where lower activities of these enzymes in metal contaminated fish were reported (Couture and Rajotte 2003, Couture et al. 2008a). Likely, mechanisms other than direct inhibition affect the activity of these enzymes in metal contaminated wild fish. These can include a wide range of metal-sensitive physiological and ecological factors such as cell energy allocation, mitochondrial metabolism, locomotion, food availability, competition and predation (Perceval et al. 2002; Pane et al. 2004; Kövecses et al. 2005).

In contrast, an increase was measured in muscle CS activity with addition of Ni, which was further enhanced at the higher Ni concentration. These results are supported by the only study where the relationship between fish Ni contamination and muscle CS activity was examined, and which also reported a positive correlation between Ni contamination and muscle CS activity in wild yellow perch (Couture et al. 2008b). Since citrate synthase is not a metalloenzyme, potential mechanisms of CS activation by Ni remain uncertain, but could involve conformational changes, or any other process that would enhance CS activity.

The comparison of metal effects in chronically exposed wild yellow perch with this experiment in which simple addition of metals were made to goldfish tissue homogenates is clearly limited by several major differences between these two systems, such as interspecific differences, duration of exposure or acclimation. In our system (goldfish

tissue homogenates in which metals were added), enzyme activity naturally decreases over time, so that enzyme exposure to metals could not be sustained over the 90-minute period. Few studies have examined metal inhibition of aerobic enzyme activities in other fish species (eg. Gargiulo et al. 1996; Vaglio et Landriscina, 1999). Our experimental design, although hardly comparable to studies in which live fish are exposed to metals, provides an indicator of the potential of metals for direct enzyme inhibition, and also allows to understand short-term effects such as those of a metal influx into the cells of a fish exposed to contamination.

2.6.3 Metal effects on mitochondrial respiration in goldfish

Mitochondrial respiration was inhibited by the addition of Cd and Cu at environmentally relevant concentrations. For Cu, the addition $40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight, an environmentally relevant concentration measured in wild yellow perch, was sufficient to cause a significant inhibition. Cadmium inhibition of mitochondrial metabolism was even stronger than for Cu, beginning at $14 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight and quickly reaching maximal inhibition.

Sokolova et al. (2005) carried out a similar experiment with oysters and also reported an inhibition of State 3 respiration by Cd. Mitochondrial respiration involves the activity of enzymes, proton transport across the inner mitochondrial membrane and includes passive and active components (Sokolova et al. 2005). In addition, there are two major side reactions: electrons may leak from the respiratory chain and react inappropriately with oxygen to form superoxide (O_2^-) (Brand et al. 2004). Furthermore, pumped protons may

leak back across the inner membrane, diverting the conserved energy away from ATP synthesis and into heat production (Brand et al. 2004).

Direct effects of metals are likely to participate in these side reactions in addition to their own effects on enzyme activities. Due to their different chemical properties, Cd, Cu and Ni do not induce toxic effects with the same mechanisms. On the other hand, Cu and Ni are known to be involved in redox cycling that can participate in creation of ROS and lipid peroxidation (Giguère et al. 2005). On the other hand, Cu cycles between the cupric (Cu^{2+}) and the cuprous (Cu^+) oxidation state, in which hydroxyl radicals (OH) are generated (Halliwell et Gutteridge 1984). Pourahmad et al. (2001) suggested that Cu toxicity is caused by the action of ROS on lysosomal membrane and the release of proteases and phospholipases.

However, in contrast with the previous experiment, where Ni affected more strongly enzyme activities than Cd or Cu in goldfish tissue homogenates, Ni did not affect mitochondrial respiration. Nickel is proposed to cycle between Ni^{2+} and Ni^{3+} , catalyzing the reduction of hydrogen peroxide leading to hydroxyl radical generation (Torreilles et Guerin 1990). Nickel also induces lipid peroxidation (Stohs et Bagchi 1995). There seems to be a difference in Ni induced toxicity since in our experiment mitochondrial respiration was not inhibited even with concentrations as high as $37.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight, i.e. 250% more Ni than typically measured in metal contaminated yellow perch. Given that Ni has a good affinity to serum albumin (BSA) (Pane et al. 2004), the amount of BSA in the respiration chamber may have been too elevated to permit toxic effects of Ni

to occur, since albumin was not taken into account in the equilibrium calculations when determining metal concentrations. Time of exposition could also be an issue for Ni compared to Cd and Cu. Mitochondria were exposed to metals for about a half hour; maybe this is insufficient for Ni to react.

As for Cd toxicity, Risso-de Faverney et al. (2004) demonstrated in cultured trout hepatocytes that Cd intoxication induced apoptosis via mitochondrial Cytochrome C release and a caspase-dependant pathway. They also demonstrated that this apoptosis process is reduced by the addition of antioxidants, suggesting the primary role of reactive oxygen species in this process (Risso-De Faverney et al. 2004).

Our data on mitochondrial respiration in goldfish liver support the threshold values proposed by Couture and Pyle (2008) for yellow perch to discriminate between contaminated and clean fish for Cd and Cu contamination, since mitochondrial impairment was measured at metal concentrations around these thresholds. However, it is most unlikely that in wild yellow perch mitochondrial respiration is impaired to the extent measured in goldfish mitochondria. Although our study demonstrates that environmentally relevant concentrations of Cd or Cu are sufficient to inhibit mitochondrial respiration, in live fish, a number of mechanisms exist to limit the effects of metals on mitochondrial respiration, including metal-binding proteins such as metallothioneins and antioxidant enzyme systems.

To conclude, our study provides a more complete investigation on metal impact on mitochondrial enzyme activities in wild fish. Nevertheless, it remains difficult to discriminate between metal effects and contextual effect of the environment. Keeping that in mind, our investigation on direct inhibition of goldfish mitochondrial enzymes suggests that Ni may enhance muscle CS activity supporting the positive correlation between Ni and CS activity found by Couture et al. (2008a). Ni also decreased liver CCO activity which is also supported by a negative correlation found by Couture et al. (2008a). In contrast, our data did not indicate an effect of Cu or Cd on CCO or CS activities.

Finally, our study confirms that metals do have a direct effect on fish mitochondrial respiration. As mentioned in the discussion metal direct effect may involve ROS formation and lipid peroxidation. Cu and Cd toxic effects are detectable almost immediately after contamination. However, Ni did not change mitochondrial respiration even with a dose equivalent to 250% of environmentally relevant concentration, again showing the different nature of the toxicity of Ni. Further investigations should involve tests of mitochondrial respiration on mitochondria from wild fish to confirm these findings.

Tables

Table 1: Variations in the activity of goldfish liver homogenate citrate synthase (CS) and cytochrome C oxidase (Complex IV, CCO) expressed as mean percent activity relative to the activity measured in control homogenates (n = 3 for controls and for metal additions). Negative values indicate an inhibition compared to controls; negative values indicate decreased activity ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SE. N.S. Not significant.

Table 1

	Cu		Ni	
	50 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt	500 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt	15 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt	150 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt
CS	-3.9% \pm 0.01	N.S.	N.S.	N.S.
CCO	N.S.	N.S.	-3.3% \pm 0.05	-6.4% \pm 0.02

Table 2: Activity of goldfish muscle homogenate citrate synthase (CS) and cytochrome C oxidase (Complex IV, CCO) expressed as mean percent activity relative to the activity measured in control at two concentrations of Ni (n = 3 for controls and for Ni additions). Negative values indicate an inhibition compared to controls; positive values indicate increased activity ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SE. N.S. Not significant.

Table 2

	31 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt	310 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt
CS	+2.9% \pm 0.02	+5.1% \pm 0.02
CCO	N.S.	N.S.

Figure Legend

Figure 3: Activity of the four complexes of the electron transport chain in the liver of yellow perch from five lakes of Rouyn-Noranda, Québec. Lakes represent a gradient of contamination increasing from left to right. Data are expressed as mean \pm SE (n = 20). Bars with different letters are significantly different (p < 0.05). **A** = Complex I (NADH dehydrogenase; EC 1.6.5.3), **B** = Complex II (succinate dehydrogenase (ubiquinone)); EC 1.3.5.1), **C** = Complex III (Ubiquinol:ferricytochrome c reductase; EC 1.10.2.2) **D** = Complex IV (Cytochrome c oxidase; E.C. 1.9.3.1).

Figure 4: Activity of complexes I and IV of the electron transport chain in the muscle of yellow perch from five lakes of Rouyn-Noranda, Québec. Lakes represent a gradient of contamination increasing from left to right. Data are expressed as mean \pm SE (n = 20). Bars with different letters are significantly different (p < 0.05). **A** = Complex I (NADH dehydrogenase; EC 1.6.5.3), **B** = Complex IV (Cytochrome c oxidase; E.C. 1.9.3.1).

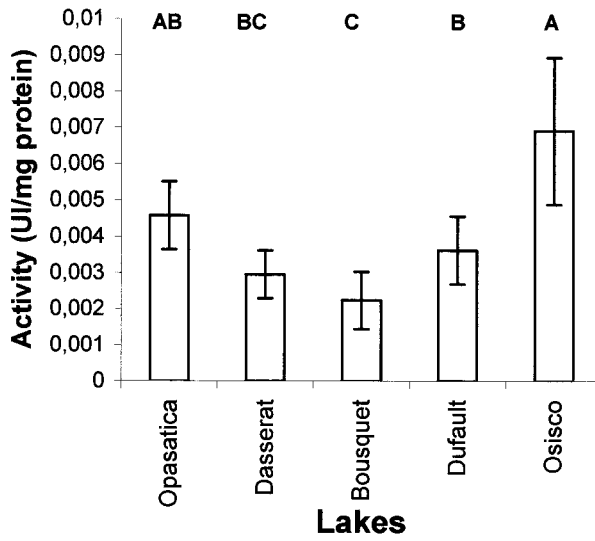
Figure 5: Inhibition of oxygen consumption in goldfish liver mitochondria as a function of A: Cu concentration; or B: Cd concentration (top X scales). Bottom X scales present the equivalent KNO₃ addition in control preparations run in parallel (Cd and Cu are added as NO₃ salts). Inhibition is expressed by the following ratio: State 3 rate (after each addition of metal or KNO₃) over State 4+ (with oligomycin, which triggers the maximal inhibition). The axis also represents time since greater concentrations of metals are obtained by sequential additions of smaller quantities (full X scale represents 25-30

minutes). Data are expressed as mean \pm SE. Asterisks represent significant differences observed between controls and treatments groups ($p < 0.05$).

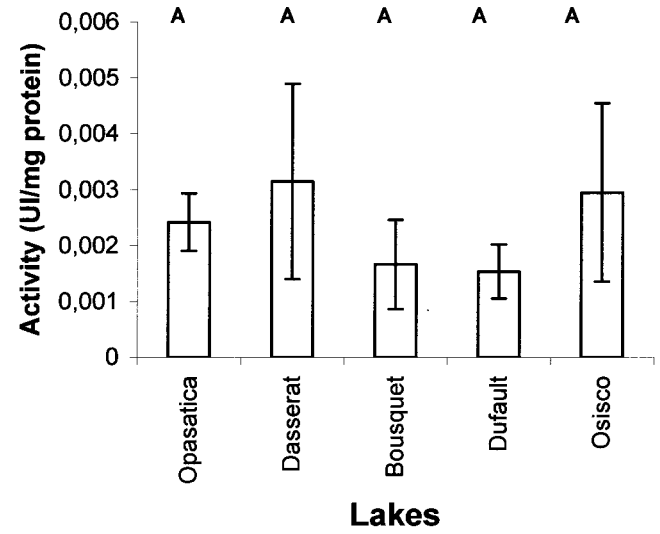
Figure 6: Fulton's condition factor (FCF) of yellow perch sampled in five lakes of Rouyn-Noranda, Québec. Lakes present a gradient of contamination increasing from left to right. Data are expressed as mean \pm SE ($n = 25$). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Figure 3

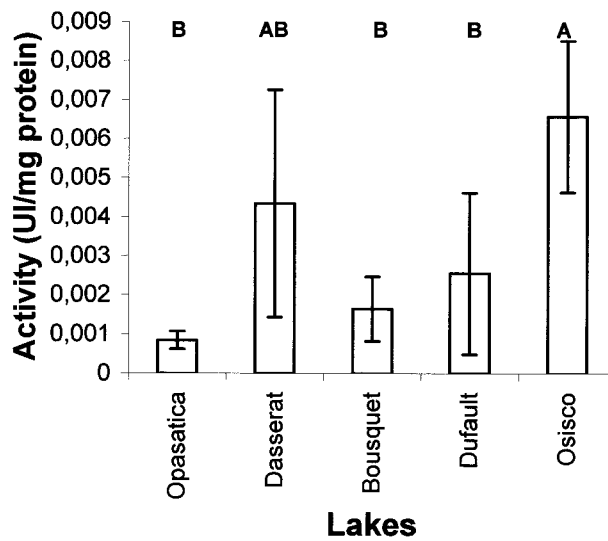
A Complex I Liver



B Complex II Liver



C Complex III Liver



D Complex IV liver

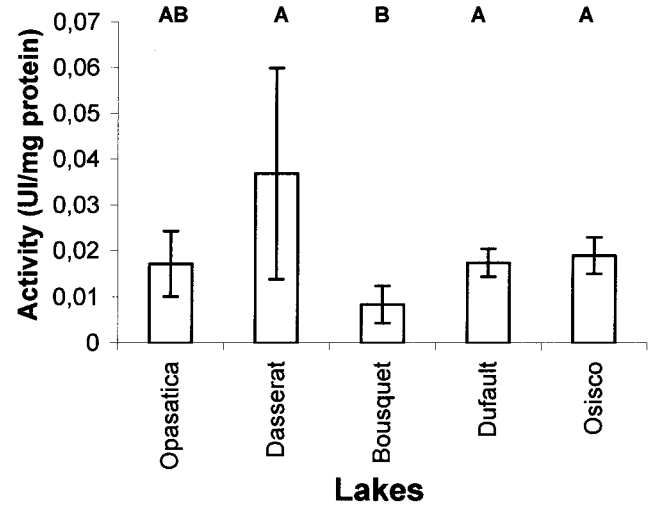
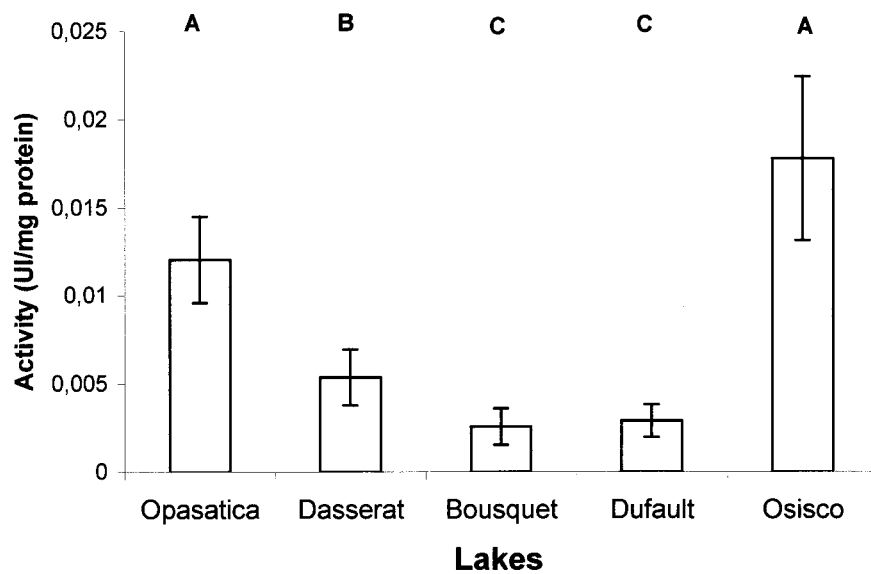


Figure 4

A Complex I Muscle



B Complex IV Muscle

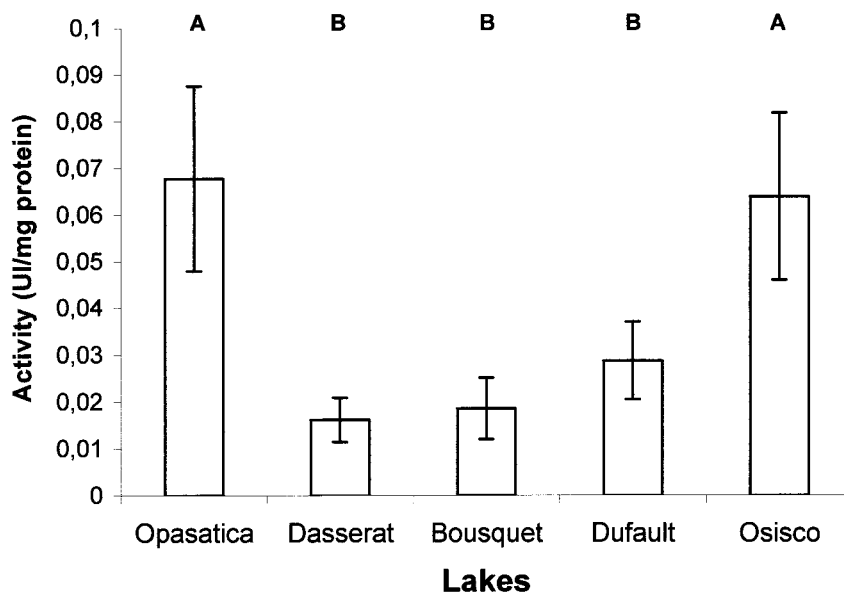


Figure 5

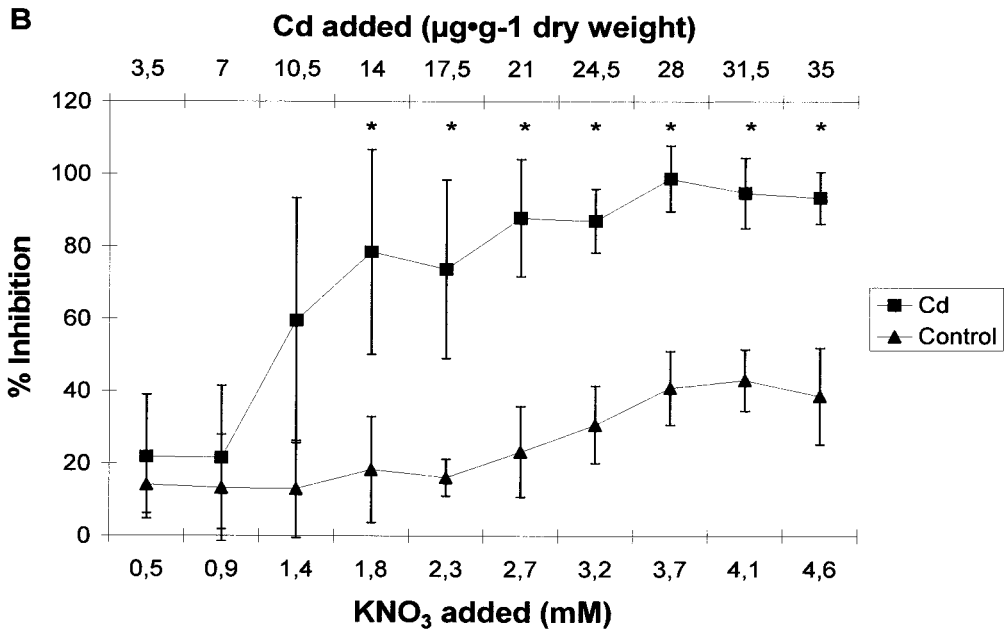
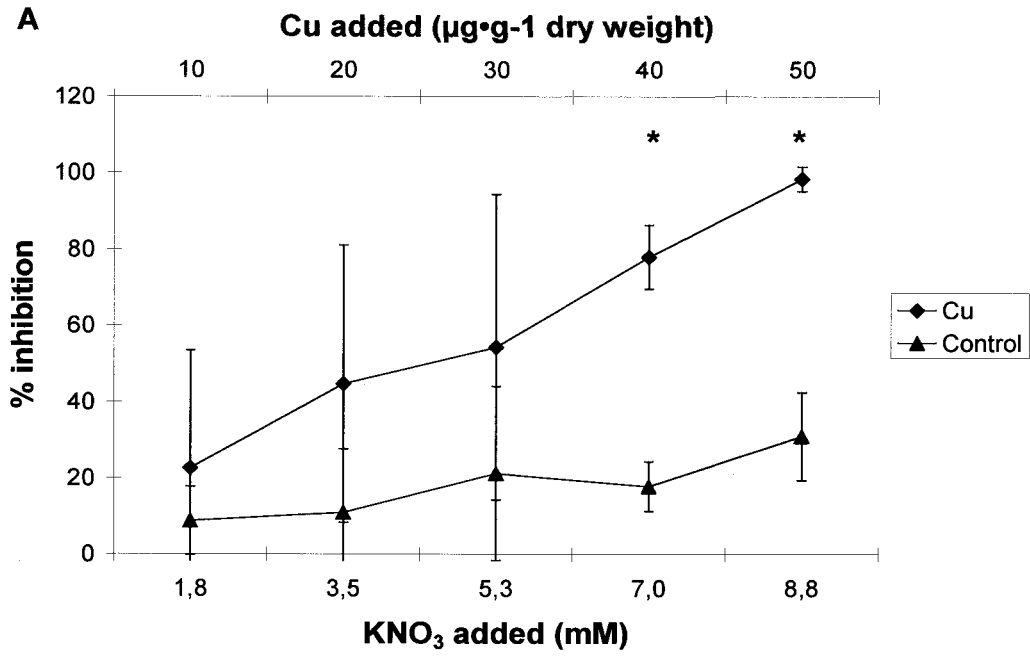
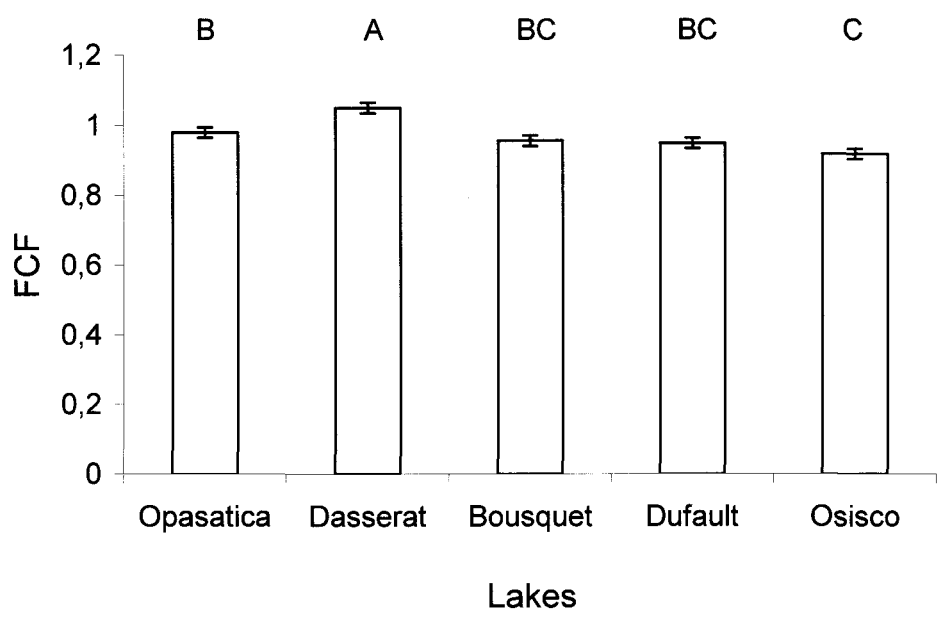


Figure 6



Acknowledgements

This work was funded by the National Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. The authors are particularly grateful for the assistance provided by Pierre Blier and Nicolas Pichaud (UQAR) in setting up the mitochondrial respiration experiments, and to Claude Fortin (INRS-ETE) and Mery Garcia Martinez (Laurentian University, Sudbury ON), for their helpful criticism of this work.

3. Conclusion

Les effets qu'ont les matériaux et les produits que l'on rejette dans l'environnement sont une préoccupation de plus en plus importante pour notre société. L'étude de ces effets sur l'environnement reste un champ d'étude extrêmement large et complexe, et plus souvent qu'autrement, les mécanismes biologiques, chimiques et physiologiques qui sous-tendent les problèmes observés chez les organismes restent obscurs. Il est beaucoup plus aisé d'effectuer des tests déterminant si tel ou tel contaminant a un effet délétère, carcinogène ou autre forme de toxicité sur un organisme que de trouver les mécanismes sous-jacents. Cependant, après avoir conclu que les métaux sont responsables des dommages aux populations de poissons, la recherche des mécanismes est logiquement la prochaine étape. Ce projet de maîtrise s'inscrit dans ce cadre.

Concrètement, cette étude a permis : (i) d'agrandir l'éventail des enzymes mitochondriales de poissons sauvages pour lesquelles on a testé l'effet des métaux ; (ii) de discriminer entre les effets directs et les effets indirects des métaux sur les enzymes mitochondriales ; (iii) déterminer si les métaux ont un effet direct sur la respiration mitochondriale. Les résultats au niveau des enzymes restent plutôt mitigés et ne permettent pas d'affirmer que les métaux affectent directement leur activité au point que le métabolisme énergétique pourrait en être perturbé. Cependant, le cuivre et le cadmium ont clairement stoppé la respiration mitochondriale et ce même à des concentrations plus faibles que celles prévues. Cette étude permet donc de conclure que le cadmium et le cuivre affectent directement le métabolisme énergétique aérobie des cellules.

Bien que mes résultats semblent montrer que le nickel n'influence pas la respiration mitochondriale, on peut s'attendre à ce que les mécanismes de la toxicité du nickel impliquent des processus en dehors des limites de cette étude. La littérature entourant la toxicité du nickel implique plus souvent qu'autrement la génération de ROS ainsi que la peroxydation des lipides (Torreilles et Guerin 1990; Valko et al. 2005). Étant donné la très grande affinité du nickel pour l'albumine, il se retrouve en majeure partie dans le plasma (Pane et al. 2004). D'ailleurs, Pane et al. (2004) ont aussi démontré que le niveau de nickel accumulé dans les organes était proportionnel au taux de vascularisation de cet organe. Suivant cette logique, étant donné que le protocole d'isolation de mitochondrie nécessite l'utilisation d'albumine, ce dernier a pu capturer tout le nickel ajouté.

Par ailleurs, cette étude confirme que l'on peut relier des effets métaboliques directs des métaux sur les mitochondries aux valeurs précédemment suggérées pour le cuivre et le cadmium (Couture et Pyle 2008) comme seuil de discrimination entre des poissons contaminés et des poissons sains pour les perchaudes. Effectivement, j'ai mesuré des effets directs des métaux sur les mitochondries à des concentrations très près des valeurs qui avaient été suggérées; à $40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec pour le Cu (le seuil proposé étant de $38 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec) et à $14 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec pour le Cd (le seuil étant proposé étant de $11 \mu\text{g}/\text{g dry}$). L'utilisation de ces seuils est une façon simple et rapide de discriminer les poissons contaminés des poissons sains, et permet de supposer que des poissons présentant des concentrations de métaux excédents ces seuils subissent des effets toxiques. Comme le mentionnent Couture et Pyle (2008), il faut tout de même être

prudents dans l'utilisation de ces seuils et prendre en compte des facteurs régionaux et saisonniers pouvant affecter la charge métallique des poissons. De plus, une certaine prudence est toujours de mise aussi lorsque l'on veut relier des résultats d'expériences de contamination aiguë dans un environnement contrôlé comme le laboratoire, et des connaissances provenant de la contamination chronique de poissons sauvages dans un environnement présentant une contamination de nature polymétallique. De ce fait, il serait intéressant de compléter cette étude en s'intéressant aux effets provoqués par le zinc, un autre contaminant en importance pour la région de Rouyn-Noranda. Le contrôle homéostatique du zinc est beaucoup plus important, étant un métal essentiel (Beyersmann et Haase 2001; Giguère et al. 2005). Certains suspectent un effet protecteur du zinc en présence de Cd (Oteiza et al. 1999).

Dans un autre ordre d'idée, l'établissement d'un protocole d'isolation de mitochondries intactes était un des défis majeurs à remplir au cours de cette maîtrise. Pour y parvenir, il est nécessaire de briser la membrane cellulaire sans toutefois briser les organelles. Des protocoles pour y parvenir avec différents organismes et différentes cellules sont disponibles dans la littérature. Nedergaard et al. (1979) ont fait une excellente revue des propriétés à tenir en compte dans l'utilisation des différents tampons d'isolation ainsi que les différences entre certains tissus. Le protocole que j'ai finalement utilisé a été présenté dans le chapitre 2 ainsi que dans l'annexe A.

Finalement, afin de mieux comprendre les effets des métaux sur le métabolisme énergétique des poissons, il serait intéressant d'utiliser les techniques mises au point

durant le cours de cette maîtrise avec une approche basée sur la contamination chronique. Les résultats ainsi obtenus seraient plus représentatifs des pressions subies par les populations de poissons et prendrait en compte les possibles interactions des métaux dans un environnement à contamination polymétallique. Une autre avenue pour compléter les connaissances au niveau des effets directs des métaux serait de mesurer la création de ROS et le taux de peroxydation des lipides lors d'une contamination par les métaux. Puisque la technique de respiration mitochondriale est maintenant au point, elle peut facilement être utilisée pour compléter les connaissances en changeant les métaux utilisés, et en reliant l'inhibition de la respiration avec d'autres mesures.

4. Bibliographie

- Achard-Joris, M., Gonzalez, P., Marie, V., Baudrimont, M., and Bourdineaud, J.-P. 2006. Cytochrome c oxydase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. *BioMetals* 19:237-244.
- Audet, D., and Couture, P. 2003. Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60 (3):269-278.
- Battaglini, P., Andreozzi, G., Antonucci, R., Arcamone, N., De Girolamo, P., Ferrara, L., and Gargiulo, G. 1993. The effects of cadmium on the gills of the goldfish *Carassius auratus L.*: Metal uptake and histochemical changes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 104 (2):239-247.
- Belyaeva, E. A., Glazunov, V. V., and Korotkov, S. M. 2002. Cyclosporin A-sensitive permeability transition pore is involved in CD^{2+} -induced dysfunction of isolated rat liver mitochondria: Doubts no more. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 405 (2):252-264.
- Belyaeva, E. A., Glazunov, V. V., and Korotkov, S. M. 2004. Cd^{2+} -promoted mitochondrial permeability transition: A comparison with other heavy metals. *Acta Biochimica Polonica* 51 (2):545-551.
- Beyersmann, D., and Haase, H. 2001. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *BioMetals* 14 (3):331-341.

- Bourret, V., Couture, P., Campbell, P. G., and Bernatchez, L. 2008. Evolutionary ecotoxicology of wild yellow perch (*Perca flavescens*) populations chronically exposed to a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 86 (1):76-90.
- Brand, M. D. 2000. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology* 35 (6-7):811-820.
- Brand, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J., Miwa, S., Pakay, J. L., and Parker, N. 2004. Mitochondrial superoxide: Production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology and Medicine* 37 (6):755-767.
- Brodeur, J. C., Sherwood, G., Rasmussen, J. B., and Hontela, A. 1997. Impaired cortisol secretion in yellow perch (*Perca flavescens*) from lakes contaminated by heavy metals: In vivo and in vitro assessment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54 (12):2752-2758.
- Campbell, P. G., Giguère, A., Bonneris, E., and Hare, L. 2005. Cadmium-handling strategies in two chronically exposed indigenous freshwater organisms - The yellow perch (*Perca flavescens*) and the floater mollusc (*Pyganodon grandis*). *Aquatic Toxicology* 72 (1-2 SPEC. ISS.):83-97.
- Campbell, P. G., Peter M. Chapman, and Hale, B. A. 2006. Risk assessment of metals in the environment. *Issues in Environmental Science and Technology* 22.
- Casalino, E., Sblano, C., and Landriscina, C. 1997. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: The possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 346 (2):171-179.

- Chance, B., and Williams, G. R. 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *Journal of Biological Chemistry* 217 (1):409-428.
- Couillard, Y., Campbell, P., and Tessier, A. 1993. Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. *Limnology and Oceanography* 38 (2):299-313.
- Couture, P., Busby, P., Gauthier, C., Rajotte, J. W., and Pyle, G. G. 2008b. Seasonal and regional variations of metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. I. Factors influencing tissue metal concentrations. *Human and Ecological Risk Assessment* 14 (1):97-125.
- Couture, P., and Kumar, P. R. 2003. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology* 64 (1):107-120.
- Couture, P., and Pyle, G. 2008. Live fast and die young: Metal effects on condition and physiology of wild yellow perch from along two metal contamination gradients. *Human and Ecological Risk Assessment* 14 (1):73-96.
- Couture, P., and Rajotte, J. W. 2003. Morphometric and metabolic indicators of metal stress in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from Sudbury, Ontario: A review. *Journal of Environmental Monitoring* 5 (2):216-221.
- Couture, P., Rajotte, J. W., and Pyle, G. G. 2008a. Seasonal and regional variations in metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*)

- along two polymetallic gradients. III. Energetic and physiological indicators. *Human and Ecological Risk Assessment* 14 (1):146-165.
- Draves, J. F., and Fox, M. G. 1998. Effects of a mine tailings spill on feeding and metal concentrations in yellow perch (*Perca flavescens*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (8):1626-1632.
- Dyer, C. 2007. *Heavy metals as endocrine-disrupting chemicals*. Vol. 1, *Endocrine-Disrupting Chemicals*: Humana Press 111-133.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., and Aykin-Burns, N. 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry* 1 (6):529-539.
- Garenc, C., Couture, P., Laflamme, M. A., and Guderley, H. 1999. Metabolic correlates of burst swimming capacity of juvenile and adult threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 169 (2):113-122.
- Gargiulo, G., Arcamone, N., De Girolamo, P., Andreozzi, G., Antonucci, R., Esposito, V., Ferrara, L., and Battaglini, P. 1996. Histochemical study of the effects of cadmium uptake on oxidative enzymes of intermediary metabolism in kidney of goldfish (*Carassius auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 113 (2):177-183.
- Garrett, R. 2000. Natural sources of metals to the environment. *Human and Ecological Risk Assessment* 6 (6):945 - 963.
- Giguère, A., Campbell, P. G., Hare, L., and Cossu-Leguille, C. 2005. Metal bioaccumulation and oxidative stress in yellow perch (*Perca flavescens*) collected

- from eight lakes along a metal contamination gradient (Cd, Cu, Zn, Ni). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62 (3):563-577.
- Giguere, A., Couillard, Y., Campbell, P. G., Perceval, O., Hare, L., Pinel-Alloul, B., and Pellerin, J. 2003. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 64 (2):185-200.
- Gravel, A., Campbell, P. G., and Hontela, A. 2005. Disruption of the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in 1+ yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the environment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62 (5):982-990.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219 (1):1-14.
- Hatefi, Y. 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual Review of Biochemistry* 54 (1):1015-1069.
- Herrero, A., and Barja, G. 1997. Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mechanisms of Ageing and Development* 98 (2):95-111.
- Irato, P., and Albergoni, V. 2005. Interaction between copper and zinc in metal accumulation in rats with particular reference to the synthesis of induced-metallothionein. *Chemico-Biological Interactions* 155 (3):155-164.
- Kövecses, J., Sherwood, G. D., and Rasmussen, J. B. 2005. Impacts of altered benthic invertebrate communities on the feeding ecology of yellow perch (*Perca*

- flavescens*) in metal-contaminated lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62 (1):153-162.
- Kraemer, L. D., Campbell, P. G. C., and Hare, L. 2005. Dynamics of Cd, Cu and Zn accumulation in organs and sub-cellular fractions in field transplanted juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Environmental Pollution* 138 (2):324-337.
- Krahenbuhl, S., Chang, M., Brass, E. P., and Hoppel, C. L. 1991. Decreased activities of ubiquinol:Ferricytochrome c oxidoreductase (complex III) and ferrocyclochrome c: oxygen oxidoreductase (complex IV) in liver mitochondria from rats with hydroxycobalamin[c-lactam]-induced methylmalonic aciduria. *Journal of Biological Chemistry* 266 (31):20998-21003.
- Krumschnabel, G., and Nawaz, M. 2004. Acute toxicity of hexavalent chromium in isolated teleost hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 70 (2):159-167.
- Kumar, D., Lou, H., and Singal, P. K. 2002. Oxidative stress and apoptosis in heart dysfunction. *Herz* 27 (7):662-668.
- Liu, R. M., and Liun, Y. G. 1990. Effects of cadmium on the energy metabolism of isolated hepatocytes: its relationship with the nonviability of isolated hepatocytes caused by cadmium. *Biomedical and environmental sciences : BES* 3 (3):251-261.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. E. 2001. *Molecular Cell Biology*. 4th edition ed: W. H. Freeman and Company 616-648.
- Lukin, A., Dauvalter, V., Kashulin, N., Yakovlev, V., Sharov, A., and Vandysh, O. 2003. Assessment of copper-nickel industry impact on a subarctic lake ecosystem. *Science of the Total Environment* 306 (1-3):73-83.

- Maes, G. E., Raeymaekers, J. A. M., Pampoulie, C., Seynaeve, A., Goemans, G., Belpaire, C., and Volckaert, F. A. M. 2005. The catadromous European eel *Anguilla anguilla* (L.) as a model for freshwater evolutionary ecotoxicology: Relationship between heavy metal bioaccumulation, condition and genetic variability. *Aquatic Toxicology* 73 (1):99-114.
- Mandal, B. K., and Suzuki, K. T. 2002. Arsenic round the world: A review. *Talanta* 58 (1):201-235.
- Masso, E. L., Corredor, L., and Antonio, M. T. 2007. Oxidative damage in liver after perinatal intoxication with lead and/or cadmium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 21 (3):210-216.
- Meregalli, G., Bettinetti, R., Pluymers, L., Vermeulen, A. C., Rossaro, B., and Ollevier, F. 2002. Mouthpart deformities and nucleolus activity in field-collected *chironomus riparius* larvae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42 (4):405-409.
- Miliou, H., Zaboukas, N., and Moraitou-Apostolopoulou, M. 1998. Biochemical composition, growth, and survival of the guppy, *Poecilia reticulata*, during chronic sublethal exposure to cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35 (1):58-63.
- Moghaddas, S., Hoppel, C. L., and Lesnefsky, E. J. 2003. Aging defect at the QO site of complex III augments oxyradical production in rat heart interfibrillar mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414 (1):59-66.

- Moyes, C. D., Mathieu-Costello, O. A., Tsuchiya, N., Filburn, C., and Hansford, R. G. 1997. Mitochondrial biogenesis during cellular differentiation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 272 (4):41-44.
- Murad, A., and Houston, A. H. 1988. Leucocytes and leucopoietic capacity in goldfish, *Carassius auratus*, exposed to sublethal levels of cadmium. *Aquatic Toxicology* 13 (2):141-154.
- Nedergaard, J., Cannon, B., and Sidney Fleischer and Lester, P. 1979. [1] Overview- Preparation and properties of mitochondria from different sources. In *Methods in Enzymology*: Academic Press.
- Ortega-Villasante, C., Hernandez, L. E., Rella-Alvarez, R., Del Campo, F. F., and Carpena-Ruiz, R. O. 2007. Rapid alteration of cellular redox homeostasis upon exposure to cadmium and mercury in alfalfa seedlings. *New Phytologist* 176 (1):96-107.
- Oteiza, P. I., Adonaylo, V. N., and Keen, C. L. 1999. Cadmium-induced testes oxidative damage in rats can be influenced by dietary zinc intake. *Toxicology* 137 (1):13-22.
- Pamplona, R., Portero-Otn, M., Bellmunt, M. J., Gredilla, R., and Barja, G. 2002. Aging increases Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and caloric restriction decreases Nepsilon-(carboxyethyl)lysine and Nepsilon-(malondialdehyde)lysine in rat heart mitochondrial proteins. *Free Radical Research* 36 (1):47-54.
- Pane, E. F., Haque, A., Goss, G. G., and Wood, C. M. 2004. The physiological consequences of exposure to chronic, sublethal waterborne nickel in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Exercise vs resting physiology. *Journal of Experimental Biology* 207 (7):1249-1261.

- Paquin, P. R., Gorsuch, J. W., Apte, S., Batley, G. E., Bowles, K. C., Campbell, P. G. C., Delos, C. G., Di Toro, D. M., Dwyer, R. L., Galvez, F., Gensemer, R. W., Goss, G. G., Hogstrand, C., Janssen, C. R., McGeer, J. C., Naddy, R. B., Playle, R. C., Santore, R. C., Schneider, U., Stubblefield, W. A., Wood, C. M., and Wu, K. B. 2002. The biotic ligand model: a historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 133 (1):3-35.
- Pêches-et-Océans-Canada. *Feuille d'information - Perchaude*, 2008-08-28 2008 [cited. Available from http://www.dfo-mpo.gc.ca/regions/central/pub/fact-fait-ogla-rglo/yellowperch_f.htm.
- Peplow, D., and Edmonds, R. 2006. Cell pathology and developmental effects of mine waste contamination on invertebrates and fish in the Methow River, Okanogan County, Washington (USA). *Mine Water and the Environment* 25 (4):190-203.
- Perceval, O., Pinel-Alloul, B., Methot, G., Couillard, Y., Giguere, A., Campbell, P. G. C., and Hare, L. 2002. Cadmium accumulation and metallothionein synthesis in freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*): relative influence of the metal exposure gradient versus limnological variability. *Environmental Pollution* 118 (1):5-17.
- Peter G.C. Campbell, Peter M. Chapman, and Hale, B. A. 2006. Risk assessment of metals in the environment. *Issues in Environmental Science and Technology* 22.
- Pierrel, F., Cobine, P. A., and Winge, D. R. 2007. Metal ion availability in mitochondria. *BioMetals* 20 (3-4):675-682.
- Pourahmad, J., and O'Brien, P. J. 2000. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu²⁺ and Cd²⁺. *Toxicology* 143 (3):263-273.

- Pourahmad, J., Ross, S., and O'Brien, P. J. 2001. Lysosomal involvement in hepatocyte cytotoxicity induced by Cu²⁺ but not Cd²⁺. *Free Radical Biology and Medicine* 30 (1):89-97.
- Ptashynski, M. D., and Klaverkamp, J. F. 2002. Accumulation and distribution of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology* 58 (3-4):249-264.
- Pyle, G., Busby, P., Gauthier, C., Rajotte, J., and Couture, P. 2008. Seasonal and regional variations in metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. II. Growth patterns, longevity, and condition. *Human and Ecological Risk Assessment* 14 (1):126-145.
- Pyle, G. G., Rajotte, J. W., and Couture, P. 2005. Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61 (3):287-312.
- Rajotte, J. W., and Couture, P. 2002. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59 (8):1296-1304.
- Risso-De Faverney, C., Orsini, N., De Sousa, G., and Rahmani, R. 2004. Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: Involvement of oxidative stress. *Aquatic Toxicology* 69 (3):247-258.
- Sato, M., and Kondoh, M. 2002. Recent studies on metallothionein: Protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 196 (1):9-22.

- Sherwood, G. D., Rasmussen, J. B., Rowan, D. J., Brodeur, J., and Hontela, A. 2000. Bioenergetic costs of heavy metal exposure in yellow perch (*Perca flavescens*): In situ estimates with a radiotracer (^{137}Cs) technique. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57 (2):441-450.
- Smedley, P. L., and Kinniburgh, D. G. 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* 17 (5):517-568.
- Sokolova, I. M. 2004. Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Journal of Experimental Biology* 207 (15):2639-2648.
- Sokolova, I. M., Sokolov, E. P., and Ponnappa, K. M. 2005. Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquatic Toxicology* 73 (3):242-255.
- Stohs, S. J., and Bagchi, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* 18 (2):321-336.
- Takashi, U., and Yumi, W. 2006. Pathogenesis of Osteomalacia in Itai-Itai Disease. *J Toxicol Pathol* 19 (2):69-74.
- Taylor, L. N., Wood, C. M., and McDonald, D. G. 2003. An evaluation of sodium loss and gill metal binding properties in rainbow trout and yellow perch to explain species differences in copper tolerance. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (9):2159-2166.
- Torreilles, J., and Guerin, M. C. 1990. Nickel (II) as a temporary catalyst for hydroxyl radical generation. *FEBS Letters* 272 (1-2):58-60.

- USEPA. 1992. Framework for Ecological Risk Assessment. *U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum, Washington, DC* EPA/630/R-92/001.
- Vaglio, A., and Landriscina, C. 1999. Changes in liver enzyme activity in the teleost *Sparus aurata* in response to cadmium intoxication. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43 (1):111-116.
- Valko, M., Morris, H., and Cronin, M. T. D. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 12 (10):1161-1208.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S., and Krishna Rao, K. M. 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces Reactive Oxygen Species. *Free Radical Biology and Medicine* 36 (11):1434-1443.
- Williams, R. J. P., and Fraústo da Silva, J. J. R. 2000. The distribution of elements in cells. *Coordination Chemistry Reviews* 200-202:247-348.
- Zheng, X., Shoffner, J. M., Voljavec, A. S., and Wallace, D. C. 1990. Evaluation of procedures for assaying oxidative phosphorylation enzyme activities in mitochondrial myopathy muscle biopsies. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1019 (1):1-10.
- Žikić, R. V., Štajn, A. Š., Pavlović, S. Z., Ognjanović, B. I., and Saičić, Z. S. 2001. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. *Physiological Research* 50 (1):105-111.

ANNEXE A

Méthode d'isolation des mitochondries

Dans le cadre de ce projet, il fallait mettre au point une technique d'isolation des mitochondries. Cette technique a été mise au point grâce à l'aide de Nicolas Pichaud et de Pierre Blier, qui ont accepté de me donner un coup de main. Cette méthode est au point pour des mitochondries provenant de foie de poissons rouges. Des ajustements seront nécessaires pour avoir de bons résultats avec d'autres espèces. Énormément d'informations à ce sujet se retrouvent sur le site Internet : <http://www.oroboros.at> dans la section MiPNet Protocols. Voir aussi les premiers numéros de *Methods in Enzymology*.

PREPARATION DES SOLUTIONS POUR ISOLATION ET RESPIRATION :

- Solutions tampons : **à préparer à chaque jour, la vaisselle rincée à l'acide, le matériel utilisé au frigo.**

Milieu d'isolation : concentrations pour 50 mL

- 140 mM de KCl (**sigma : P4504**) : 0,5496 g
- 20 mM de HEPES (**sigma : H0527**) : 0,2909 g
- 10 mM de EGTA (**sigma : E4378**) : 0,2003 g
- 2 % (w/v) de BSA (**Sigma : A3803**) : 1 g
- pH 7,2 ; conserver à 4°C

Milieu de respiration : concentrations pour 50 mL

- 140 mM de KCl (**sigma : P4504**) : 0,4473 g
- 5 mM de KH₂PO₄ : 0,0358 g
- 20 mM de HEPES (**sigma : H0527**) : 0,2909 g
- 3 mM de MgCl₂ (**sigma : M2670**) : 0,0321 g
- (5 mM de EGTA: 0,1002g) le EGTA peut être enlevé pour éliminer le plus possible les problèmes de chélation des métaux.
- 0,5% (w/v) de BSA : 0,25 g
- pH 7,2 ; conserver à 4°C

METHODE D'ISOLATION DES MITOCHONDRIES :

Toutes les étapes doivent être effectuées **sur glace.**

- Prendre 2 poissons, récupérer le foie
- Homogénéiser le foie dans 200 µL de tampon d'isolation (pellet pestle)
- Filtrer sur gaze grâce à une seringue de 1 mL, rapporter le volume à 1,2 mL
- Centrifuger 3 minutes à 150 g, 4°C.
- Filtrer sur gaze le surnageant (environ 1 mL)
- Centrifuger 10 minutes à 9000 g à 4°C
- Rincer le culot dans 200 µL de tampon d'isolation
- Resuspendre dans 60 µL

MÉTHODE DE RESPIRATION :

Préparation des substrats : les concentrations sont calculées pour un volume de **500 μ L** dans la chambre.

- Pyruvate (**sigma : P2256**) : 0,4448 g d'acide pyruvique dans 5 mL d'eau nanopure \rightarrow en prenant 5 μ L, on obtient une concentration de 10 mM dans la chambre de respiration
- Glutamate (**sigma : G1626**): 0,8625 g de L-Glutamic acid dans 5 mL d'eau nanopure, pH 7,2 \rightarrow en prenant 5 μ L, on obtient une concentration de 10 mM dans la chambre
- Malate (**sigma : M1000**): 0,3487 g de L-acide malique dans 5 mL d'eau nanopure, pH 7,2 \rightarrow en prenant 10 μ L, on obtient une concentration de 10 mM dans la chambre
- ADP (**sigma : A4386**): 0,0449 g d'ADP + 0,0128 g de $MgCl_2$ dans 10 mL d'eau nano, pH 7,2 \rightarrow en prenant 5 μ L, on obtient une concentration de 100 μ M dans la chambre
- ADP' (**sigma : A4386**): 0,0906 g d'ADP + 0,0259 g de $MgCl_2$ dans 5 mL d'eau nano, pH 7,2 \rightarrow en prenant 5 μ L, on obtient une concentration de 400 μ M dans la chambre
- Oligomycine (**sigma : O4876**) : 0,0025 g dans 5 mL d'éthanol \rightarrow en prenant 1 μ L, on obtient une concentration de 1 μ g/mL dans la chambre
- Sodium azide (**sigma : S2002**): 0,1842 dans 10 mL d'eau nano \rightarrow en prenant 5 μ L on obtient 500 μ M dans la chambre.

Mesure RCR et ADP/O :

Mettre 25 μ L de mitochondries isolées avec 475 μ L de tampon de respiration dans la chambre, ajouter les substrats quand le tracé est stable : pyr (10 mM) + glut (10 mM) + mal (10 mM)

Ajouter 100 μ M d'ADP, attendre la déplétion (ratio ADP/O).

Ajouter 400 μ M d'ADP (stade 3 max)

Ajouter 1 μ g·mL⁻¹ d'oligomycine (stade 4)

Mesure COX :

Mettre 25 μ L de mitochondries isolées avec 475 μ L de tampon respiration dans la chambre.

Ajouter les substrats : pyr (10 mM) + glut (10 mM) + mal (10 mM)

Ajouter l'ADP 400 μ M (voir même 800 μ M)

Ajouter sodium azide par étape de 500 μ M (ou 250 μ M selon tes tests), jusqu'à inhibition totale (au moins cinq injections).

ANNEXE B

Localisation et caractéristiques physico-chimiques des lacs échantillonnés

Localisation:

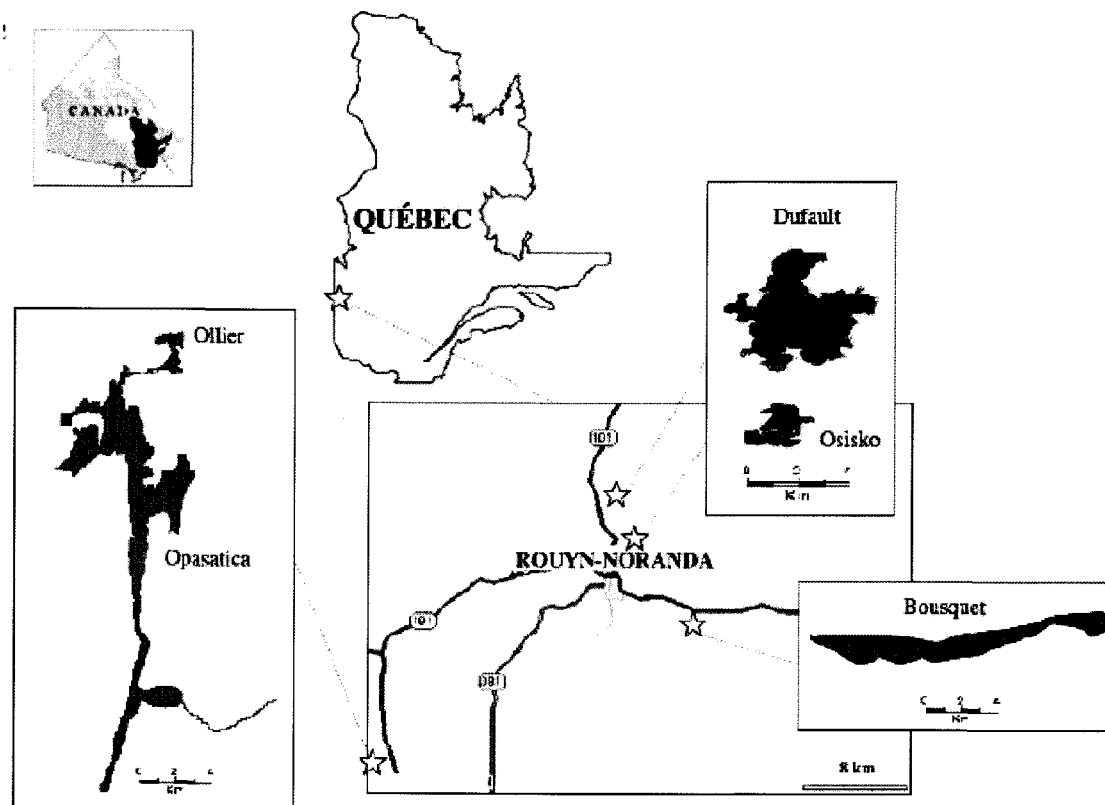


Figure tirée de Couture et al. (2008b)

Données physico-chimiques

Table 1: Water quality parameters and sediment metal concentrations in the 10 study lakes. Hardness and DOC are expressed in mg/L; metal concentrations are in µg/L (water) or µg/g dry weight (sediments). N=1 to 6. DL = Detection Limit. Water Se was omitted from the analysis since it was only detected in S4 and S5 (1.0 and 2.6 µg/L respectively; DL=1 µg/L). ND=not detected.

Lake	Water							Sediment				
	pH	Hardness	DOC	Cd	Cu	Ni	Zn	Cd	Cu	Ni	Se	Zn
DL	-	-	-	0.01	0.5	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
RN1	7.66	50.8	6.95	0.01	3.0	<0.2	0.3	1.62	46	40	<0.5	110
RN2	7.68	49.6	5.90	0.03	4.2	<0.2	4.8	0.70	28	19	<0.5	86
RN3	6.91	14.5	11.12	0.06	3.3	1.2	3.3	0.18	9	12	<0.5	20
RN4	7.81	84.8	3.00	0.16	5.7	3.5	13.3	96.42	12111	104	46.4	9263
RN5	7.65	56.5	4.85	0.62	14.3	<0.2	66.4	26.85	1965	30	8.9	2728
S1	6.78	98.5	11.23	0.10	1.6	0.9	13.9	2.34	23	15	31.8	221
S2	6.55	11.0	7.21	0.02	2.0	4.5	7.8	1.60	49	99	22.6	138
S3	7.16	9.8	4.24	0.17	15.6	73.2	16.3	1.92	568	550	24.6	71
S4	7.36	25.3	6.62	0.52	20.7	149.1	22.8	3.83	973	1384	32.0	193
S5	7.03	42.7	4.88	0.45	24.4	174.8	13.6	2.67	1051	1093	26.4	124

Données tirées de Couture et al. (2008b)

Les noms de lacs sont : RN1 : Opasatica,
 RN2 : Ollier,
 RN3 : Bousquet,
 RN4 : Osisco,
 RN5 : Dufault