

Québec  
INRS-Eau, Terre et Environnement

**ACCUMULATION ET RÉPARTITION SUBCELLULAIRE  
DES MÉTAUX (CD, CU, ZN, NI) CHEZ DEUX ORGANISMES AQUATIQUES  
EXPOSÉS À UN GRADIENT MÉTALLIQUE EN MILIEU NATUREL: LIENS  
AVEC LE STRESS OXYDANT**

Par  
Anik Giguère

Thèse présentée  
pour l'obtention  
du grade de Philosophia doctor (Ph. D.)  
en Sciences de l'eau et de l'environnement

**Jury d'évaluation**

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Examineur externe        | Alain Boudou<br>Université de Bordeaux I             |
| Examineur externe        | Jack F. Klaverkamp<br>Freshwater Institute, Winnipeg |
| Examineur interne        | Patrice Couture, INRS-ETE                            |
| Directeur de recherche   | Peter G.C. Campbell, INRS-ETE                        |
| Codirecteur de recherche | Landis Hare, INRS-ETE                                |



*À Daniel, Anaïs et Thomas*



## Résumé

Ce projet visait à améliorer notre compréhension des liens entre les métaux totaux accumulés par un organisme ou un organe entier et les effets de cette accumulation sur la santé des organismes. Puisque les métaux peuvent se lier à de multiples ligands à l'intérieur des cellules, ils exerceront divers effets physiologiques selon le ligand auquel ils sont associés. D'une part, plusieurs systèmes subcellulaires ont évolué pour l'accumulation, la régulation et l'immobilisation des métaux, tels les métallothionéines, granules, lysosomes ou vésicules entourées d'une membrane. D'autre part, les métaux peuvent exercer un effet toxique en se liant à des molécules ou organites cibles physiologiquement importantes. De telles cibles incluent des molécules cytosoliques, tel le glutathion, les métalloenzymes et les acides nucléiques. Les métaux peuvent aussi catalyser la peroxydation des membranes lipidiques, porter atteinte aux organites et déstabiliser les membranes lysosomales.

Des travaux antérieurs sur les bivalves d'eau douce menés au sein de notre équipe, de même que les travaux réalisés dans d'autres laboratoires, ont suggéré que l'examen de la distribution des métaux dans les différents compartiments subcellulaires chez des animaux exposés pourrait constituer une manière de déterminer si l'organisme a réussi à détoxiquer ou non les métaux accumulés. **L'accumulation excessive de métaux, au-delà des capacités liguantes de la métallothionéine et/ou des granules disponibles, devrait résulter en leur liaison avec les ligands cellulaires considérés comme sensibles aux métaux.** Selon cette hypothèse, les effets des métaux sur la santé d'un organisme ne s'observeront qu'après le débordement des mécanismes de détoxification, lorsque les métaux se lieront à des constituants cellulaires sensibles aux métaux.

Ce projet de doctorat comportait deux objectifs principaux. Le premier objectif était de déterminer s'il y avait une perturbation de la répartition subcellulaire du métal chez deux organismes sentinelles, soient un bivalve d'eau douce (*Pyganodon grandis*) et la perchaude juvénile (*Perca flavescens*), exposés en milieu naturel à un gradient métallique. Le deuxième objectif était de démontrer la valeur diagnostique de cette perturbation comme biomarqueur précoce d'effets. Pour atteindre ces objectifs, nous avons mesuré l'exposition

aux métaux, leur accumulation dans un organe cible entier, leur répartition subcellulaire dans cet organe et finalement certains de leurs effets toxiques, incluant des biomarqueurs de stress oxydant, et ce chez les deux espèces récoltées dans des lacs situés au sein de régions minières.

Nous avons trouvé que le bivalve et la perchaude exposés de façon chronique aux métaux dans l'environnement accumulaient les métaux en proportions stables dans toutes les fractions subcellulaires, et ce pour tous les niveaux d'exposition métallique. En conséquence, les effets toxiques mesurés se sont manifestés de manière graduelle, à partir de faibles concentrations de métaux accumulés. Ces résultats invalident notre hypothèse initiale quant à l'utilité des concentrations métalliques mesurées dans les fractions subcellulaires sensibles aux métaux pour prédire la toxicité. En effet, les concentrations mesurées dans l'organe entier ont permis une aussi bonne prédiction d'effets toxiques que celles mesurées dans les fractions dites "sensibles aux métaux". Ces résultats contrastent de façon marquée avec les résultats d'expériences d'exposition aiguë, ce qui nous amène à questionner le réalisme de plusieurs expériences de transplantation et d'exposition en laboratoire pour lesquelles la durée d'exposition est inférieure au temps nécessaire pour que les concentrations accumulées atteignent l'état stationnaire.

---

**Anik Giguère**

---

**Peter G. C. Campbell, Directeur de thèse**

## Avant-propos

Cette thèse comporte d'abord une synthèse générale de l'ensemble du doctorat, composée de la problématique, des objectifs et hypothèses de recherche et finalement d'une discussion et d'une intégration des résultats. Le noyau de la thèse est présenté sous forme de quatre publications scientifiques soumises ou sur le point d'être soumise à des revues avec comités de lecture. Les mises au point de trois méthodes sont présentées en annexes.

La contribution des auteurs aux différents articles s'établit comme suit:

1. GIGUÈRE, A., Y. Couillard, P.G.C. Campbell, O. Perceval, L. Hare, B. Pinel-Alloul et J. Pellerin. 2003. "Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient". Aquat. Toxicol., vol. 64, p. 185-200.

**A. Giguère:** Conception et réalisation du projet (échantillonnage; développement des méthodes analytiques; analyses, traitement et interprétation des données); rédaction initiale et finale de l'article.

**Y. Couillard:** Conception et réalisation du projet (échantillonnage, développement des méthodes analytiques, analyses); révision finale de l'article.

**P.G.C. Campbell:** Conception et réalisation du projet (contribution au traitement et à l'interprétation des données); rédaction initiale et finale de l'article.

**O. Perceval:** Réalisation du projet (échantillonnage); révision finale de l'article.

**L. Hare:** Conception du projet; rédaction initiale et finale de l'article.

**B. Pinel-Alloul:** Conception du projet; révision finale de l'article.

**J. Pellerin:** Réalisation du projet (contribution à l'analyse); révision finale de l'article.

2. GIGUÈRE, A., P.G.C. Campbell, L. Hare, D.G. McDonald and J.B. Rasmussen "Influence of lake chemistry and fish age on Cd, Cu and Zn concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*)". Soumis au Can. J. Fish. Aquat. Sci.

**A. Giguère:** Conception et réalisation du projet (échantillonnage; développement des méthodes analytiques; analyses, traitement et interprétation des données); rédaction initiale et finale de l'article.

**P.G.C. Campbell:** Conception et réalisation du projet (contribution au traitement et à l'interprétation des données); rédaction initiale et finale de l'article.

**L. Hare:** Conception du projet; rédaction initiale et finale de l'article.

**D.G. McDonald:** Conception du projet; révision finale de l'article.

**J.B. Rasmussen:** Conception du projet; révision finale de l'article.

3. GIGUÈRE, A., P.G.C. Campbell, L. Hare et P. Couture. En révision. "Subcellular partitioning of cadmium, copper, zinc and nickel in indigenous yellow perch sampled along a polymetallic gradient". Soumis à Environ.Toxicol. Chem.

**A. Giguère:** Conception et réalisation du projet (échantillonnage, développement des méthodes analytiques, analyses, traitement et interprétation des données); rédaction initiale et finale de l'article.

**P.G.C. Campbell:** Conception et réalisation du projet (contribution au traitement et à l'interprétation des données); rédaction initiale et finale de l'article.

**L. Hare:** Conception du projet; rédaction initiale et finale de l'article.

**P. Couture:** Réalisation du projet (contribution à l'analyse); révision finale de l'article.

4. GIGUÈRE, A., P.G.C. Campbell, L. Hare et C. Cossu-Leguille. "Metal bioaccumulation and oxidative stress evidences in yellow perch sampled in eight lakes along a metal contamination gradient (Cd, Cu, Zn, Ni)". En préparation.

**A. Giguère:** Conception et réalisation du projet (échantillonnage; développement des méthodes analytiques; analyses, traitement et interprétation des données); rédaction initiale et finale de l'article.

**P.G.C. Campbell:** Conception et réalisation du projet (contribution au traitement et à l'interprétation des données); rédaction initiale et finale de l'article.

**L. Hare:** Conception du projet; rédaction initiale et finale de l'article.

**C. Cossu-Leguille:** Réalisation du projet (contribution à l'analyse); révision finale de l'article

## Remerciements

L'encadrement exceptionnel offert par mon directeur de thèse, le Dr Campbell, mérite d'être souligné en premier lieu. Celui-ci, en plus de manifester un respect évident envers toutes mes idées, des plus aux moins farfelues, a su stimuler ma créativité par une critique constructive de ces idées, en me permettant de rencontrer nombre de chercheurs *via* des collaborations et lors de réunions scientifiques, ainsi qu'en me fournissant tout le matériel nécessaire à la mise en pratique de nos idées. Merci, Monsieur Campbell, de m'avoir toujours traitée en égale, avec respect, patience et gentillesse, ainsi que pour votre très grande disponibilité. Merci pour le modèle d'enthousiasme et de rigueur face à la science que vous représentez pour moi.

Je remercie aussi mon codirecteur de thèse, le Dr Hare, pour son esprit toujours en éveil, pour son humour, pour sa plume acérée et aussi pour sa très grande disponibilité. Merci aussi, Landis, pour le recul que tu me permets de prendre, par ta vision si originale et souvent approfondie des choses de sciences et de tout le reste.

Je dois également des remerciements à tous les assistants de terrain qui ont plongé et pataugé dans les lacs, qui se sont fait mouiller sous la pluie, qui ont disséqué sans relâche moules et poissons et qui ont finalement toujours fait de leur mieux pour qu'on obtienne des résultats de qualité. Merci Lyne Morrissette, Étienne Guay, Yvan Bettarel, Isabelle Louis, Alexandre van den Abel, Jord Orvoine, Annick Michaud, Céline Porcher, Sophie Cooper, Amélie Cliche et René Rodrigue. Merci aussi pour la bonne humeur et les fous rires des jours de pluie et pour l'amitié des jours de congé.

Un gros merci à Yves Couillard pour son encadrement de mes débuts et aussi pour m'avoir appris la rigueur lors du travail de terrain. Merci pour leur généreuse aide technique à Sophie Gauthier-Clerc, Louis Croisetière, Janick Lalonde, Marie-Noële Croteau, Olivier Perceval et Lisa Kraemer. Merci aussi aux techniciens de l'INRS-Eau, Terre et Environnement, pour leur souci du travail bien fait et leur disponibilité. Un merci

X

particulier à Michelle Geoffroy-Bordeleau, à Sylvie St-Pierre et à René Rodrigue qui ont fait des milliers d'analyses de métaux pour ce projet et finalement à Stéphane Prémont, toujours disponible pour trouver une solution aux problèmes les plus inextricables.

Merci aux étudiants de l'Université de Rimouski ainsi qu'aux étudiants et techniciens de l'Université de Metz pour leur accueil lors de mes stages. Merci pour leur amitié à Yves, Marie-Noële, Catalina, Béatrice, Claude, Bernard, Janick, Céline, Louis, Annick, Sophie, Amiel, José, Lisa, Suzie, Bernard, Johanne, Edith et Stéphane.

En terminant, je remercie toute ma famille pour leur soutien inconditionnel, pour leur aide et leur amour. Merci Daniel, merci Paul et Diane et merci Jacques et Nicole.

# Table des matières

|  |            |
|--|------------|
| <b>RÉSUMÉ.....</b>   | <b>V</b>   |
| <b>AVANT-PROPOS.....</b>   | <b>VII</b> |
| <b>REMERCIEMENTS.....</b>  | <b>IX</b>  |
| <b>1 INTRODUCTION.....</b>   | <b>1</b>   |
| 1.1 INDICATEURS BIOCHIMIQUES.....  | 3          |
| 1.1.1 <i>La métallothionéine.....</i>  | <i>4</i>   |
| 1.1.2 <i>La répartition subcellulaire des métaux.....</i>  | <i>5</i>   |
| 1.1.3 <i>Paramètres de stress oxydant.....</i>   | <i>7</i>   |
| 1.2 PERTINENCE DE L'ÉTUDE D'ANIMAUX EXPOSÉS EN MILIEU NATUREL.....   | 9          |
| 1.3 ESPÈCES SENTINELLES.....   | 11         |
| 1.3.1 <i>Le bivalve d'eau douce (Pyganodon grandis).....</i>   | <i>12</i>  |
| 1.3.2 <i>La perchaude (Perca flavescens).....</i>  | <i>15</i>  |
| <b>2 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....</b>   | <b>19</b>  |
| 2.1 IDENTIFICATION DE L'ORGANE CIBLE.....  | 19         |
| 2.1.1 <i>Bivalve.....</i>  | <i>19</i>  |
| 2.1.2 <i>Perchaude.....</i>  | <i>20</i>  |
| 2.2 RELATION ENTRE LA CHIMIE DE L'EAU ET LES CONCENTRATIONS MÉTALLIQUES.....   | 20         |
| 2.3 INFLUENCE DE L'ÂGE SUR L'ACCUMULATION MÉTALLIQUE.....  | 21         |
| 2.4 RÉPARTITION SUBCELLULAIRE DES MÉTAUX DANS L'ORGANE SÉLECTIONNÉ.....  | 21         |
| 2.5 LIEN ENTRE L'ACCUMULATION MÉTALLIQUE DANS LES FRACTIONS CELLULAIRES SENSIBLES ET LES EFFETS TOXIQUES INDUITS PAR LES MÉTAUX..... | 21         |
| <b>3 MÉTHODOLOGIE.....</b>   | <b>23</b>  |
| 3.1 RÉGIONS D'ÉTUDE.....   | 23         |
| 3.2 MESURES D'EXPOSITION MÉTALLIQUE.....   | 23         |
| 3.3 MESURES D'ACCUMULATION MÉTALLIQUE.....   | 23         |
| 3.4 MESURE DES CONCENTRATIONS DE MÉTALLOTHIONÉINE.....   | 24         |
| 3.5 RÉPARTITION SUBCELLULAIRE.....   | 24         |
| 3.5.1 <i>Chromatographie liquide haute performance (HPLC).....</i>   | <i>24</i>  |
| 3.5.2 <i>Centrifugation différentielle.....</i>  | <i>27</i>  |
| 3.6 ÉVALUATION DU STRESS OXYDANT ET DES DÉFENSES ANTIOXYDANTES.....  | 27         |
| 3.7 ÉVALUATION DE LA COMPÉTITION.....  | 28         |
| <b>4 RÉSULTATS.....</b>  | <b>29</b>  |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 4.1       | IDENTIFICATION DE L'ORGANE CIBLE CHEZ LA PERCHAUDE .....                        | 29         |
| 4.2       | RELATIONS ENTRE LA CHIMIE DE L'EAU ET LES CONCENTRATIONS MÉTALLIQUES.....       | 30         |
| 4.2.1     | <i>Bivalve</i> .....  | 30         |
| 4.2.2     | <i>Perchaude</i> .....  | 30         |
| 4.3       | EFFET DE L'ÂGE SUR L'ACCUMULATION DE CD, DE CU ET DE ZN CHEZ LA PERCHAUDE ..... | 33         |
| 4.4       | INDUCTION DE MÉTALLOTHIONÉINE CHEZ LE BIVALVE.....                              | 33         |
| 4.5       | RÉPARTITION SUBCELLULAIRE DES MÉTAUX DANS L'ORGANE SÉLECTIONNÉ .....            | 34         |
| 4.5.1     | <i>Bivalve</i> .....  | 34         |
| 4.5.2     | <i>Perchaude</i> .....  | 34         |
| 4.6       | EFFETS TOXIQUES INDUITS PAR LES MÉTAUX.....                                     | 36         |
| 4.6.1     | <i>Bivalve</i> .....  | 36         |
| 4.6.2     | <i>Perchaude</i> .....  | 37         |
| <b>5</b>  | <b>DISCUSSION ET INTÉGRATION DES RÉSULTATS .....</b>                            | <b>39</b>  |
| 5.1       | MODÈLE DU DÉBORDEMENT DE LA MÉTALLOTHIONÉINE OU " SPILLOVER" .....              | 39         |
| 5.2       | COMPARAISON DES DEUX ORGANISMES SENTINELLES .....                               | 44         |
| 5.2.1     | <i>Concentrations d'exposition dans l'eau</i> .....                             | 45         |
| 5.2.2     | <i>Bioaccumulation métallique</i> .....   | 46         |
| 5.2.3     | <i>Répartition subcellulaire des métaux</i> .....                               | 50         |
| 5.2.4     | <i>Métallothionéines</i> .....  | 52         |
| 5.2.5     | <i>Défenses antioxydantes</i> .....   | 53         |
| <b>6</b>  | <b>CONCLUSIONS.....</b>   | <b>59</b>  |
| 6.1       | POTENTIEL DE CHACUNE DES ESPÈCES COMME SENTINELLE .....                         | 62         |
| 6.2       | PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....  | 63         |
| <b>7</b>  | <b>LISTE DES RÉFÉRENCES.....</b>  | <b>67</b>  |
| <b>8</b>  | <b>1<sup>ER</sup> ARTICLE .....</b>   | <b>79</b>  |
| <b>9</b>  | <b>2<sup>ÈME</sup> ARTICLE .....</b>  | <b>119</b> |
| <b>10</b> | <b>3<sup>ÈME</sup> ARTICLE .....</b>  | <b>159</b> |
| <b>11</b> | <b>4<sup>ÈME</sup> ARTICLE .....</b>  | <b>193</b> |
| <b>12</b> | <b>ANNEXE A .....</b>   | <b>235</b> |
| <b>13</b> | <b>ANNEXE B.....</b>  | <b>239</b> |
| <b>14</b> | <b>ANNEXE C .....</b>   | <b>243</b> |

|    |                |     |
|----|----------------|-----|
| 15 | ANNEXE D ..... | 253 |
| 16 | ANNEXE E ..... | 259 |

### Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| TABLEAU 1. COEFFICIENTS DE DÉTERMINATION ( $r^2$ ) POUR LES RELATIONS (TOUTES POSITIVES) ENTRE UN PARAMÈTRE ET LES CONCENTRATIONS DE MÉTAL DANS LES BRANCHIES ENTIÈRES DE BIVALVES OU DANS LES FRACTIONS SUBCELLULAIRES POTENTIELLEMENT SENSIBLES À LA TOXICITÉ DES MÉTAUX, LES FRACTIONS DE HAUT (HMW) ET DE FAIBLE (LMW) POIDS MOLÉCULAIRE (N=21). * $P \leq 0.05$ ; ** $P \leq 0.01$ ; *** $P \leq 0.001$ ; n.s. $P > 0.05$ . ..... | 41 |
| TABLEAU 2. CONCENTRATIONS MAXIMALES (MAX) ET MINIMALES (MIN) DE L'ION LIBRE MÉTALLIQUE, DU CALCIUM DISSOUS ET PH DE L'EAU POUR L'ENSEMBLE DES LACS ÉCHANTILLONNÉS EN 1998 POUR LES BIVALVES, AINSI QUE POUR CEUX ÉCHANTILLONNÉS POUR LES PERCHAUDS EN 2000 ET 2001.....  | 46 |
| TABLEAU 3. CONCENTRATIONS MÉTALLIQUES CHEZ DES BIVALVES ÉCHANTILLONNÉES DANS LE LAC BOUSQUET EN 1997 (NOTRE ÉTUDE) ET 2002 (EMMANUELLE BONNERIS, ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON, DONNÉES NON-PUBLIÉES) AINSI QUE CHEZ DES PERCHAUDS ÉCHANTILLONNÉES DANS LE MÊME LAC EN 2000.....   | 47 |
| TABLEAU 4. CONCENTRATIONS MINIMALES ET MAXIMALES DE DIFFÉRENTS BIOMARQUEURS DE STRESS OXYDANTS TELS QUE MESURÉS DANS DEUX ORGANISMES RÉCOLTÉS DANS DES LACS SITUÉS LE LONG D'UN GRADIENT D'EXPOSITION MÉTALLIQUE.....  | 52 |
| TABLEAU 5. SENS DE LA RÉPONSE (ORDRE DE GRANDEUR DE LA RÉPONSE) DE DIFFÉRENTS BIOMARQUEURS DE STRESS OXYDANT SUITE À UNE ACCUMULATION DE Cd, Cu ou Zn DANS DIFFÉRENTS ORGANES DE 2 ORGANISMES SENTINELLES. + AVEC M= RÉGRESSION POSITIVE AVEC [MÉTAL]; - = RÉGRESSION NÉGATIVE AVEC [M]. .....   | 55 |

### Liste des figures

|  |   |
|--|---|
| FIGURE 1. ÉMISSIONS DE CADMIUM (TONNES/AN) DE LA FONDERIE HORNE À ROUYN-NORANDA. DONNÉES DE NORANDA INC.....   | 2 |
| FIGURE 2. MODÈLE CLASSIQUE DU "SPILLOVER".....   | 6 |
| FIGURE 3. VARIATIONS DE LA DISTRIBUTION SUBCELLULAIRE DU Cd DANS DES FRACTIONS CYTOSOLIQUES DES BRANCHIES DE <i>P. GRANDIS</i> RÉCOLTÉES DANS PLUSIEURS LACS DE LA RÉGION DE ROUYN-NORANDA, EN |   |

FONCTION DES  $[Cd^{2+}]$  AMBIANTES. (A)  $[Cd]$  DANS LA FRACTION MT; RÉGRESSION LINÉAIRE AJUSTÉE À LA FRACTION MT:  $Y = A + Bx$ . (B)  $[Cd]$  DANS LA FRACTION LMW; MODÈLE SEGMENTÉ (LINÉAIRE "PIECEWISE") AJUSTÉ À LA FRACTION LMW:  $Z = A + B_{max} (0, X - C)$ . CHAQUE POINT REPRÉSENTE LA MOYENNE ( $\pm SD$ ) POUR LE LAC CORRESPONDANT (WANG ET AL., 1999). .....14

FIGURE 4. RELATIONS ENTRE LES CONCENTRATIONS DE MÉTALLOTHIONÉINE ET (A) LES CONCENTRATIONS DE Cd MESURÉES DANS LE FOIE (RELATION LOG-LOG), OU (B) LA SOMME DES CONCENTRATIONS DE Cd, Cu ET Zn MESURÉES DANS LE FOIE DE PERCHAUDS ADULTES RÉCOLTÉES DANS 6 LACS DE LA RÉGION DE ROUYN-NORANDA EN JUIN 1997 (LAFLAMME ET AL., 2000). .....16

FIGURE 5: CARTE DE LA RÉGION D'ÉTUDE DE ROUYN-NORANDA, DANS LA PROVINCE DE QUÉBEC, CANADA. .25

FIGURE 6: CARTE DE LA RÉGION D'ÉTUDE DE SUDBURY, .....26

FIGURE 7. COMPARAISON DES CONCENTRATIONS MÉTALLIQUES (MOYENNE + ÉCART-TYPE) MESURÉES DANS LE FOIE DE LA PERCHAUDE ENTRE LES ANNÉES D'ÉCHANTILLONNAGE 2000 (N=15) ET 2001 (N=3 RÉPLICATS COMPOSÉS DE 16 FOIES CHACUN). LES MOYENNES OBTENUES POUR LES 2 ANNÉES ONT ÉTÉ COMPARÉES POUR CHAQUE LAC ET POUR CHAQUE MÉTAL AU MOYEN DU TEST DE STUDENT, SAUF POUR LES  $[Cu]$  POUR LE LAC OP QUI ONT ÉTÉ COMPARÉES AU MOYEN DU TEST DE KOLMOGOROV-SMIRNOV SUR LES RANGS. LE PH MESURÉ DANS L'EAU DES MÊMES LACS EST AUSSI PRÉSENTÉ. OP: LAC OPASATICA; VA: LAC VAUDRAY, OS: LAC OSISKO ET DU: LAC DUFALUT. \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ .....31

FIGURE 8. RELATIONS ENTRE LES CONCENTRATIONS MÉTALLIQUES DANS LE FOIE ENTIER DE LA PERCHAUDE ET LA CONTRIBUTION RELATIVE DES FRACTIONS SENSIBLE ET DÉTOXIFIÉE À LA TENUEUR TOTAL EN MÉTAL POUR (A) LE CADMIUM (B) LE CUIVRE ET (C) LE ZINC. CHAQUE POINT REPRÉSENTE DES DONNÉES POUR DES PERCHAUDS RÉCOLTÉS DANS UN LAC PARTICULIER. SIGNIFICATIONS DES SYMBOLES:  $\triangle$  FRACTION SENSIBLE AUX MÉTAUX (NOYAUX / RESTES, .....35

FIGURE 9. LE MODÈLE CLASSIQUE DE "SPILLOVER" DE LA MT (CF. FIGURE 2, SECTION INTRODUCTION) NE SEMBLE PAS S'APPLIQUER AUX ORGANISMES INDIGÈNES. EN EFFET, LES MÉTAUX NONESSENTIELS SONT LIÉS AUX FRACTIONS SUBCELLULAIRES SENSIBLES, MÊME À DE FAIBLES CONCENTRATIONS D'EXPOSITION MÉTALLIQUE DANS L'ENVIRONNEMENT. LA SYNTHÈSE DE MT EST PROPORTIONNELLE À L'EXPOSITION ET N'ATTEINT PAS DE PLATEAU MÊME CHEZ LES ANIMAUX RÉCOLTÉS DANS LES LACS LES PLUS ENRICHIS EN MÉTAUX. TEL QUE PRÉCONISÉ, L'ACCUMULATION MÉTALLIQUE DANS LES FRACTIONS SUBCELLULAIRES SENSIBLES EST RELIÉE À UNE DIMINUTION DES PERFORMANCES CELLULAIRES POUR CERTAINES DES FONCTIONS MESURÉES, MAIS POUR D'AUTRES NOUS AVONS AUSSI MESURÉ AUCUN EFFET OU UNE AMÉLIORATION DES PERFORMANCES DE LA CELLULE. ....39

FIGURE 10. RELATIONS ENTRE L'ACTIVITÉ DE LA GLUTATHION RÉDUCTASE ET (A) LES CONCENTRATIONS DE Cu BIOACCUMULÉES DANS LE FOIE ENTIER DES PERCHAUDS OU (B) LES CONCENTRATIONS DE Cu BIOACCUMULÉES DANS LES FRACTIONS SUB-CELLULAIRES SENSIBLES AUX MÉTAUX (NOYAUX / RESTES, MITOCHONDRIES ET "ENZYMES").....42

- FIGURE 11. RELATIONS ENTRE LES CONCENTRATIONS DE MALONDIALDÉHYDE ET (A) LES CONCENTRATIONS DE CU BIOACCUMULÉES DANS LE FOIE ENTIER DES PERCHAUTES OU (B) LES CONCENTRATIONS DE CU BIOACCUMULÉES DANS LES FRACTIONS DÉTOXIQUÉES ("MÉTALLOTHIONÉINE", GRANULES).....43
- FIGURE 12. RELATION ENTRE LES CONCENTRATIONS DE GLUTATHION ET (A) LES CONCENTRATIONS DE Cd BIOACCUMULÉES DANS LE FOIE ENTIER DES PERCHAUTES OU (B) LES CONCENTRATIONS DE Cd BIOACCUMULÉES DANS LES FRACTIONS SUB-CELLULAIRES SENSIBLES AUX MÉTAUX (NOYAUX / RESTES, MITOCHONDRIES ET "ENZYMES"). .....43
- FIGURE 13. CONCENTRATIONS ET TENEURS EN Cd DE DIFFÉRENTES PARTIES DU CORPS DE DEUX ORGANISMES RÉCOLTÉS DANS DES LACS CONTAMINÉS (A) LE BIVALVE *P. GRANDIS* PRÉLEVÉ DANS LE LAC VAUDRAY (COUILLARD ET AL., 1993), (B) LA PERCHAUTE *PERCA FLAVESCENS* PRÉLEVÉE DANS LE LAC DUFAULT (CHAPITRE 9). .....45
- FIGURE 14. ÉTUDE COMPARATIVE DE LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE ET DE LA DURÉE DE VIE MAXIMALE CHEZ PLUSIEURS ESPÈCES. RÉALISÉ À PARTIR DE DONNÉES TIRÉES DE PEREZ-CAMPO ET AL. (1998) SAUF POUR LES DONNÉES POUR LA PERCHAUTE ET LE BIVALVE. LES DONNÉES SUR LA CONSOMMATION D'O<sub>2</sub> VIENNENT DE CHEN (1998) POUR *P. GRANDIS* ET DE COUTURE ET KUMAR (2003) POUR LA PERCHAUTE. LES DONNÉES SUR LA DURÉE DE VIE MAXIMALE VIENNENT DE SCOTT ET CROSSMAN (1973) POUR LA PERCHAUTE ET DE COUILLARD ET AL. (1995B) POUR *P. GRANDIS*. .....56



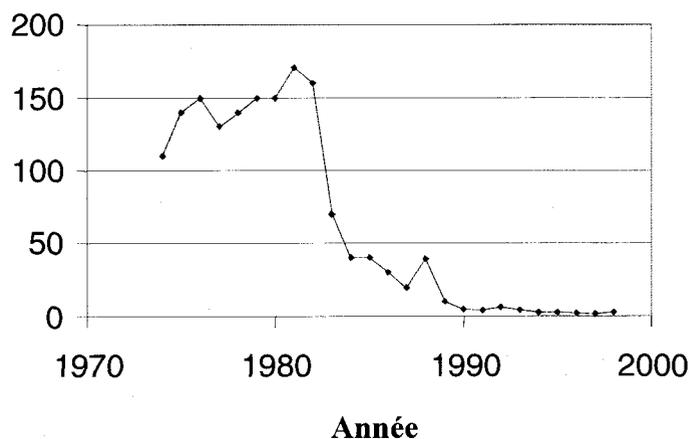
## **1 Introduction**

Certains métaux sont des macronutriments et sont donc essentiels au maintien de la vie, comme le calcium, le magnésium, le potassium et le sodium. Ils sont nécessaires à de multiples fonctions métaboliques et les organismes les utilisent en grandes quantités. D'autres métaux, comme le cuivre, le zinc, le chrome, le cobalt, le manganèse, le molybdène, le nickel, le sélénium, le vanadium et le fer sont aussi essentiels, mais en faibles quantités, comme micronutriments (Stumm et Morgan, 1996). La présence d'un excès de ces métaux dans le milieu ambiant provoque une réaction toxique chez les organismes qui y vivent. Une dernière classe regroupe des éléments qui ne sont pas essentiels à la vie. Des concentrations trop élevées de ces métaux dans l'environnement provoqueront aussi une réponse toxique. On peut placer le cadmium, l'argent, le mercure, l'antimoine et le plomb dans cette dernière catégorie (Mason et Jenkins, 1995), quoique des travaux récents (Lee et al., 1995) suggèrent que le Cd puisse remplacer le Zn chez le phytoplancton carencé en Zn.

Par ailleurs, les métaux sont présents naturellement dans la lithosphère et peuvent atteindre l'environnement aquatique suite à l'altération naturelle du socle rocheux et au lessivage des sols. Leur présence dans l'environnement superficiel de la planète n'est pas nécessairement nuisible à la vie puisque les organismes vivants possèdent des mécanismes de régulation pour en contrôler les concentrations dans leurs tissus. Cependant, lorsque leurs concentrations dépassent celles retrouvées naturellement dans l'environnement, ces mécanismes de régulation peuvent être débordés et les organismes en subissent alors des effets.

L'activité minière a accru de manière importante les apports dans l'environnement de métaux toxiques essentiels, comme le cuivre, le zinc et le nickel et non-essentiels, comme le cadmium et le plomb. Les fonderies de métaux et parcs à résidus miniers sont aussi responsables d'importants apports en acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) sur les bassins versants et dans les milieux aquatiques, provoquant une acidification de ces milieux et entraînant une augmentation de la fraction métallique biodisponible (Campbell et Stokes, 1985; Croteau

et al., 2002). Ces phénomènes peuvent être observés à Rouyn-Noranda, en Abitibi, où se trouvent une fonderie de cuivre qui opère depuis 1927 ainsi que 24 parcs à résidus miniers présentant un potentiel de drainage minier acide (Couillard, 1997). Les principaux métaux relâchés par la fonderie de Rouyn-Noranda sont le Cd, Cu et le Zn. Des contrôles de la pollution de l'air et de l'eau ont été introduits en 1982 et en 1989 (figure 1) mais les sédiments reflètent toujours l'histoire de contamination de cette région (Tessier et al., 1993). Une autre région minière d'importance de l'est du Canada est la région de Sudbury, où se trouvent deux fonderies qui relâchent dans l'atmosphère principalement du Cu et du Ni et de manière moins importante du Cd et du Zn, en plus du gaz producteur d'acide, le dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>) (Bradley et Morris, 1986). Les émissions de SO<sub>2</sub> et de métaux particulaires des fonderies de Sudbury ont été réduites dramatiquement depuis le début des années 1970 (~90%), provoquant une amélioration de la qualité de l'eau et un rétablissement des communautés (Mallory et al., 1998).



**Figure 1.** Émissions de cadmium (tonnes/an) de la fonderie Horne à Rouyn-Noranda. Données de Noranda Inc.

La Canada étant un leader mondial dans la production de métaux, l'industrie minière canadienne et les gouvernements cherchent à gérer les risques que les métaux posent à l'environnement pour continuer leur production et leur utilisation sans dangers. Des critères de qualité de l'eau sont déjà utilisés pour les composés synthétiques organiques mais ils doivent être modifiés pour s'appliquer aux composés métalliques et inorganiques

(Chapman et Wang, 2000). Les personnes en charge d'établir les politiques relatives à la gestion des métaux recherchent donc des critères indicateurs des risques potentiels des métaux à l'environnement (MITE-RN, 2001). Le présent projet de recherche vise, par l'étude de deux organismes indigènes, (1) l'évaluation d'indicateurs d'exposition aux métaux dont la métallothionéine et les concentrations accumulées dans divers organes et (2) l'évaluation de plusieurs indicateurs d'effets sous-léthaux des métaux dont le débordement des mécanismes de régulation/détoxication, la dégradation oxydative des membranes cellulaires, plusieurs antioxydants, ainsi que des indices de condition.

### *1.1 Indicateurs biochimiques*

Pour faire le suivi des concentrations métalliques à l'intérieur d'un écosystème aquatique, on pense intuitivement à mesurer les concentrations totales dans l'eau et/ou dans les sédiments. De telles mesures sont cependant d'une utilité limitée puisqu'elles ne nous renseignent pas sur la fraction du contaminant effectivement accumulée par les organismes vivants qui pourrait avoir un effet sur leur santé, soit la fraction dite **biodisponible** (Campbell, 1995). En effet, les métaux (M) sont présents sous différentes formes dans l'eau des lacs: libre,  $M^{z+}$ ; carbonato-complexes,  $M(CO_3)_x$  et  $MHCO_3$ ; sulfato-complexes,  $MSO_4$ ; chloro-complexes,  $M(Cl)_x$ ; hydroxo-complexes,  $M(OH)_x$ ; et aussi des complexes impliquant la matière organique naturelle. Selon le modèle de l'activité de l'ion libre (FIAM), c'est uniquement l'activité de l'ion libre (par exemple  $\{Cd^{2+}\}$ ,  $\{Cu^{2+}\}$  ou  $\{Zn^{2+}\}$ ) qui, à des valeurs de pH et dureté fixes, gouverne l'accumulation des métaux traces dans les animaux aquatiques (Campbell, 1995). Mesurer cette espèce métallique demande cependant des efforts considérables et on se limite, en général, à en estimer la valeur. De plus, la mesure de l'ion libre ne renseigne pas sur les effets de l'accumulation sur la santé des animaux. Les indicateurs biochimiques reflètent à la fois l'exposition, la biodisponibilité et les effets biologiques des métaux et pourraient être utilisés comme complément à ces mesures de métaux dans l'environnement.

L'indicateur biochimique (ou biomarqueur) est défini comme une réponse biologique suite à l'exposition à un produit chimique. Cette réponse se produit à l'intérieur de l'organisme, aux niveaux cellulaire et subcellulaire ou dans les produits de l'organisme (urine, fèces,

poils, etc.). Elle ne se détecte pas nécessairement au niveau de l'organisme en entier. Couillard (1997) a défini 5 critères auxquels un bon indicateur biochimique doit satisfaire :

1. **Alerte précoce** : la réponse du biomarqueur précède et permet donc de prédire les effets du contaminant aux niveaux supérieurs de l'organisation biologique.
2. **Spécificité** : l'indicateur biochimique répond spécifiquement à un contaminant ou à une classe de contaminants.
3. **Relation dose-réponse** : l'indicateur devrait répondre de façon dépendante à un changement de la biodisponibilité du contaminant.
4. **Variabilité d'origine non-toxicologique** : les variables exogènes (relatives au milieu externe) ou endogènes (relatives à la physiologie de l'organisme) affectant l'indicateur devraient être identifiées afin de minimiser les sources de variation non souhaitées.
5. **Relation avec la santé de l'organisme** : l'indicateur devrait refléter la santé ou l'ajustement général de l'organisme à son milieu ("fitness").

#### 1.1.1 La métallothionéine

Ce projet de recherche visait à évaluer l'utilité de la **métallothionéine** (MT) comme indicateur biochimique de l'exposition aux métaux. La MT est une protéine de faible poids moléculaire (6-7 kD) riche en cystéine, qui démontre une grande affinité pour les ions métalliques de classe B, tels le Ag, le Cd, le Cu, le Hg et le Zn (Langston et al., 1998). La MT est actuellement perçue comme étant presque omniprésente dans le règne animal. Plusieurs études suggèrent que la MT joue un rôle de premier plan dans la régulation et dans la détoxification des métaux essentiels, comme le cuivre et le zinc, ainsi que dans la détoxification des métaux non-essentiels comme le cadmium, l'argent et le mercure inorganique (Johansson et al., 1986; Roesijadi et Fellingham, 1987; Roesijadi, 1992). Chez plusieurs espèces, il a été démontré que les niveaux de MT varient en premier lieu suivant les besoins vitaux en métaux de l'animal au cours de son cycle vital, et en second lieu selon les apports de métaux en provenance de l'environnement (crabe: Engel et Brouwer, 1987; huître: Unger et Roesijadi, 1996). En plus de l'exposition à certains métaux,

plusieurs facteurs peuvent induire la synthèse de métallothionéine, incluant entre autres les hormones, les facteurs de croissance, les vitamines, les agents inflammatoires et les agents stressant comme le jeûne, l'infection et les radiations ultraviolettes (revu dans Kägi, 1991). L'exposition aux métaux induit une synthèse de MT, qui lie les métaux et empêche leur liaison non-spécifique à des constituants cellulaires sensibles, causant une augmentation de la tolérance de l'organisme à cette exposition. Ces capacités de détoxification et de régulation des métaux, combinées à la sensibilité de l'induction de la MT même à de faibles concentrations métalliques et à sa synthèse proportionnelle à l'exposition confèrent à la MT le potentiel de devenir un excellent indicateur biochimique de la contamination en cadmium, cuivre, zinc et/ou argent. De plus, la synthèse de la MT étant induite au niveau cellulaire, elle donne une alerte précoce quant au statut toxicologique de l'organisme et elle satisfait ainsi au 1<sup>er</sup> critère mentionné plus haut.

Pour répondre au 5<sup>ème</sup> critère, les concentrations de MT devraient être reliées à l'état de santé de l'organisme cible. Selon le modèle du "spillover" (Winge et al., 1973; Brown et Parsons, 1978), ces effets sur la santé ne se produiront qu'au moment où le mécanisme de détoxification, en l'occurrence la capacité de synthèse et/ou de liaison de la métallothionéine, sera débordé. La détection d'un tel débordement permettrait donc de connaître les limites d'acclimatation d'un organisme et serait significative du point de vue de la réglementation et de la gestion. Pour la métallothionéine un modèle hypothétique de débordement est proposé à la section suivante.

### 1.1.2 La répartition subcellulaire des métaux

À l'instar de l'eau des lacs, différentes espèces métalliques sont aussi présentes à l'intérieur des cellules. En effet, les métaux peuvent être associés à divers ligands cellulaires, soient particuliers comme les organites, les granules et les membranes, soient dissous comme les acides aminés, les peptides et les protéines cytosoliques (Mason et Jenkins, 1995; Langston et al., 1998). Parmi ces ligands, certains jouent un rôle de séquestration et de détoxification des métaux comme la métallothionéine (Engel et Roesijadi, 1987) et les granules (Hare, 1992; Roesijadi et Robinson, 1994). L'accumulation métallique dans les autres fractions

mène potentiellement à la manifestation d'effets toxiques au niveau cellulaire, d'abord, puis éventuellement aux niveaux supérieurs d'organisation biologique si l'entrée des métaux dans l'organisme dépasse ses capacités de le détoxiquer au niveau subcellulaire (Mason et Jenkins, 1995; Wallace et al., 2003).

La majorité des études évaluent les effets des métaux en fonction soit de l'exposition dans l'environnement ou des métaux totaux bioaccumulés. L'évaluation de l'accumulation métallique dans chacun des réservoirs subcellulaires devrait permettre de raffiner les relations entre l'exposition au métal et les effets sur la santé de l'organisme. La MT influence la distribution du métal dans la cellule de deux manières. D'abord, elle lie les ions métalliques qui entrent dans la cellule, puis elle joue un rôle de «sauvetage», en enlevant les ions métalliques déjà associés aux ligands potentiellement sensibles responsables de la toxicité cellulaire (Roesijadi et Robinson, 1994). L'hypothèse du "spillover" (Winge et al., 1973; Brown et Parsons, 1978) propose que l'accumulation excessive de métaux, au-delà des capacités liguantes ou des capacités de synthèse de la MT, provoque la conjugaison des ions métalliques à d'autres constituants cytosoliques (figure 2). Ce sont ces surplus de métaux qui sont alors responsables de la toxicité cellulaire et des effets néfastes sur la santé de l'organisme (Brown et Parson, 1978; Johansson et al., 1986; Mason et Jenkins, 1995).

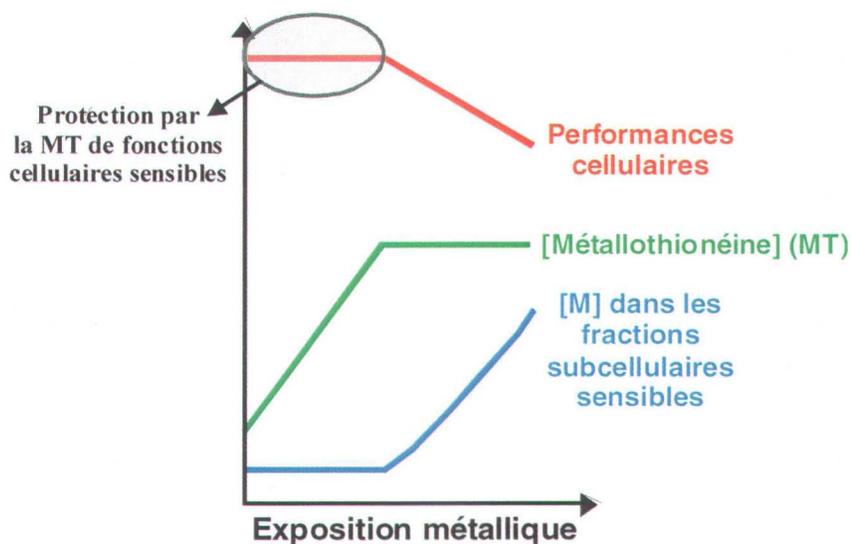
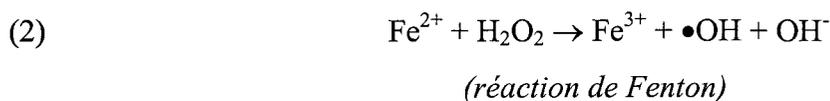


Figure 2. Modèle classique du "spillover".

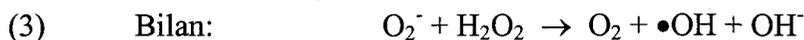
### 1.1.3 Paramètres de stress oxydant

Ce projet de recherche vise aussi à vérifier l'utilité de plusieurs paramètres liés au stress oxydant en tant que biomarqueurs d'effets des métaux, dont les concentrations de malondialdéhyde et les niveaux de trois antioxydants, la glutathion peroxydase, la glutathion réductase et le glutathion (Chapitre 11).

En plus de se lier à différentes protéines cytosoliques, certains métaux peuvent catalyser la détérioration oxydative des lipides polyinsaturés des membranes. Ces métaux doivent cependant pouvoir changer d'état oxydation pour produire des espèces réactives d'oxygène telles  $O_2^-$ ,  $\bullet OH$  et  $O_2\bullet$ . (Bus et Gibson, 1979). Un mécanisme plausible de production de ces espèces réactives peut être décrit comme une réaction Haber-Weiss, représentée ci-après comme catalysée par le fer, mais qui pourraient tout autant être catalysée par le cuivre:



*Catalysée par Fe*



Les radicaux libres d'oxygène, une fois formés, réagissent avec les lipides polyinsaturés des membranes biologiques en leur enlevant un hydrogène selon la réaction suivante (Halliwell et Gutteridge, 1984) :



Le lipide ainsi transformé est cependant lui aussi très réactif et réagit avec la molécule d'oxygène de cette manière :



Ce lipide réagit ensuite avec une molécule de lipide intacte et propage la dégradation de la membrane, selon cette réaction :



On peut évaluer la peroxydation lipidique en mesurant un sous-produit de cette dégradation, le **malondialdéhyde** ( $\text{CH}_3\text{H}_2\text{O}_2$ ), référé ci-après comme MDA (Chapitre 11: figure 8).

En plus du fer, le cuivre (Halliwell et Gutteridge, 1984) et le nickel (Torreilles et Guérin, 1990) ont démontré la capacité de générer des radicaux libres. Le Cd ne peut catalyser la peroxydation lipidique selon ces réactions, puisqu'il n'obéit pas à un cycle redox. Certaines études (Wofford et Thomas, 1988; Thomas et Wofford, 1993) ont malgré tout mesuré des concentrations accrues de MDA dans les tissus de poissons exposés *in vitro* et *in vivo* au cadmium. Nous avons donc envisagé d'autres mécanismes d'action du cadmium sur les membranes lipidiques.

Plusieurs enzymes contribuent à protéger les cellules contre la peroxydation des lipides. La superoxyde dismutase, la catalase ainsi que la glutathion peroxydase interceptent les radicaux libres d'oxygène qui induisent le processus de peroxydation, et les rendent inoffensifs. Dans le cadre de ce projet, nous avons étudié la **glutathion peroxydase** qui est reconnue comme une des défenses les plus importantes contre le stress oxydant et qui agit en détoxiquant le peroxyde et les hydroperoxydes lipidiques. L'exposition aux métaux pourrait agir de deux manières sur cet enzyme. Premièrement, par une liaison sur ses groupes fonctionnels, le métal pourrait l'inhiber. Deuxièmement, si un métal catalyse la production d'espèces réactives selon les réactions décrites ci-haut, alors la synthèse de cet enzyme pourrait s'en trouver stimulée. Des travaux réalisés sur des animaux exposés en milieu naturel (Cd: Palace et Klaverkamp, 1993; Cu: Doyotte et al., 1997; As, Cu, Fe, Mn,

Pb, Zn: Regoli, 1998) ou en laboratoire (Cd: Thomas et Wofford, 1984; Bay et al., 1990; Venugopal et al., 1997) reflètent ces deux mécanismes d'action contradictoires, avec des activités enzymatiques accrues ou inhibées à la suite de l'exposition aux métaux.

Le cadmium pourrait aussi affecter les réserves d'antioxydants disponibles. Le principal antioxydant de la cellule est le **glutathion** (GSH;  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) que l'on retrouve à des concentrations intracellulaires assez élevées (~5 mM dans le foie du rat; Kosower et Kosower, 1978; ~2 mM dans le foie de perchaude, Chapitre 11). Il est présent principalement sous forme réduite dans les cellules alors que la forme oxydée, composée de 2 molécules de glutathion liées par un pont disulfure (GSSG), excède rarement 10% du glutathion total dans les cellules saines de rat (Kosower et Kosower, 1978). C'est le groupement thiol de l'acide aminé cystéine qui confère au glutathion des caractéristiques de donneurs d'électrons et qui fait de lui un antioxydant efficace. Cela confère aussi à la molécule de glutathion une importante affinité pour les métaux mous comme le cadmium et le mercure. Il peut donc agir comme ligand intracellulaire de ces métaux et prévenir leur interaction avec structures cellulaires essentielles. Il semble donc que le GSH servirait à tamponner les fluctuations de métaux à court terme, la MT étant relativement lente à répondre à l'exposition (Chubatsu et al., 1992; Mason et Jenkins, 1995). La liaison du GSH avec le métal interférerait avec le cycle normal d'interconversion entre le GSH et le GSSG qui permet le maintien de concentrations cellulaires importantes de la forme réduite (Christie et Costa, 1984).

Dans le cadre de ce projet de doctorat, nous avons étudié un deuxième enzyme, la **glutathion réductase**, qui catalyse la réduction du glutathion et permet de maintenir le ratio [GSH]/[GSSG] constant.

### **1.2 Pertinence de l'étude d'animaux exposés en milieu naturel**

Les informations scientifiques traditionnellement utilisées pour établir les critères de qualité de l'eau et pour construire et valider les modèles, proviennent d'expositions d'organismes aquatiques réalisées en laboratoire durant des périodes relativement courtes. Lors de ces expériences, les organismes subissent un changement d'une exposition

métallique de concentration presque nulle à une relativement élevée. En conséquence, la distribution des métaux entre les organes internes changera vraisemblablement avec l'augmentation de la durée d'exposition. Ainsi, des concentrations métalliques plus élevées aux sites de prise en charge seront mesurées au début de l'exposition, et cette distribution pourra changer si le métal entre dans le système circulatoire de l'animal, puis s'il est transféré aux sites de filtration, d'entreposage, de détoxification et d'excrétion, au fur et à mesure de l'augmentation de la durée de l'exposition. Lors d'expériences de laboratoire de courte durée, les concentrations métalliques accumulées dans le corps entier ainsi que dans chacun des organes n'auront vraisemblablement pas encore atteint un état stationnaire. On sait de plus que des mécanismes de tolérance (e.g. Benson et Birge, 1985 ou Pynnönen, 1995) entrent en jeu lors d'expositions plus chroniques ou dans le milieu naturel.

Un autre facteur à considérer pour évaluer les risques posés par les métaux envers les organismes aquatiques est la forme de métal offerte à l'organisme modèle. Dans les expériences de laboratoire traditionnelles, les organismes sont exposés au métal sous forme dissoute dans l'eau ou, dans le meilleur des cas, à un sel métallique mélangé à de la nourriture commerciale en flocons. L'importance de la nourriture comme voie d'exposition a été démontrée chez plusieurs espèces dont entre autres des bivalves (Harvey et Luoma, 1985; Lee et al., 2000), des poissons (Dallinger et Kautzky, 1985) ainsi que des insectes (Munger et Hare, 1997; Roy et Hare, 1999). On sait aussi que la forme métallique à laquelle l'organisme est exposé peut influencer la biodisponibilité (Langevoord et al., 1995; Wallace et al., 1998; Szebedinszky et al., 2001), le site d'accumulation (Harrison et Klaverkamp, 1989; Farag et al., 1994; Langevoord et al., 1995) et la toxicité du métal (Farag et al., 1994; Wallace et al., 1998).

D'autre part, sur le terrain les métaux sont souvent présents comme mélanges polymétalliques, à la différence d'exposition typique de laboratoire où les organismes ne sont exposés qu'à un contaminant à la fois. Très peu de données sont disponibles actuellement concernant l'importance relative des différents métaux présents ensemble dans les mélanges en termes d'accumulation et d'effets. Il existe aussi peu de données sur l'effet compétitif d'un ou de plusieurs ions métalliques aux sites de prise en charge.

Finalement, dans la majorité des expériences réalisées en laboratoire les organismes sont exposés à des concentrations métalliques relativement élevées comparativement aux concentrations trouvées dans le milieu naturel. En conséquence, les mécanismes de prise en charge, les concentrations accumulées et les effets toxicologiques seront vraisemblablement différents de ceux observés chez des animaux indigènes exposés à des concentrations plus faibles.

Même si les résultats obtenus par les expériences en laboratoire sont plus faciles à interpréter, ces travaux recréent rarement les conditions d'exposition subies par les organismes vivant naturellement dans les milieux contaminés. Ce projet vise donc à documenter l'accumulation et les effets des métaux chez des organismes exposés dans l'environnement naturel pour une durée d'exposition souvent négligée dans la littérature, soit chez des animaux exposés durant toute leur vie.

### **1.3 Espèces sentinelles**

Il apparaît de plus en plus évident que le suivi de la disponibilité des métaux dans les écosystèmes aquatiques ne peut se faire au moyen d'un seul organisme. En effet, les divers organismes répondent différemment à la contamination dans le milieu. L'accumulation (prise en charge, concentrations accumulées et élimination) chez une espèce dépend non seulement des paramètres physico-chimiques de l'eau dans laquelle elle vit, mais aussi (de manière non-exhaustive) de son habitat et de son comportement, de sa stratégie d'alimentation, de son type de nourriture et des niveaux métalliques qu'on trouve dans celle-ci, des mécanismes physiologiques qu'elle utilise pour la prise en charge, la détoxification et l'élimination des métaux et de son métabolisme basal. Le potentiel de deux espèces comme sentinelles de la contamination métallique dans l'environnement a été évalué dans le cadre de ce travail: le bivalve d'eau douce, *Pyganodon grandis*, ainsi que la perchaude, *Perca flavescens*. Toutes deux sont relativement tolérantes aux métaux, une condition essentielle pour les retrouver dans les milieux enrichis en métaux. Chacune présente des avantages et inconvénients qui lui sont propres et que nous tenterons de mieux identifier au cours de ce projet.

### 1.3.1 Le bivalve d'eau douce (*Pyganodon grandis*)

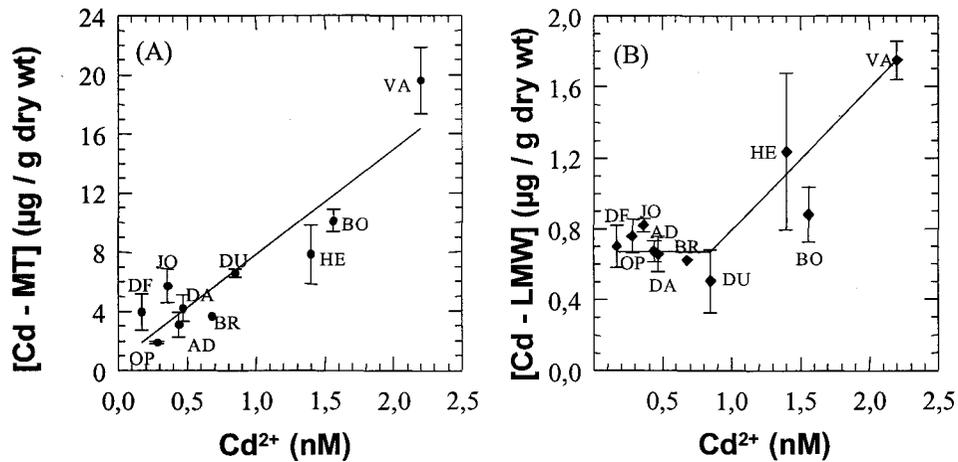
*Pyganodon grandis* (anciennement *Anodonta grandis grandis*) est largement distribué en Amérique du nord, à partir du centre de l'Alberta à l'ouest jusqu'à Montréal à l'est, puis à partir du milieu de l'Ontario au nord jusqu'au bassin du Golfe du Mexique en Louisiane et au Texas (Clarke, 1981). Ce bivalve habite les étangs permanents, les lacs et les rivières de toutes tailles (Clarke, 1981). Il vit relativement longtemps (~15 ans, Couillard et al., 1995b) et sa coquille peut atteindre 16 cm (Clarke, 1981). Il adopte un comportement d'enfouissement dans les sédiments pendant l'hiver, réduisant son métabolisme basal. Ce mollusque garde ses petits dans des parties modifiées de ses branchies jusqu'à ce que les jeunes (ou glochidies) soient expulsés par le parent pour s'accrocher à un poisson-hôte en tant qu'ectoparasites. Ils continuent là leur développement jusqu'à leur métamorphose en petits bivalves, puis tombent au fond. Cet organisme benthique s'alimente en filtrant la couche d'eau près du fond des lacs et rivières. L'orientation de son siphon inhalant, légèrement au-dessus du sédiment, permet principalement l'entrée du matériel en suspension dans l'eau, ce qui expliquerait que l'ingestion de sédiments contaminés ne contribue qu'en de faibles proportions à la prise en charge de métaux chez cette espèce (Tessier et al., 1986).

Les vitesses de prise en charge et d'excrétion des métaux sont lentes chez cette espèce, ce qui fait que ses concentrations métalliques tissulaires reflètent des changements à long terme dans les concentrations ambiantes (Tessier et al., 1986; Couillard et al., 1995a). Chez les mollusques en général, et chez *P. grandis* en particulier, les branchies semblent très perméables aux métaux relativement à l'épithélium digestif, probablement à cause de leurs fonctions nutritionnelle et respiratoire. Pour *P. grandis*, les branchies et le manteau sont responsables à eux seuls de ~75% de la teneur en cadmium de tout l'organisme, et ce malgré le fait qu'ils ne comptent que pour 35-40% du poids total de tissus mous (Couillard et al., 1993). Le taux de croissance de cette espèce a été mesuré chez quatre populations de bivalves de lacs situés dans la région de Rouyn-Noranda (Tessier et al., 1986; Couillard et al., 1995b).

L'utilisation du bivalve *P. grandis* comme espèce sentinelle est considérée par notre équipe depuis plusieurs années, ce qui explique que plusieurs sources de variabilité d'origine non-toxicologique qui pourraient influencer les mesures des indicateurs biochimiques (critère #4; Section 1.1) ont été étudiées jusqu'ici. On sait ainsi que les fluctuations saisonnières des concentrations de métallothionéine et de malondialdéhyde dans les branchies sont faibles (Couillard et al., 1995b). Couillard et al. (1995b) ont également caractérisé les fluctuations dans le poids sec des tissus mous entre deux années consécutives, et ce chez des bivalves de deux lacs différents. Ces fluctuations dans le poids et dans l'âge des organismes peuvent entraîner à leur tour des fluctuations dans les concentrations de Cd, de Cu et de Zn des tissus, tel qu'observé par Tessier et al. (1986) chez des bivalves en provenance de 2 autres lacs de la même région.

Des travaux antérieurs ont révélé le potentiel des concentrations de métallothionéine dans les branchies du bivalve d'eau douce *Pyganodon grandis* comme indicateur biochimique. Pour vérifier si ce paramètre répondait au 3<sup>ème</sup> critère définissant l'indicateur biochimique (Section 1.1), i.e. qu'il répond de façon dépendante à un changement de la biodisponibilité du contaminant, Couillard et al. (1993) ont prélevé des bivalves dans dix lacs présentant un gradient de concentrations en cadmium dans l'eau. Ils ont trouvé que le bivalve accumulait le cadmium dans ses branchies, que cette accumulation était corrélée aux concentrations de MT dans les branchies et que ces deux paramètres répondaient au gradient de  $[Cd^{2+}]$  dans le milieu externe. Wang et al. (1999) ont ensuite mesuré la répartition subcellulaire des métaux dans le cytosol des branchies de *P. grandis* et confirmé que les concentrations de Cd associées à la fraction MT étaient corrélées aux concentrations estimées de cadmium libre ambiant,  $Cd^{2+}$  (figure 3A). De plus, ces auteurs ont remarqué que les concentrations de Cd associées aux protéines et peptides de faible poids moléculaire (LMW, 2.5-15 kD) étaient relativement faibles et stables pour des concentrations en  $Cd^{2+}$  faibles, et augmentaient ensuite proportionnellement avec l'augmentation de  $Cd^{2+}$  à partir d'un seuil d'environ 1 nM de  $Cd^{2+}$  (figure 3B). Ce phénomène pourrait témoigner d'une saturation du mécanisme de détoxification par la MT, provoquant le débordement de Cd dans la fraction

de faible poids moléculaire ("spillover") à partir de 1 nM de  $\text{Cd}^{2+}$ , tel que discuté plus haut (Section 1.1.2).



**Figure 3.** Variations de la distribution subcellulaire du Cd dans des fractions cytosoliques des branchies de *P. grandis* récoltées dans plusieurs lacs de la région de Rouyn-Noranda, en fonction des  $[\text{Cd}^{2+}]$  ambiantes. (A) [Cd] dans la fraction MT; régression linéaire ajustée à la fraction MT:  $Y = A + Bx$ . (B) [Cd] dans la fraction LMW; modèle segmenté (linéaire "piecewise") ajusté à la fraction LMW:  $Z = A + B_{\max} (0, X - C)$ . Chaque point représente la moyenne ( $\pm$ SD) pour le lac correspondant (Wang et al., 1999).

Une expérience de transplantation à partir d'un lac de référence vers un lac contaminé a aussi montré un accroissement des concentrations de MT dans le temps, accroissement corrélé à l'augmentation des concentrations tissulaires de Cd (Couillard et al., 1995b). De plus, des symptômes de toxicité cellulaire dans les branchies des bivalves transplantés (accroissement des concentrations de malondialdéhyde et de Ca) ont coïncidé avec l'accroissement des concentrations de Cd dans la fraction subcellulaire de faible poids moléculaire dans le cytosol branchial (Couillard et al., 1995a).

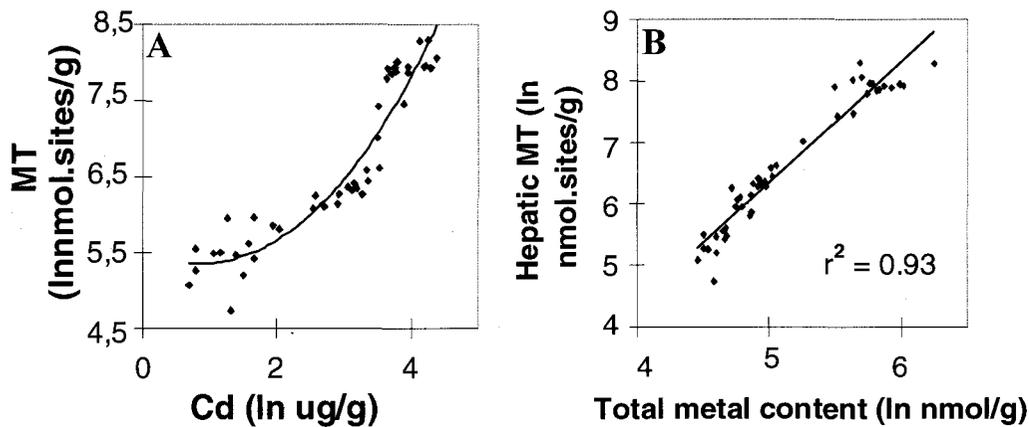
En plus de ces mesures de toxicité observées au niveau cellulaire chez des bivalves transplantés, des indications de toxicité au niveau des populations ont aussi été observées chez des bivalves indigènes. En effet, l'abondance des populations de *Pyganodon grandis*, en densité et biomasse, ainsi que leur production et fécondité cumulée diminuaient en fonction du gradient de contamination en  $\text{Cd}^{2+}$  dans les lacs étudiés en 1997 (Pinel-Alloul et al., 2004).

Ces résultats suggèrent que les bivalves indigènes ne soient pas parfaitement adaptés et/ou acclimatés à l'exposition aux métaux et que les effets toxiques observés au niveau des populations des lacs plus contaminés de la région de Rouyn-Noranda aient été précédés par une toxicité aux niveaux précédents d'organisation biologique soit aux niveaux de la cellule et de l'individu. De plus, il semble que les concentrations de malondialdéhyde soient un bon indicateur de toxicité chez *P. grandis* exposé au Cd. Ce projet vise donc d'abord à confirmer la présence d'un "spillover" de Cd dans la fraction de faible poids moléculaire, tel qu'observé par Wang et al. (1999), ainsi qu'à mesurer la toxicité cellulaire qui pourrait être associée à un tel débordement.

### 1.3.2 La perchaude (*Perca flavescens*)

La perchaude s'adapte bien à toutes sortes d'habitats : grands lacs, petits étangs ou rivières tranquilles. Elle tolère aussi une grande étendue de températures et même les eaux saumâtres. Elle est aussi tolérante à de faibles concentrations en oxygène (Scott et Crossman, 1973) et à des pH aussi faibles que 4.8 (Baker et Christensen, 1991). Ces caractéristiques en font une espèce présente dans une grande proportion de lacs du Québec. De plus, la perchaude est un poisson relativement sédentaire (Aalto et Newsome, 1990), ce qui fait que ses concentrations bioaccumulées en contaminants témoignent des conditions d'exposition locales. La perchaude change de nourriture au cours de sa vie, selon son âge et selon les saisons. Les jeunes de l'année se nourrissent de zooplancton et, en grossissant, sélectionnent des proies plus grosses : insectes immatures, gros invertébrés puis autres poissons. Ainsi, la perchaude change d'habitudes alimentaires en grandissant, de planctivore, à benthivore, à piscivore (Sherwood et al., 2002). On connaît la variabilité saisonnières des concentrations de Cu dans le contenu stomacal, dans le foie et dans les branchies de perchaude provenant de lacs contaminés situés le long d'un gradient de contamination dans la région de Sudbury (Eastwood et Couture, 2002; Audet et Couture, 2003). Des travaux sur des perchaudes prélevées dans six lacs de la région de Rouyn-Noranda par Laflamme et al. (2000) ont démontré le potentiel des concentrations de métallothionéine mesurées dans le foie et dans le tissu interrénal comme biomarqueur de

contamination métallique. Cependant chez les perchaudes, à la différence des bivalves, les concentrations de MT étaient corrélées à la somme des concentrations du Cd, du Cu et du Zn mesurées dans ces organes (mesures dans le foie: figure 4). Cette même étude a aussi mesuré des effets toxiques endocriniens de l'accumulation de métaux chez les perchaudes. Suite à un stress standardisé, le niveau de cortisol plasmatique était plus élevé chez les perchaudes en provenance des lacs de référence alors que cette réponse normale était atténuée chez les perchaudes récoltées dans des lacs contaminés.



**Figure 4.** Relations entre les concentrations de métallothionéine et (A) les concentrations de Cd mesurées dans le foie (relation log-log), ou (B) la somme des concentrations de Cd, Cu et Zn mesurées dans le foie de perchaudes adultes récoltées dans 6 lacs de la région de Rouyn-Noranda en juin 1997 (Laflamme et al., 2000).

D'autres études ont aussi mis en évidence des manifestations de toxicité à différents niveaux d'organisation biologique chez les perchaudes exposées aux métaux. Au niveau de l'individu, Lévesque et al. (2002) ont observé une altération du cycle saisonnier des concentrations de glycogène et de triglycérides hépatiques ainsi que de l'activité de certains enzymes métaboliques suite à l'exposition aux métaux. Une diminution de la capacité aérobique musculaire a de plus été observée chez des perchaudes provenant de lacs contaminés par les métaux de la région de Sudbury (Rajotte et Couture, 2002; Audet et Couture, 2003; Couture et Kumar, 2003). Au niveau des populations, Sherwood et al. (2000) ont observé une réduction de la survie de perchaudes juvéniles (âge < 3+ ans) dans les deux lacs les plus contaminés de leur étude, réduction probablement attribuable à un effet toxique direct de l'exposition métallique. Au niveau des communautés, Sherwood et

al. (2002) ont observé que les poissons provenant des lacs les plus contaminés ne suivaient pas la séquence normale de changements de leur alimentation en grandissant (zooplancton → macroinvertébrés littoraux → poissons littoraux) observée dans les lacs de référence. Sherwood et al. (2000) ont associé ce phénomène à la présence de populations naines ainsi qu'à une communauté benthique appauvrie dans ces lacs plus contaminés par les métaux.

Pour compléter ce tableau des effets de l'accumulation métallique chez les perchaudes, notre projet vise d'abord à vérifier si la toxicité observée jusqu'à présent peut être attribuée à une liaison non-spécifique des métaux à des constituants cellulaires sensibles. Dans un deuxième temps, notre projet vise à mesurer les effets de l'exposition aux métaux à deux niveaux d'organisation biologique négligés jusqu'à présent, soit au niveau cellulaire ainsi qu'au niveau des organes.



## **2 Objectifs et hypothèses de recherche**

Ce projet comportait **deux objectifs principaux**. Le premier objectif était de déterminer s'il y a une perturbation de la répartition subcellulaire du métal chez deux organismes sentinelles, soient un bivalve d'eau douce (*P. grandis*) et la perchaude juvénile (*P. flavescens*), exposés en milieu naturel à un gradient métallique. Le deuxième objectif était de démontrer la valeur diagnostique de cette perturbation comme biomarqueur précoce, tel que décrit par le 5<sup>ème</sup> critère de validité pour un indicateur biochimique cité plus haut (Section 1.1).

Notre **hypothèse principale** était que la relation entre l'accumulation métallique et les effets induits par les métaux est améliorée si les concentrations métalliques dans le corps de l'animal sont exprimées non pas en termes de métaux totaux, mais plutôt en termes de répartition subcellulaire dans un ou des organes cibles.

### **2.1 Identification de l'organe cible**

La première étape du travail de thèse consistait à identifier, pour chacune des espèces sentinelles, l'organe le plus susceptible de subir des dysfonctions suite à l'accumulation de métaux.

#### **2.1.1 Bivalve**

Chez le bivalve, des travaux antérieurs d'Yves Couillard ont permis d'identifier qu'entre les branchies et la glande digestive, les branchies présentaient les concentrations les plus élevées en Cd, en Cu et en Zn ainsi que l'étendue des concentrations métalliques entre les lacs la plus importante (Couillard et al., 1993). C'est aussi dans les branchies que les concentrations de MT étaient les plus élevées et que la plus forte relation entre le Cd et la MT a été mesurée (Couillard et al., 1993). De plus, des travaux sur la répartition subcellulaire des métaux chez ce même organe du bivalve ont montré une perturbation dans la répartition subcellulaire du Cd chez les animaux provenant des lacs les plus

contaminés par ce métal (Wang et al., 1999). Les branchies ont donc été sélectionnées comme organe cible pour réaliser ce projet.

### 2.1.2 Perchaude

Il existait peu de données sur la distribution des métaux dans les organes de la perchaude indigène. Pour identifier l'organe cible, nous avons donc déterminé la contribution de chacun des organes aux teneurs métalliques totales chez des perchaudes juvéniles récoltées dans des lacs sélectionnés le long d'un gradient de contamination métallique.

Notre hypothèse (A) était que les mécanismes d'excrétion métallique seraient débordés dans l'organe cible, ce qui se manifesterait par un accroissement de la contribution de cet organe à la teneur métallique totale au-delà d'un certain seuil d'exposition aux métaux.

## 2.2 Relation entre la chimie de l'eau et les concentrations métalliques

Une fois l'organe cible identifié pour chacune des espèces, nous avons identifié (1) les métaux accumulés par ces organes parmi ceux enrichissant le milieu d'exposition, et (2) les principaux paramètres physico-chimiques, incluant les cations compétiteurs ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{H}^+$  et métaux), qui influencent les concentrations accumulées de chacun de ces métaux.

Notre hypothèse (B) était que le cadmium, en raison de son statut de métal non-essentiel, serait le métal principalement accumulé par l'organe cible et que ses concentrations accumulées seraient corrélées aux concentrations d'ions libres métalliques en solution. De plus, des expériences réalisées en laboratoire sur des poissons exposés aux métaux dissous ayant démontré que les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{H}^+$  avaient une influence sur la prise en charge de Cd, de Zn et de Cu par les branchies (*Oncorhyncus mykiss*: Cusimano et al., 1986 ainsi que Hollis et al., 2000; *Pimephales promelas*: Playle et al., 1993), nous avons émis l'hypothèse (C) que ces ions influenceraient aussi l'accumulation chez les perchaudes indigènes.

### **2.3 Influence de l'âge sur l'accumulation métallique**

Nous voulions aussi vérifier si l'âge des perchaudes a une influence sur les concentrations métalliques mesurées dans divers organes. Sachant que les perchaudes changent de niveau trophique en vieillissant (Sherwood et al., 2002) et sachant que la biominification des métaux (à l'exception du Hg) est fréquemment observée le long de la chaîne trophique (Campbell et al., 1988), notre hypothèse (D) était qu'il n'y aurait pas d'influence de l'âge sur les concentrations accumulées des métaux à l'étude (Cd, Cu, Zn).

### **2.4 Répartition subcellulaire des métaux dans l'organe sélectionné**

Notre projet visait aussi à évaluer si le métal accumulé dans l'organe ciblé est détoxiqué ou bien s'il s'accumule dans des fractions cellulaires potentiellement sensibles à l'accumulation métallique chez les bivalves et chez les perchaudes.

Nos hypothèses (E) et (F) étaient que les concentrations de métallothionéine chez ces organismes répondrait d'une manière dose-dépendante aux concentrations ambiantes de métaux libres et qu'à mesure que les concentrations d'ion libre métallique et de métaux accumulés augmenteraient, une perturbation croissante de la répartition subcellulaire des métaux chez les organismes exposés serait observée.

### **2.5 Lien entre l'accumulation métallique dans les fractions cellulaires sensibles et les effets toxiques induits par les métaux.**

La dernière partie de notre projet visait à vérifier si les métaux accumulés dans les fractions subcellulaires sensibles permettent de prédire certains effets toxiques au niveau de la cellule (biomarqueurs de stress oxydant) et de l'individu (indices généraux de condition).

Nous avons émis l'hypothèse (G) que l'intensité de la perturbation de la répartition subcellulaire des métaux est corrélée à des effets néfastes sur la santé de l'animal au niveau de la cellule et de l'organisme, plus précisément :

- à une concentration accrue de malondialdéhyde;
- à des changements de concentrations en glutathion réduit et oxydé;

- à des changements de l'activité des enzymes glutathion réductase et glutathion peroxydase;
- à une diminution des réserves de lipides dans la gonade des bivalves;
- à une diminution de l'indice de condition et de l'indice hépatosomatique chez la perchaude.

### **3 Méthodologie**

#### **3.1 Régions d'étude**

L'étude sur les bivalves a été réalisée en 1997, dans 21 lacs situés dans un rayon de 30 kilomètres autour de de la région de Rouyn-Noranda (figure 5), et en 1998 dans une sélection de 10 lacs parmi ces 21 lacs. L'étude sur les perchaudes a été réalisée dans 8 lacs de la région de Rouyn-Noranda en 2000 et dans une combinaison de 4 lacs de la région de Rouyn-Noranda et de 4 lacs de la région de Sudbury en 2001 (figure 6).

#### **3.2 Mesures d'exposition métallique**

Pour estimer les niveaux d'exposition de la faune aquatique aux métaux, les concentrations de métaux libres (Cd, Cu, Zn, Ni) furent estimées au moyen de deux méthodes différentes. En 1997 et 1998, des échantillons de sédiments superficiels furent récoltés en plongée et les concentrations de métaux libres estimées par un modèle basé sur l'équilibre de l'ion libre métallique entre les sédiments oxyques et l'eau (Chapitre 8). En 2000 (Chapitre 9) et en 2001 (Chapitre 11), des échantillons d'eau de l'épilimnion furent récoltés au moyen de dialyseurs et la spéciation métallique à l'équilibre fut estimée avec le logiciel WHAM 6.0.1 à partir des concentrations de métaux dissous (incluant l'Al et le Fe), de cations et d'anions inorganiques majeurs, du carbone organique dissous ainsi que du pH.

#### **3.3 Mesures d'accumulation métallique**

Les échantillons d'organes entiers ainsi que ceux fractionnés furent lyophilisés avant leur digestion dans l'acide nitrique concentré. Lors de chaque séquence analytique des échantillons de référence furent analysés comme contrôle de qualité. Les analyses de métaux furent faites au spectromètre d'émission atomique (ICP-AES) ainsi qu'au spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'une fournaise au graphite (GFAAS).

### 3.4 Mesure des concentrations de métallothionéine

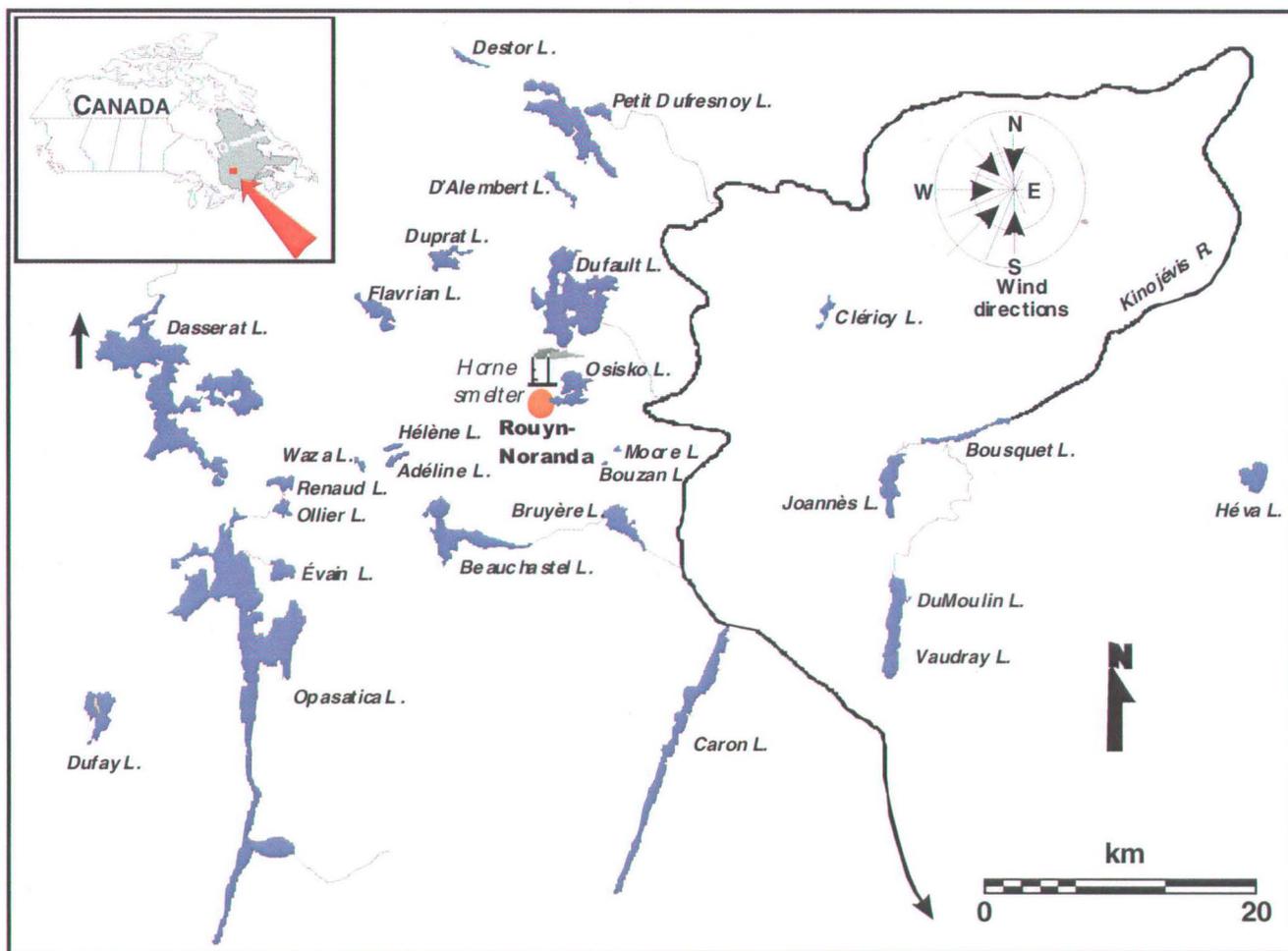
Les concentrations de métallothionéine dans les branchies du bivalve (Chapitre 8) furent mesurées au moyen d'une technique de saturation par le Hg décrite par Couillard et al. (1993).

### 3.5 Répartition subcellulaire

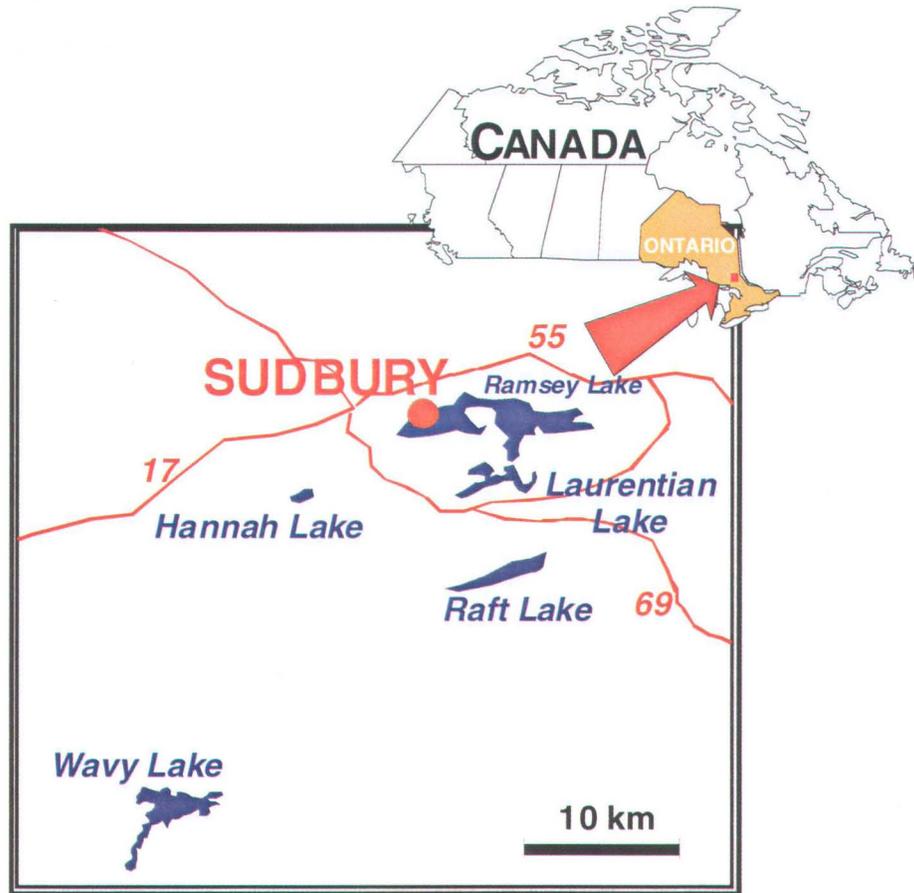
#### 3.5.1 Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La répartition subcellulaire des métaux peut être faite au moyen de la chromatographie sur gel. Nous avons utilisé la méthode de chromatographie décrite par Wang et al. (1999) ainsi que par Micallef et al. (1992) qui vise la séparation des différentes protéines cytosoliques et la mesure du métal associé à chacune. Cette technique consiste à isoler le cytosol par centrifugation (170 000 X g, 1h, 2°C) et à l'injecter dans un système de chromatographie haute performance (HPLC) muni d'une colonne d'exclusion stérique qui sépare les molécules (protéines et peptides) selon leur taille. Pour les comparaisons statistiques, les fractions ainsi obtenues sont combinées selon leur masse moléculaire en trois réservoirs de ligands de métaux :

- 1- un réservoir de ligands au poids moléculaire plus faible que la MT, référé ci-après comme la fraction LMW (*Low Molecular Weight*), de masse moléculaire entre 2.45 et 15 kD, ce réservoir inclut entre autres le glutathion;
- 2- un réservoir de ligands au poids moléculaire équivalent à celui de la MT, de masse moléculaire entre 15 et 18 kD;
- 3- et un réservoir de ligands au poids moléculaire plus élevé que la MT, référé ci-après comme la fraction HMW (*High Molecular Weight*) de masse moléculaire entre 18 à 208 kD. Ce réservoir comprend généralement plusieurs enzymes.



**Figure 5:** Carte de la région d'étude de Rouyn-Noranda, dans la province de Québec, Canada.



**Figure 6:** Carte de la région d'étude de Sudbury, dans la province de l'Ontario, au Canada.

Pour contrôler la qualité de la séparation, nous avons comparé la quantité de métal injectée à celle récupérée dans l'ensemble des fractions, de manière à calculer un % de récupération. Lors de l'injection du cytosol de cellules branchiales de bivalves, la récupération du Cd et du Cu était majoritairement entre 80-120%, alors que pour 94% des échantillons la récupération du Zn fut inférieure à 80%. Pour cette raison, les résultats de Zn furent mis de côté (Chapitre 8). Nous avons observé une récupération beaucoup moins bonne lors de l'injection de cytosol de cellules hépatiques de perchaudes que dans le cas des bivalves. Nous avons obtenu en moyenne 64% ( $\pm$ ET 5%) de récupération pour le Cd, 83% ( $\pm$ ET 25%) pour le Cu et 56% ( $\pm$ ET 4%) pour le Zn. Pour cette raison, nous avons jugé cette technique inappropriée pour estimer la répartition subcellulaire de ces métaux

dans les cellules hépatiques de perchaudes, et avons plutôt utilisé la centrifugation différentielle, décrite ci-après, à la place.

### 3.5.2 Centrifugation différentielle

Seize foies de perchaude furent combinés pour chacun des réplicats (N=3 réplicats) et ensuite homogénéisés dans du NaCl 0.9% (Chapitre 10). L'homogénat et les fractions surnageantes successives furent centrifugées à 800 Xg pour 15 min (Durand et al., 1999), à 10 000 Xg pour 30 min (Takeda and Schimizu, 1982; Olsson and Haux, 1986), à 100 000 Xg pour 60 min (Durand et al., 1999) de manière à obtenir 4 fractions : (i) noyaux, granules / restes; (ii) mitochondries; (iii) microsomes / lysosomes; et (iv) cytosol. La fraction (i) a ensuite subi un traitement à la chaleur et au NaOH avant d'être centrifugée à 10 000 Xg pendant 10 min pour séparer les fractions (v) granules dans le culot et (vi) noyaux / restes dans le surnageant (Wallace et al., 1998). Le cytosol a aussi subi un traitement à la chaleur suivi d'une centrifugation à 50 000 Xg pendant 10 min pour séparer deux fractions: (vii) les protéines cytosoliques stables à la chaleur, appelée ci-après fraction "MT"; et (viii) les protéines dénaturées à la chaleur, appelée ci-après fraction "enzymes" (Wallace et al., 1998).

### 3.6 Évaluation du stress oxydant et des défenses antioxydantes

La peroxidation lipidique fut quantifiée par la mesure des concentrations en malondialdéhyde, au moyen de la méthode colorimétrique de Sunderman et al. (1985) en utilisant le tétraéthoxypropane comme standard interne (Chapitres 8 et 11). Cette méthode fut optimisée pour les foies de perchaude (Annexe C).

L'activité des enzymes fut évaluée par le suivi des vitesses de réaction enzymatique au moyen du spectrophotomètre (Chapitres 8 et 11). L'activité de la glutathion peroxydase Se-indépendante fut mesuré au moyen de la méthode décrite par Lawrence and Burk (1976), optimisée pour les foies de perchaude (Annexe E). L'activité de la glutathion réductase fut évaluée au moyen de la méthode décrite par Carlberg and Mannervick (1985), aussi optimisée pour les foies de perchaude (Annexe D).

Les concentrations de glutathion réduit et oxydé furent mesurées par chromatographie HPLC en phase inverse suivi d'une dérivatisation post-colonne avec l'ortho-phthaldéhyde, une méthode adaptée de Leroy et al. (1993) par Cossu et al. (2000) (Chapitre 11).

### 3.7 Évaluation de la compétition

À partir des mesures physico-chimiques dans l'eau des lacs ainsi que des concentrations métalliques accumulées, les effets du  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$  et des métaux sur l'accumulation du Cd, Cu, Zn furent testés dans différents organes de la perchaude (Chapitre 9 et 10). Le modèle testé est décrit en détail par Croteau et al. (1998), par Pagenkopf (1983) ainsi qu'au Chapitre 9.

## 4 Résultats

Dans la section qui suit, je décris les résultats principaux obtenus dans le cadre de cette thèse et je discute des implications qui en découlent. Ces résultats, ainsi que des résultats additionnels, figurent dans chacun des articles individuels (Chapitres 8-11).

### 4.1 Identification de l'organe cible chez la perchaude

Chez des perchaudes juvéniles récoltées dans huit lacs de la région de R.-N. (Chapitre 9) les concentrations en Cd dans les organes étaient, dans l'ordre du plus au moins concentré: rein>foie>tractus gastrointestinal>branchies>carcasse. Les concentrations de Cu suivaient le même ordre, à l'exception du foie et du rein qui étaient inversés. Dans les lacs les moins contaminés, les teneurs en Cd les plus élevées ont été mesurées dans la carcasse, suivi du foie. Avec l'augmentation des concentrations ambiantes en  $[Cd^{2+}]$ , la contribution relative de la carcasse à la teneur en Cd du poisson entier a décru de façon linéaire, alors que la contribution relative du foie s'est accrue. De façon similaire, la contribution relative de la carcasse à la teneur en Cu du poisson entier a décru avec l'augmentation des  $[Cu^{2+}]$  alors que la contribution du foie s'est accrue. Finalement, parmi tous les organes, le foie était celui dont les concentrations en Cd étaient le mieux reliées aux concentrations en Cd dans l'eau des lacs, suivi du rein, des branchies et du tractus gastrointestinal (Chapitre 9: tableau 3).

En conclusion, le rein et le foie sont les organes où ont été mesurées les concentrations les plus élevées de Cd et de Cu. De plus, les variations de la contribution de chaque organe aux teneurs totales en Cd et en Cu révélèrent une apparente saturation des capacités d'excrétion du foie chez les poissons en provenance des lacs très contaminés par ces métaux. À partir de ces résultats, nous avons donc présumé que le rein et foie étaient les organes les plus susceptibles de subir (1) un dérèglement dans la répartition subcellulaire des métaux qui y étaient accumulés et (2) une toxicité induite par l'accumulation métallique. Le foie a été préféré au rein pour faire les analyses subséquentes de répartition subcellulaire et de mesures de toxicité à cause de sa taille relativement plus importante, ce qui nous a permis de réaliser toutes les analyses souhaitées.

## 4.2 Relations entre la chimie de l'eau et les concentrations métalliques

### 4.2.1 Bivalve

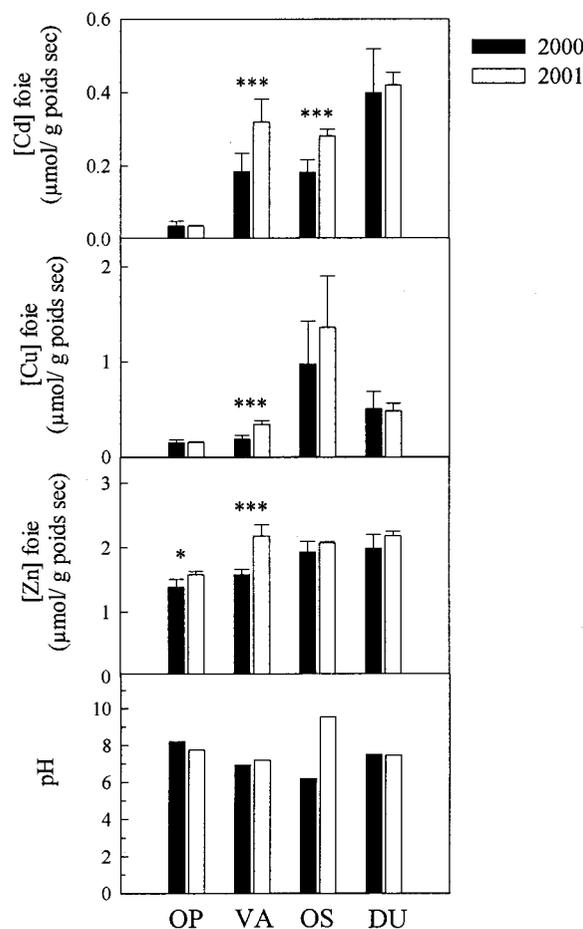
Chez le bivalve, les concentrations cytosoliques en Cd étaient reliées aux concentrations ambiantes de ce métal dans l'eau des lacs, alors que celles en Cu et Zn ne l'étaient pas (Chapitre 8). Des corrélations négatives entre les concentrations cytosoliques en Cd et les  $[H^+]$  et  $[Ca]_{diss}$  ambiantes ont été mesurées. Ces résultats suggèrent que les ions  $Ca^{2+}$  et que peut-être les ions  $H^+$  compétitionnaient avec le  $Cd^{2+}$  pour la prise en charge aux sites de liaison des métaux sur les branchies (Perceval et al., 2002).

### 4.2.2 Perchaude

Pour les perchaudes échantillonnées dans huit lacs de la région de Rouyn-Noranda en 2000, les concentrations de Cd dans tous les organes, à l'exception de la carcasse, augmentaient significativement avec celles mesurées dans l'eau des lacs (Chapitre 9). En considérant la compétition du  $Ca^{2+}$  avec le  $Cd^{2+}$  aux sites de prise en charge des métaux, nous avons pu accroître le pourcentage de variance expliquée pour chacune de ces relations, mais pas de manière significative. Les ions  $H^+$  et  $Cu^{2+}$  n'ont eu aucun effet compétitif sur l'accumulation du Cd dans les différents organes de la perchaude alors que la compétition par le  $Zn^{2+}$  n'a pu être évaluée à cause d'une corrélation positive entre ce cation et le  $Cd^{2+}$ .

En 2001, des perchaudes ont été récoltées dans 4 lacs de Sudbury en plus de 4 lacs de la région de Rouyn-Noranda. Plusieurs raisons ont motivé cette décision d'étendre la région d'étude. D'abord, le gradient métallique obtenu en 2000 dans la région de Rouyn-Noranda nous semblait inadéquat puisqu'il comportait plusieurs lacs peu contaminés, un lac de contamination intermédiaire, le lac Osisko, et un lac de contamination élevée, le lac Dufault. En plus de compléter le gradient métallique, l'addition de 4 lacs de Sudbury a permis d'étudier l'accumulation, la répartition subcellulaire et les effets du Ni, un métal relativement peu étudié. Finalement, l'ajout de 4 lacs de la région de Sudbury nous a donné la possibilité de valider le

modèle d'accumulation obtenu chez les perchaudes de Rouyn-Noranda et ainsi de généraliser l'application de ce modèle.



**Figure 7.** Comparaison des concentrations métalliques (moyenne + écart-type) mesurées dans le foie de la perchaude entre les années d'échantillonnage 2000 (N=15) et 2001 (N=3 réplicats composés de 16 foies chacun). Les moyennes obtenues pour les 2 années ont été comparées pour chaque lac et pour chaque métal au moyen du test de Student, sauf pour les [Cu] pour le lac OP qui ont été comparées au moyen du test de Kolmogorov-Smirnov sur les rangs. Le pH mesuré dans l'eau des mêmes lacs est aussi présenté. OP: lac Opasatica; VA: lac Vaudray, OS: lac Osisko et DU: lac Dufault. \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

Quatre lacs de Rouyn-Noranda ont donc été visités à deux reprises, en 2000 et en 2001. Les concentrations de Cd, de Cu et de Zn mesurées dans le foie des perchaudes provenant de ces lacs en 2000 sont généralement similaires à celles mesurées en 2001, sauf pour le lac Vaudray, pour

lequel on observe une augmentation des concentrations des 3 métaux en 2001 (figure 5). On observe également une augmentation des concentrations de Cd dans le foie des perchaudes du lac Osisko et une augmentation des [Zn] chez les perchaudes du lac Opasatica en 2001. Les augmentations dans les concentrations de métaux accumulés pour les lacs Vaudray et Osisko pourraient peut-être être attribuées à une augmentation du pH dans l'eau de ces lacs (figure 5). En effet, Croteau et al. (2002) ont observé que l'augmentation du pH dans l'eau de lacs des mêmes régions avait provoqué une augmentation de l'accumulation de Cd dans des larves d'insectes aquatiques. Cependant, si la compétition entre le cation  $H^+$  et le Cd aux sites de prise en charge est bien documentée pour l'espèce étudiée dans l'étude de Croteau et al. (2002), elle n'a jamais été observée chez la perchaude.

De manière surprenante, lors de l'étude de 2001 les concentrations de Cd, de Cu et de Zn dans le foie des perchaudes n'ont pu être reliées significativement aux concentrations ambiantes de chacun de ces métaux sous formes libres,  $[M^{z+}]$ , ou sous formes totales dissoutes. D'autre part, les concentrations de Ni dans le foie ont pu être reliées aux concentrations ambiantes de ce métal, mais cette relation ne comporte que les 4 lacs de la région de Sudbury. La compétition par les ions  $Ca^{2+}$  et/ou  $H^+$  fut testée, de même que la compétition par chacun des 3 métaux traces autres que celui considéré, pour essayer d'expliquer ces apparentes exceptions au modèle de l'ion libre. Ces calculs de compétition n'ont cependant pas permis d'améliorer la relation entre l'exposition au Cd, au Cu et au Zn et leur accumulation dans le foie. Nos résultats ne permettent pas d'expliquer l'absence de relation entre les concentrations accumulées de métaux dans le foie et les concentrations d'exposition dans l'eau des lacs. Ils ne permettent pas non plus de comprendre pourquoi les concentrations de Cd, de Cu et de Ni sont relativement plus importantes dans les perchaudes du lac Raft que dans celles des autres lacs. Plusieurs hypothèses sont avancées dans la section "Discussion" du Chapitre 11 pour expliquer ces résultats, dont:

- une différence dans le type de proies et dans les concentrations métalliques des proies entre les lacs;
- des différences génétiques entre les populations de poissons provenant des divers lacs;
- une influence du type de mélange polymétallique dans le milieu d'exposition (deux mélanges différents à Rouyn-Noranda et à Sudbury);

- la non-représentativité de nos mesures d'exposition métallique, estimées pendant 3 jours uniquement, qui pourraient donc ne pas refléter le régime réel d'exposition saisonnière.

#### **4.3 Effet de l'âge sur l'accumulation de Cd, de Cu et de Zn chez la perchaude**

Des mesures sur des perchaudes âgées de 1 à 10 ans (N=81), échantillonnées dans un unique lac de niveau de contamination intermédiaire, ont montré un accroissement des concentrations en Cd dans le rein, le foie et la carcasse avec l'âge des poissons. Les concentrations métalliques mesurées dans le contenu du tractus gastrointestinal nous ont permis de vérifier que la préférence alimentaire n'était pas un facteur significatif pour expliquer l'accroissement des concentrations métalliques accumulées. Nous avons interprété ce résultat comme le résultat d'une prise en charge nette de Cd en été plus importante que l'efflux net en hiver (Chapitre 9).

À l'opposé, nous avons observé que les concentrations de Cd accumulées dans les branchies diminuaient significativement avec l'augmentation de l'âge des poissons. Une explication possible de ce résultat serait que la diminution du taux métabolique avec l'augmentation de l'âge provoque une diminution du taux de ventilation des branchies et en conséquence une diminution des concentrations de Cd accumulées par cet organe. Une diminution du taux de ventilation mène à une réduction de la vitesse avec laquelle l'eau passe au-dessus de la surface branchiale, et donc à une augmentation de l'épaisseur de la couche d'eau non-mélangée près de cette surface. Cependant, selon le modèle du ligand biotique, de tels changements ne devraient pas influencer la vitesse de la prise en charge d'un métal (l'étape limitant la vitesse de prise en charge étant le transport trans-membranaire, non pas le transport de la solution vers la surface des branchies: Campbell et al., 2002). En effet, pour que la diminution de la ventilation branchiale affecte les concentrations accumulées de Cd, il faudrait que la diminution du taux de ventilation conduise à une réduction de la surface ventilée des branchies.

#### **4.4 Induction de métallothionéine chez le bivalve**

Les concentrations de métallothionéines dans les branchies du bivalve, telles que mesurées par un essai de saturation métallique, étaient plus fortement reliées aux concentrations de Cd cytosoliques qu'aux concentrations de Cd<sup>2+</sup> mesurées dans l'eau des lacs (Chapitre 8). De plus,

les concentrations de métallothionéine n'étaient pas reliées aux concentrations cytosolique de Cu ou de Zn, ce qui suggère que le Cd soit le métal responsable de l'induction de la métallothionéine chez le bivalve.

#### 4.5 Répartition subcellulaire des métaux dans l'organe sélectionné

##### 4.5.1 Bivalve

Chez le bivalve, le Cd et le Cu ont été détectés dans les 3 fractions cytosoliques, et les concentrations les plus élevées de chacun de ces métaux se trouvaient dans la fraction MT (Chapitre 8). Nous avons mesuré une augmentation des concentrations de Cd liées à chacune des fractions cytosoliques avec l'augmentation des concentrations de Cd dans le cytosol des branchies. Ces résultats suggèrent que le concept de saturation de la métallothionéine suivi d'un débordement (ou "spillover") dans les fractions HMW et LMW, à partir d'un certain seuil dans les concentrations d'exposition métallique, ne soit pas applicable pour un organisme ayant été exposé toute sa vie aux métaux.

Nous avons aussi observé chez le bivalve que la proportion de Cd dans chaque fraction était stable avec l'augmentation des concentrations de Cd dans le cytosol des branchies (moyenne±ET): 81±7% du Cd cytosolique était lié à la fraction MT, 7±3% était associé à la fraction LMW et 13±7% était lié à la fraction HMW. Une telle tendance correspond probablement à un état stationnaire dans l'échange de Cd entre les ligands cytosoliques en excès (i.e., [L] >> [M]), avec un pourcentage de Cd lié à chaque ligand correspondant à leur affinité relative pour le Cd et à la concentration de chacun, selon l'équation:

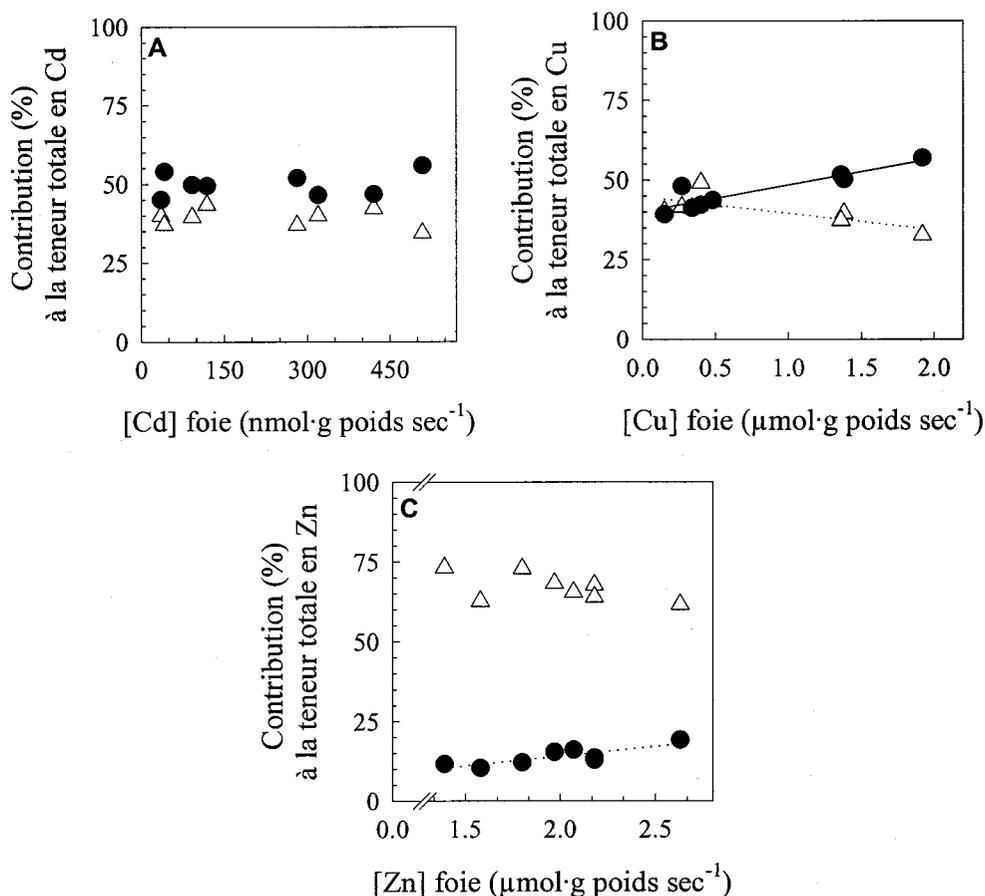
$$\%Cd - ligand = \frac{[L] \times K_{ML}}{\sum [L] \times K_{ML}} \times 100$$

##### 4.5.2 Perchaude

Chez la perchaude, les concentrations de Cd, de Cu, de Zn et de Ni dans chacune des fractions subcellulaires étaient reliées linéairement aux concentrations métalliques de chaque métal dans le foie entier, sauf pour les [Cd] dans la fraction granules pour lesquelles nous n'avons mesuré

aucune relation significative (Chapitre 10). Tout comme pour le bivalve, le modèle de "spillover", proposant un débordement de métal dans les fractions sensibles suite à la saturation de la métallothionéine, semble donc invalidé chez la perchaude indigène.

Nous avons mesuré une majeure partie des teneurs en Cd et en Cu dans la fraction "MT" alors que les teneurs les plus élevées en Zn et en Ni se trouvaient dans la fraction "enzymes". La liaison du Zn aux enzymes cytosoliques pourrait ne pas provoquer d'effets toxiques puisque ce métal est essentiel, alors que la liaison du Ni aux enzymes altère probablement leurs fonctions, ce qui pourrait mener à des effets toxiques (Chapitre 10).



**Figure 8.** Relations entre les concentrations métalliques dans le foie entier de la perchaude et la contribution relative des fractions sensible et déttoxiquée à la teneur total en métal pour (A) le cadmium (B) le cuivre et (C) le zinc. Chaque point représente des données pour des perchaudes récoltées dans un lac particulier. Significations des symboles:  $\triangle$  Fraction sensible aux métaux (noyaux / restes,

mitochondries et "enzymes"), —●—: Fraction détoxiquée (fractions "MT" et granules).

Les contributions relatives des fractions sensibles et détoxiquées à la teneur en Cd dans le poisson entier étaient stables chez la perchaude (figure 6), à l'exception des contributions des fractions détoxiquées aux teneurs totales en Cu et en Zn qui augmentaient significativement avec l'accroissement des concentrations de chacun de ces métaux dans le foie entier (figures 6B et 6C). Cela suggère une protection partielle par la MT et les granules contre les effets toxiques potentiels du Cu et du Zn dans les lacs contaminés par ces métaux et se reflète, pour le Cu, dans la diminution de la contribution de la fraction sensible aux teneurs totales en Cu avec l'augmentation de Cu dans le foie entier.

#### **4.6 Effets toxiques induits par les métaux.**

##### **4.6.1 Bivalve**

Chez le bivalve, nous avons décelé une augmentation de l'exposition des cellules branchiales au stress oxydant, tel que mesuré par les concentrations de malondialdéhyde, avec l'accroissement du Cd cytosolique (Chapitre 8). Les concentrations de malondialdéhyde n'étaient pas reliées aux concentrations cytosoliques de Cu et de Zn. Nous suggérons que le Cd puisse provoquer une dégradation des membranes cellulaires par l'inhibition d'antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques (Chapitre 8).

Dans la glande digestive des bivalves, les concentrations de malondialdéhyde n'étaient pas reliées à l'exposition métallique mais les activités de la glutathion peroxydase et de la glutathion réductase s'accroissaient avec l'exposition au Cu. Cela suggère que le Cu est responsable de la production d'espèces réactives oxygénées dans la glande digestive, et qu'une activité accrue des antioxydants, dont la glutathion réductase et la glutathion peroxydase, arrivent à limiter le stress oxydant au niveau basal.

Nous avons mesuré un accroissement des concentrations en lipides totaux de la gonade avec l'accroissement des concentrations en carbone et azote sestoniques, mais ce paramètre n'était corrélé à aucun paramètre toxicologique. Le potentiel des concentrations en lipides comme

indicateur d'exposition métallique chez les bivalves indigènes semble donc limité. Chez des animaux relativement bien acclimatés à l'exposition métallique comme chez les bivalves indigènes, il n'est pas surprenant qu'un tel paramètre général de condition soit plus influencé par une variabilité d'origine écologique que par une variabilité d'origine toxicologique.

#### 4.6.2 Perchaude

Chez les perchaudes échantillonnées en 2000 dans les lacs de Rouyn-Noranda, une diminution significative du facteur de condition avec l'accroissement des concentrations de Cd dans le foie et dans le rein a été observée (Chapitre 9). L'étude réalisée l'année subséquente dans les régions combinées de Rouyn-Noranda et de Sudbury ne permit cependant pas de confirmer la généralité de cette réponse (Chapitre 11). En effet, le facteur de condition des poissons échantillonnés lors de cette deuxième étude ne décroissait qu'avec le logarithme naturel des concentrations en Ni, et pas avec les concentrations des autres métaux étudiés. Une diminution du facteur de condition, liée à l'exposition métallique, a été observée dans plusieurs autres études sur la perchaude des mêmes régions (Rouyn-Noranda- Laflamme et al., 2000; Lévesque et al., 2002; Sudbury-Eastwood and Couture, 2002; Rajotte and Couture, 2002; Audet and Couture, 2003). Cependant, aucune de ces études n'a tenté de relier la baisse du facteur à l'exposition à un métal en particulier. Nos résultats supportent les conclusions de Couture and Rajotte (2003) à l'effet que les indices de condition peuvent être utilisés comme outils pour évaluer la condition générale de perchaudes exposées aux métaux. Cependant, étant donnée que ce facteur n'est pas toujours corrélé aux concentrations du même métal, son utilité semble variable, et il devrait être jumelé à d'autres mesures (de condition, biomarqueur ou autre) avant de conclure sur la présence d'effets toxiques chez des perchaudes indigènes dont l'indice de condition est relativement bas.

L'indice hépatosomatique (HSI), pour sa part, ne diminuait pas significativement avec les concentrations de Cd<sup>2+</sup> mesurées dans l'eau des lacs de Rouyn-Noranda mais les perchaudes du lac Osisko avaient un indice hépatosomatique significativement plus faible que celui des perchaudes de n'importe quel lac à l'exception du lac Dufault (Chapitre 9). Chez les perchaudes échantillonnées dans les régions combinées de Rouyn-Noranda et de Sudbury, l'indice hépatosomatique n'était pas relié aux concentrations métalliques mesurées dans l'eau des lacs ou

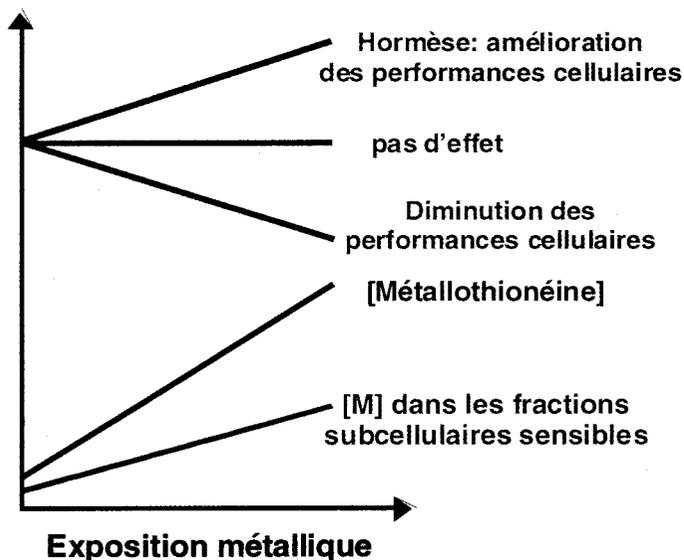
à celles mesurées dans le foie (Chapitre 11). Ces résultats, ainsi que des résultats obtenus sur la perchaude de la même région (Laflamme et al., 2000), nous permettent de conclure, à l'exemple de Couture et Rajotte (2003), que cet indice n'est pas un bon marqueur d'exposition pour les perchaudes indigènes.

Une diminution des concentrations de malondialdéhyde a été observée avec l'augmentation des concentrations de Cu hépatique chez les perchaudes (Chapitre 11). Cette réponse est à l'opposé de notre hypothèse de départ (Section 2.5) et pourrait refléter une stimulation des mécanismes antioxydants qui dépasserait les stricts besoins des cellules pour contrer l'accroissement des espèces oxygénées réactives consécutive à l'exposition au Cu. Nous avons pu vérifier en partie cette possibilité par la mesure de quelques antioxydants. Aucun des antioxydants préconisé (glutathion, glutathion peroxydase et glutathion réductase) n'a démontré de stimulation suite à l'exposition au Cu. Nous avons donc envisagé la possibilité que la métallothionéine ait été l'antioxydant responsable de la baisse des concentrations de malondialdéhyde avec l'accroissement du Cu accumulé. En effet, cette protéine est synthétisée de manière importante dans le foie des perchaudes des lacs les plus contaminés des régions de Rouyn-Noranda et de Sudbury (Chapitre 10; Laflamme et al., 2000) et elle est reconnue comme étant un antioxydant chez plusieurs espèces (Wright et al., 2000; Viarengo et al., 1999).

## 5 Discussion et intégration des résultats

### 5.1 Modèle du débordement de la métallothionéine ou "spillover"

D'après les résultats obtenus chez les 2 espèces sentinelles, le modèle du "spillover" (cf. Introduction, section 1.1.2) ne semble pas s'appliquer à des organismes indigènes. En effet nous avons observé une augmentation constante de l'accumulation métallique dans les fractions potentiellement sensibles aux métaux avec l'augmentation de l'exposition métallique, et ce chez les deux espèces étudiées (figure 7).



**Figure 9.** Le modèle classique de "spillover" de la MT (cf. figure 2, Section Introduction) ne semble pas s'appliquer aux organismes indigènes. En effet, les métaux nonessentiels sont liés aux fractions subcellulaires sensibles, même à de faibles concentrations d'exposition métallique dans l'environnement. La synthèse de MT est proportionnelle à l'exposition et n'atteint pas de plateau même chez les animaux récoltés dans les lacs les plus enrichis en métaux. Tel que préconisé, l'accumulation métallique dans les fractions subcellulaires sensibles est reliée à une diminution des performances cellulaires pour certaines des fonctions mesurées, mais pour d'autres nous avons aussi mesuré aucun effet ou une amélioration des performances de la cellule.

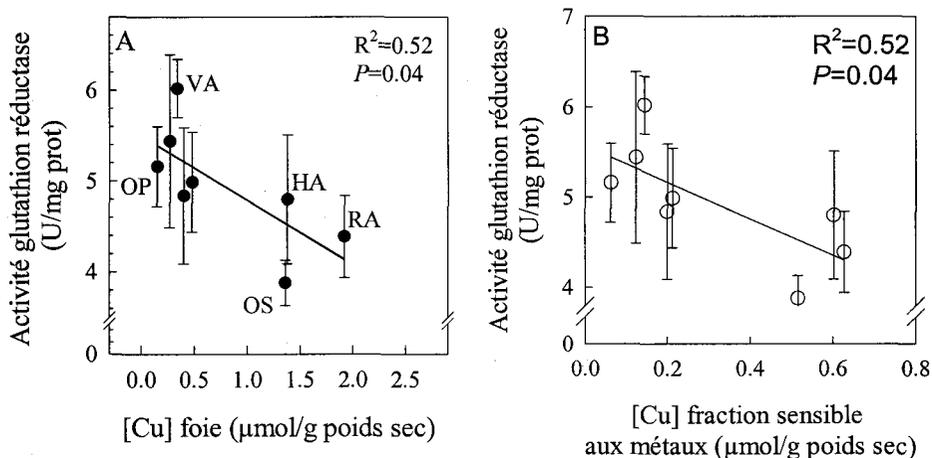
Cela suggère que les effets toxiques découlant de cette liaison non-spécifique des métaux puissent se manifester même à une faible exposition, et non à partir d'un certain seuil, tel que le modèle du débordement le propose. Nous avons aussi observé des concentrations croissantes de

métallothionéines avec l'augmentation de l'exposition métallique, ce qui suggère que les capacités de synthèse de cette protéine ne soient pas limitées, même aux concentrations métalliques les plus importantes mesurées dans le milieu.

Nous avons pu comparer la répartition subcellulaire des métaux entre des bivalves transplantées d'un lac de référence vers un lac contaminé (Couillard et al., 1995a) et des bivalves indigènes (notre étude, Chapitre 8). Cette comparaison révéla une proportion importante de Cd (~90%) dans les fractions subcellulaires sensibles chez les bivalves transplantés alors que cette proportion n'atteignait que ~20% chez les bivalves indigènes des lacs contaminés. Ces observations suggèrent que le modèle du débordement, élaboré à partir d'observations faites sur des animaux exposés en laboratoire à des concentrations élevées de métaux, s'applique bien à ce type d'expériences, mais qu'un autre modèle de toxicité devrait être proposé pour des organismes qui sont exposés de manière chronique à des concentrations métalliques élevées.

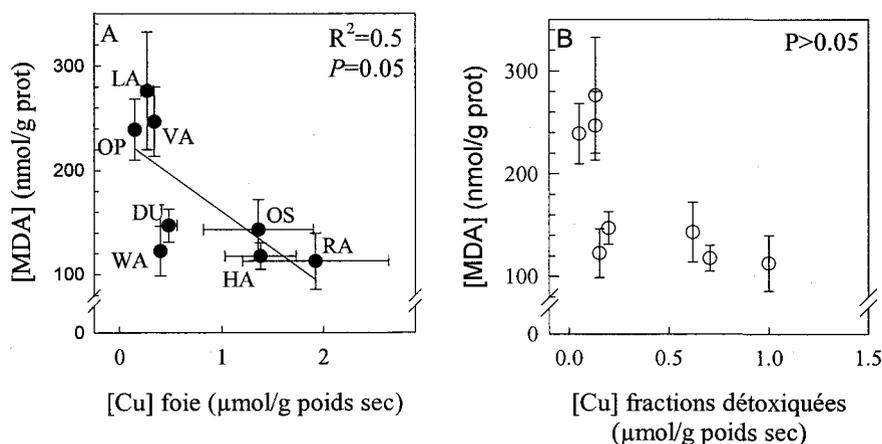
Le dernier corollaire du modèle du débordement est que le métal lié de manière non-spécifique aux fractions subcellulaires potentiellement sensibles permet de prédire les effets toxiques observés au niveau subcellulaire. Dans le but de vérifier l'utilité de la répartition subcellulaire des métaux pour prédire leurs effets, nous avons donc mesuré la répartition subcellulaire dans le cytosol branchial du bivalve, par chromatographie, ce qui nous a informés des concentrations de Cd et de Cu dans 2 fractions cytosoliques potentiellement sensibles aux métaux (fractions de faible et de haut poids moléculaire) ainsi que dans une fraction vouée à la détoxification, la fraction métallothionéine. Chez la perchaude, la répartition subcellulaire dans le foie a été mesurée par centrifugation différentielle, ce qui nous a donné les concentrations de Cd, de Cu, de Zn et de Ni dans 3 fractions potentiellement sensibles aux métaux (fractions noyaux / restes, mitochondries et "enzymes") et dans 2 fractions vouées à leur détoxification (fractions granules et "métallothionéine"). La fraction microsomes / lysosomes a été exclue de cette analyse puisqu'elle combine à la fois une organite potentiellement sensible aux métaux, le réticulum endoplasmique, et des organites ayant des fonctions de détoxification, les lysosomes. Pour chaque animal, nous avons ensuite mesuré plusieurs paramètres, dont des marqueurs de stress oxydants ([malondialdéhyde], les activités de la glutathion peroxydase et de la glutathion réductase, [glutathion]) et chez les bivalves un paramètre de condition, les [lipides] dans la



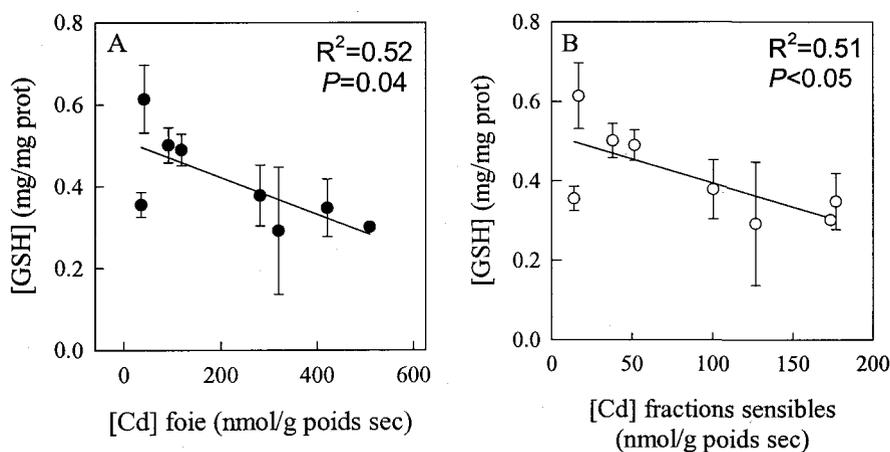


**Figure 10.** Relations entre l'activité de la glutathion réductase et (A) les concentrations de Cu bioaccumulées dans le foie entier des perchaudes ou (B) les concentrations de Cu bioaccumulées dans les fractions sub-cellulaires sensibles aux métaux (noyaux / restes, mitochondries et "enzymes").

En général pour les bivalves (tableau 1) et pour les perchaudes (figures 8, 9 et 10), les coefficients de détermination des relations entre ces paramètres et les concentrations métalliques totales n'étaient pas supérieurs à ceux obtenus pour les relations entre ces paramètres et les concentrations métalliques dans les fractions potentiellement sensibles à la toxicité des métaux, à quelques exceptions près. En effet, chez le bivalve, la variabilité de l'activité de la glutathion réductase est le mieux expliquée par les concentrations de Cu associé à la fraction protéique de faible poids moléculaire et la variabilité dans les concentrations de malondialdéhyde dans la glande digestive est le mieux expliquée par les concentrations de Cu associé aux protéines de haut poids moléculaire (tableau 1). L'amélioration de la prédiction de la toxicité par le fractionnement subcellulaire n'étant cependant pas généralisée à l'ensemble des paramètres testés, il semble présomptueux de conclure en ce sens. Chez la perchaude, pour les concentrations de glutathion oxydé, seul le coefficient de détermination de sa relation avec le Cd mesuré dans la fraction microsomes / lysosomes, était significatif (Annexe B, tableau B-1). La portée de ce dernier résultat est cependant amoindrie par le fait que cette relation n'ait été observée que dans les lacs de Rouyn-Noranda (N=4) et aussi par le fait que cette fraction ne soit classée ni "sensible aux métaux", ni "détoxiquée".



**Figure 11.** Relations entre les concentrations de malondialdéhyde et (A) les concentrations de Cu bioaccumulées dans le foie entier des perchaudes ou (B) les concentrations de Cu bioaccumulées dans les fractions détoxiquées ("métallothionéine", granules).



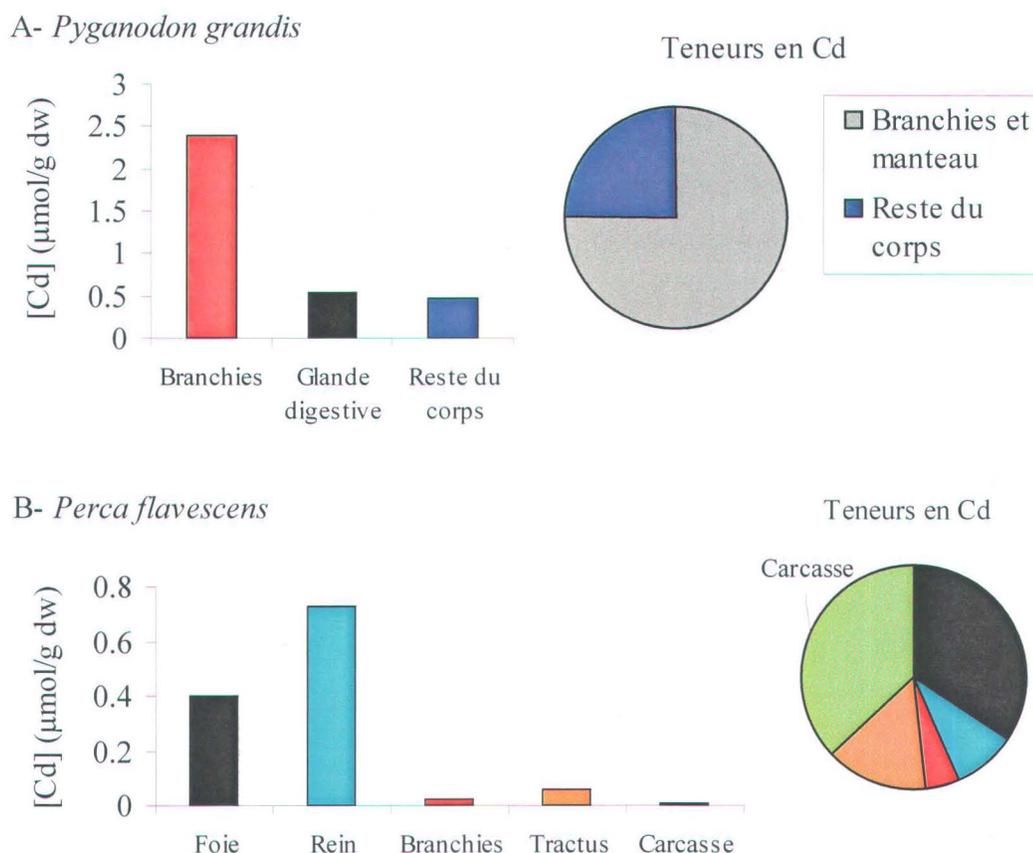
**Figure 12.** Relation entre les concentrations de glutathion et (A) les concentrations de Cd bioaccumulées dans le foie entier des perchaudes ou (B) les concentrations de Cd bioaccumulées dans les fractions sub-cellulaires sensibles aux métaux (noyaux / restes, mitochondries et "enzymes").

Pour les 2 organismes étudiés, les résultats obtenus ne permettent donc pas de conclure à une meilleure prédiction des effets toxiques des métaux à partir de la mesure de leur répartition subcellulaire. Deux éléments pourraient contribuer à ce résultat. En premier lieu, les biomarqueurs de stress oxydant semblent être de meilleurs indicateurs de toxicité induite par le Cu que par le Cd (Di Giulio, 1989; Viarengo et al., 1990; Reddy and Bhagyalakshmi, 1994; Berntssen et al., 2000; Roméo et al., 2000), alors que c'est le Cd qui est le métal le moins bien

régulé par les bivalves (Chapitre 8) et par les perchaudes (Chapitres 9 et 11). En effet, parmi toutes les mesures réalisées chez les deux espèces sentinelles, seules les concentrations de malondialdéhyde dans les branchies du bivalve étaient reliées à une accumulation en cadmium. Les activités des 2 enzymes antioxydants mesurées dans la glande digestive du bivalve, l'activité de la glutathion réductase et les concentrations de malondialdéhyde dans le foie des perchaudes étaient toutes reliées aux concentrations totales bioaccumulées de Cu. En second lieu, les concentrations métalliques dans une fraction subcellulaire en particulier étaient souvent corrélées aux concentrations dans les autres fractions, ainsi qu'aux concentrations mesurées dans l'organe entier (*cf.* valeurs des coefficients de corrélation; Annexe A). En conséquence, la variabilité des paramètres mesurés peut s'expliquer aussi bien par les concentrations dans l'organe entier que par les celles dans une fraction subcellulaire en particulier.

## **5.2 Comparaison des deux organismes sentinelles**

Dans cette section nous comparons les stratégies utilisées par chaque organisme sentinelle pour "gérer" la présence de concentrations élevées de métaux dans le milieu les environnant. Les organes que nous avons ciblés comme étant prioritaires pour l'étude des stratégies de détoxification des métaux sont différents pour chacune des deux espèces. En effet, Couillard et al. (1993) ont trouvé que les branchies étaient la partie du corps présentant les concentrations et les teneurs en Cd les plus importantes chez le bivalve (figure 11A). En conséquence, on ne pourrait prétendre connaître les mécanismes de détoxification du bivalve sans une étude approfondie de cet organe. Chez la perchaude, le rein est l'organe où on trouve les concentrations de Cd les plus élevées, suivi de près par le foie (figure 11B). Par ailleurs, le foie présente des teneurs élevées en Cd (presque autant que la carcasse). Une étude des mécanismes de détoxification du Cd chez la perchaude implique donc l'étude approfondie de son foie. Au plan de la physiologie générale, les fonctions des branchies du bivalve et du foie de la perchaude sont très différentes et il peut donc sembler à prime a bord hasardeux de les comparer. Cependant, au plan de la physiologie des métaux, ces 2 organes jouent un rôle prépondérant pour chacune des espèces sentinelles et leur comparaison est essentielle pour comprendre les différentes stratégies de gestion des métaux des deux organismes.



**Figure 13.** Concentrations et teneurs en Cd de différentes parties du corps de deux organismes récoltés dans des lacs contaminés (A) le bivalve *P. grandis* prélevé dans le lac Vaudray (Couillard et al., 1993), (B) la perchaude *Perca flavescens* prélevée dans le lac Dufault (Chapitre 9).

### 5.2.1 Concentrations d'exposition dans l'eau

Même si les deux espèces étudiées ont été récoltées sensiblement dans les mêmes régions d'étude, elles ont été soumises à des régimes d'exposition différents. Ces différences sont attribuables, d'une part, à des sélections de lacs différentes et, d'autre part, à des années d'échantillonnage différentes (tableau 2).

**Tableau 2.** Concentrations maximales (max) et minimales (min) de l'ion libre métallique, du calcium dissous et pH de l'eau pour l'ensemble des lacs échantillonnés en 1998 pour les bivalves, ainsi que pour ceux échantillonnés pour les perchaudes en 2000 et 2001.

|                          | [Cd <sup>2+</sup> ]<br>(nM) | [Cu <sup>2+</sup> ]<br>(nM) | [Zn <sup>2+</sup> ]<br>(nM) | [Ni <sup>2+</sup> ]<br>(nM) | [Ca] <sub>diss.</sub><br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | pH                  |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|---------------------|
| <b>Bivalve – 1998*</b>   |                             |                             |                             |                             |  |                     |
| max                      | 0.9                         | 54                          | 181                         | -                           | 17.7   | 8.7                 |
| min                      | 0.003                       | 1.4                         | 0.4                         | -                           | 2.0  | 6.2                 |
| max/min                  | 300                         | 39                          | 453                         | -                           | 9  | 316                 |
| <b>Perchaude - 2000†</b> |                             |                             |                             |                             |  |                     |
| max                      | 3.7                         | 6.3 <sup>E</sup> -1         | 1146                        | -                           | 55.1   | 8.2                 |
| min                      | 0.01                        | 1.3 <sup>E</sup> -4         | 2.8                         | -                           | 4.8  | 6.1                 |
| max/min                  | 370                         | 4846                        | 409                         | -                           | 12   | 126                 |
| <b>Perchaude - 2001†</b> |                             |                             |                             |                             |  |                     |
| max                      | 2.3                         | 11                          | 370                         | 1600                        | 25.5   | 9.5                 |
| min                      | 0.02                        | 1 <sup>E</sup> -4           | 0.9                         | 1.9                         | 1.6  | 5.0                 |
| max/min                  | 115                         | 1 <sup>E</sup> 5            | 411                         | 842                         | 16   | 3,1x10 <sup>4</sup> |

\* Concentrations de métaux libres estimées par un modèle basé sur l'équilibre de l'ion libre métallique entre les sédiments oxiques et l'eau.

† Concentrations de métaux libres estimées par WHAM 6.01.

Par exemple, des bivalves vivants n'ont pas été trouvés dans les lacs supportant les concentrations de [Cd<sup>2+</sup>] ambiantes les plus élevées, comme dans les lacs Dufault et Ousisko, alors que des perchaudes ont pu y être récoltées. Les perchaudes en provenance du lac le plus contaminé en 2000 ont donc été exposées à des concentrations 4 fois plus élevées en Cd<sup>2+</sup> et 6 fois plus élevées en Zn<sup>2+</sup> que les bivalves les plus contaminés récoltés en 1998. En outre, les perchaudes récoltées en 2001 ont été exposées à des concentrations élevées en Ni<sup>2+</sup> dans certains lacs, contrairement aux bivalves et aux perchaudes récoltées en 2000.

### 5.2.2 Bioaccumulation métallique

Chez des bivalves et des perchaudes récoltés dans le lac Bousquet, presque au même moment, on observe que les branchies du bivalve présentent des concentrations de Cd environ 90 fois plus importantes que celles de la perchaude et 8 à 9 fois plus importante que le foie de la perchaude (tableau 3). Pour sa part, le Cu semble bien régulé par le bivalve puisque les [Cu]

mesurées dans les branchies de bivalves provenant de lacs enrichis en Cu présentaient des concentrations similaires en Cu que celles chez les animaux récoltés dans les lacs de référence (Chapitre 8). Chez la perchaude, le Cu ne semble être que partiellement régulé puisque des concentrations plus élevées de ce métal ont été mesurées dans le foie de perchaudes provenant des lacs les plus contaminés (lacs Dufault et Osisko: Chapitre 9) comparativement aux mesures faites sur des perchaudes provenant des lacs de référence. Les concentrations de Cu dans le foie des perchaudes provenant du lac Bousquet étaient cependant équivalentes à celles trouvées dans les perchaudes des lacs de référence. Le Zn est un métal régulé par la bivalve (Chapitre 8) et par la perchaude (Chapitre 9 et 11). Les concentrations observées de Cu et de Zn chez des représentants des deux espèces récoltés dans le lac Bousquet reflètent donc une homéostasie (i.e. maintien d'un état stationnaire interne des [Cu] *via* des mécanismes de régulation) plutôt qu'une bioaccumulation de ces métaux.

L'échantillonnage de 2 espèces animales dans l'épilimnion d'un même lac, au même moment, permet de comparer leurs concentrations en métaux bioaccumulés tout en éliminant l'influence de plusieurs variables confondantes attribuables à la physico-chimie de l'eau. Des différences pourraient cependant persister dans l'environnement chimique de ces deux animaux puisque la bivalve vit à l'interface du sédiment et de l'eau alors que la perchaude juvénile utilise plutôt la colonne d'eau entière.

**Tableau 3.** Concentrations métalliques chez des bivalves échantillonnées dans le lac Bousquet en 1997 (notre étude) et 2002 (Emmanuelle Bonneris, École nationale vétérinaire de Lyon, données non-publiées) ainsi que chez des perchaudes échantillonnées dans le même lac en 2000.

| Métal                                 | Bivalves                   | Perchaude |      |
|---------------------------------------|----------------------------|-----------|------|
|                                       | branchies<br>(1997 / 2002) | branchies | foie |
| [Cd] (nmol·g <sup>-1</sup> poids sec) | 910 / 980                  | 10        | 110  |
| [Cu] (nmol·g <sup>-1</sup> poids sec) | 730 / 720                  | 140       | 359  |
| [Zn] (nmol·g <sup>-1</sup> poids sec) | 8040 / 8570                | 1200      | 1570 |

Il se pourrait que les différences observées au niveau des concentrations accumulées soient attribuables aux différentes sources de la contamination métallique chez les 2 espèces. Les bivalves sont exposés au cadmium en solution dans l'eau ainsi qu'à celui présent dans le seston (Harvey et Luoma, 1985; Fisher et al., 1996). Chez les poissons juvéniles, les deux voies de prise en charge existent aussi: via l'eau, par les branchies au cours de la respiration, et via la nourriture (constituée principalement de zooplancton chez les juvéniles; Sherwood et al., 2002) par le tractus gastrointestinal au cours de l'alimentation et de la digestion. Cependant, chez les perchaudes indigènes, des observations indirectes suggèrent une plus grande contribution de la nourriture que de l'eau à la prise en charge du Cd et du Cu (Chapitre 9). Selon le modèle décrit par Thomann (1981) et par Munger et al. (1999), les concentrations à l'état stationnaire chez un organisme qui prend des métaux à la fois de l'eau et de la nourriture sont décrites par l'équation suivante:

$$C_{\text{stat}} = \left[ \underbrace{(k_{\text{eau}} \cdot C_{\text{eau}})}_{\substack{\text{prise en} \\ \text{charge par} \\ \text{l'eau}}} + \underbrace{(EA \cdot TI \cdot C_{\text{nour}})}_{\substack{\text{prise en} \\ \text{charge par} \\ \text{la nourriture}}} \right] / (k_e + k_{\text{croiss}})$$

où  $C_{\text{stat}}$  et  $C_{\text{nour}}$  = concentrations du métal dans l'animal à l'état stationnaire et dans sa nourriture ( $\mu\text{g métal} \cdot \text{g}^{-1}$  poids sec), respectivement,  $k_{\text{eau}}$  = constante de vitesse pour la prise en charge par l'eau ( $\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ),  $C_{\text{eau}}$  = concentrations du métal dans l'eau ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $EA$  = efficacité d'assimilation du métal à partir de la nourriture ( $\text{g métal retenu} \cdot \text{g}^{-1}$  métal ingéré),  $TI$  = taux d'ingestion de la nourriture enrichie en métaux ( $\text{g poids sec de proies} \cdot \text{g}^{-1}$  poids sec du prédateur  $\cdot \text{j}^{-1}$ ),  $k_e$  et  $k_{\text{croiss}}$  = constantes de vitesse pour l'efflux et pour la croissance, respectivement ( $\text{j}^{-1}$ ).

Les différences dans les concentrations bioaccumulées de Cd chez les 2 espèces sentinelles pourraient donc être attribuées à un ou à une combinaison de ces paramètres, à l'exception de  $C_{\text{eau}}$  qui est la même pour les 2 organismes. Par exemple, une prise en charge plus importante d'une des sources de métaux, l'eau ou la nourriture, pourrait mener à des différences importantes dans les concentrations bioaccumulées de métaux entre les espèces. Ainsi, Harrisson et Klaverkamp (1989) ont montré que les poissons exposés uniquement au Cd dissous accumulaient moins de Cd que ceux exposés au Cd dans la nourriture. De plus, les différents types de nourriture des 2 espèces (bivalve = seston; perchaude juvénile = zooplancton)

entraînent vraisemblablement des différences au niveau des concentrations métalliques dans la nourriture des 2 espèces ( $C_{\text{nour}}$ ), de leur efficacité d'assimilation (EA) et de leur taux d'ingestion (TI). Langevoord et al. (1995) ont effectivement démontré que les préférences alimentaires avaient une influence sur la bioaccumulation des métaux chez des poissons indigènes. De plus, Wallace et al. (1998) ont montré que la répartition subcellulaire du Cd dans les proies influençait la biodisponibilité du métal pour un prédateur, en l'occurrence une crevette.

Il n'existe pas d'études, à notre connaissance, qui nous permettent une comparaison aussi détaillée des sources et taux d'échange des métaux chez les 2 espèces d'intérêt. De manière globale, il existe cependant quelques études nous permettant de comparer la prise en charge globale  $\{(k_{\text{eau}} \cdot C_{\text{eau}}) + (EA \cdot TI \cdot C_{\text{nour}})\}$  ainsi que la perte globale ( $k_e \cdot C_a + k_{\text{croiss}} \cdot C_a$ ; où  $C_a$  représente les concentrations du métal dans l'animal en  $\mu\text{g métal} \cdot \text{g}^{-1}$  poids sec).

Ainsi, la constante de vitesse pour la prise en charge du Cd, mesuré chez des bivalves (*P. grandis*) transplantés du lac Opasatica au lac Vaudray était de  $0.7 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  (calculs selon Hare et al., 1990, à partir des données de Couillard et al., 1995b). Pour la perchaude juvénile, la constante de vitesse pour la prise en charge chez des poissons transplantés du lac Opasatica vers le lac Dufault était de  $2.9 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  (données de Lisa Kraemer, INRS-ETE, Québec).

On sait que les mollusques présentent en général des taux de perte (ou efflux) des métaux relativement faibles (résultats d'expositions en laboratoire revus par Langston et Spence, 1995 ainsi que par Langston et Bebianno, 1998). Ainsi, une expérience de transplantation avec *P. grandis* a révélé que les concentrations métalliques changeaient très lentement dans le temps, avec une demi-vie du Cd  $> 0.9$  an (constante de vitesse pour l'efflux de  $0.016 \text{ j}^{-1}$ : calculé à partir de données de Tessier et al., 1986). Trois études distinctes réalisées sur des bivalves ont même observé une élimination métallique nulle chez ces animaux (revue par Roesijadi et Robinson, 1994). Pour la perchaude, nous n'avons pas de mesures d'efflux du Cd. Douben (1989) a mesuré des taux d'élimination du Cd de  $0.2$  à  $0.4 \text{ j}^{-1}$  chez des loches franches (*Noemacheilus barbatulus* L.) qui avaient été exposés au Cd pendant 4 jours. Harrison et Klaverkamp (1989) ont, pour leur part, mesuré une demi-vie du Cd de 27 jours chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et de 24 jours chez le grand corégone (*Coregonus clupeaformis*), tous deux ayant été exposés via la

nourriture pendant 72 jours. L'élimination des métaux semble donc effectivement plus rapide chez les poissons en général que chez les bivalves. La réalisation de ces expériences sur des animaux exposés pendant une période courte relativement aux animaux indigènes diminue cependant l'applicabilité des ces résultats aux animaux indigènes.

Les concentrations métalliques plus faibles chez la perchaude que chez le bivalve pourraient donc être principalement attribuables, d'après l'ensemble de la littérature recensée, à une élimination (efflux) métallique plus importante chez les perchaudes que chez les bivalves, pour une prise en charge assez similaire. Les faibles taux de pertes métalliques observées chez plusieurs espèces de mollusque sont probablement attribuables à une bioaccumulation des métaux dans des fractions subcellulaires relativement moins labiles, tel que discuté à la section suivante.

### 5.2.3 Répartition subcellulaire des métaux

Dans les branchies de bivalves prélevés dans 9 lacs de la région de Rouyn-Noranda, Bonneris et al. (2003) ont observé que la majorité du Cd, du Cu et du Zn était associée à la fraction granules. Parallèlement, dans le foie de la perchaude, nous avons plutôt mesuré une majorité de Cd et de Cu associés à la fraction dite "MT" (Chapitre 10). De plus, dans les branchies de bivalves en provenance du lac le plus contaminé, le lac Vaudray, les concentrations de Cd dans la fraction "MT" ( $\sim 100 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$  poids sec, Bonneris et al., 2003) étaient moins élevées que celles trouvées chez dans le foie des perchaudes du lac le plus contaminé, le lac Raft ( $\sim 270 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$  poids sec, Chapitre 10).

Ces différentes répartitions subcellulaires métalliques pourraient refléter (1) une constante de complexation ( $K_c$ ) plus faible de la MT de bivalve pour le Cd que celle de la MT de poisson pour le même métal ou (2) une synthèse de la MT moins efficace chez le bivalve. Cependant, la présence à la fois de métallothionéine et de granules dans les branchies des bivalves suggère plutôt une plus grande compétition entre différents ligands intracellulaires. En effet, les mollusques ont généralement des ligands métalliques plus diversifiés que les autres organismes aquatiques (Mason et Jenkins, 1995). La perchaude, contrairement aux bivalves, utilise la production de métallothionéine comme principale stratégie de détoxification alors qu'elle n'utilise

pratiquement pas les granules, sauf peut-être pour la détoxification du Cu (Chapitre 10). Chacun des mécanismes de liaison des métaux présente des avantages chimiques spécifiques ainsi que des restrictions. Ainsi, les protéines induites pour lier les métaux représentent un compartiment de grande affinité répondant relativement rapidement aux changements des concentrations métalliques. En conséquence, les métaux y sont plus labiles et leur turnover est relativement plus rapide. D'autre part, plusieurs types d'inclusions, de concrétions et de lysosomes renferment des métaux hautement insolubles (granules) et représentent donc des réservoirs plus stables pour l'entreposage à long terme des métaux toxiques (Fowler, 1987; Langston et al., 1998; Mason et Jenkins, 1995).

L'observation d'une accumulation de Cd principalement dans les granules, pour les branchies de *P. grandis*, permet vraisemblablement d'expliquer que nous avons mesuré des concentrations plus élevées dans les branchies de bivalves récoltés dans le lac Bousquet que dans les branchies ou le foie de perchaudes (section précédente). En effet, chez les perchaudes, le Cd est principalement accumulé dans la métallothionéine cytosolique, un réservoir de métaux reconnu comme plus transitoire que les granules; selon Viarengo et al. (1981 et 1989) et Gross et al. (1989), les complexes M-MT pourraient être excrétés via certains types de lysosomes. Il existe malheureusement peu de données sur les taux de renouvellement et les voies de dégradation du métal associé aux différents compartiments subcellulaires. Certains auteurs ont mesuré des demi-vies de la Zn-MT de 27 j et de 32 j dans le foie et le rein de la plie (*Pleuronectes platessa*) respectivement (revue par Olsson, 1993). Cependant, la demi-vie des MTs est vraisemblablement plus lente pour la Cd-MT que pour les Zn, Cu-MT (revue par Cherian et Chan, 1993). Chez la palourde (*Chlamys opercularis* L.) et le pétoncle (*Pecten maximus*), les demi-vies du métal dans les granules intracellulaires de Ca/Mg étaient d'au moins 3-6 mois (revue par George, 1990). Ces données ne peuvent s'appliquer qu'avec réserve aux 2 espèces sentinelles, celles-ci vivant en eau-douce et étant indigènes, mais elles appuient les idées développées par Fowler (1987), Langston et al. (1998) et Mason et Jenkins (1995) sur le turnover des métaux dans les différents compartiments subcellulaires.

#### 5.2.4 Méthallothionéines

Les concentrations basales de MT étaient plus élevées dans le foie de la perchaude que dans les branchies du bivalve (tableau 4). Chez des organismes non-exposés aux métaux la MT est généralement impliquée dans la régulation des concentrations de Cu et de Zn (Roesijadi, 1992). Ces niveaux de base de MT plus élevés sont conformes aux concentrations basales de Cu (300-400 nmol·g<sup>-1</sup> poids sec) et de Zn (1200-2000 nmol·g<sup>-1</sup> poids sec) plus élevées dans le foie de la perchaude alors que les concentrations basales de MT plus faibles chez le bivalve correspondent à des concentrations basales de Cu (25-75 nmol·g<sup>-1</sup> poids sec) et de Zn (150-450 nmol·g<sup>-1</sup> poids sec) aussi plus faibles.

**Tableau 4.** Concentrations minimales et maximales de différents biomarqueurs de stress oxydants tels que mesurés dans deux organismes récoltés dans des lacs situés le long d'un gradient d'exposition métallique.

| Biomarqueur  | <i>P. grandis</i> |                  | Perchaude |
|--|-------------------|------------------|-----------|
|  | branchies         | glande digestive | foie      |
| [MDA] (nmol·g <sup>-1</sup> poids sec)                       | 7-16              | 50-240           | 14-33     |
| [MT] (nmol sites de liaison de Hg·g <sup>-1</sup> poids sec) | 40-260            | ?                | 250-2900* |
| Glutathion peroxidase (U·g <sup>-1</sup> poids hum.)         | ?                 | 0.1-0.3          | 280-430   |
| Glutathion réductase (U·g <sup>-1</sup> poids hum.)          | ?                 | 0.5-0.6          | 0.7-1.3   |

\*Laflamme et al., 2000

Dans un lac relativement contaminé, le lac Vaudray, les concentrations de méthallothionéine dans le foie de perchaudes récoltées en 1997 étaient de ~500 nmol sites de liaison de Hg·g<sup>-1</sup> poids sec (Laflamme et al., 2000), alors que dans les branchies des bivalves nous avons trouvé ~140 nmol sites de liaison de Hg·g<sup>-1</sup> poids sec en 1998 (Chapitre 8) et ~200 nmol sites de liaison de Hg·g<sup>-1</sup> poids sec en 2002 (E. Bonneris, données non-publiées). Pour fins de comparaisons, Couillard et al. (1993) ont mesuré des concentrations en MT ~4 fois moins élevées dans la glande digestive que dans les branchies de bivalves prélevés dans le lac Vaudray en 1989. Ces différences dans les concentrations de MT synthétisée entre la moule (branchies et glande digestive) et la perchaude (foie) pourraient en partie être attribuables au fait que la synthèse de MT chez le

bivalve est induite principalement par le Cd (Chapitre 8) alors que chez la perchaude les résultats de Laflamme et al. (2000) suggèrent qu'elle puisse être induite par plus d'un des 3 métaux présents dans le milieu (Cd et/ou Cu et/ou Zn). Tel que discuté à la section précédente (Section 5.2.3: Répartition subcellulaire des métaux), ces différences pourraient aussi être dues à des stratégies de détoxification différentes chez les deux espèces.

#### 5.2.5 Défenses antioxydantes

L'indice de peroxydation lipidique sélectionné pour notre étude, les concentrations de malondialdéhyde, a répondu de façon opposée chez les 2 espèces sentinelles (tableau 5). Dans les branchies du bivalve, nous avons observé un accroissement des concentrations de malondialdéhyde avec l'augmentation des concentrations bioaccumulées de Cd. Au contraire, dans le foie de la perchaude nous avons observé un effet de type hormétique; l'augmentation des [Cu] bioaccumulées dans le foie semble avoir provoqué une diminution du niveau de stress oxydant, alors que nous n'avons trouvé aucune relation entre ce paramètre et les [Cd] bioaccumulées. Ce genre de réponse pourrait refléter une stimulation des mécanismes antioxydants dépassant les stricts besoins de la cellule pour contrer la peroxydation lipidique catalysée par l'exposition au Cu. Comme aucun des antioxydants mesurés n'a été stimulé par l'exposition au Cu, nous soupçonnons la métallothionéine d'être responsable de cet effet protecteur chez la perchaude. En effet, des études réalisées *in vitro* sur différentes cellules de poissons ont démontré les capacités antioxydantes de cette protéine (Kling et al., 1996; Schlenk et Rice, 1998; Wright et al., 2000).

Cependant, l'exposition aux métaux a aussi induit une synthèse de métallothionéine chez le bivalve et celle-ci n'a pas provoqué un tel effet d'hormèse chez cette espèce. Il pourrait donc y avoir des différences dans la quantité (cf. Section 5.2.4) et/ou dans la qualité de la métallothionéine chez ces 2 espèces. Laflamme et al. (2000) ont effectivement observé que la synthèse de MT dans le foie de la perchaude était un peu plus importante que celle que nous avons mesuré dans les branchies du bivalve (tableau 4), avec des concentrations de métallothionéine 12X plus élevées chez les perchaudes du lac le plus contaminé par rapport au lac de référence, alors que nous-mêmes avons trouvé 7X plus de MT chez les bivalves en

provenance du lac le plus contaminé par rapport au lac de référence (Chapitre 8). De plus, tel que mentionné à la section 5.2.3, les concentrations de Cd dans la fraction "MT" du foie des perchaudes en provenance du lac le plus contaminé étaient ~3X plus élevées que celles trouvées dans les branchies des bivalves.

En accord avec la notion que la synthèse de MT ne serait pas le mécanisme de détoxification privilégié par le bivalve, contrairement à la perchaude (cf. Section 5.2.3), il est aussi possible que le turnover de la MT soit plus important chez la perchaude (Fowler, 1987). Dans ce cas, les capacités antioxydantes de la métallothionéine chez la perchaude seraient plus considérables que préconisées uniquement à partir des concentrations ponctuelles dans le temps de cette protéine. Pour valider ce modèle il faudrait étudier les taux de renouvellement de la métallothionéine chez les 2 espèces.

Finalement, il serait très intéressant de comparer les différentes caractéristiques des molécules de MT des 2 espèces, pour vérifier si elles permettent d'expliquer leurs différentes répartitions subcellulaires des métaux. Cependant, les métallothionéines de *P. grandis* et de la perchaude n'ont pas été purifiées et caractérisées structurellement à ce jour. On ne connaît donc pas leur composition exacte en acides aminés. La composition en acides aminés de la métallothionéine est cependant connue chez 2 espèces de bivalves, la moule bleue (*M. edulis*) et l'huître (*Crassostrea virginica*) et chez plusieurs espèces de poissons, dont la truite arc-en ciel (*Oncorhynchus mykiss*), la carpe (*Cyprinus carpio*) et la plie (*Pleuronectes platessa*). À la fois pour les poissons et pour les bivalves, les MTs ont été identifiées comme des MTs de classe I (revue par Kay et al., 1991 et par Roesijadi, 1992). Une masse moléculaire de 11 à 15 kD a été mesurée par chromatographie pour la MT des poissons (revue par Kito et al., 1982) alors que chez la moule et l'huître on trouve une masse moléculaire de 10 à 20 kD pour le monomère et le dimère respectivement (revue par Roesijadi, 1992). Pour les 2 groupes on trouve 2 isoformes (revue par Kito et al., 1982 et par Roesijadi, 1992), à l'exception de la moule bleue pour laquelle on a trouvé 4 isoformes (Roesijadi, 1992). Il existe donc plus de similitudes entre les métallothionéines des 2 espèces que de différences dans ce sommaire survol de la littérature, et cela ne nous permet donc pas d'expliquer les différentes répartitions subcellulaires des métaux chez les 2 organismes sentinelles.

Les activités des enzymes antioxydants (glutathion peroxydase et glutathion réductase) ont répondu à la présence d'espèces oxydantes de manière semblable chez les deux espèces sentinelles (tableau 5). En effet, l'accroissement du stress oxydant (tel qu'évalué par les [malondialdéhyde] mesurées dans les branchies) a stimulé l'activité des 2 enzymes dans la glande digestive du bivalve. Suivant la même logique, la baisse du stress oxydant dans le foie de la perchaude a correspondu à une diminution de l'activité de la glutathion réductase. À noter cependant la faible variabilité de l'enzyme glutathion réductase.

**Tableau 5.** Sens de la réponse (ordre de grandeur de la réponse) de différents biomarqueurs de stress oxydant suite à une accumulation de Cd, Cu ou Zn dans différents organes de 2 organismes sentinelles. + avec M= régression positive avec [métal]; - = régression négative avec [M].

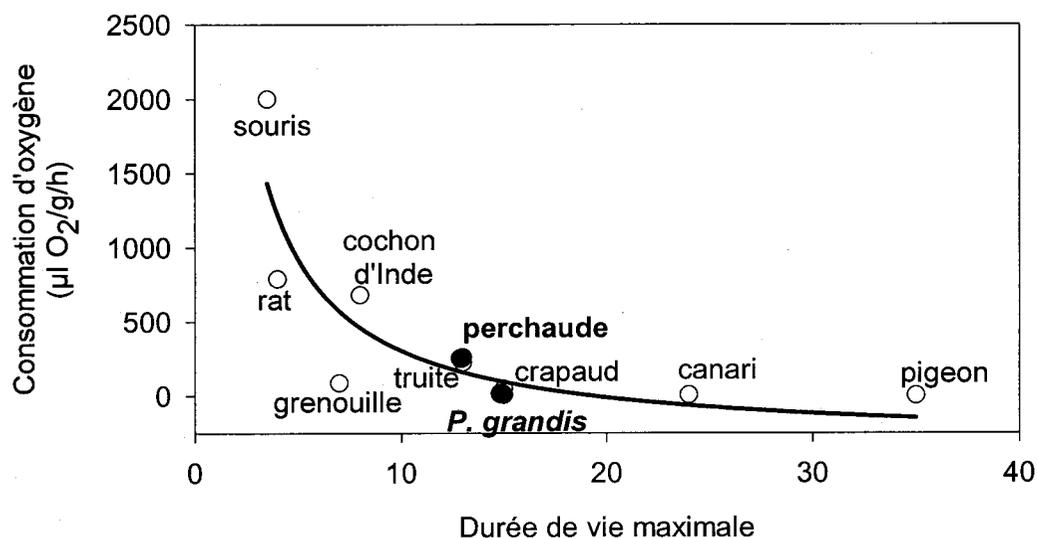
| Biomarqueur   | <i>P. grandis</i> |                  | Perchaude                  |
|---|-------------------|------------------|----------------------------|
|   | branchies         | glande digestive |                            |
| [MDA] (nmol·g poids sec <sup>-1</sup> )                     | + avec Cd (2X)    | p>0.05           | - avec Cu (2X)             |
| [MT]<br>(sites de liaison de Hg·g poids sec <sup>-1</sup> ) | + avec Cd (7X)    | nd               | + avec Cd, Cu ou Zn (12x)* |
| Glutathion peroxydase<br>(U·g poids hum. <sup>-1</sup> )    | nd                | + avec Cu (3X)   | p>0.05                     |
| Glutathion réductase<br>(U·g poids hum. <sup>-1</sup> )     | nd                | + avec Cu (1.2X) | - avec Cu (1.9X)           |

\*Laflamme et al., 2000

Après avoir analysé le sens de la réponse des biomarqueurs suite à l'exposition métallique, nous avons comparé les niveaux de chacun des biomarqueurs. Ainsi, le niveau de stress oxydant, tel que mesuré par les concentrations de malondialdéhyde, est plus élevé dans la glande digestive du bivalve, suivi du foie de la perchaude et finalement des branchies des bivalves (tableau 4). La glande digestive du bivalve regroupe l'équivalent des fonctions du foie et du pancréas de la perchaude. En conséquence, il y a beaucoup plus d'enzymes digestives et d'activité chimique

dans cet organe que dans le foie de la perchaude, ce qui pourrait expliquer que les niveaux de stress oxydant y soient comparativement plus élevés.

Nous avons mesuré des activités d'enzymes antioxydants plus élevées dans le foie de la perchaude que dans la glande digestive du bivalve (tableau 4). Tel que discuté précédemment, nous avons aussi mesuré des concentrations de métallothionéine plus élevées dans le foie de la perchaude que dans les branchies du bivalve. Ces résultats peuvent être interprétés à la lumière de la théorie du vieillissement par les radicaux libres (Free radical theory of aging). Cette théorie s'appuie sur l'observation que le taux métabolique et la consommation d'O<sub>2</sub> sont reliés au niveau de stress oxydant et à la durée de vie d'un organisme (Perez-Campo et al., 1998).



**Figure 14.** Étude comparative de la consommation d'oxygène et de la durée de vie maximale chez plusieurs espèces. Réalisé à partir de données tirées de Perez-Campo et al. (1998) sauf pour les données pour la perchaude et le bivalve. Les données sur la consommation d'O<sub>2</sub> viennent de Chen (1998) pour *P. grandis* et de Couture et Kumar (2003) pour la perchaude. Les données sur la durée de vie maximale viennent de Scott et Crossman (1973) pour la perchaude et de Couillard et al. (1995b) pour *P. grandis*.

Plusieurs études ont montré que le taux métabolique basal, et par conséquent la consommation d'O<sub>2</sub>, étaient les paramètres les plus clairement liés au vieillissement et à la durée de vie chez la majorité des espèces (Perez-Campo et al., 1998). Chez les espèces aérobies, comme le bivalve et

la perchaude, une grande partie de l'oxygène absorbé (95% chez l'humain) est consommé par l'enzyme cytochrome oxydase, dans le système de transport d'électron de la mitochondrie pour produire de l'énergie sous forme d'ATP. Cette production d'ATP engendre la production d'oxygène sous formes extrêmement réactive: anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et radical hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ). Les espèces oxygénées réactives sont donc des produits normaux du métabolisme, et leur production correspond à environ 3% de l'oxygène consommé chez l'humain. Le stress oxydant est observé lorsque la production des espèces oxygénées réactives dépasse les capacités antioxydantes des tissus. Selon la théorie du vieillissement par les radicaux libres, les espèces au métabolisme rapide consommant plus d'oxygène produiraient en conséquence plus d'espèces oxygénées réactives et elles supporteraient donc des concentrations plus élevés de malondialdéhyde. Effectivement, on peut voir à la figure 12 que la perchaude consomme plus d'oxygène et a une durée de vie maximale plus courte que le bivalve. Cela pourrait peut être expliquer que nos mesures des concentrations basales de malondialdéhyde soient plus élevées dans le foie de la perchaude que dans les branchies du bivalve.



## **6 Conclusions**

Ce projet de doctorat a permis d'étudier les liens exposition → bioaccumulation → effets chez deux organismes exposés aux métaux dans leur environnement naturel.

Chez le bivalve indigène, le lien bioaccumulation → effet est celui qui avait été le moins exploré jusqu'ici. Pour pallier ce manque, nous avons mesuré une série de biomarqueurs de stress oxydant et identifié le potentiel des concentrations de malondialdéhyde comme biomarqueur d'effet de l'exposition au Cd. Nous avons aussi identifié le potentiel des enzymes glutathion peroxydase et glutathion réductase comme biomarqueurs d'effet de l'exposition au Cu chez le bivalve.

Chez la perchaude, c'est plutôt le lien exposition → bioaccumulation qui avait été le moins étudié jusqu'ici puisque plusieurs collaborateurs avaient déjà caractérisé certains effets de l'accumulation métallique aux niveaux de l'individu, des populations et des communautés. Nous avons d'abord trouvé que les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{H}^+$  ambiantes n'influençaient pas significativement les concentrations de Cd bioaccumulées dans différents organes de la perchaude, un résultat contrastant avec de nombreux résultats de la littérature montrant l'effet protecteur de ces cations sur la prise en charge métallique chez les poissons exposés aux métaux (cf. modèle du ligand biotique). Nous proposons un modèle alternatif pour des poissons exposés de manière chronique aux métaux, dans lequel la chimie de l'eau ambiante est secondaire à la nourriture des poissons pour comprendre les concentrations accumulées. Nos résultats suggèrent en effet une prise en charge métallique plus importante par la nourriture que par l'eau, ce qui intéressera les gestionnaires responsables de la réglementation relative à l'environnement qui questionnent actuellement la validité des critères de qualités de l'eau basés exclusivement sur les concentrations métalliques dissoutes.

En second lieu, nous avons aussi élargi l'étude du lien accumulation → effets à des niveaux d'organisation biologiques plus négligés jusqu'à présent chez la perchaude, soit aux niveaux des organes ainsi qu'au niveau cellulaire. Ainsi, ce projet a permis d'apprécier le

potentiel d'un indicateur de santé inédit pour les poissons, soit les variations dans la contribution relative de chaque organe aux teneurs totales en Cd et en Cu. Cet indicateur a révélé une dysfonction possible dans les mécanismes d'excrétion du foie et du rein chez les poissons provenant des lacs les plus contaminés. Au niveau cellulaire, l'étude de plusieurs biomarqueurs de stress oxydant a permis de constater la complexité de l'interprétation des résultats relatifs à ces mesures chez la perchaude. En effet, ces différents biomarqueurs ont répondu de façon contradictoire suite à l'exposition aux métaux: certains ont semblé plus sensibles à l'exposition métallique (le glutathion et la glutathion réductase) alors qu'un de ceux-ci n'a pas répondu à l'exposition (la glutathion peroxydase) et que l'autre a répondu de manière opposée à ce qui était attendu (le malondialdéhyde). Ces résultats ont aussi permis de comprendre que les métaux accumulés ont vraisemblablement causé un stress oxydant, mais que l'action d'une combinaison de plusieurs antioxydants (incluant probablement la métallothionéine) a permis de contrôler ce stress au niveau de la cellule. Nos résultats suggèrent que le stress oxydant causé par les métaux n'aura pas de répercussion directe importante au niveau individuel chez la perchaude indigène.

Pour les deux espèces à l'étude, l'utilité de la MT comme biomarqueur **d'exposition** chez les animaux indigènes a été constatée, alors que son potentiel comme biomarqueur **d'effets** demeure discutable. En effet, le bivalve et la perchaude exposés de façon chronique aux métaux dans l'environnement ont accumulé les métaux en proportions stables dans toutes les fractions subcellulaires, ce qui fait que les concentrations accumulées dans l'organe entier ont permis une aussi bonne prédiction d'effets toxiques que les concentrations métalliques dans n'importe quelle fraction subcellulaire. Ces résultats permettent donc d'invalider le modèle du "spillover" chez les deux organismes étudiés, probablement en raison de leur exposition chronique aux contaminants, puisqu'ils contrastent avec les résultats d'expériences d'exposition aiguë. Ces différences permettent finalement de questionner le réalisme de plusieurs expériences de transplantation et d'exposition en laboratoire. Les expériences réalisées en laboratoire sont essentielles pour, par exemple, étudier des mécanismes pointus au niveau cellulaire ou physiologique ou bien pour isoler une variable dans le cas d'un mécanisme fortement influencé par la variabilité des conditions environnementales caractéristique au milieu naturel. Cependant, pour que les

résultats de telles expériences puissent s'appliquer aux animaux exposés dans le milieu naturel, plusieurs conditions devront être réunies. D'abord, la durée d'exposition sera idéalement supérieure au temps nécessaire pour que les concentrations accumulées atteignent l'état stationnaire. De plus, les organismes seront exposés à la même forme métallique que celle à laquelle ils sont exposés en milieu naturel. Finalement, les concentrations d'exposition utilisées pour ces expériences ne dépasseront pas les plus hautes concentrations mesurées dans le milieu naturel.

Il manque actuellement d'informations sur les effets de l'exposition aux mélanges polymétalliques et sur leur synergie (MITE-RN, 2001). Notre projet a permis de cibler, parmi les métaux présents dans les mélanges enrichissant les lacs des régions de Rouyn-Noranda et de Sudbury, ceux qui représentent un risque pour les organismes aquatiques aux concentrations retrouvées dans l'environnement. Ainsi, les deux espèces accumulaient le Cd, ce qui en fait de bons biomoniteurs d'exposition à ce métal, mais leur utilité pour suivre les concentrations de Zn et de Cu dans l'environnement était limitée, certainement en raison du statut essentiel de ces métaux. De plus la perchaude semble être un bon biomoniteur des concentrations de Ni. Cette identification des métaux accumulés par rapport à ceux qui sont bien régulés permettra de choisir les métaux plus problématiques sur lesquels réaliser des analyses toxicologiques plus sophistiquées et sur lesquels étudier, par exemple, les mécanismes de prise en charge.

Finalement, nos résultats ont montré un effet de l'âge des perchaudes sur la bioaccumulation du Cd dans le foie, le rein et les branchies dans une population provenant d'un seul lac, le lac Osisko. Nous avons suggéré que cet effet de l'âge puisse être lié au taux de croissance des poissons. Comme le taux de croissance dépend de multiples facteurs environnementaux, il peut être très variable d'une population à une autre. Les perchaudes provenant de lacs autres que le lac Osisko pourraient démontrer soit un effet de l'âge plus important ou bien aucun effet de l'âge. Pour tenir compte de la possibilité d'un tel effet de l'âge sur la bioaccumulation de Cd chez des poissons provenant d'autres lacs, nous suggérons que leur âge soit considéré lors de leur utilisation comme biomoniteur d'exposition au Cd.

### **6.1 Potentiel de chacune des espèces comme sentinelle**

Les deux espèces étudiées dans le cadre de ce projet se complètent bien puisqu'elles représentent des types écologiques différents: le bivalve se nourrit par filtration et la perchaude juvénile est principalement zooplanctivore. Elles occupent aussi des habitats différents à l'intérieur des mêmes lacs: l'interface entre les sédiments et l'eau pour le bivalve et la zone pélagique de l'épilimnion pour les perchaudes juvéniles. Leur physiologie (métabolisme, systèmes de transport, systèmes digestifs et reproducteurs) est aussi très différente.

Le bivalve semble être un moins bon biomoniteur que la perchaude puisqu'il était présent dans moins de lacs: absent des lacs les plus contaminés de la région de Rouyn-Noranda et absent de la région de Sudbury. Le bivalve est une bonne espèce indicatrice des niveaux de Cd mais non des niveaux de Cu et de Zn (Chapitre 8). Certains facteurs physico-chimiques qui modulent l'accumulation chez *P. grandis* ont déjà été étudiés (Perceval et al., 2002; Couillard et al., 1995b, Tessier et al., 1986). Pour valider l'utilisation des activités de la glutathion peroxydase et de la glutathion réductase chez le bivalve *P. grandis*, les fluctuations saisonnières de l'activité de ces enzymes devraient être étudiées.

Par ailleurs, les informations nécessaires pour évaluer le potentiel de la perchaude comme espèce sentinelle sont plus morcelées puisque l'histoire de la perchaude en tant que biomoniteur est relativement récente. Le présent projet a permis de voir que la perchaude serait potentiellement une bonne espèce indicatrice des concentrations de Cd et de Ni dans le milieu d'exposition alors qu'elle régule les concentrations de Zn et en partie les concentrations de Cu (Chapitres 9 et 11). Avant d'être désignée comme espèce indicatrice, le lien entre concentrations métalliques dans l'eau et celles dans le foie devra cependant être amélioré (Chapitre 11). Nous avons également évalué l'importance de quelques facteurs physico-chimiques sur l'accumulation, comme les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$ , de  $\text{H}^+$  et de métaux autres que celui d'intérêt (Chapitres 9 et 11). Parmi les facteurs physico-chimiques devant toujours être étudiés à ce jour se trouvent les facteurs modulés par les saisons comme la température et les teneurs en  $\text{O}_2$  de l'eau, la conductivité et les

paramètres indicateurs d'eutrophisation. Nous avons aussi évalué l'importance de quelques facteurs biologiques pour l'accumulation métallique dont la croissance (âge et taille, Chapitre 9) ainsi que les stratégies de détoxification et d'entreposage des métaux (Chapitre 10). Au chapitre des facteurs biologique pouvant moduler l'accumulation, nous ne connaissons toujours pas l'influence de la qualité et de la disponibilité de la nourriture, du sexe et du cycle reproducteur. Nous ne connaissons pas non plus la cinétique de l'accumulation des métaux, ni l'influence du stress de capture sur l'induction de métallothionéine chez cette espèce.

## 6.2 Perspectives de recherche

Chez le bivalve *P. grandis*, la contribution relative de l'eau et de la nourriture à la prise en charge du Cd est une question importante qui reste à élucider. De plus, la connaissance de la parenté génétique entre les bivalves des différents lacs permettrait de quantifier la part d'acclimatation et la part d'adaptation qui permettent à ces organismes de tolérer l'exposition aux métaux dans les lacs les plus contaminés. Finalement, il semble impératif de valider l'utilisation de cette espèce comme sentinelle à d'autres régions, en plus de la région de Rouyn-Noranda.

Les résultats obtenus sur la répartition subcellulaire des métaux ont soulevé des interrogations additionnelles, auxquelles les travaux effectués par Émmanuelle Bonneris dans notre laboratoire ont déjà commencé à répondre. Ainsi, on sait maintenant grâce à ces travaux que le bivalve utilise principalement les granules minéraux pour la détoxification des métaux. Ces travaux permettront aussi de voir si la synthèse de granules est accrue avec l'exposition ou bien si les granules initialement présents deviennent de plus en plus concentrés en métaux au cours de l'exposition.

Chez la perchaude, la principale question à élucider à l'heure actuelle concerne le lien entre l'exposition et l'accumulation métallique chez les poissons des régions combinées de Rouyn-Noranda et de Sudbury. Il est suggéré d'étudier d'abord la variabilité temporelle de l'exposition et des concentrations accumulées dans le foie des perchaudes juvéniles. À cette fin, l'échantillonnage d'eau et de poisson devrait être fait dans au moins six lacs de chacune

des deux régions, et à plusieurs reprises durant la saison de croissance. L'exposition des poissons par la nourriture devrait être considérée par la mesure des concentrations métalliques dans les contenus stomacaux des poissons récoltés. Éventuellement, l'activité métabolique, la parenté génétique entre les perchaudes des différents lacs et les communautés benthiques et planctoniques de ces lacs pourraient être étudiées.

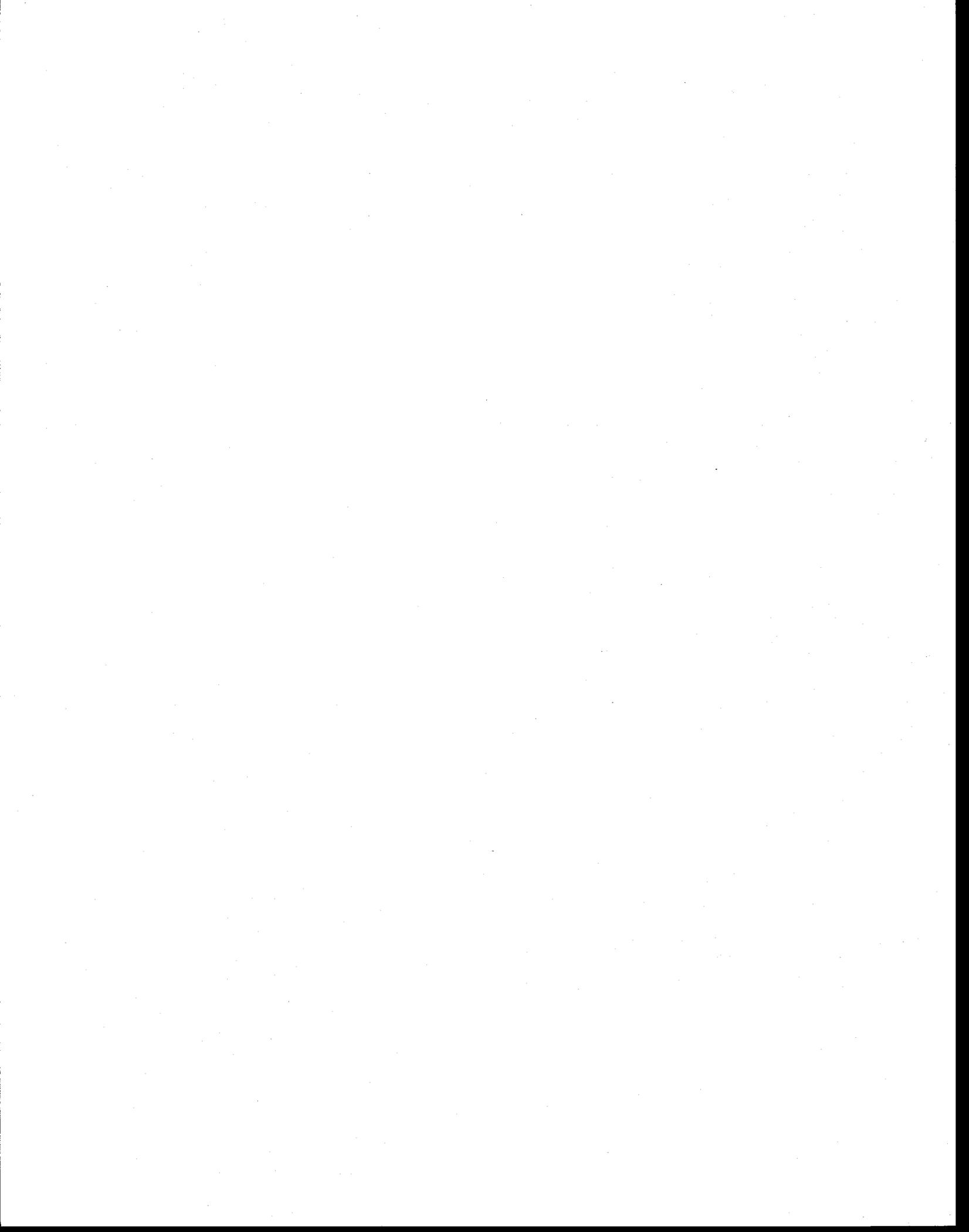
Étant donné l'accroissement des teneurs en Ni associées à la métallothionéine avec l'augmentation des concentrations de Ni accumulées dans le foie des perchaudes, et à cause des résultats contradictoires concernant l'induction de MT par le Ni dans la littérature, il serait intéressant de vérifier si des concentrations réalistes de Ni parviennent à induire la synthèse de MT. De plus, nos observations d'une accumulation non-spécifique de Ni dans la fraction "enzymes", combinées à l'observation de la diminution du facteur de condition des poissons avec l'accroissement des concentrations accumulées de Ni, appellent une analyse plus poussée des impacts de l'accumulation du Ni sur les réserves antioxydantes de la perchaude, ce qui pourrait être réalisé avec un gradient métallique composé d'au minimum 6 lacs. De plus, comme l'étude inter-organes réalisée en 2000 n'a pas considéré l'accumulation du Ni, une étude de l'accumulation de ce métal dans plusieurs organes semble indiquée pour déterminer les organes principaux d'accumulation.

Il serait également important de corroborer, par des travaux sur la perchaude, l'observation faite chez le bivalve que le "spillover" n'est qu'un phénomène transitoire typique d'animaux soumis à une exposition récente aux métaux. L'étude de transplantation de perchaudes amorcée par Lisa Kraemer permettra de comparer la répartition subcellulaire des métaux que nous avons mesuré chez ces organismes exposés durant toute leur vie aux métaux à celle d'organismes subissant plus un stress d'exposition instantanée aux métaux.

Chez les deux espèces, on sait maintenant qu'une accumulation métallique non-spécifique de métaux se produit dans des compartiments potentiellement sensibles à la présence de ces métaux, comme les enzymes cytosoliques, mitochondries, le réticulum endoplasmique et les noyaux. Il serait intéressant de mesurer des fonctions spécifiques à chacun de ces organites pour voir les impacts de l'accumulation métallique sur ces fonctions. Par

exemple, les activités des enzymes liés à la respiration mitochondriale (déhydrogénases) ou au métabolisme des glucides dans la mitochondrie (pyruvate-, malate- et glutamate déhydrogénases) pourraient être mesurées dans le foie entier et dans la fraction mitochondriale de poissons récoltés le long d'un gradient de contamination. La stabilité des membranes lysosomales pourrait aussi être vérifiée au moyen de test du rouge neutre, ce qui permettrait de vérifier l'effet de l'accumulation métallique dans cette fraction cellulaire, tout en vérifiant le niveau de stress oxydant cellulaire.

L'étude comparative du bivalve et de la perchaude a soulevé la question de l'importance du turnover des métaux dans les différents compartiments subcellulaires ayant une fonction de détoxification. Le transfert du métal à partir des fractions MT et granules vers la fraction lysosomale et enfin son excrétion pourraient être explorés par des expériences de suivi de métaux radio-marqués ("pulse-chase"), des concentrations de cystéine et de soufre inorganique dans chacun de ces compartiments.



## 7 Liste des références

- AALTO, S.K. et G.E. Newsome. 1990. "Additional evidence supporting demic behaviour of a yellow perch (*Perca flavescens*) population". Can. J. Fish. Aquat. Sci., vol. 47, p. 1959-1962.
- AUDET, D. et P. Couture. 2003. "Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments". Can J. Fish. Aquat. Sci., vol. 60, p. 269-278.
- BAKER, J.P. et S.W. Christensen. 1991. "Effect of acidification on biological communities in aquatic ecosystems". In D.F. Charles (éd.). *Acidic deposition and aquatic ecosystems*. Springer-Verlag, New York. pp. 83-106.
- BAY, S.M., D.J. Greenstein, P. Szalay et D.A. Brown. 1990. "Exposure of scorpionfish (*Scorpaena guttata*) to cadmium: biochemical effects of chronic exposure". Aquat. Toxicol., vol. 16, p. 311-320.
- BENSON, W.H. et W.J. Birge. 1985. "Heavy metal tolerance and metallothionein induction in fathead minnows: results from field and laboratory experiments". Environ. Toxicol. Chem., vol. 4, p. 209-217.
- BERNTSSEN, M.H.G., A.K. Lundebye et K. Hamre . 2000. "Tissue lipid peroxidative responses in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) parr fed high levels of dietary copper and cadmium". Fish Physiol. Biochem., vol. 23, p. 35-48.
- BONNERIS, E., A. Giguère, S. Masson et P.G.C. Campbell. 2003. "Sub-cellular partitioning of essential and non-essential metals in a freshwater mollusc, *Pyganodon grandis*, collected in the field along a polymetallic environmental gradient". J. Phys. IV Proceedings, vol. 107- I, p. 197-200.
- BRADLEY, R.W. et J.R. Morris. 1986. "Heavy metals in fish from a series of metal contaminated lakes near Sudbury, Ontario". Water Air Soil Pollut., vol. 27, p. 341-354.
- BROWN, D.A. et T.R. Parsons. 1978. "Relationship between cytoplasmic distribution of mercury and toxic effects to zooplankton and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) exposed to mercury in a controlled ecosystem.". J. Fish. Res. Board Can., vol. 35, p. 880-884.
- BUS, J.S. et J.E. Gibson. 1979. "Lipid peroxidation and its role in toxicology". Rev. Biochem. Toxicol., vol. 1, p. 125-149.
- CAMPBELL, P.G.C. 1995. "Interaction between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model". In A. Tessier et D.R. Turner (éd.). *Metal*

- speciation and bioavailability in aquatic system. John Wiley & Sons Ltd, New York. pp. 45-102.
- CAMPBELL, P.G.C., A.G. Lewis, P.M. Chapman, A.A. Crowder, W.K. Fletcher, B. Imber, S.N. Luoma, P.M. Stokes et M. Winfrey. 1988. "Biologically available metals in sediments". National Research Council of Canada No. NRCC-27694, Ottawa.
- CAMPBELL, P.G.C. et P.M. Stokes. 1985. "Acidification and toxicity of metals to aquatic biota". Can. J. Fish. Aquat. Sci., vol. 42, p. 2034-2049.
- CAMPBELL, P.G.C., O. Érrécalde, C. Fortin, V.P. Hiriart-Baer et B. Vigneault. 2002. "Metal bioavailability to phytoplankton - applicability of the biotic ligand model". Comp. Biochem. Physiol., vol. 133C, p. 189-206.
- CARLBERG, I. et B. Mannervik. 1985. "Glutathione reductase". Methods Enzymol., vol. 113, p. 484-490.
- CHAPMAN, P.M. et F.Y. Wang. 2000. "Issues in ecological risk assessment of inorganic metals and metalloids". Human and Ecological Risk Assessment, vol. 6, p. 965-988.
- CHEN, L.-Y. "The respiratory physiology and energy metabolism of freshwater mussels and their responses to lack of oxygen". Thèse de doctorat, Blacksburg, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- CHERIAN, M.G. et H.M. Chan. 1993. "Biological functions of metallothionein - a review". In K.T. Suzuki, N. Imura et M. Kimura (éd.). Metallothionein III. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland. pp. 87-109.
- CHRISTIE, N.T. et M. Costa. 1984. "In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. IV. Disposition of metals in cells: interactions with membranes, glutathione, metallothionein, and DNA". Biol. Trace Element Res., vol. 6, p. 139-158.
- CHUBATSU, L.S., M. Gennari et R. Meneghini. 1992. "Glutathione is the antioxidant responsible for resistance to oxidative stress in V79 chinese hamster fibroblasts rendered resistant to cadmium". Chem.-Biol. Interactions, vol. 82, p. 99-110.
- CLARKE, A.H. 1981. "Les mollusques d'eau douce au Canada". Musée national des sciences naturelles/Musées nationaux du Canada, Ottawa.
- COSSU, C., A. Doyotte, M. Babut, A. Exinger et P. Vasseur. 2000. "Antioxydant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments". Ecotox. Environ. Saf., vol. 45, p. 106-121.

- COUILLARD, Y. 1997. "Technical evaluation of metallothionein as a biomarker for the mining industry". Aquatic Effects Technology Evaluation (AETE) Program. CANMET, Natural Resources Canada, Ottawa.
- COUILLARD, Y., P.G.C. Campbell, J. Pellerin-Massicotte et J.C. Auclair. 1995a. "Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. II. Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence for cytotoxicity, and links to effects at higher level of biological organization." Can. J. Fish. Aquat. Sci., vol. 52, p. 703-715.
- COUILLARD, Y., P.G.C. Campbell et A. Tessier . 1993. "Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient". Limnol. Oceanogr., vol. 38, p. 299-313.
- COUILLARD, Y., P.G.C. Campbell, A. Tessier, J. Pellerin-Massicotte et J.C. Auclair. 1995b. "Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I. Temporal changes in metallothionein and metal (Cd, Cu, and Zn) concentrations in soft tissues." Can. J. Fish. Aquat. Sci., vol. 52, p. 690-702.
- COUTURE, P. et P.R. Kumar. 2003. "Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*)". Aquat. Toxicol., vol. 64, p. 107-120.
- COUTURE, P. et J.W. Rajotte. 2003. "Morphometric and metabolic indicators of metal stress in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from Sudbury, Ontario: a review". J. Environ. Monit., vol. 5, p. 216-221.
- CROTEAU, M.-N., L. Hare et A. Tessier. 2002. "Increases in food web cadmium following reductions in atmospheric inputs to some lakes". Environ. Sci. Technol., vol. 36, p. 3079-3082.
- CROTEAU, M.-N., L. Hare et A. Tessier. 1998. "Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lake". Environ. Sci. Technol., vol. 32, p. 1348-1353.
- CUSIMANO, R.F., D.F. Brakke et G.A. Chapman. 1986. "Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*)". Can. J. Fish. Aquat. Sci., vol. 43, p. 1497-1503.
- DALLINGER, R. et H. Kautzky. 1985. "The importance of contaminated food for the uptake of heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*): a field study". Oecologia, vol. 67, p. 82-89.
- DI GIULIO, R.T., P.C. Washburn, R.J. Wenning, G.W. Winston et C.S. Jewell. 1989. "Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress". Environ. Toxicol. Chem., vol. 8, p. 1103-1123.

- DOUBEN, P.E.T. 1989. "Uptake and elimination of waterborne cadmium by the fish *Noemacheilus barbatulus* L. (stone loach)". Arch. Environ. Contam. Toxicol., vol. 18, p. 576-586.
- DOYOTTE, A., C. Cossu, M.C. Jacquin, M. Babut et P. Vasseur. 1997. "Antioxydant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*". Aquat. Toxicol., vol. 39, p. 93-110.
- DURAND, J.P., F.P. Carvalho, F. Goudard, J. Pieri, S.W. Fowler et O. Cotret. 1999. "Po-210 binding to metallothioneins and ferritin in the liver of teleost marine fish". Mar. Ecol. Prog. Ser., vol. 177, p. 189-196.
- EASTWOOD, S. et P. Couture. 2002. "Seasonal variations in condition and liver metal concentrations of yellow perch (*Perca flavescens*) from a metal contaminated environment". Aquat. Toxicol., vol. 58, p. 43-56.
- ENGEL, D.W. et M. Brouwer. 1987. "Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus* : metallothionein function in metal metabolism.". Biol. Bull., vol. 173, p. 239-251.
- ENGEL, D.W. et G. Roesijadi. 1987. "Metallothionein: a monitoring tool". In W.B. Vernberg, A. Calabrese, F.P. Thurberg et F.J. Vernberg (éd.). *Pollution physiology of estuarine organisms*. University of South Carolina Press, pp. 421-438.
- FARAG, A.M., C.J. Boese, D.F. Woodward et H.L. Bergman. 1994. "Physiological changes and tissue metal accumulation in rainbow trout exposed to foodborne and waterborne metals". Environ. Toxicol. Chem., vol. 13, p. 2021-2029.
- FISHER, N.S., J.-L. Teyssié, S.W. Fowler et W.-X. Wang. 1996. "Accumulation and retention of metals in mussels from food and water: a comparison under field and laboratory conditions". Environ. Sci. Technol., vol. 30, p. 3232-3242.
- FOWLER, B.A. 1987. "Intracellular compartmentation of metals in aquatic organisms: roles in mechanisms of cell injury". Environ. Health Perspect., vol. 71, p. 121-128.
- GEORGE, S.G. 1990. "Biochemical and cytological assessments of metal toxicity in marine animals". *Heavy metals in the marine environment*. CRC Press Inc., Florida, pp. 123-142.
- GROSS, J.B., B.M. Myers, L.J. Kost, S.M. Kuntz et N.F. LaRusso. 1989. "Biliary copper excretion by hepatocytes lysosomes in the rat". J. Clin. Invest., vol. 83, p. 30-39.
- HALLIWELL, B. et M.C. Gutteridge. 1984. "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease". Biochem. J., vol. 219, p. 1-14.
- HARE, L. 1992. "Aquatic insects and trace metals: Bioavailability, bioaccumulation, and toxicity". Crit. Rev. Toxicol., vol. 22, p. 327-369.

- HARE, L., E. Saouter, P.G.C. Campbell, A. Tessier, F. Ribeyre et A. Boudou. 1990. "Dynamics of cadmium, lead, and zinc exchange between nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* (Ephemeroptera) and the environment". Can. J. Fish. Aquat. Sci., vol. 48, p. 39-47.
- HARRISON, S.E. et J.F. Klaverkamp. 1989. "Uptake, elimination and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) and lake whitefish (*Coregonus clupeaformis* Mitchill)". Environ. Toxicol. Chem., vol. 8, p. 87-97.
- HARVEY, R.W. et S.N. Luoma. 1985. "Separation of solute and particulate vectors of heavy metal uptake in controlled suspension-feeding experiments with *Macoma balthica*". Hydrobiologia, vol. 121, p. 97-102.
- HOLLIS, L., J.C. McGeer, D.G. McDonald et C.M. Wood. 2000. "Effects of long term sublethal Cd exposure in rainbow trout during soft water exposure: Implications for biotic ligand modelling". Aquatic Toxicol., vol. 51, p. 93-105.
- JOHANSSON, C., D.J. Cain et S.N. Luoma. 1986. "Variability in the fractionation of Cu, Ag, and Zn among cytosolic proteins in the bivalve *Macoma balthica*". Mar. Ecol. Prog. Ser., vol. 28, p. 87-97.
- KÄGI, J.H.R. 1991. "Overview of metallothionein". Meth. Enzymol., vol. 205, p. 613-626.
- KAY, J., A. Cryer, B.M. Darke, P. Kille, W.E. Lees, C.G. Norey et J.M. Stark. 1991. "Naturally occurring and recombinant metallothioneins: structure, immunoreactivity and metal-binding functions". Int. J. Biochem., vol. 23, p. 1-5.
- KITO, H., Y. Ose, V. Mizuhira, T. Sato, T. Ishikawa et T. Tazawa. 1982. "Separation and purification of (Cd, Cu, Zn)-metallothionein in carp hepatopancreas". Comp. Biochem. Physiol., vol. 73C, p. 121-127.
- KLING, P., L.J. Erkell, P. Kille et P.-E. Olsson. 1996. "Metallothionein induction in rainbow trout gonadal (RTG-2) cells during free radical exposure". Mar. Environ. Res., vol. 42, p. 33-36.
- KOSOWER, N.S. et E.M. Kosower. 1978. "The glutathione status of cells". Int. Rev. Cytol., vol. 54, p. 109-160.
- LAFLAMME, J.-S., Y. Couillard, P.G.C. Campbell et A. Hontela. 2000. "Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, and Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes". Can. J. Fish. Aquat. Sci., vol. 57, p. 1692-1700.
- LANGEVOORD, M., M. Kraak, M. Kraal et C. Davids. 1995. "Importance of prey choice for Cd uptake by carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings". J. N. Am. Benthol. Soc., vol. 14, p. 423-429.

- LANGSTON, W.J., M.J. Bebianno et G.R. Burt. 1998. "Metal handling strategies in molluscs". *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman & Hall, London, U. K. pp. 219-283.
- LANGSTON, W.J. et K. Spence. 1995. "Biological factors involved in metal concentrations observed in aquatic organisms". In A. Tessier et D.R. Turner (éd.). *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. John Wiley & Sons, New York, pp. 407-478.
- LAWRENCE, R.A. et R.F. Burk. 1976. "Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver". *Biochem. Biophys. Res. Com.*, vol. 71, p. 952-958.
- LEE, B.G., S.B. Griscom, J.S. Lee, H.J. Choi, C.H. Koh, S.N. Luoma et N.S. Fisher. 2000. "Influences of dietary uptake and reactive sulfides on metal bioavailability from aquatic sediments". *Science*, vol. 287, p. 282-284.
- LEE, J.G., S.B. Roberts et F.M.M. Morel. 1995. "Cadmium: a nutrient for the marine diatom *Thalassiosira weissflogi*". *Limnol. Oceanogr.*, vol. 40, p. 1056-1063.
- LEROY, P., A. Nicolas, M. Wellman, F. Michelet, T. Oster et G. Siest. 1993. "Evaluation of *o*-Phthalaldehyde as bifunctional fluorogenic post-column reagent for glutathione in LC". *Chromatographia*, vol. 36, p. 130-134.
- LEVESQUE, H.M., T.W. Moon, P.G.C. Campbell et A. Hontela. 2002. "Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field". *Aquat. Toxicol.*, vol. 60, p. 257-267.
- MALLORY, M.L., D.K. McNicol, D.A. Cluis et C. Laberge. 1998. "Chemical trends and status of small lakes near Sudbury, Ontario, 1983-1995: evidence of continued chemical recovery". *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, vol. 55, p. 63-75.
- MASON, A.Z. et K.D. Jenkins. 1995. "Metal detoxification in aquatic organisms". In A. Tessier et D.R. Turner (éd.). *Metal speciation and bioavailability in aquatic ecosystems*. John Wiley & Sons Ltd, New York, pp. 478-608.
- MICALLEF, S., Y. Couillard, P.G.C. Campbell et A. Tessier. 1992. "An evaluation of the HPLC-gel chromatographic method for analysing metallothioneins in aquatic organisms". *Talanta*, vol. 39, p. 1073-1079.
- MITE-RN. 2001. "Metals in the Environment – Research Network Science Policy Workshop Summary Report". <http://www.mite-rn.org/files/workshopv200.pdf>
- MUNGER, C. et L. Hare. 1997. "Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): implications for predicting Cd bioaccumulation in nature". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 31, p. 891-895.
- MUNGER, C., L. Hare et A. Tessier. 1999. "Cadmium sources and exchange rates for *Chaoborus* larvae in nature". *Limnol. Oceanogr.*, vol. 44, p. 1763-1771.

- OLSSON, P.-E. 1993. "Metallothionein gene expression and regulation in fish". In P.W. Hochachka et T.P. Mommsen (éd.). *Biochemistry and molecular biology of fishes*, vol.2. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam pp. 259-278.
- OLSSON, P.-E. et C. Haux. 1986. "Increased hepatic metallothionein content correlates to cadmium accumulation in environmentally exposed perch (*Perca fluviatilis*)". *Aquat. Toxicol.*, vol. 9, p. 231-242.
- PAGENKOPF, G.K. 1983. "Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 17, p. 342-347.
- PALACE, V.P. et J.F. Klaverkamp. 1993. "Variation of hepatic enzymes in three species of freshwater fish from precambrian shield lakes and the effect of cadmium exposure". *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 104C, p. 147-154.
- PERCEVAL, O., B. Pinel-Alloul, G. Methot, Y. Couillard, A. Giguère, P.G.C. Campbell et L. Hare. 2002. "Cadmium accumulation and metallothionein synthesis in freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*): relative influence of the metal exposure gradient versus limnological variability". *Environ. Pollut.*, vol. 118, p. 5-17.
- PEREZ-CAMPO, R., M. Lopez-Torres, S. Cadenas, C. Rojas et G. Barja. 1998. "The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach". *J. Comp. Physiol. B.*, vol. 168, p. 149-158.
- PINEL-ALLOUL, B., O. Perceval, A. Giguère, Y. Couillard, P.G.C. Campbell et L. Hare. 2004. "Évaluation de la métallothionéine comme biomarqueur d'exposition au cadmium et de toxicité pour les invertébrés d'eau douce: Étude de cas en région minière". In E. Pelletier, P.G.C. Campbell et F. Denizeau (éd.). *Écotoxicologie moléculaire - Principes fondamentaux et perspectives de développement*. Québec, sous presses.
- PLAYLE, R.C., D.G. Dixon et K. Burnison. 1993b. "Copper and cadmium binding to fish gills: estimates of metals-gills stability constants and modelling of metal accumulation". *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, vol. 50, p. 2678-2687.
- PYNNÖNEN, K. 1995. "Effect of pH, hardness and maternal pre-exposure on the toxicity of Cd, Cu and Zn to the glochidial larvae of a freshwater clam *Anodonta cygnea*". *Water Res.*, vol. 29, p. 247-254.
- RAJOTTE, J.W. et P. Couture. 2002. "Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*)". *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, vol. 59, p. 1296-1304.
- REDDY, P.S. et A. Bhagyalakshmi. 1994. "Lipid peroxidation in the gill and hepatopancreas of *Oziotelphusa senex senex* Fabricius during cadmium and copper exposure". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 53, p. 704-710.

- REGOLI, F. 1998. "Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*". Arch. Environ. Contam. Toxicol., vol. 34, p. 48-63.
- ROESIJADI, G. 1992. "Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals". Aquat. Toxicol., vol. 22, p. 81-114 .
- ROESIJADI, G. et G.W. Fellingham. 1987. "Influence of Cu, Cd, and Zn preexposure on Hg toxicity in the mussel *Mytilus edulis*". Can. J. Fish. Aquat. Sci., vol. 44, p. 680-684.
- ROESIJADI, G. et W.E. Robinson. 1994. "Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation, and release". Aquatic toxicology: molecular, biochemical, and cellular perspectives. Lewis publisher, London pp. 387-420.
- ROMEO, M., N. Bennani, M. GnassiaBarelli, M. Lafaurie et J.P. Girard. 2000. "Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*". Aquat. Toxicol., vol. 48, p. 185-194.
- ROY, I. et L. Hare. 1999. "Relative importance of water and food as cadmium sources to the predatory insect *Sialis velata* (Megaloptera)". Can. J. Fish. Aquat. Sci. vol. 56, p. 1143-1149.
- SCHLENK, D. et C.D. Rice. 1998. "Effect of zinc and cadmium treatment on hydrogen peroxide-induced mortality and expression of glutathione and metallothionein in a teleost hepatoma cell line". Aquat. Toxicol., vol. 43, p. 121-129.
- SCOTT, W. B. et E.J. Crossman. "Freshwater Fish of Canada". 1973. Ottawa, Bull. Fish. Res. Board Can. No.184.
- SHERWOOD, G.D., I. Pazzia, A. Moeser, A. Hontela et J.B. Rasmussen. 2002. "Shifting gears: enzymatic evidence for the energetic advantage of switching diet in wild-living fish". Can. J. Fish. Aquat. Sci., vol. 59, p. 229-241.
- SHERWOOD, G.D., J.B. Rasmussen, D.J. Rowan, J. Brodeur et A. Hontela. 2000. "Bioenergetic costs of heavy metal exposure in yellow perch (*Perca flavescens*): in situ estimates with a radiotracer (Cs-137) technique". Can. J. Fish. Aquat. Sci., vol. 57, p. 441-450.
- STUMM, W. et Morgan, J.J. 1996. "Aquatic Chemistry". John Wiley & Sons, New York.
- SUNDERMAN, F.W., A. Marzouk, S.M. Hopper, O. Zaharia et M.C. Reid. 1985. "Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats". Ann. Clin. Lab. Sci., vol. 15, p. 229-236.
- SZEBEDINSZKY, C., J.C. McGeer, D.G. McDonald et C.M. Wood. 2001. "Effects of chronic Cd exposure via the diet or water on internal organ-specific distribution

- and subsequent gill Cd uptake kinetics in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem., vol. 20, p. 597-607.
- TAKEDA, H. et C. Shimizu. 1982. "Existence of the metallothionein-like protein in various fish tissues". Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., vol. 48, p. 711-715.
- TESSIER, A., J.C. Auclair, P.G.C. Campbell, P. Ardisson, D. Huizenga, R. Shenk, et C. Legrand. 1986. "Étude de la biodisponibilité de métaux traces particulières pour des pélecypodes". INRS-Eau, Université du Québec, Québec.
- TESSIER, A., P.G.C. Campbell, J.-C. Auclair et M. Bisson. 1984. "Relationships between the partitioning of trace metals in sediments and their accumulation in the tissues of the freshwater mollusc *Elliptio complanata*". Can. J. Fish. Aquat. Sci., vol. 41, p. 1463-1472.
- TESSIER, A., Y. Couillard, P.G.C. Campbell et J.C. Auclair. 1993. "Modeling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve *Anodonta grandis*". Limnol. Oceanogr., vol. 38, p. 1-17.
- THOMANN, R.V. 1981. "Equilibrium model of fate of microcontaminants in diverse aquatic food chains". Can. J. Fish. Aquat. Sci., vol. 38, p. 280-296.
- THOMAS, P. et H.W. Wofford. 1993. "Effects of cadmium and Arochlor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues". Aquat. Toxicol., vol. 27, p. 159-178.
- THOMAS, P. et H.W. Wofford. 1984. "Effects of metals and organic compounds on hepatic glutathione, cysteine, and acid soluble thiol levels in Mullet (*Mugil Cephalus L.*)". Toxicol. Appl. Pharmacol., vol. 76, p. 172-182.
- TORREILLES, J. et M.-C. Guerin. 1990. "Nickel (II) as a temporary catalyst for hydroxyl radical generation". FEBS, vol. 272, p. 58-60.
- UNGER, M.E. et G. Roesijadi. 1996. "Increase in metallothionein mRNA accumulation during Cd challenge in oysters preexposed to Cd". Aquat. Toxicol., vol. 34, p. 185-193.
- VENUGOPAL, N.B.R.K., T.V.D.D. Ramesh, D.S. Reddy et S.L.N. Reddy. 1997. "Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in a freshwater field crab, *Barytelphusa guerini*". Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 59, p. 132-138.
- VIARENGO, A., B. Burlando, M. Cavaletto, B. Marchi, E. Ponzano et J. Blasco. 1999. "Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*". Am. J. Physiol., p. R1612-R1619.

- VIARENCO, A., L. Canesi, M. Pertica, G. Poli, M.N. Moore et M. Orunesu. 1990. "Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam.". Comp. Biochem. Physiol., vol. 97C, p. 37-42 .
- VIARENCO, A., M. Pertica, L. Canesi, A. Mazzucotelli, M. Orunesu et J.M. Bouquegneau. 1989. "Purification and biochemical characterization of a lysosomal copper-rich thionein-like protein involved in metal detoxification in the digestive gland of mussels". Comp. Biochem. Physiol., vol. 93C, p. 389-395.
- VIARENCO, A., G. Zanichchi, M.N. Moore et M. Orunesu. 1981. "Accumulation and detoxication of copper in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam.: a study of the subcellular distribution in the digestive gland cells.". Aquatic toxicology, vol. 1, p. 147-157.
- WALLACE, W.G., B.-G. Lee et S.N. Luoma. 2003. "Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM)". Mar. Ecol. Prog. Ser., vol. 249, p. 183-197.
- WALLACE, W.G., G.R. Lopez et J.S. Levinton. 1998. "Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp". Mar. Ecol. Prog. Ser., vol. 172, p. 225-237.
- WANG, D., Y. Couillard, P.G.C. Campbell et P. Jolicoeur. 1999. "Changes in subcellular metal partitioning in the gills of the freshwater bivalve (*Pyganodon grandis*) living along an environmental cadmium gradient". Can. J. Fish. Aquat. Sci. vol. 56, p. 774-784.
- Windermere Humic Aqueous Model (WHAM). Version 6.0.1 Windermere (U.K) Center for Hydrology and Ecology, Natural Environment Research Council. 2001.
- WINGE, D., J. Krasno et A.V. Colucci. 1973. "Cadmium accumulation in rat liver: correlation between bound metal and pathology". Trace element metabolism in animals-2. University Park Press, Baltimore pp. 500-502.
- WOFFORD, H.W. et P. Thomas. 1988. "Effects of xenobiotics on peroxidation of hepatic microsomal lipids from striped mullet (*Mugil cephalus*) and Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*)". Mar. Environ. Res., vol. 24, p. 285-289.
- WRIGHT, D.A. 1977. "Toxicity of fluoride to brown trout fry (*Salmo trutta*)". Environ. Pollut., vol. 12, p. 57-61.
- WRIGHT, J., S. George, E. MartinezLara, E. Carpena et M. Kindt. 2000. "Levels of cellular glutathione and metallothionein affect the toxicity of oxidative stressors in an established carp cell line". Mar. Environ. Res., vol. 50, p. 503-508.

**PARTIE II**

**Articles scientifiques**



8 1<sup>er</sup> article

**État stationnaire de la distribution des métaux entre la métallothionéine et les autres ligands cytosoliques et liens avec la cytotoxicité chez des bivalves vivant le long d'un gradient polymétallique.**

**Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient.**

*Anik Giguère<sup>1</sup>, Yves Couillard<sup>2</sup>, Peter G.C. Campbell<sup>1</sup>, Olivier Perceval<sup>3</sup>, Landis Hare<sup>1</sup>, Bernadette Pinel-Alloul<sup>3</sup> and Jocelyne Pellerin<sup>4</sup>*

<sup>1</sup> INRS-ETE, Université du Québec, C.P. 7500, Sainte-Foy, QC, Canada G1V 4C7

<sup>2</sup> Direction des Substances Existantes, Environnement Canada,  
Place Vincent Massey, 351 Bd Saint-Joseph, Hull, QC, Canada K1A 0H3

<sup>3</sup> Groupe Interuniversitaire en Limnologie, Département de Sciences biologiques,  
Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre ville, Montréal, QC, Canada H3C 3J7

<sup>4</sup> Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER), Université du Québec à Rimouski,  
310 Allée des Ursulines, Rimouski, QC, Canada G5L 3A1



## Abstract

The present study was designed to assess the environmental effects of metals in a field setting. We explored exposure → bioaccumulation → effects relationships in freshwater molluscs exposed to metals in their natural habitat. Indigenous floater mussels (*Pyganodon grandis*) were collected from 10 limnologically similar lakes located along a Cd, Cu and Zn gradient. Ambient free-metal ion concentrations were estimated as a measure of metal exposure. Metallothionein was measured in mussel gills and metal partitioning among the various cytosolic protein pools was determined by size exclusion chromatography. Various biomarkers were also measured, including malondialdehyde concentrations in the gills and in the digestive gland, glutathione-peroxidase and glutathione-reductase activities in the digestive gland, and lipid concentrations in the gonad.

Cadmium and metallothionein concentrations in the gill cytosol increased along the contamination gradient, but Cu and Zn levels were independent of the ambient free-metal ion concentrations. The distribution of Cd among the various cytosolic complexes remained quite constant: 80% in the metallothionein-like pool, 7% in the low molecular weight pool (LMW < 1.8 kDa) and 13% in the high molecular weight pool (HMW > 18 kDa). For these chronically exposed molluscs there was thus no threshold exposure concentration above which spillover of Cd occurred from the MT pool to other cytosolic ligands. However, the presence of Cd in the LMW and HMW fractions suggests that metal detoxification was imperfect, i.e. that *P. grandis* was subject to some Cd-related stress at low chronic exposure concentrations. Consistent with this suggestion, malondialdehyde concentrations, an indicator of oxidative stress, increased with gill cytosolic Cd. In the digestive gland, malondialdehyde concentrations were unrelated to any of the measured metals, but glutathione-peroxidase and glutathione-reductase activities increased with gill cytosolic copper. We speculate that cytosolic Cu catalyses the production of reactive oxygen species, to which the organism reacts by increasing activities of the two enzymes, thus preventing the accumulation of reactive oxygen

species. Lipid concentrations in the gonad did not decrease with any of the measured toxicological parameters, suggesting that energy reserves for reproduction were not compromised in the metal-contaminated mussels.

The results of the present study, where chronically exposed bivalves were collected from their natural habitat along a metal contamination gradient, contrast markedly with what would have been predicted on the basis of experimental metal exposures, and clearly demonstrate the need to study metal exposure → bioaccumulation → effects relationships in natural populations.

Keywords: chronic toxicity, oxidative stress, detoxification, subcellular partitioning, malondialdehyde, molluscs

## Introduction

In the laboratory, the biological availability, accumulation and toxicity of metals are usually best predicted by the activity of the free-metal ion  $\{M^{z+}\}$  or one of its kinetically labile complexes, rather than by total metal concentrations (Campbell, 1995). In nature, however, such relations are difficult to demonstrate, particularly in the case of toxicity. A lack of adverse effects in the field could be due to detoxification and compensation strategies that counter metal toxicity within cells.

Metal toxicity is often postulated to arise from reactions in the cytosol, through the non-specific binding of metals to non-thionein ligands that are physiologically important molecules (metalloenzymes or small peptides such as glutathione) and are inactivated by metal binding (Mason and Jenkins, 1995). Control of intracellular metal toxicity is generally achieved via the production of metal-binding ligands that sequester metals. These cellular ligands can be found in the particulate fraction of cells (granules and lysosomes; George, 1990) and in the cytosol (peptides such as metallothionein; Engel and Roesijadi, 1987). Most of the data supporting this model of metal cytotoxicity have however been obtained in laboratory experiments; there are few studies relating subcellular metal partitioning to toxic effects in indigenous animals. In typical laboratory studies, the test organisms are subjected to a step-change in metal exposure, and the occurrence of deleterious effects is linked to changes in subcellular metal partitioning. In such studies, metal concentrations are often higher than those encountered in the field, the duration of exposure shorter, and metal sources such as food are usually ignored (Malley et al., 1993; Luoma, 1995). In addition, metals are usually present in the field as metal mixtures, in contrast to typical laboratory experiments. Although laboratory studies have the advantage that they yield readily interpretable results, they often fail to represent what is happening in the environment.

The objective of our study was thus to test this general model of cellular toxicity in the field. We chose a filter-feeding bivalve as our sentinel organism, which we collected

from a series of lakes of similar trophic characteristics but differing in their metal concentrations (Cd, Cu, Zn). Metal and metallothionein (MT) concentrations were measured in gills excised from these bivalves, and the subcellular partitioning of metals in the gill cytosol was determined by size-exclusion chromatography. We looked for links between metal binding to various ligands and the onset of deleterious effects at the cellular level.

## **Materials and Methods**

### **The sentinel organism: the floater mussel (Pyganodon grandis)**

The freshwater mussel Pyganodon grandis, formerly known as Anodonta grandis grandis, is widely distributed in Canada and in the United States. It lives half-buried in the littoral sediment during summer (Ghent et al., 1978). Shell length can reach 160 mm, but in lakes on the Canadian Shield it generally averages 75 mm. Individuals are thought to live up to the age of 15 years, and like all unionids P. grandis passes through a larval stage, the glochidium, which requires a fish host.

### **Study area**

The sampled lakes are located in the vicinity of Rouyn-Noranda, a city located about 600 km north-west of Montréal, Québec, Canada. A large copper smelter, the Horne smelter, has been in operation in Rouyn-Noranda since 1927; atmospheric emissions are presently largely controlled, but prior to 1985 the smelter was an important source of metals and sulphur dioxide. In the year immediately preceding the present study (i.e., summer 1997), we carried out a preliminary sampling campaign. Water and sediment samples were collected at 37 sites in 20 lakes, to characterise the sites from a geochemical and limnological perspective. Specimens of the sentinel organism, P. grandis, were also collected at each site and tissue metal levels were determined. For the present study (summer 1998), using multivariate statistical analyses of the 1997 data, we selected 10 lakes from the original set of 20 that would present the narrowest range of limnological

characteristics while having the widest metal concentration gradient possible (Perceval et al., 2002).

### **Sampling procedures**

#### **Metal exposure**

To determine the degree of exposure of molluscs to ambient metals, SCUBA-equipped divers collected 3 sediment cores at each station. The cores were extruded in the boat, and only the upper oxidised layer (0.5 cm) was retained for analysis. These 3 sub-samples were pooled, placed in high density polyethylene (HDPE) bottles half-filled with lake water and kept at  $\sim 4^{\circ}\text{C}$  during transport to the central laboratory where they were kept frozen until analysis. The sediments were subjected to a partial extraction procedure as described in Couillard et al. (1993). Based on the sediment metal, organic carbon and amorphous iron oxyhydroxide concentrations, together with the pH of the overlying water, we estimated free  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations at the sediment-water interface, using a geochemical model based on the sorptive equilibrium of the free-metal ions between oxic sediments and water. The model for  $\text{Cd}^{2+}$  is described in Tessier et al. (1993) and the model for  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  can be found in Tessier (1992).

#### **Bivalves**

At each sampling site, the divers also collected 12 bivalves, which were kept alive and returned to the field laboratory; dissection was performed at most 6 hours after collection. Based on a previous study in the Rouyn-Noranda area, which had demonstrated that gills contain the greatest proportion ( $40 \pm 13\%$ ) of Cd present in *P. grandis* (Tessier et al., 1993), we chose the gills as our target organ, although complementary measurements were done on the gonad and digestive gland. To minimise the influence of possible seasonal variations in metal detoxification status (Baudrimont et al., 1997), animals with similar nominal lengths of 80 mm (75-85 mm) were collected before the onset of gametogenesis, shortly after their rise from deep sediments in the spring.

### Limnological parameters

To evaluate habitat quality for *P. grandis*, water samples were collected 10 cm above the lake bottom, 2 times during the ice-free season. Temperature, pH, conductivity and dissolved oxygen were measured in the field whereas water samples for analyses of total phosphorus, dissolved organic carbon, humic acids (HA) and fulvic acids (FA) were taken to the laboratory for later analysis. Water samples for chlorophyll-*a*, phaeopigments and sestonic C and N were pre-filtered through a Nitex® sieve (80 µm) in the field; analysis of the gut contents of another freshwater bivalve, *Elliptio complanata*, showed that >90% of the particles were smaller than 80 µm (Tessier et al., 1984). Methods for the analysis of all limnological parameters and results obtained are described in Perceval et al. (2002).

### Tissue preparation

Gills from each of 12 bivalves were separated into 3 portions. Portions from different animals were then pooled in groups of 4 and sealed in plastic bags under a nitrogen atmosphere before freezing in liquid nitrogen. In this way, triplicate pooled samples were prepared for each of the 3 types of analyses described below. Digestive glands and gonads, 12 per lake, were frozen individually. After initial freezing, organs were kept at -80°C until analysis. Metallothionein analyses were carried out 4 months after collection whereas measurements of subcellular partitioning, malondialdehyde, total lipids and enzymes were done within 8 months of collection.

After thawing on ice, tissues were mechanically homogenised with a glass tube and pestle. To limit organelle disruption, homogenisation was limited to 60 revolutions/min, and to a maximum of one minute. Antioxidants were not used since they are known to alter subcellular partitioning of metals (Lobel, 1989). Instead, gill oxidation was minimised by injecting gaseous nitrogen into the tube during homogenisation. To limit enzymatic protein degradation, all homogenate manipulations were performed at ~4°C in ice-cold buffer (Lobel, 1989). All reagents used for the buffer preparations were of ACS grade or equivalent.

The first gill portion was homogenised in Tris buffer (25 mM, pH 7.2; 2 mL per g tissue wet weight) and sub-samples of this homogenate were used for determinations of total cytosolic metal concentrations, subcellular partitioning of metals and dry weight to wet weight ratios. The second portion was homogenised in Tris buffer for MT analysis (1 mL per g tissue wet weight). The third gill portion was homogenised in KCl (154 mM; 1 to 3 mL per g tissue wet weight) for malondialdehyde (MDA) analysis; the same procedure was used for one digestive gland.

Three digestive glands were pooled and homogenised in phosphate buffer (0.2 M, pH 7; 1 to 5 mL per g tissue wet weight) containing 2 mM EDTA for the measurement of glutathione-peroxidase and glutathione-reductase activities. Lastly, 3 gonads were pooled and homogenised in phosphate buffer (0.1 M, pH 7; 1 to 5 mL per g tissue wet weight) for total lipids analysis.

#### **Determination of metal partitioning**

Determinations of the subcellular partitioning of metals were performed on the gill cytosolic fraction, defined as the supernatant from an ultracentrifugation of the tissue homogenate at 160,000 X g during 1 hour. To evaluate metal subcellular partitioning, the cytosol was fractionated by high-performance liquid chromatography (HPLC, Waters Action Analyzer chromatograph, equipped with a Waters 996 photodiode array detector) on a steric exclusion column (BIOSEP-SEC-S 2000; 30 X 0.75 cm). The column was eluted with a mobile phase of 10 mM Tris, 100 mM NaCl, and 0.03% NaN<sub>3</sub>, adjusted to pH 7, at a flow rate of 0.5 mL/min. This eluant has been shown to limit protein adsorption to the column packing (Micallef et al., 1992). The separation technique is fully described in Wang et al. (1999) with the difference that eluting fractions were collected more frequently (every 2 min) in the present study.

All reagents used for metal subcellular partitioning analysis were of HPLC grade, with the exception of NaCl, which was unavailable in that purified form. The stock solution of NaCl (ACS grade, 2 M) was passed through a Chelex ion exchange resin (200-400 mesh,

BioRad #142-2842) to minimise Zn contamination of the eluant. The matrix modifier used during metal analysis ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  10%) was also purified in this manner.

For statistical comparisons, the metal burdens measured in each eluting fraction were combined into 3 metal-ligand pools (Fig. 1):

- a high molecular weight pool (245-18 kDa), eluting from 14 to 20 min after injection, which includes metalloenzymes;
- a metallothionein-like pool (18-1.8 kDa), eluting from 20 to 30 min after injection, which displays many of the characteristics of metallothionein (heat stability, synthesis induced by metal exposure, high affinity for binding trace metals, low aromatic content, ratio of 0.3 HS- groups per amino acid residue; Couillard et al., 1993);
- a low molecular weight pool (<1.8 kDa), eluting from 30 to 40 min after injection, which includes amino acids and small peptides such as glutathione. Glutathione, an important antioxidant, elutes 34 to 36 min after injection.

#### Quality control

Separation of the metal-ligand complexes present in gill cytosols was performed chromatographically. We performed quality control tests to determine the recovery of metals initially present in the gill cytosol preparation. For Cd and Cu most of the mass balance recoveries were in the 80-120% range, but for Zn 94% of the injected samples had a recovery of less than 80%. Silica-based packing materials used in size exclusion HPLC columns show a high affinity for Zn and it is not unusual to see losses of Zn during chromatography. However, this loss of Zn should not greatly perturb the cytosolic distributions of Cd and Cu, given their much higher affinity for MT and most other cytosolic ligands. Similar problems with loss of Zn were reported by Micallef et al. (1992). We retained the Cd and Cu results that fell in the 80-120% range, but rejected all the Zn results.

#### Biochemical assays

Cytosolic MT concentrations were measured by a Hg-saturation assay adapted from Dutton et al. (1993) and Couillard et al. (1993); because the Hg-binding stoichiometry for

metallothionein is unknown for *P. grandis*, results are expressed in terms of nmol Hg binding sites/g dry weight. Lipid peroxidation was evaluated by the measurement of malondialdehyde (MDA) concentrations according to the colourimetric method of Sunderman et al. (1985) using tetraethoxypropane (97%; Sigma T 8282) as an internal standard. This method is based on the reaction of thiobarbituric acid with MDA and related chromogens. Glutathione-dependent oxidoreductase enzymes were analysed with kinetic enzymatic reactions monitored by spectrophotometric methods. Glutathione-peroxidase (EC 2.5.1.18) was measured according to Lawrence and Burk (1976). Glutathione-reductase (EC 1.6.4.2) was determined according to Carlberg and Mannervick (1985). Total lipids were estimated according to Frings et al. (1972) using olive oil (Sigma O1500) as the standard.

### **Metal analysis**

No acidic digestion was carried out prior to analysis of whole cytosols or the HPLC fractions. Whole cytosol samples were analysed for Cd, Cu and Zn by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS: Fisons model VG PQII). Each fraction from the HPLC separation was analysed for Cd, Cu and Zn by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (GFAAS: Perkin-Elmer model Simaa 6000 with Zeeman background correction and a Perkin-Elmer model AS-72 automatic sampler). The matrix modifier used for Cd and Cu analyses was a solution of 3.3%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.3  $\mu\text{g/L}$   $\text{H}_3\text{PO}_4$  and 33%  $\text{HNO}_3$ . For Zn, the matrix modifier was a solution of 0.1%  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  and 0.06%  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ . Procedural blanks and a certified reference water sample (US National Institute of Standards and Technology, NIST SRM 1643d) were analysed during each analytical run. When metal concentrations in the sample were below the detection limit (Cd=0.04  $\mu\text{g/L}$ ; Cu=0.36  $\mu\text{g/L}$ ; Zn=0.08  $\mu\text{g/L}$ ), they were replaced by half the detection limit. Blanks indicated negligible contamination (N=333: Cd and Cu below detection limits; Zn 0.35  $\mu\text{g/L}$ ). Certified samples were quantitatively recovered (N=134): Cd, 97.5%; Cu, 109.8%; Zn, 97.1%.

### Statistical analysis

Relationships between variables were initially examined in bivariate scatter plots and a simple regression model was then tested by calculating determination coefficients ( $r^2$ ) using the Statistica package of computer programs (Statsoft Inc., 1999). The assumptions required for use of this approach were met with the non-transformed data.

## Results

### Exposure gradient

Metal concentrations in lake water decreased with distance downwind from the smelter; the calculated ambient free-metal levels in the individual lakes are summarised in Table 1. The estimated free  $[Cd^{2+}]$  at our most contaminated sampling station (L. Héva) was >300-fold higher than that in the least contaminated lake. Lake Héva also had the highest free  $[Zn^{2+}]$ , >400-fold higher than that in the least contaminated habitat. Inter-lake variations of free  $[Cu^{2+}]$  were less dramatic than for Cd and Zn, but  $[Cu^{2+}]$  at the most contaminated sampling station was nevertheless 39-fold higher than in the least contaminated lake. Lake-to-lake variations in aqueous metal concentrations were significantly positively correlated between metal pairs (correlation test;  $P < 0.01$ ), reflecting their common (largely atmospheric) origin.

### Metal bioaccumulation

Metal concentrations in gill cytosols varied from lake to lake, but the {[M]-maximum : [M]-minimum} ratios (Cd 11, Cu 5, Zn 3) were markedly lower than those in lake water. Inter-lake variations in cytosolic metal concentrations were greater for Cd, a non-essential metal, than for Cu or Zn. Cytosolic Cd concentrations were directly related to those of aqueous  $[Cd^{2+}]$  (Fig. 2A;  $r^2 = 0.60$ ;  $P < 0.001$ ). In contrast, cytosolic levels of the essential metals Cu and Zn were independent of their ambient free-metal concentrations (Figs. 2B and 2C;  $P > 0.05$ ). Negative correlations were observed between gill cytosolic [Cd] and both ambient  $[H^+]$  ( $r^2 = 0.51$ ;  $P < 0.001$ ) and aqueous dissolved [Ca] ( $r^2 = 0.47$ ;  $P < 0.001$ ). These latter relationships are discussed in Perceval et al. (2002).

### Detoxification

Gill metallothionein concentrations, as determined by the mercury saturation assay, were 5-fold higher in mussels from contaminated lakes than in mussels from reference lakes (Fig. 3). Gill MT concentrations were more strongly related to gill cytosolic Cd concentrations (Fig. 3B;  $r^2=0.78$ ;  $P<0.001$ ) than to  $[Cd^{2+}]$  (Fig. 3A;  $r^2=0.50$ ;  $P<0.001$ ). Gill MT concentrations increased linearly with Cd exposure, without reaching a plateau in contaminated lakes. The relationship between MT and cytosolic Cd is described by the equation:  $[MT]_{gill} = 1.3 [Cd]_{cytosol} + 51$ . No significant relationships were found between gill MT and cytosolic Cu or Zn.

### Cytosolic metal partitioning

Cadmium was detected in all three cytosolic pools, but the majority of this metal was always in the metallothionein-like pool (Fig. 4A). Variations in  $[Cd-MT]$  were strongly related to cytosolic  $[Cd]$  ( $r^2=0.95$ ;  $P<0.001$ ); weaker but significant ( $P<0.001$ ) relationships were also observed between cytosolic  $[Cd]$  and  $[Cd-HMW]$  ( $r^2=0.37$ ) and  $[Cd-LMW]$  ( $r^2=0.68$ ). Note that although the amount of Cd bound to each subcellular pool increased along the Cd contamination gradient, the cadmium proportion in each pool was stable along the gradient and there was no apparent shift from one subcellular compartment to another. On average ( $\pm$ S.D.),  $80.6\pm 6.9\%$  of the cytosolic Cd was bound to the MT pool,  $6.6\pm 2.9\%$  was associated with the LMW pool and  $12.9\pm 7.0\%$  was bound to the HMW pool. The differences in  $[Cd]$  among the 3 pools were significant ( $P<0.001$ , Kruskal-Wallis one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test on ranks;  $P<0.05$ ).

Even though total gill MT was not related to total cytosolic Cu ( $P>0.05$ ),  $[Cu-MT]$  did increase cytosolic  $[Cu]$  ( $r^2=0.77$ ;  $P<0.001$ ) as did  $[Cu-HMW]$  ( $r^2=0.36$ ;  $P<0.01$ ), but not  $[Cu-LMW]$  ( $P>0.05$ ) (Fig. 4B). As the total gill MT concentration increased, there was a significant increase in the concentration of the Cd-MT complex ( $r^2=0.59$ ;  $P<0.001$ ) but not the Cu-MT complex (Fig. 5).

From a bivariate plot of the concentrations of the Cd-MT and Cu-MT complexes versus the cytosolic cadmium concentration, we estimated the basal level of MT bound to each metal when there is minimal environmental exposure to Cd. As expected, when there was no accumulated Cd in the cytosol, there was also no measurable Cd bound to MT (intercept not significantly different than zero,  $t$  test,  $P < 0.09$ ). Under these conditions of low environmental [Cd], a certain amount of the essential metal Cu is bound to MT ( $[Cu-MT] = 17.0 \pm (S.E.) 6$  nmol/g dw: intercept significantly different than zero,  $t$  test,  $P < 0.009$ ).

### Cytotoxicity

Malondialdehyde (MDA) concentrations in the gills increased with increasing gill cytosolic [Cd] ( $r^2 = 0.46$ ;  $P = 0.002$ ) (Fig. 6) and this relationship is still significant ( $P = 0.03$ ) without the highest Cd value (HE). Gill malondialdehyde also increased significantly with Cd bound to the LMW pool ( $r^2 = 0.34$ ;  $P = 0.01$ ). Gill malondialdehyde was not related to either cytosolic Cu or Zn. In the digestive gland, MDA concentrations were unrelated ( $P > 0.05$ ) to Cd and Cu exposure, as inferred from gill cytosolic [Cd] and [Cu].

In the digestive gland, glutathione-peroxidase activity increased with exposure to Cu, as reflected by gill cytosolic [Cu] ( $r^2 = 0.49$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 7A). Glutathione-reductase activity also increased with exposure to Cu ( $r^2 = 0.20$ ,  $P = 0.05$ ) (Fig. 7B) as well as with Cu bound to the LMW pool ( $r^2 = 0.48$ ,  $P = 0.005$ ) (Fig. 7C). However, this latter relationship is no longer significant ( $P = 0.12$ ) if the lake with the highest glutathione-reductase activity (EV) is removed. Gonad lipid concentrations (ratio max/min among lakes=5) increased with sestonic carbon ( $r^2 = 0.37$ ,  $P = 0.004$ ) and nitrogen ( $r^2 = 0.40$ ,  $P = 0.003$ ) but were unrelated to any other limnological or toxicological parameters.

## Discussion

### Metal bioaccumulation

Exposure to ambient Cd concentrations led to a significant increase in the concentration of this non-essential metal in the gill cytosols of *P. grandis* collected along the environmental Cd gradient. In contrast, Cu and Zn concentrations in the gill cytosol varied much less, suggesting that the bivalve regulates the concentrations of these essential metals. Possible homeostasis mechanisms include changes in the rate of metal excretion to match the rate of metal uptake and storage in extracytosolic compartments such as granules, which have been widely reported in molluscan species (George, 1990).

### Detoxification

Basal levels of gill MT (Fig. 3A, intercept:  $43 \pm 13$  nmol Hg binding sites/g dw) were lower than those reported by Wang et al. (1999) (78 nmol Hg binding sites/g dw) for the same species in the same region, probably due to the inclusion in our dataset of one lake in which molluscs have very low cytosolic [Cd] (OL-1 and OL-2 in Fig. 3). MT concentrations measured in *P. grandis* from our most contaminated lake, Lake Héva (254 nmol Hg binding sites/g dw), were similar to MT values reported for *P. grandis* collected from an Ontario lake that had received experimental Cd additions for 3 years (245 nmol Hg binding sites/g dw, estimated from reported value of 35  $\mu\text{g/g}$  wet weight; Malley et al., 1993). Gill MT concentrations were strongly related to gill cytosolic [Cd] (Fig. 3B), but were independent of those of the essential metals Cu and Zn, as has been reported in Couillard et al. (1993) and Wang et al. (1999). The possibility that the MT biosynthesis capacity in *P. grandis* was overwhelmed by Cd influx from its environment can be discarded in our study since gill MT concentrations did not reach a plateau in contaminated lakes. In contrast, in a transplant experiment with the freshwater mollusc *Corbicula fluminea*, Baudrimont et al. (1999) demonstrated a shut-down of MT synthesis in individuals that were moved to a site contaminated by Cd and Zn. This shut-down was rapidly followed by the death of the transplanted molluscs.

### **Cytosolic metal partitioning**

#### The spillover concept

According to the "spillover" concept, non-essential metals can bind to sensitive intracellular targets if detoxification mechanisms are overwhelmed or damaged by metal influx (Langston and Zhou 1986, Mason and Jenkins, 1995). The onset of spillover has been shown to occur at a threshold free-ion activity for metals such as Cd and Cu (Sanders and Jenkins, 1984; Mason and Jenkins, 1988). However, most of these earlier studies were carried out in the laboratory where animals were subjected to a step-change in metal exposure; in the present study we are dealing with animals that have been chronically exposed to metals in the field since the egg stage.

The intracellular binding and distribution of cadmium is a dynamic process that depends on both the magnitude and the duration of Cd exposure (Brown et al., 1990; Baudrimont et al., 1999). The importance of exposure duration is clearly demonstrated by comparing our results with those from an earlier transplantation experiment. In the earlier study, *P. grandis* was transferred from a reference lake (L. Opasatica) to a contaminated lake (L. Vaudray) in the same geographical area as our study. After 400 d (2 summers), 74% of cytosolic Cd was bound to LMW components, whereas only 12% was bound to the MT fraction and 14% to the HMW fraction (Couillard et al., 1995a). These data contrast sharply with the present results for non-transplanted individuals, in which the majority of the Cd was in the MT pool in all indigenous animals, whether collected from reference or contaminated lakes (cf. Table 2).

These contrasting results suggest that the concept of saturation of MT followed by metal "spillover" into the HMW and LMW pools above a threshold free-ion activity may be applicable when the animals are subjected to a change in ambient metal levels, but not for life-long exposure to elevated metal concentrations. Observations made by Brown et al. (1990) and Wang et al. (1999) are consistent with this interpretation. Spillover, as pointed out by Engel and Roesijadi (1987), should be evaluated in the framework of the time-course of exposure and may well not be applicable to indigenous populations. It is however unclear from the present work whether the observed differences between short-

and long-term exposures should be ascribed to an acclimation of the exposed animal (through MT synthesis, for example) or to an adaptation (through genetic selection) of the populations from the more contaminated lakes.

Many authors have stressed the need for chronic exposure tests to observe effects associated with metal accumulation (Brown et al., 1990; Mouneyrac et al., 1999). Short exposure tests can underestimate the chronic toxicity of an element by orders of magnitude, especially if the exposure duration is shorter than the life span of the test organism (Luoma, 1995). In the present study we observed differences between indigenous mollusc populations chronically exposed to metals and animals that had been subjected to a change in their metal exposure regime (and thus had been exposed to high metal levels for a shorter time). These differences are perhaps not unexpected, given the relatively slow rates at which *P. grandis* accumulates cadmium from its environment (Couillard et al., 1995b). Engel and Brouwer (1982) observed different copper subcellular partitioning between indigenous and laboratory-exposed American oysters and they proposed that the short duration of the laboratory exposures might account for the differences. Langston and Zhou (1986) also measured marked differences in cadmium subcellular partitioning between indigenous and laboratory-exposed winkles.

#### Subcellular steady-state in indigenous animals

Metal partitioning among ligand pools, for indigenous animals in steady-state with their environment, is driven by thermodynamic considerations. The analysis of that steady-state should consider the relative concentrations of the metals, the relative concentrations of the various ligands, the relative affinities of each ligand type for each metal and competition among metals (Mason and Jenkins, 1995). To test the applicability of this concept, we have examined how the subcellular partitioning of Cd and Cu responds to the changes in ambient metal levels that occur along the contamination gradient.

Cadmium proportions in each subcellular pool were stable along the contamination gradient, even though total cytosolic Cd increased. Such a trend is consistent with an equilibrium-dependent exchange of metals among cytosolic ligands present in excess

(i.e.,  $[L] \gg [M]$ ) and has been observed for copper in marine organisms in time-course experiments in the laboratory (Sanders and Jenkins, 1984) and in field transplant experiments (Roesijadi et al., 1984). However, to our knowledge it has not been observed along spatial metal contamination gradients. We cannot completely rule out the possibility that metal redistribution, resulting from cell disruption or during the chromatography separation, may have contributed to the constancy of the subcellular distribution profile. However, in an earlier study (Micallef et al. 1992) we performed competition experiments with commercial metallothionein (pre-labelled with  $^{109}\text{Cd}$ ) and fresh cytosol extract from *P. grandis*. In these experiments, no appreciable metal exchange occurred during the 20-min pre-equilibration or the subsequent chromatographic separation step. Similarly, Bracken et al. (1984) spiked bovine kidney cells with cadmium during the homogenization step to check for such artifacts; these authors concluded that metal redistribution following cell disruption was not significant.

Concentrations of copper bound to MT and HMW ligands increased as cytosolic copper concentrations increased (Fig. 4B) but were unrelated to ambient Cu concentrations. We interpret the relationship between  $[\text{Cu-MT}]$  and  $[\text{Cu}]$ -cytosol as an example of the equilibrium response of Cu partitioning to an increase in cytosolic MT. Increased exposure to Cd leads to increased induction of MT and higher concentrations of (cytosolic) MT. This increase in MT would perturb the cytosolic Cu pool, with a greater proportion of Cu binding to MT (as though the cytosol were being "titrated" with additional MT, which has a higher in vitro affinity for Cu(I) than for Cd). This kind of indirect "induction" of the Cu-MT complex has previously been observed in fish (Olsson and Haux, 1986), and in lobster (Engel and Brouwer, 1986). In our study, the amount of Cu bound to the HMW pool did not decrease but rather increased with increasing ambient Cd ( $r^2 = 0.23$ ;  $P = 0.03$ ) (Fig. 8). There is thus no evidence that non-essential metals such as Cd are replacing Cu in metalloenzymes.

### **Cytotoxicity**

Previous studies have tried to relate subcellular metal partitioning and MT synthesis to deleterious effects such as growth inhibition (Sanders and Jenkins, 1984), mortality

(Hamilton and Mehrle, 1987) and condition index deterioration (Roesijadi et al., 1984). Based on our subcellular partitioning results, the potential for Cd toxicity exists in the floater mussel even at low Cd exposures. The concentrations of all subcellular cadmium complexes increased in a dose-dependent manner along the Cd exposure gradient. This result implies that effects associated with the non-specific binding of Cd to LMW and HMW ligands might be expected all along the environmental Cd gradient, and that effects should be proportional to that gradient.

In the gills of *P. grandis* the concentration of MDA, a breakdown product of the oxidative degradation of cell membrane lipids, increased along the metal gradient, and this increase was positively correlated with gill cytosolic Cd concentrations. Increased levels of MDA following Cd exposure have been reported in some other bivalve studies (Couillard et al., 1995a; Cossu et al., 2000) but this type of response cannot be generalised, since other researchers have failed to detect such increases (Thomas and Wofford, 1993; Venugopal et al., 1997; Reddy, 1999). Cadmium could provoke the degradation of cellular membranes through two pathways. First, we know that glutathione and MT are both antioxidants that can be bound by Cd after exposure and that the binding of Cd to these antioxidants would interfere with their capacity to protect against oxidative stress (Christie and Costa, 1984). Second, Cd readily interacts with the ubiquitous sulfhydryl groups of amino acids, proteins and enzymes. The replacement of essential metals such as Cu and Zn by non-essential metals such as Cd would tend to change the conformation of antioxidant enzymes and affect their activity (Hamilton and Mehrle, 1986).

In the digestive gland, Cu appeared to be the agent responsible for the production of reactive oxygen species, and this should not be surprising since Cu can directly catalyse the production of these species (Christie and Costa, 1984). The organism, however, seemed able to cope with this oxidative stress since MDA levels did not increase in relation to Cu in the digestive gland. Glutathione-peroxidase and glutathione-reductase enzymes are probably among the antioxidants responsible for the regulation of the cells' oxidative stress levels since both enzymes' activities increased in relation to Cu. Glutathione-reductase activity was better related to Cu bound to the LMW pool than to

total cytosolic Cu; this cytosolic pool could partly represent levels of Cu bound to glutathione. These observations could reflect the facts that glutathione can be directly oxidised by Cu and that its reduction is catalysed by glutathione-reductase. Glutathione-peroxidase activity was not better related to the concentration of Cu bound to LMW or HMW ligands than to total cytosolic Cu, probably because the production of this enzyme is not induced by the binding of Cu to important target macromolecules, but more directly by the oxyradicals generated by the redox cycle between the cupric ( $\text{Cu}^{2+}$ ) and the cuprous ( $\text{Cu}^+$ ) oxidation states (Christie and Costa, 1984). Few studies have reported altered enzyme activities after Cd exposure (Thomas and Wofford, 1993; Venugopal et al., 1997) whereas many workers have reported an effect of Cu on enzymes in laboratory studies (Regoli and Principato, 1995; Reddy, 1999).

Mussels lay down energy reserves as carbohydrates, proteins or lipids and, in some species, these stores are used to fuel the demands of gametogenesis. In mussels, environmental stresses often act to reduce the allocation of available energy to reproduction, in favor of somatic growth (Bayne and Newell, 1983). Based on literature reports of lipid metabolism in molluscs being affected by exposure to contaminants (Capuzzo, 1988), we measured gonad lipid concentrations in the indigenous animals. Variations in total lipid concentrations were however unrelated to any of the measured toxicological parameters and seemed influenced by natural variability in sestonic C and N among lakes (data not shown), which probably demonstrates the influence of the energetic content of the bivalves' food on lipid production in the gonad.

## **Conclusion**

In various ecotoxicological studies, including this one, the ability of metallothionein to sequester all incoming toxic metals has been shown to be less than perfect; metals have been demonstrated to bind concomitantly to MT and to other intracellular ligands. If the binding of non-essential metals to cytosolic ligands others than MT were responsible for deleterious effects in a target animal, than the concentrations of metal bound to HMW

and LMW would be logical biomarkers of potential effects. To verify this cytotoxicity model, four different potential biomarkers of effects were measured, including the activity of the enzyme glutathione-reductase. This biomarker was in fact better explained by Cu bound to cytosolic ligands other than MT, in this case the LMW pool, than by total cytosolic Cu. This result indicates that Cu bound to LMW ligands would be a good predictor of oxidative stress in the digestive gland of P. grandis. On the other hand, glutathione-peroxidase activity and MDA, two other markers of oxidative stress, were not better related to Cu bound to cytosolic ligands other than MT than to total cytosolic Cu. This result may reflect the complexity of the antioxidant defences of cells, an understanding of which cannot be derived from one variable. It may also result from the ambiguities inherent in any field study carried out along a contamination gradient: two independent biomarkers could be correlated with an external stressor and thus with each other ... even if they were not mechanistically related.

When chronically exposed to Cd in its environment, the floater bivalve accumulates the metal in the gill cytosol. Along the metal exposure gradient, the amounts of Cd bound to HMW and LMW ligands remain proportional to the amount bound to MT, and thus for this type of exposure, the concentration of accumulated cytosolic Cd is as good a predictor of lipid peroxidation as the concentration of Cd bound by any particular ligand type.

Lastly, our study raises important questions about the environmental realism of laboratory and transplant experiments. In the past such studies have often reported an enhanced contribution of non-metallothionein ligands in exposed animals, as opposed to the stable contribution from these ligands observed in the indigenous molluscs collected for the present study. Given these differences between the field observations and the results from laboratory and transplant experiments, we suggest that care be taken in extrapolating the measures of metal-induced effects obtained in such experiments to indigenous animals, unless the exposure duration is longer than the time taken for the studied organ or animal to reach a steady state in accumulated metal levels.

## Acknowledgements

This research was supported financially by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC strategic grant), the Canada Centre for Mineral and Energy Technology (CANMET), and the Noranda Technology Centre (Noranda Mines). Invaluable logistical support was provided by the Société de la Faune et des Parcs de l'Abitibi-Témiscamingue (Government of Québec). The contributions of D. Campbell (CANMET), R. Prairie (Noranda) and L. Champoux (Canadian Wildlife Service, Environment Canada) as members of the project steering committee are gratefully acknowledged. Thanks are due to S. Gauthier-Clerc for training AG in the measurement of biomarkers of oxidative stress in the laboratory. We also thank Y. Bettarel, I. Louis, A. van den Abel and R. Rodrigue for help with fieldwork, M. Geoffroy-Bordeleau, S. St-Pierre, P. Fournier and S. Prémont for technical assistance in the laboratory and J.-C. Auclair for help with statistical analyses.

## References

- Baudrimont, M., Andrès, S., Metivaud, J., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C., Boudou, A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve Corbicula fluminea along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): II. metallothionein response to metal exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2472-2477.
- Baudrimont, M., Metivaud, J., Maury-Brachet, R., Ribeyre, F., Boudou, A., 1997. Bioaccumulation and metallothionein response in the Asiatic clam (Corbicula fluminea) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2096-2105.
- Bayne, B.L., Newell, R.C., 1983. Physiological energetics of marine molluscs. In: Saleudin, A.S.M., Wilbur, K.M. (Eds.), *The mollusca*. Academic Press, New York, NY, pp. 407-515.

Bracken, W.M., Sharma, R.P., Kleinschuster, S.J. 1984. Cadmium accumulation and subcellular distribution in relation to cadmium chloride induced cytotoxicity in vitro. *Toxicology* 33, 93-102.

Brown, D.A., Bay, S.M., Hershelman, G.P., 1990. Exposure of scorpionfish (Scorpaena guttata) to cadmium: effects of acute and chronic exposures on the cytosolic distribution of cadmium, copper and zinc. *Aquat. Toxicol.* 16, 295-310.

Campbell, P.G.C. 1995. Interaction between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In: Tessier, A., Turner, D. R. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic System*. John Wiley & Sons Ltd, New York, pp. 45-102.

Capuzzo, J.M., 1988. Physiological effects of a pollutant gradient - Summary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46, 147-148.

Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology* 113, 484-490.

Christie, N.T., Costa, M., 1984. In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. IV. Disposition of metals in cells: interactions with membranes, glutathione, metallothionein, and DNA. *Biological Trace Element Research* 6, 139-158.

Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, Unio tumidus, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45, 106-121.

Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Pellerin-Massicotte, J., Auclair, J.C., 1995a. Field transplantation of a freshwater bivalve, Pyganodon grandis, across a metal contamination gradient. II. Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence for cytotoxicity,

and links to effects at higher level of biological organization. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 703-715.

Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Tessier, A., 1993. Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (Anodonta grandis) along an environmental cadmium gradient. *Limnol. Oceanogr.* 38, 299-313.

Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Tessier, A., Pellerin-Massicotte, J., Auclair, J.C., 1995b. Field transplantation of a freshwater bivalve, Pyganodon grandis, across a metal contamination gradient. I. Temporal changes in metallothionein and metal (Cd, Cu, and Zn) concentrations in soft tissues. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 690-702.

Dutton, M.D., Stephenson, M., Klaverkamp, J.F., 1993. A mercury saturation assay for measuring metallothionein in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1193-1202.

Engel, D.W., Brouwer, M., 1986. Cadmium and copper metallothionein in the American lobster, Homarus americanus. *Environmental Health Perspectives* 65, 87-92.

Engel, D.W., Brouwer, M., 1982. Detoxification of accumulated trace metals by the American oyster, Crassostrea virginica: laboratory vs. environment. In: Vernberg, W.B. Calabrese, A., Thurberg, F.P., Vernberg, F.J. (Eds.), *Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity*. Academic Press, Inc., New York, pp. 89-107.

Engel, D.W., Roesijadi, G., 1987. Metallothionein: a monitoring tool. In: Vernberg, W. B., Calabrese, A., Thurberg, F. P., Verneberg, J. (Eds.), *Pollution Physiology of Estuarine Organisms*. University of South Carolina Press, pp. 421-438.

Frings, C.S., Fendley, T.W., Dunn, R.T., Queen, C.A., 1972. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phosphovanillin reaction. *Clin. Chem.* 18, 673-674.

George, S.G., 1990. Biochemical and cytological assessments of metal toxicity in marine animals. In: Furness, R. W., Rainbow, P. S. (Eds.), *Heavy Metals in the Marine Environment*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp. 123-142.

Ghent, A.W., Singer, R., Johnson-Singer, L., 1978. Depth distributions determined with SCUBA, and associated studies of the freshwater unionid clams, Elliptio complanata and Anodonta grandis in lake Bernard, Ontario. *Can. J. Zool.* 56, 1654-1663.

Gobas, F.A.P.C., Morrison, H.A., 2000. Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment. In: Boethling, R.S., Mackay, D. (Eds.), *Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 189-231.

Hamilton, S.J., Mehrle, P.M., 1987. Evaluation of metallothionein measurement as a biological indicator of stress from cadmium in brook trout. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 116, 551-560.

Jenkins, K.D., Mason, A.Z., 1988. Relationships between subcellular distributions of cadmium and perturbations in reproduction in the polychaete Neanthes arenaceodentata. *Aquat. Toxicol.* 12, 229-244.

Langston, W.J., Zhou, M., 1986. Evaluation of the significance of metal-binding proteins in the gastropod Littorina littorea. *Mar. Biol.* 92, 505-515.

Lawrence, R.A., Burk, R.F., 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 71, 952-958.

Lobel, P.B., 1989. The effect of dithiothreitol on the subcellular distribution of zinc in the cytosol of mussel kidney (Mytilus edulis): isolation of metallothionein and a unique low molecular weight zinc-binding ligand. *Comp. Biochem. Physiol.* 92, 189-192.

Luoma, S.N. 1995. Prediction of metal toxicity in nature from bioassays: limitations and research needs. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, pp. 609-646.

Malley, D.F., Klaverkamp, J.F., Brown, S.B., Chang, P.S.S., 1993. Increase in metallothionein in freshwater mussels Anodonta grandis grandis exposed to cadmium in the laboratory and the field. *Water Pollut. Res. J. Can.* 28, 253-273.

Mason, A.Z., Jenkins, K.D., 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Ecosystems*. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, pp. 478-608.

Micallef, S., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Tessier, A., 1992. An evaluation of the HPLC-gel chromatographic method for analysing metallothioneins in aquatic organisms. *Talanta* 39, 1073-1079.

Mouneyrac, C., Berthet, B., Amiard, J.C., 1999. Cd distribution in the tissues of oysters (Crassostrea gigas) exposed chronically in situ. *Water Air and Soil Pollution* 112, 187-196.

Olsson, P.-E., Haux, C., 1986. Increased hepatic metallothionein content correlates to cadmium accumulation in environmentally exposed perch (Perca fluviatilis). *Aquat. Toxicol.* 9, 231-242.

Perceval, O., Pinel-Alloul, B., Methot, G., Couillard, Y., Giguère, A., Campbell, P.G.C., 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, 5-17.

Reddy, P.S., 1999. Modulations in antioxidant enzymes in the hepatopancreas and gill of the fresh water crab Oziotelphusa senex senex during exposure to cadmium and copper. *Fresenius Environmental Bulletin* 8, 445-452.

Regoli, F., Principato, G., 1995. Glutathione, glutathione dependant and antioxidant enzymes in mussels, Mytilus galloprovincialis, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31, 143-164.

Roesijadi, G., Young, J.S., Drum, A.S., Gurtisen, J.M., 1984. Behaviour of trace metals in Mytilus edulis during a reciprocal transplant field experiment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 18, 155-170.

Sanders, B.M., Jenkins, K.D., 1984. Relationships between free cupric ion concentrations in sea water and copper metabolism and growth in crab larvae. *Biol. Bull.* 167, 704-712.

STATISTICA for Windows [Computer program manual]. StatSoft, Inc. 99. Tulsa, OK

Sunderman, F.W., Marzouk, A., Hopfer, S.M., Zaharia, O., Reid, M.C., 1985. Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 15, 229-236.

Tessier, A. 1992. Sorption of trace elements on natural particles in oxic environments. In: Buffle, J., Van Leeuwen, H.P. (Eds.), *Environmental Particles, Environmental Analytical and Physical Chemistry Series*. J. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 425-453.

Tessier, A., Campbell, P.G.C., Auclair, J.-C., Bisson, M., 1984. Relationships between the partitioning of trace metals in sediments and their accumulation in the tissues of the freshwater mollusc Elliptio complanata. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41, 1463-1472.

Tessier, A., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Auclair, J.-C., 1993. Modeling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve Anodonta grandis. *Limnol. Oceanogr.* 38, 1-17.

Thomas, P., Wofford, H.W., 1993. Effects of cadmium and Arochlor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues. *Aquat. Toxicol.* 27, 159-178.

Venugopal, N.B.R.K., Ramesh, T.V.D.D., Reddy, D.S., Reddy, S.L.N., 1997. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in a freshwater field crab, Barytelphusa guerini. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 132-138.

Wang, D., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Jolicoeur, P., 1999. Changes in subcellular metal partitioning in the gills of the freshwater bivalve (Pyganodon grandis) living along an environmental cadmium gradient. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56, 774-784.

**TABLE 1:** Free-metal ion concentrations in the overlying water of the studied lakes.<sup>a</sup>

| <b>Lake</b>          | <b>[Cd<sup>2+</sup>]</b><br><b>nM</b> | <b>[Cu<sup>2+</sup>]</b><br><b>nM</b> | <b>[Zn<sup>2+</sup>]</b><br><b>nM</b> | <b>pH</b>  | <b>[Ca]<sub>diss.</sub></b><br><b>mg/L</b> |
|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------|--|
| Renault (RE)         | 0.003                                 | 1.4                                   | 0.4                                   | 8.7        | 17.7                                       |
| Opasatica (OP)       | 0.036                                 | 6.5                                   | 1.7                                   | 7.6        | 8.1  |
| Ollier (OL)          | 0.048                                 | 12.1                                  | 8.1                                   | 7.5        | 12.6                                       |
| Évain (EV)           | 0.055                                 | 6.8                                   | 3.3                                   | 7.5        | 6.6  |
| Joannès (JO)         | 0.236                                 | 14.4                                  | 25.4                                  | 7.2        | 7.0  |
| Caron (CA)           | 0.251                                 | 8.7                                   | 27.8                                  | 7.0        | 10.4                                       |
| Dufay (DU)           | 0.339                                 | 7.7                                   | 28.8                                  | 6.8        | 2.8  |
| Vaudray (VA)         | 0.673                                 | 54.1                                  | 69.3                                  | 6.6        | 3.0  |
| Bousquet (BO)        | 0.761                                 | 13.3                                  | 64.9                                  | 6.5        | 4.3  |
| Héva (HE)            | 0.927                                 | 27.4                                  | 181.3                                 | 6.2        | 2.0  |
| <b>ratio max/min</b> | <b>329</b>                            | <b>38</b>                             | <b>431</b>                            | <b>1.4</b> | <b>9</b>                                   |

<sup>a</sup> The free Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> concentrations were estimated from sediment metal, organic carbon and amorphous iron oxyhydroxide concentrations, together with the pH of the overlying water. The geochemical model is based on the sorptive equilibrium of free-metal ions between oxic sediments and water – see Tessier (1992) and Tessier et al. (1993) for details.

**TABLE 2:** Percentage of Cd in three metal-ligand pools in the gill cytosol of *P. grandis* from a reference lake, OP (this study), from a contaminated lake, VA (this study), and when transplanted from the reference to the contaminated lake (Couillard et al., 1995a). M-HMW, the high molecular weight pool; M-MT, the metallothionein-like pool; M-LMW, the low molecular weight pool.

|  | <b>Indigenous<br/>Lake Opasatica<br/>(OP)</b> | <b>Transplanted<br/>from OP to VA<br/>(after 400-d)</b> | <b>Indigenous<br/>Lake Vaudray<br/>(VA)</b> |
|--|---|---|---|
| HMW pool (%)                               | 6   | 14  | 12  |
| MT pool (%)                                | 91  | 12  | 80  |
| LMW pool (%)                               | 3   | 74  | 8   |
| Total [Cd] gill cytosol<br>(nmol/g dry wt) | 30  | 56  | 103   |

## Figure captions

**Figure 1:** Cd concentrations in various molecular weight pools collected after size exclusion chromatographic separation (HPLC) of gill cytosols from P. grandis collected in a reference lake (Ollier) and in a metal contaminated lake (Héva). HMW= high molecular weight pool (245-18 kDa); MT= metallothionein-like pool (18-1.8 kDa); LMW= low molecular weight pool (<1.8 kDa).

**Figure 2:** Relationships between cytosolic metal concentrations in the gills of P. grandis and free-metal ion concentrations, as estimated using a geochemical model based on the sorptive equilibrium of free-metal ions between oxic sediments and water: (A) cadmium (B) copper and (C) zinc. Each point represents data for molluscs collected at a single sampling station (mean  $\pm$  SD; N=3 composite subsamples of 4 individuals). See Table 1 for lake abbreviations.

**Figure 3:** Relationships between metallothionein concentrations and (A) free-cadmium ion concentrations estimated in the overlying water and (B) gill cytosolic cadmium. Each point represents data for molluscs collected at a single sampling station (mean  $\pm$  SD; N=3 composite subsamples of 4 individuals).

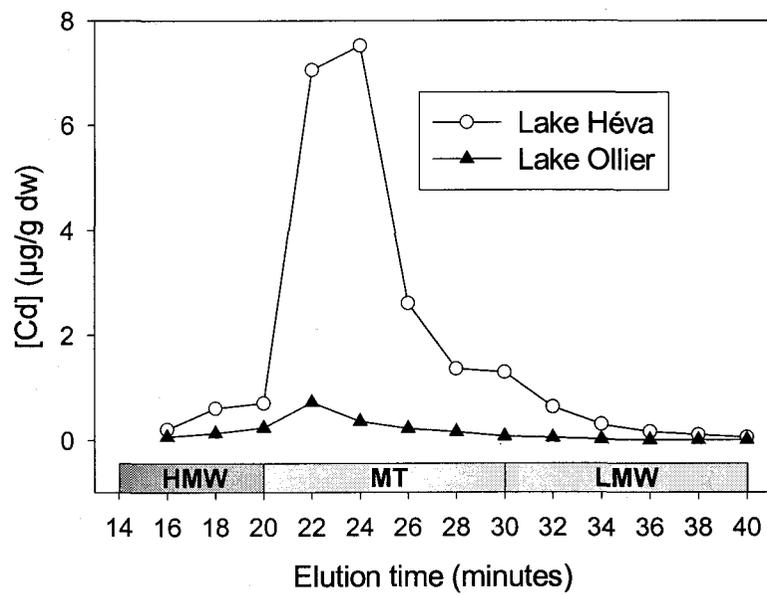
**Figure 4:** Relationships between gill cytosolic metal concentrations and metal concentrations in three metal-ligand pools identified as M-MT, the metallothionein-like pool, M-HMW, the high molecular weight pool and M-LMW, the low molecular weight pool: (A) cadmium and (B) copper. Each point represents data for a composite subsample of 4 individuals.

**Figure 5:** Relationships between cadmium and copper bound to the metallothionein-like pool, as measured by HPLC, and metallothionein concentrations, as measured by the Hg-saturation assay. Each point represents data for a composite subsample of 4 individuals.

**Figure 6:** Relationship between malondialdehyde and gill cytosolic cadmium concentrations. Each point represents data for molluscs collected at a single sampling station (mean  $\pm$  SD; N=3 composite subsamples of 4 individuals). See Table 1 for lake abbreviations.

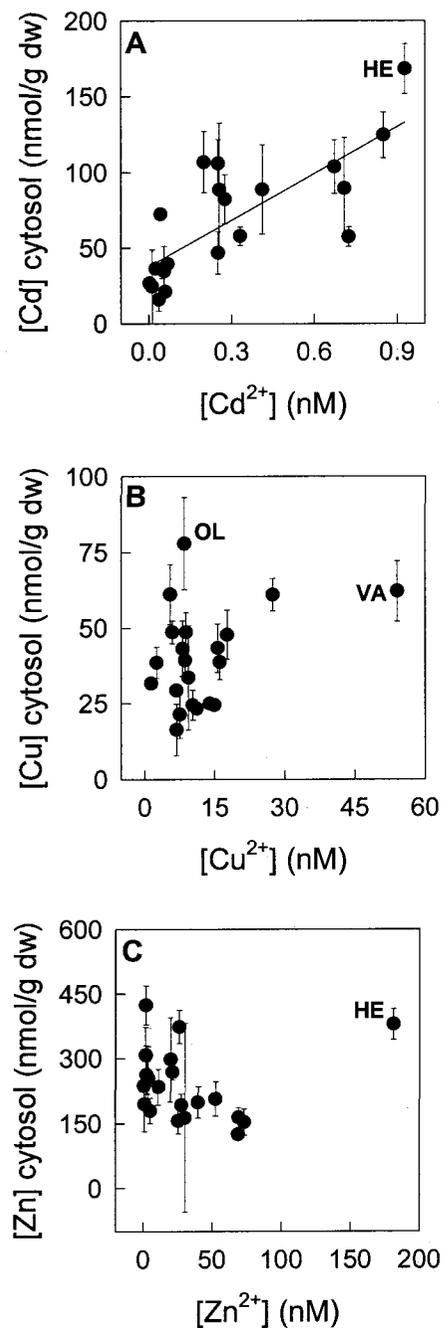
**Figure 7:** Relationships between enzyme activities and accumulated copper: (A) glutathione-peroxidase vs. gill cytosolic Cu, (B) glutathione-reductase vs. gill cytosolic Cu and (C) glutathione-reductase vs. Cu bound to the low molecular weight pool. Each point represents data for molluscs collected at a single sampling station (mean  $\pm$  SD; N=3 composite subsample of 4 individuals). See Table 1 for lake abbreviations.

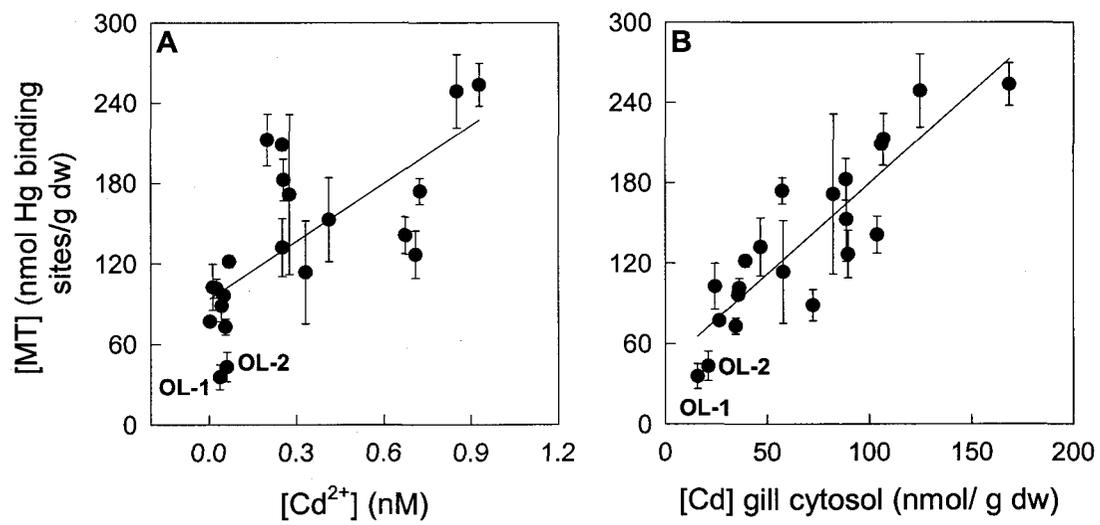
**Figure 8:** Relationship between copper concentrations in the high molecular weight (HMW) cytosolic pool and gill cytosolic Cd concentrations. Each point represents data for a composite subsample of 4 individuals.

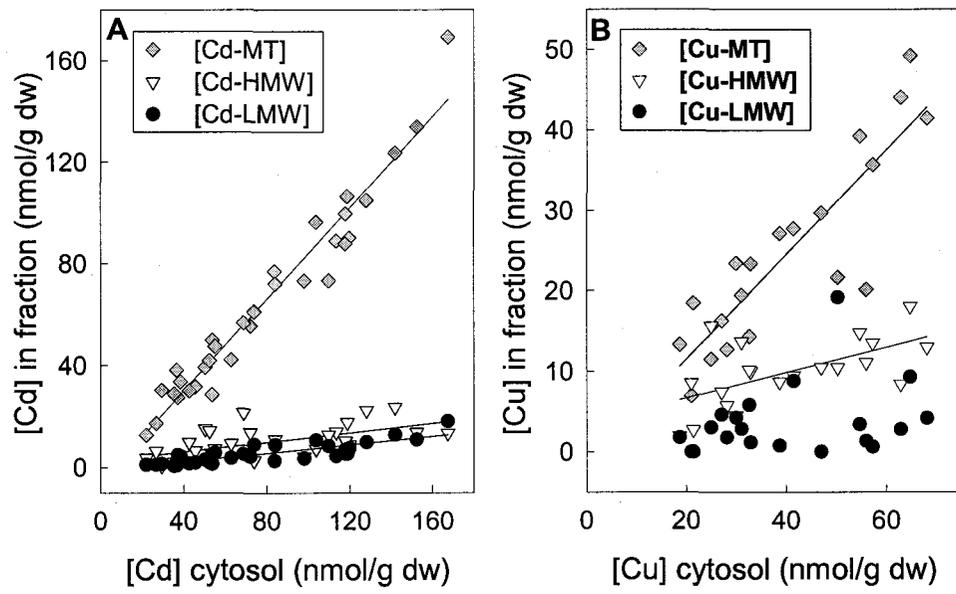


**Figure 1**

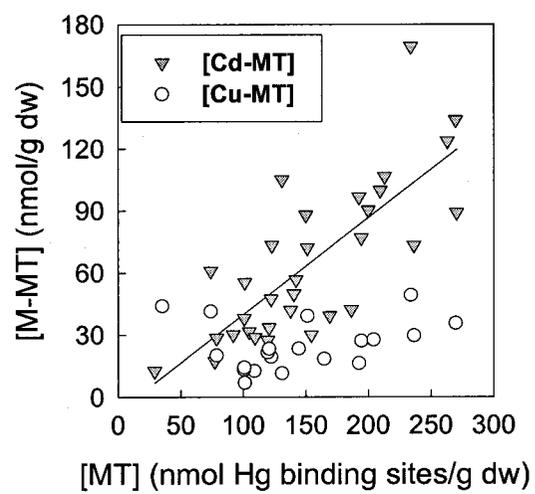
**Anik Giguère et al.**



**Figure 3****Anik Giguère et al.**

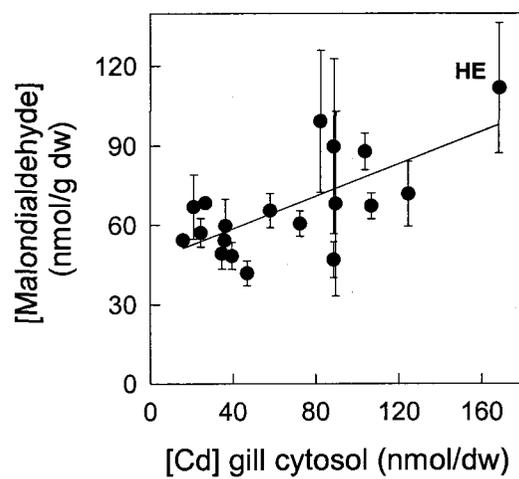
**Figure 4**

Anik Giguère et al.



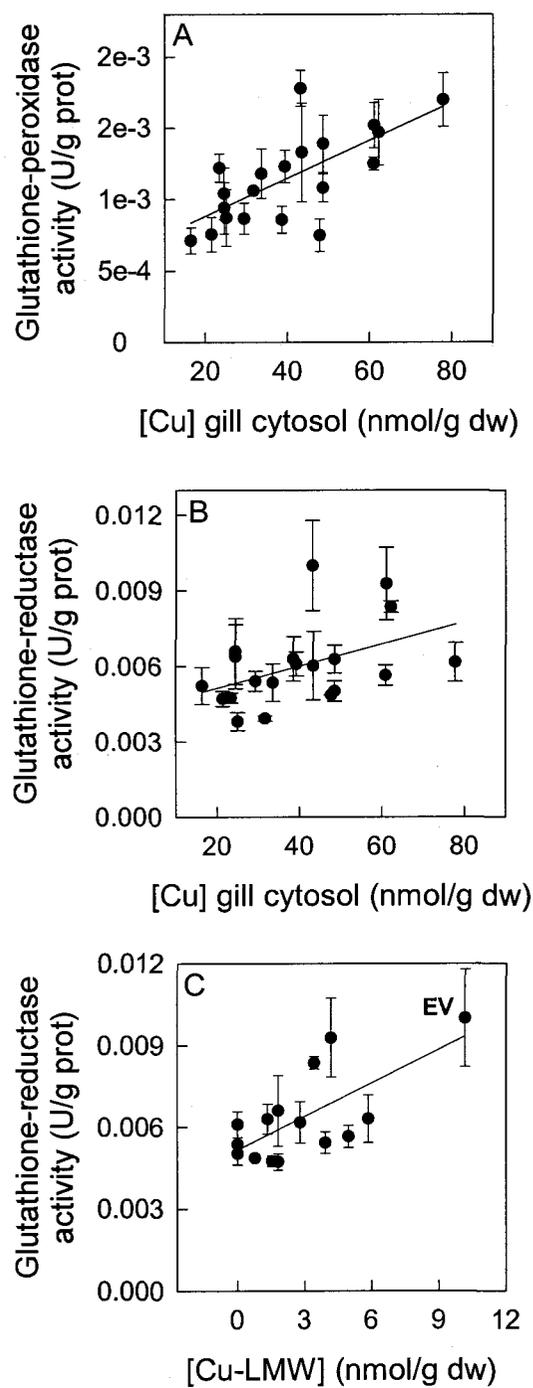
**Figure 5**

**Anik Giguère et al.**

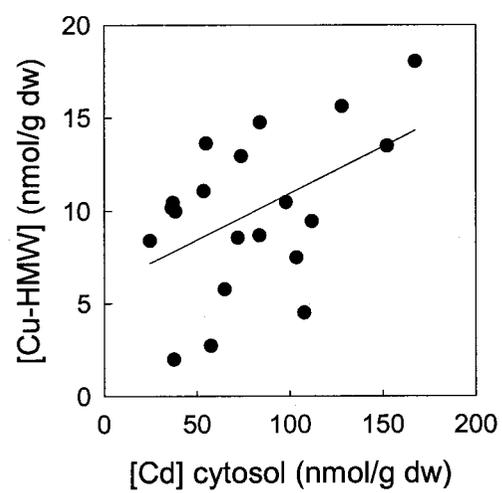


**Figure 6**

**Anik Giguère et al.**

**Figure 7**

Anik Giguère et al.



**Figure 8**

**Anik Giguère et al.**

9 2<sup>ème</sup> article

**Influence de la chimie de l'eau des lacs et de l'âge des poissons sur les concentrations de Cd, Cu et Zn dans plusieurs organes de la perchaude (*Perca flavescens*)**

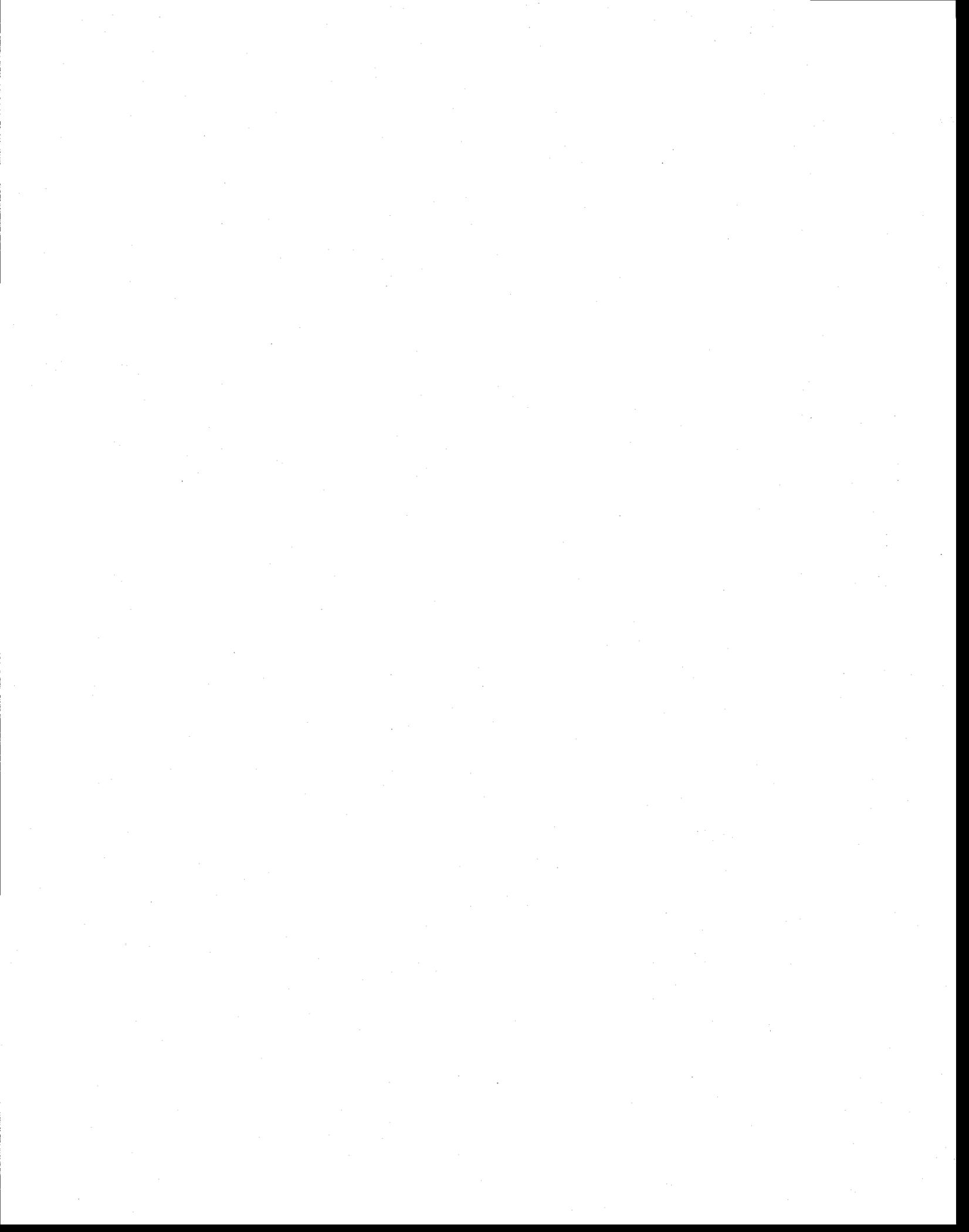
**Influence of lake chemistry and fish age on Cd, Cu and Zn concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*)**

*Anik Giguère<sup>1</sup>, Peter G. C. Campbell\*<sup>1</sup>, Landis Hare<sup>1</sup>, D. Gordon McDonald<sup>2</sup> and Joseph B. Rasmussen<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> INRS-ETE, Université du Québec, C.P. 7500, Sainte-Foy, QC G1V 4C7, Canada

<sup>2</sup> Department of Zoology, University of Guelph, Guelph, ON N1G 2W1, Canada

<sup>3</sup> Department of Biology, McGill University, 1205 Dr Penfield Ave, Montreal, QC, H3A 1B1, Canada



## Abstract

Concentrations of cadmium (Cd), copper (Cu) and zinc Zn were determined in various organs of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) collected from eight lakes located along a metal concentration gradient. Metal exposure was evaluated on the basis of the free ambient  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations, as estimated from chemical equilibrium simulations using the ambient water chemistry data. Based on regression analyses, lakewater  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{H}^+$  did not significantly influence the steady-state metal concentrations in various body parts of yellow perch. Cadmium concentrations were significantly higher in the gastrointestinal tract than in the gills, suggesting that uptake of this metal from food is more important than from water. Variations in the contribution of each organ to the total Cd and Cu burdens revealed a possible dysfunction in liver excreting capacities in the fish from the most highly contaminated lakes. Additionally, measurements on perch from 0 to 10 years old ( $N = 81$ ) collected from a single lake suggest that Cd concentrations in some organs increase with fish age, which we interpret to be linked to changes in fish growth rate with age.

## Résumé

Les concentrations en  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ont été estimées par simulations chimiques à l'équilibre dans l'eau de 8 lacs situés le long d'un gradient de concentrations métalliques. Des perchaudes juvéniles y ont aussi été échantillonnées et les concentrations métalliques dans divers organes mesurées. Des analyses de régression ont révélé que les concentrations aqueuses en  $\text{Ca}^{2+}$  et en  $\text{H}^+$  n'influençaient pas significativement les concentrations métalliques dans divers organes des perchaudes. Les concentrations en cadmium du tractus gastro-intestinal étaient plus élevées que dans les branchies, suggérant une prise en charge plus importante de ce métal par la nourriture que par l'eau. Les variations de la contribution de chaque organe aux teneurs totales en Cd et en Cu révélèrent une apparente saturation des capacités d'excrétion du foie chez les poissons en provenance des lacs très contaminés par ces métaux. Finalement, des mesures sur des perchaudes âgées de 0 à 10 ans ( $N=81$ ) échantillonnées dans un unique lac suggèrent que les concentrations en Cd dans certains organes augmentent avec l'âge du poisson, ce que nous interprétons comme un effet du changement du taux de croissance avec l'âge.

Keywords: metal bioaccumulation, biotic ligand model, tissue residues, target organs, condition factor

Mots clé : bioaccumulation de métaux, modèle du ligand biotique, organes cibles, concentrations tissulaires, facteur de condition

## Introduction

Metal concentrations in fish have been used extensively as indicators of metal exposure (Ion et al. 1997; Yearley et al. 1998). In this regard, yellow perch (*Perca flavescens*) offer considerable potential as metal biomonitors since they are widespread in Canada (from New Brunswick to Alberta) and are found in the United States as far south as Florida (Scott and Crossman 1973). They are also present in a wide variety of habitats, from lakes to small ponds to slow flowing rivers, in part because they tolerate wide ranges of temperature and pH values as low as 4.8 (Baker and Christensen 1991). Because this fish species is relatively sedentary (Aalto and Newsome 1990), its metal concentrations are generally representative of local conditions. However, the yellow perch's potential as a metal biomonitor is hampered by a lack of data on relationships between metal exposure and metal concentrations in feral individuals.

Laboratory studies suggest that metal concentrations in a given fish species depend on many factors, such as the exposure concentration and duration (Hansen et al. 2002) as well as metal speciation and the concentrations of competing ions in exposure media (Playle et al. 1993). The pre-exposure history of metal exposed fish can also influence their accumulation of metals (Taylor et al. 2000). In the laboratory fish are usually exposed to metal in water alone, whereas in the field food can also be an important exposure route. Furthermore, most laboratory metal exposures are at higher concentrations and for shorter durations than would be the case in nature.

These differences between laboratory and field exposure conditions are especially important for fish because most researchers treat these animals as multi-compartment systems, that is, they measure metals in various organs (Berninger and Pennanen 1995; Andr s et al. 2000). Metal partitioning among organs is likely to change over time in laboratory fish because they are usually exposed to a sudden change in dissolved metal concentrations: metal concentrations will likely be higher at the site of uptake at the beginning of exposure, but this distribution should change as exposure duration increases and the metal enters the fish's circulatory system. This is less likely to be the case in the field where fish are exposed to metals at more stable concentrations in both food and water. Because there are few published measurements of metals in the various organs of wild perch

from lakes of various metal concentrations, we do not know the typical distribution patterns in nature.

The working hypothesis that underlay this work was that the distribution of a metal among the organs of wild fish varies along metal exposure gradients and that perturbations in the 'normal' distribution occur when a toxic threshold is exceeded. The specific objectives of this study on wild yellow perch were to (1) measure the influence of fish age on metal accumulation, (2) relate metal concentrations in fish to those in lake water and (3) identify the most probable target for metal toxicity among five fish organs. To address the first objective, we measured metal concentrations (Cd, Cu and Zn) in the various body parts of yellow perch ranging in age from 0 to 10 years that we collected from a single lake. To address the next two objectives, we characterized metal exposure in 8 lakes located along a Cd, Cu and Zn gradient and then measured shifts in relative metal concentrations and burdens among five body parts of juvenile yellow perch as metal exposure increased.

## **Materials and methods**

### **Study area**

The study lakes (N = 8, Table 1) are located in the vicinity of Rouyn-Noranda, a city situated about 600 km northwest of Montréal, Québec, Canada. Metal sources in this region include mineralized rock outcrops, mine tailings, abandoned mines and the Horne copper smelter (in operation since 1927). Two of the sampled lakes receive localized runoff from nearby mine tailings (lakes Dufault and Osisko) whereas the others are mainly contaminated by atmospheric emissions. Atmospheric emissions from the smelter are presently largely controlled, but prior to 1985 the smelter was an important source of metals (Cd, Cu, Pb, Zn) and sulphur dioxide to the atmosphere and to lakes downwind from the smelter. Given the physical separation of the sampled lakes, the fish collected from the lakes are considered to be independent observations.

### **Metal exposure quantification**

Water samples were collected in the epilimnion of the eight studied lakes in June 2000, using duplicate *in situ* diffusion samplers consisting of eight contiguous cells (4 mL) milled into a Plexiglas block and separated from lake water by a polysulfone membrane (0.2

$\mu\text{m}$  nominal pore-size; Pall Gelman Sciences, HT-200). Samplers were filled with ultrapure water (Milli Q system water; resistivity  $\sim 17 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ) prior to placement in the lake. The two samplers were suspended 1 m above the bottom and at least 1.5 m under the surface in the epilimnion of each lake. They were retrieved after three days and sampled immediately (a sampling period of 3 days had been shown to be sufficient for equilibration of this design of sampler with ambient water; A. Tessier and R. De Vitre, INRS-ETE, C.P. 7500, Ste-Foy, Québec, Canada G1V 4C7, unpublished data). When the diffusion samplers were retrieved, ambient pH and temperature were measured in water collected 0.5 meters below the lake surface, above the dialysis samplers, with a portable pH meter (Hannah Instruments, model 9025).

Three replicate samples (3.5 mL) for the determination of trace metal (Cd, Cu, Zn, Al, Fe) and major cation (Ca, Mg, Na and K) concentrations were removed from each sampler (2 samplers/lake for a total of 6 samples/lake) using a pipette fitted with an acid-washed tip. These samples were injected into prewashed and preacidified (53  $\mu\text{L}$  of 10%  $\text{HNO}_3$ , Fisher Scientific trace metal grade) high density polyethylene (HDPE) bottles. Metal and major cation analyses were performed by inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry (ICP-AES) (Varian, Vista AX), except for Cd and Cu, which were measured using a graphite furnace atomic absorption spectrophotometer (GFAAS) equipped with a graphite tube atomizer (Perkin-Elmer, Simaa 6000) and an autosampler (Perkin-Elmer model AS-72). Certified reference water samples (Riverine water reference material NIST 1643d, U.S. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland, USA) were also analysed for metals during each analytical run; measured trace metal concentrations were consistently within the certified range for each element. Average concentrations were calculated for each sampler resulting in two independent observations for each lake.

Two replicate samples ( $\sim 1.5 \text{ mL}$ ) for major anions ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ) were also removed from each sampler (2 samplers/lake for a total of 4 replicates/lake) with a pipette fitted with a plastic tip. These samples were injected into polyallomer microcentrifuge tubes prewashed with ultrapure water. Anions were measured by ion chromatography (Dionex, DX300). Two replicate samples (1.5 mL) for inorganic carbon determination were removed from each sampler using a glass syringe and injected through a septum into pre-evacuated

and prewashed glass tubes; the CO<sub>2</sub> analyses were done using a hot wire detector (HWD) gas chromatograph (Perkin Elmer, Sigma 300). Two replicate samples (~ 4 mL) for organic carbon determinations were removed from each sampler using a pipette fitted with a tip prewashed with potassium persulfate (1 g per 50 mL) and rinsed with ultrapure water (Elgastat Maxima-HPLC water, total organic carbon < 3 ppb). These samples were injected into amber glass bottles that had been sterilised at 400 °C for 4 h. Organic carbon was measured using a total organic carbon analyser (Schimazu, TOC-5000A). Blanks and appropriate standard reference materials for anion measurements and for inorganic and organic carbon determinations were analysed in accordance with INRS-ETE quality assurance / quality control procedures. Again, average concentrations were then calculated for each sampler resulting in two measurements for each lake.

Metal speciation at equilibrium was calculated for each sampler (N = 2 for each lake) with the Windermere Humic Aqueous Model (WHAM 6.0.1; CHE 2001). Input data included major cation concentrations, total dissolved metal concentrations (Cd, Cu, Zn; Fe, Al), total concentrations of potential inorganic ligands (SO<sub>4</sub>, Cl, CO<sub>3</sub>) and organic carbon. Concentrations of fulvic and humic acids required as input data to WHAM were estimated from our measurements of dissolved organic carbon: as suggested by Tipping (1994), we assumed that (1) humic substances contain 50% carbon, (2) the ratio of humic to fulvic acids is 1:9, and (3) all dissolved organic carbon is present as humic substances. The original database of complexation constants provided with WHAM 6.0.1 was compared with recommended values in the U.S. National Institute of Standards and Technology database (Martell et al. 2001) and modified as necessary.

### **Fish collection and preservation**

For the single-lake study, we initially aimed at sampling about 15 fish from each of five size groups (5 – 10 g, 10 – 40 g, 40 – 70 g, 70 – 100 g and >100 g) in Lake Osisko in June 2000, with a seine net or fishing rods. We ended up collecting more than 15 fish in one size group (40 – 70 g), and less than 15 in the others. The age of each fish was evaluated independently by two observers, from fish otoliths as well as from a section of the longest ray of the dorsal fin. There was an agreement between the observers for 96% of the aged fish. When the two observers disagreed, a third observer independently evaluated the age

and the age estimated by two of the three observers was assigned. We then selected among all the sampled fish a maximum of 15 fish per age. Because some age classes were over-represented (e.g., the age 1 and age 6 fish classes), we selected the 15 first sampled fish from the initial sample for these two age classes for subsequent metal analysis. Lake Osisko was chosen because of its intermediate metal concentrations relative to the other lakes of the study region and because it supported a large yellow perch population. After collection, the fish were kept alive until killed with a blow to the head and dissected into five body parts (liver, kidney, gills, gastrointestinal tract and carcass) plus gastrointestinal contents.

For the multi-lake study, 15 juvenile fish (7–10 g) were collected by seining from each of eight lakes (Table 1) in June 2000. Fish were kept alive until they were killed with a blow to the head and then dissected into five body parts: liver, kidney, gills, gastrointestinal tract and carcass. The age of each fish was evaluated independently by two observers, from a section of the longest ray of the dorsal fin. There was an agreement between the observers for 79% of the aged fish (12% of the disagreement came from a single lake, Lake Bousquet). When the two observers disagreed, a third observer independently evaluated the age and the age estimated by two of the three observers was assigned.

For the single-lake and the multi-lake studies, each body part was kept individually in acid-washed plastic containers at -20 °C. Also, for both studies, gastrointestinal tracts were emptied using a scalpel to push the gastrointestinal contents (food and mucus) out of the tract. This procedure could lead to underestimates in metal content of the gastrointestinal tract if the mucus that was removed contained measurable quantities of metals.

### **Tissue metal analyses**

Metal concentrations and burdens (metal concentration in body part x body part weight) were determined for Cd, Cu, Zn and Ca in each body part. Frozen tissues were freeze-dried and then weighed. Dried tissues were digested with nitric acid (Fisher Scientific, trace metal grade; ~ 3 mL of acid per g dry weight of tissue) in an autoclave at 120 - 125 °C for 3 h. Cooled digestates were then diluted 10:1 with ultrapure water. A certified reference material (lobster hepatopancreas, National Research Council of Canada, NRCC TORT-1) was submitted to the same procedure. Concentrations of Cd, Cu, Zn and Ca were measured by ICP-AES. Blanks indicated negligible contamination (N = 18): Cd < 0.33

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{Cu} < 0.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{Zn} < 1.5\cdot\text{L}^{-1}$  and  $\text{Ca} = 0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . The recovery of TORT-1 reference samples ( $N = 22$ ) was within the certified range for Cd ( $94 \pm$  standard deviation, S.D. of 3%), within 10% of the certified values for Cu ( $92 \pm$  S.D. of 3%) and Zn ( $90 \pm$  S.D. of 3%) and within 15% for Ca ( $85 \pm$  S.D. of 3%).

### Calculations and statistics

Condition factors (CF) were calculated as  $\{W / L^{2.96}\} \times 100$ , where  $W$  is the fish body weight (g) and  $L$  is the fish fork length (cm). The value of the exponent ( $2.96 \pm$  standard error, SE 0.07) was estimated from the non-linear regression  $W = aL^b$  ( $P < 0.001$ ) using the data from fish collected for the single-lake study. Hepatosomatic indices (HSI) were calculated as the ratio {liver dry weight (mg) / total body wet weight (g)}.

Because the condition of homogeneity of variance was not respected for the raw data (Levene's test for homogeneity of variance,  $df = 7$ ;  $P < 0.001$ ), fish age differences among lakes (multi-lake study) were compared using a non-parametric test (Kruskal-Wallis) and a Scheffé test on ranks was used to discriminate among lakes. Similarly, differences in hepatic [Cu] among fish from various lakes (multi-lake study) were tested using a non-parametric test (Kruskal-Wallis). A Tukey honest significance difference (HSD) test was then performed on ranks to identify those lakes that were different.

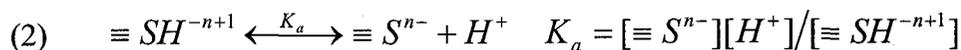
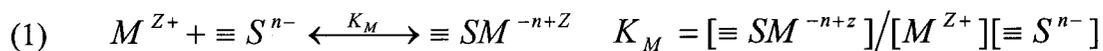
To verify the influence of age on metal concentrations in the single-lake study, and to investigate the influence of metal exposure on metal concentrations or burdens and on fish condition in the multi-lake study, we initially examined relationships between variables in bivariate scatter plots. When bivariate plots indicated a possible linear relationship, a simple regression model was tested using the Statistica computer program (Statsoft Inc. 1999). When bivariate plots appeared non-linear, non-linear regression models with least-squares fitting were tested using the Sigmaplot computer program (SPSS Inc. 2000); the explained variances were compared to those obtained from a simple regression model. For each of the significant relationships presented, we verified if the residuals were normally distributed and if some outlier values biased the regression coefficients. Lastly, because of the relatively large number of regression analyses done, the Bonferroni procedure was used to adjust the significance level for the individual regressions.

The proportionality between  $Zn^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  concentrations in the multi-lake study was tested using simple linear correlation (Pearson  $r$ ) and no outliers were identified when the scatterplot of the correlation was examined.

To identify differences among hepatosomatic indices of yellow perch from various lakes (multi-lake study), a one-way analysis of variance (ANOVA) was used ( $df = 7$ ), followed by a Tukey honest significance difference (HSD) post-hoc test. The normality of the distribution and the homogeneity of the variances of the dependent variable within groups were verified.

### Competition modelling

The free-ion activity model (Campbell 1995) and its more recent derivative, the biotic ligand model (Di Toro et al. 2001), both assume that metal bioaccumulation proceeds via facilitated cation transport across an external membrane, i.e., that the primary interaction of a metal with a living organism involves the binding of the metal to a metal-transport site embedded in an epithelial membrane. If this metal transport site is located at an epithelial surface, e.g. the apical or basolateral gill cell membranes, then other aqueous cations could in principle compete with the metal of interest for binding at the transport site (Pagenkopf 1983). Using our field data, we tested for the effects of  $Ca^{2+}$ ,  $H^+$  and metals on the accumulation of Cd, Cu and Zn in various body parts of indigenous yellow perch. The model tested has been described in detail by Croteau et al. (1998) and by Pagenkopf (1983). According to this model, reaction of negatively charged uptake sites ( $\equiv S^{n-}$ ) with metals ( $M^{z+}$ ) and protons ( $H^+$ ) can be described by the following equilibrium reactions:



where  $[\equiv S^{n-}]$  is the concentration of free uptake sites, and  $[\equiv SM^{-n+z}]$  and  $[\equiv SH^{-n+1}]$  are concentrations of uptake sites occupied by metals and protons respectively. Concentrations of the accumulated metal  $M_1$ ,  $[M_1]_{\text{organism}}$ , can be described by the following expression:

$$(3) \quad [M_1]_{\text{organism}} = F \frac{[M_1^{Z+}]}{K_a + [H^+] + K_a K_{M2} [M_2^{Z+}]}$$

where  $F$  is a proportionality constant,  $K_{M2}$  the apparent complexation constant for the reaction of a second metal ( $M_2^{Z+}$ ) with the uptake sites, and  $K_a$  is the apparent acid dissociation constant for the protonated uptake sites.

Cationic competitive interactions were quantified by performing least-square optimization using the Sigmaplot computer program (SPSS Inc. 2000). Each cation was tested individually.

## Results

### Exposure gradient

Metal concentrations in lake water varied markedly among lakes (Table 1). Metal gradients, defined as the ratios of metal concentrations in the most and least contaminated lakes, decreased in the order  $[Zn]_d$  (~100) >  $[Cd]_d$  (70) >>  $[Cu]_d$  (8) for total dissolved metals and  $[Cu^{2+}]$  (~2800) >>  $[Cd^{2+}]$  (~370)  $\approx$   $[Zn^{2+}]$  (~290) for free metal ions. The pronounced gradient for free copper stems from the extremely low estimates of free  $[Cu^{2+}]$  in the reference lakes (DA, OL, OP in Table 1). Metal concentrations in lakes Dufault and Osisko were much higher than those in the other lakes, likely because they are the only two lakes to receive runoff from mine tailings.  $H^+$ -ion concentrations also showed marked inter-lake variability (ratio ~ 130) whereas  $Ca^{2+}$  (ratio of 10x) and dissolved organic carbon concentrations (ratio of 4x) were more constant.

### Organ distributions of metals and age effects

#### Single-lake study (Lake Osisko)

The highest Cd concentrations for perch of all ages were measured in the kidney, followed by the liver, the gastrointestinal tract, the gills and the carcass; the same sequence was observed for Zn concentrations, although the difference between the kidney and the other organs was much more marked than for Cd (Fig. 1). In contrast, Cu concentrations

were highest in the liver, and declined in the order liver >> kidney > gastrointestinal tract > carcass > gills.

Metal concentrations in some organs showed modest age dependence (Table 2). This age effect was most evident for cadmium, the concentration of which increased in two organs (kidney and liver) with increasing age (Fig. 1). In contrast, gill Cd concentrations declined with fish age (Fig. 1, Table 2). Metal concentrations in fish gastrointestinal contents were unrelated to fish age ( $P > 0.05$ ) (Fig. 2a), but Cd in the gastrointestinal tract was positively related to Cd in the gastrointestinal contents (Fig. 2b;  $r^2 = 0.12$ ;  $P = 0.004$ ); this relationship is still significant ( $P = 0.01$ ) when the point at the far right hand-side of the graph is removed. The same relationships were also positive and significant for Cu ( $r^2 = 0.18$ ;  $P = 0.004$ ) and Zn ( $r^2 = 0.15$ ;  $P = 0.002$ ).

#### Multi-lake study

Although fish from the same size-class were sampled (7 – 10 g) in each lake, their ages differed slightly. The average age of the juvenile fish collected for the multi-lake study was one year for fish from lakes Bousquet, Dasserat, Héva, Ollier and Osisko and two years for those from lakes Dufault, Opasatica and Vaudray; however, this age difference was significant only for lakes Dufault and Vaudray (Kruskal-Wallis,  $P < 0.001$ ,  $df = 7$ ; followed by a Scheffé test on ranks,  $P < 0.05$ ,  $df = 7$ ). Linear regressions between fish growth rates (length/age) and metal exposure concentrations were tested and no relationships were found ( $P > 0.05$ ).

#### Cadmium concentrations

For juvenile fish collected from the eight study lakes, Cd concentrations were consistently highest in the kidney, followed by the liver, gastrointestinal tract, gills and carcass (Fig. 3) (i.e., the same order as for the single-lake study on Lake Osisko). Ratios of the highest to lowest Cd concentrations among lakes were greater in the liver, the kidney and the gills (20x each) than in the gastrointestinal tract and the carcass (7-8x). Among all studied body parts, the liver was the organ whose cadmium concentrations best reflected lakewater concentrations, followed by the kidney, gills and gastrointestinal tract (Fig. 3; Table 3). Cadmium concentrations in the whole body were not related to those in lakewater

(Fig. 3; Table 3). Considering  $\text{Ca}^{2+}$  competition with  $\text{Cd}^{2+}$  at biological uptake sites (see Methods) consistently increased the percentage of the variance explained ( $r^2$  in Table 3) for liver, but this difference was not significant ( $P > 0.05$ ; test of difference between 2 Pearson linear correlation coefficients). Relationships between waterborne free  $\text{Cd}^{2+}$  and Cd concentrations in the gills and gastrointestinal tract were best explained by hyperbolic relationships ( $y = y_0 + (ax)(b+x)^{-1}$ ;  $r^2 = 0.85$  and  $0.90$  respectively,  $P < 0.01$ ). However, considering  $\text{Ca}^{2+} - \text{Cd}^{2+}$  competition increased the linearity of these relationships (Fig. 3; Table 3). Neither  $\text{H}^+$  nor  $\text{Cu}^{2+}$  had any competitive effect on Cd accumulation in liver, kidney, gills or gastrointestinal tract. Competition by  $\text{Zn}^{2+}$  could not be tested because of a significant positive correlation between this cation and  $\text{Cd}^{2+}$  (Pearson correlation coefficient =  $0.99$ ;  $P < 0.001$ ).

#### Copper and zinc concentrations

Copper concentrations were highest in the liver, followed by the kidney, the gastrointestinal tract, the gills and the carcass (Fig. 4a). Two organs showed a relationship between exposure to Cu, evaluated as free  $[\text{Cu}^{2+}]$ , and Cu accumulation: the liver ( $r^2 = 0.96$ ;  $P < 0.0001$ ) and the gastrointestinal tract ( $r^2 = 0.81$ ;  $P < 0.01$ ). Cu concentrations measured in livers of fish from lakes Bousquet, Osisko and Dufault were significantly different from the Cu concentrations in livers of fish from reference lakes Opasatica, Ollier and Dasserat (Fig. 4b: Kruskal-Wallis,  $P < 0.001$ , followed by Tukey honest significance difference (HSD) on ranks,  $P < 0.05$ ).

Zinc concentrations were 10-fold higher in the kidney (Fig. 4c) than in any other body part (Fig. 4d). Perch from lakes Osisko (OS) and Dufault (DU) had somewhat higher Zn concentrations in most body parts than did fish from other lakes. Although the ambient  $[\text{Zn}^{2+}]$  gradient was 300-fold between the most and least contaminated lakes (Table 1), ratios in bioaccumulated Zn were only 1.4-fold for the liver, 2.7-fold for the kidney and 1.7-fold for the gills. Competition for Zn uptake by  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{H}^+$  was tested but no competitive effect was detected in any body part. Competition by  $\text{Cd}^{2+}$  could not be tested because of a strong positive inter-lake correlation between ambient  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  (see above).

## Metal burdens

Cadmium burdens were highest in the carcass followed by the liver (Fig. 5a). The relative contribution of the carcass to the total cadmium burden decreased linearly with  $\log[\text{Cd}^{2+}]$  ( $r^2 = 0.56$ ;  $P < 0.05$ ), whereas the liver contribution increased linearly with  $\log[\text{Cd}^{2+}]$  ( $r^2 = 0.71$ ;  $P < 0.01$ ). Similarly, the relative contribution of the carcass to the total Cu burden decreased linearly with  $[\text{Cu}^{2+}]$  ( $r^2 = 0.75$ ;  $P < 0.01$ ) whereas the liver contribution increased linearly with  $[\text{Cu}^{2+}]$  ( $r^2 = 0.87$ ;  $P < 0.001$ ) (Fig. 5b). In contrast, the relative contributions of each body part to the total Zn burden were not related to  $\text{Zn}^{2+}$  exposure ( $P > 0.05$ ).

Dry weights of individual body parts were not significantly correlated with  $\log[\text{Cd}^{2+}]$  or  $[\text{Cu}^{2+}]$  ( $P > 0.05$ ), except for carcass weight, which was significantly positively related to  $\log[\text{Cd}^{2+}]$  ( $r = 0.57$ ;  $P < 0.05$ ). It follows that the observed changes in metal burdens with metal exposure cannot be attributed to changes in the weight of each body part, but rather to changes in metal concentrations in the individual organs.

## Effects of metals

The condition factor of juvenile yellow perch decreased significantly with increasing liver Cd concentrations (Fig. 6a). However, if Lake Dufault (DU) is removed this relationship is no longer significant ( $P = 0.2$ ). The hepatosomatic index of juvenile yellow perch did not decrease significantly with increasing ambient  $[\text{Cd}^{2+}]$  ( $P > 0.05$ ), but perch from Lake Osisko had significantly lower liver somatic indices than did fish from all lakes except Dufault (one-way ANOVA,  $P < 0.0001$ , followed by Tukey honest significance difference (HSD),  $P < 0.05$ ) (Fig. 6b).

## Discussion

### Single-lake study

A general perception in the current literature is that cadmium concentrations do not increase with increasing body size or age within a fish population (reviewed by Sorensen 1991). In contrast, our results show that age is a potentially confounding factor when studying Cd bioaccumulation because Cd concentrations in liver and kidney in yellow perch from Lake Osisko increased with fish age. This observation is not without precedent – other

investigators have reported that [Cd] in the liver and kidney increased with increasing age in various species of fish from metal-contaminated environments, including arctic char (Köck et al. 1996) and flounder (Rotchell et al. 2001).

To explain age-related increases in Cd concentrations, Köck et al. (1996) proposed a model for long-term Cd accumulation in Arctic char living in alpine Austria, in a climate comparable to that found in our study area. This model proposes that a net gain in Cd takes place in summer, when ingestion and growth rates are important, whereas a net loss of Cd occurs in winter. However, the summer gain in Cd exceeds the loss in winter, resulting in a net annual gain in Cd. This model agrees with observations of other researchers to the effect that a fast growth rate influences Cd uptake rates and final tissue concentrations (Sorensen 1991).

Dietary preferences and food quality have also been considered as factors to explain age-related increases in Cd concentration, since these variables can affect metal bioaccumulation in wild fish (Sorensen 1991; Andrès et al. 2000). Indeed, yellow perch change their feeding habits as they grow, from zooplanktivory to benthivory to piscivory (Sherwood et al. 2002). If metal concentrations in prey items were to increase in the order planktivorous < benthivorous < piscivorous perch, then the observed increasing tissue Cd concentrations with fish age might be explained by the shift in feeding habits that occurs as yellow perch grow. As a test of this hypothesis, we measured metal concentrations in perch gastrointestinal contents. We assumed that metal concentrations in the gastrointestinal contents are predictors of bioaccumulation, given that gastrointestinal metal concentrations were related to metal concentrations in the fish tissue. However, metal concentrations in fish gastrointestinal contents proved to be independent of fish age, and thus we discount the idea that shifts in feeding habits were responsible for the increase in [Cd] with fish age.

In contrast to the increase in Cd concentrations noted with fish age in perch liver and kidney, gill Cd concentrations were lower in older fish. This trend has not been reported previously, likely because most previous researchers did not measure Cd in the gills. The decrease observed in the present study might be explained by a decrease in gill ventilation rates related to a decrease in fish metabolic rates as fish grow. Ventilation volumetric rate (volume of water flowing past the gills per unit time) is reported to be proportional to

metabolic rate and both of these parameters decrease as fish grow (Neely 1979). A decrease in ventilation rate leads to a reduction of the speed at which water passes over the gill surface, leading in turn to an increase in the thickness of the layer of unmixed water near the surface. However, according to the Biotic Ligand Model, such changes should not alter the metal uptake rate (the limiting step being the transport across membranes and not the transport from the solution to the surface of the gills: Paquin et al. 2002). A decrease in gill ventilation rate should thus affect accumulated Cd concentrations only if it leads to a decrease in the ventilated surface of the gills.

Relationships between age and copper or zinc accumulations were weak or non-existent, a result consistent with the essential nature of these metals. To our knowledge, ours is the first study to measure copper concentrations in the gastrointestinal tract of indigenous fish and the dispersion of these data points, for fish of ages  $> 1$  (Fig. 1), should be emphasised. This dispersion could reflect the time passed since the last meal of the fish. Indeed [Cu] in the gastrointestinal tract contents ( $0.5 - 120 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$ ) was high relative to [Cu] in the gastrointestinal tract itself ( $0.1 - 0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$ ). Such high [Cu] in the diet could lead to short-term Cu adsorption on the epithelium of the gastrointestinal tract.

## **Multi-lake study**

### Cadmium concentrations

Relative to other indigenous fish in the Order Perciformes (Table 4), yellow perch from Lake Dufault in the Rouyn-Noranda area had the highest Cd concentrations reported in the literature. Laboratory studies on fish other than yellow perch have shown that the distribution of Cd among organs can indicate the route of uptake. In food-exposed fish, Cd concentrations were generally higher in the gut, stomach and pyloric caeca than in the gills, whereas in fish exposed to waterborne metals, Cd concentrations were generally higher in the gills and in the kidney than in the gastrointestinal tract (Harrison and Klaverkamp 1989; Szebedinszky et al. 2001). If these patterns hold for indigenous yellow perch, then the observation that Cd levels were from 3 to 8 times higher in the gastrointestinal tract than in the gills in our study suggests that uptake of this metal from food is more important than from water. However, higher Cd concentrations in the gut than in the gills do not always reflect contamination by food and could instead reflect a biliary-faecal excretion of Cd;

Kraal et al. (1995) demonstrated a higher [Cd] in the gut than in the gills in a study on carp exposed only to waterborne Cd.

The gills have been identified as the site of toxic action of Cd in numerous acute laboratory water-only exposures (Cusimano et al. 1986; Di Toro et al. 2001); in such cases, gill Cd concentrations have proven to be good predictors of acute Cd toxicity (the Biotic Ligand Model or BLM approach). However, our results for indigenous yellow perch suggest that the liver and kidney may be important sites for chronic toxicity since these organs concentrated Cd to the highest levels. Consequently, in seeking relationships between exposure and effects, it seems relevant to model Cd bioaccumulation in all body parts, and not only at Cd uptake sites (gills and gastrointestinal tract).

According to our modelling studies, competition between the  $H^+$ -ion and  $Cd^{2+}$  for biological uptake sites did not have a significant effect on Cd accumulation. Some acute toxicity studies using waterborne exposure have shown that a reduction of pH from 7 to 5 (Cusimano et al. 1986) or from 6 to 5 (Playle et al. 1993) reduced the toxicity of Cd in fish. On the other hand, Schubauer-Berignan et al. (1993) worked between pH values of 8.5 and 6 and observed no effect of pH on Cd toxicity to fathead minnows. The  $H^+$ -ion concentrations in our lakes (pH 6.1-8.2) were likely too low to confer any protection against Cd uptake.

Similarly, our calculations revealed only a limited effect of waterborne Ca on Cd accumulation in the liver, kidney and gills of the yellow perch, though the normalization procedure did improve the linearity of the relationships (note that the points corresponding to lakes Vaudray, Bousquet and Héva move to the right). It is somewhat surprising that calcium did not have a more important competitive effect, given its environmental gradient (10-fold) and considering the laboratory studies that have reported an influence of Ca on Cd uptake (Playle et al. 1993) and toxicity (Hollis et al. 2000) in fish, at Ca concentrations or gradients that were in the same range as those observed in the present study. One possible explanation for the limited effect of aqueous Ca on Cd accumulation in juvenile yellow perch might be that Cd uptake occurs largely via the diet. Work to date on metal-metal competition modelling in fish has been performed on data from waterborne metal exposures in the laboratory (Playle et al. 1993; Hollis et al. 2000), whereas Cd in indigenous perch may also be taken up from food. Although water hardness is known to affect metal uptake across the gill epithelium (Playle et al. 1993; Hollis et al. 2000), it is less obvious how water

hardness would affect Cd uptake from the gastrointestinal tract content in freshwater fish. An *in vitro* study done by Baskin (1999) demonstrated that calcium had no inhibitory effect on Cd transport across intestinal cells, even though some earlier authors had suggested that Cd may be transported by a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger located in the basolateral membrane of fish enterocytes (Schoenmakers et al. 1992).

#### Copper and zinc concentrations

With increasing ambient  $[\text{Cu}^{2+}]$ , a steady increase in bioaccumulated Cu concentrations was observed in the liver and gastrointestinal tract of indigenous yellow perch, whereas Cu concentrations were regulated in the other body parts. Copper is essential for many functions in the vertebrate body and complex homeostatic mechanisms are involved in the regulation of its internal levels (Sorensen, 1991). Following a review of studies done on yellow perch from 18 lakes located in the Sudbury area, Couture and Rajotte (2003) suggested a value of  $50 \mu\text{g Cu}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$  ( $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$ ) for basal hepatic Cu concentrations in yellow perch. The basal levels in yellow perch from our lakes seem slightly lower: as ambient  $[\text{Cu}^{2+}]$  increases, we begin to see appreciable Cu bioaccumulation in perch collected from Lake Bousquet ( $0.3 \mu\text{mol Cu}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$ ), and in those collected from Lake Dufault ( $0.5 \mu\text{mol Cu}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$ ) – see Fig. 4b. Our threshold value is thus slightly lower than that suggested by Couture and Rajotte (2003).

Internal zinc concentrations were regulated in indigenous yellow perch in lakes with ambient  $[\text{Zn}^{2+}]$  up to 45 nM; accumulation above basal levels in the kidney, liver and gills was observed only in fish from lakes with ambient  $[\text{Zn}^{2+}] \geq 300 \text{ nM}$ . In a similar study on indigenous fish in the River Lot (France), Andrès et al. (2000) measured no net Zn accumulation above normal Zn tissue levels at an exposure concentration of 700 nM total dissolved Zn; uptake above background levels in the kidney and the gills was only noted in fish exposed to 1400 nM dissolved Zn. Zinc concentrations in the gastrointestinal tract were normally about the same as those in the gills, except for Lake Dufault for which gill Zn concentrations exceeded those in the GI tract. This result suggests that in Lake Dufault the most important accumulation route of Zn may be via lakewater, as was found by Bervoets et al. (2001) for indigenous sticklebacks.

### Metal burdens

We examined metal distributions among organs along the exposure gradient, to determine if they were altered above a certain metal exposure threshold. For Cd, a shift from carcass to liver as the major organ of accumulation occurred between 0.06 and 0.14 nM ambient  $[Cd^{2+}]$ . This shift suggests either that Cd concentrations exceeded the excretory capacity of the liver at this level of exposure, or that the liver was storing the excess Cd in detoxified forms such as complexes with metal-binding proteins or as mineral granules. If these detoxification mechanisms were however unable to cope with the excess Cd, then it would be free to bind to sensitive sites, such as cytosolic metallo-enzymes or mitochondria, with resulting deleterious effects.

A similar trend was observed for Cu. Copper being better regulated than Cd, the change in Cu distribution was small, but it could nevertheless signal the onset of a disturbance in Cu homeostasis in affected lakes (Osisko and Dufault). Because the relative Zn burdens were stable among body parts, the liver must be able to cope with the high concentrations of this metal in the most contaminated lakes (Osisko and Dufault).

### Effects of metals

The condition factor of native fish reflects their recent growth and energy reserves. The lower condition factors in metal-contaminated fish, especially from Lake Dufault, are likely explained by a direct metabolic impact of the accumulated metals (Levesque et al. 2002). A change in food web structure cannot explain the lower condition factor because fish sampled in our study weighed < 10 g, a size-class recognised as planktivorous in yellow perch from these lakes (Sherwood et al. 2002), and zooplankton were abundant in all lakes (J.R. Rasmussen, Department of Biological Sciences, University of Lethbridge, Lethbridge, Alberta, Canada T1K 3M4, unpublished data). A reduced condition factor was also observed in indigenous yellow perch from a Cu, Ni and Cd contaminated environment (Eastwood and Couture 2002).

The hepatosomatic index (HSI) measured in the present study varied between 2.6 and 4.4, but was significantly reduced in only one of the two highly contaminated lakes (Lake Osisko). This index did not respond to metal accumulation in indigenous yellow perch from

a Ni, Cu and Cd contaminated environment (Couture and Rajotte 2003). We conclude that the HSI is not a good marker of metal exposure for indigenous yellow perch.

### **Conclusion**

Our measurements of metal concentrations in indigenous yellow perch support the use of the liver, kidney and gills of this species as target organs that respond to cadmium exposure. Additionally, the liver and gastrointestinal tract seem appropriate as monitors for copper exposure, whereas none of the body parts appear appropriate to evaluate exposure to zinc. We also found that calcium concentrations and lakewater pH within the ranges measured in our study lakes did not significantly influence metal concentrations in yellow perch liver, but [Ca] did influence the prediction of metal concentrations in the kidney and in the gills. From a practical point of view, the liver seems the organ best suited for this task since its accumulated metal concentrations most closely reflected Cd and Cu exposure. Additionally, we anticipate that liver could be a good organ to monitor toxic effects of these metals. Indeed, variations in the contribution of each organ to the total Cd and Cu burdens revealed a possible dysfunction in liver excreting capacities in the highly contaminated lakes. Whether or not the excess Cd and Cu that accumulates in the liver leads to toxicity will depend to a large extent on the form in which the metals are stored in the hepatocytes of fish from the highly contaminated lakes: detoxified or toxic forms.

When using adult fish as biomonitors of metal exposure one should consider the fact that fish age is potentially a confounding factor. We believe that this age dependence of metal accumulation may be linked to fish growth rate. Since growth rate may be highly variable from one fish population to another, because of variable environmental factors, yellow perch from other lakes may well not exhibit the same age dependence of metal accumulation as those from Lake Osisko.

We found that higher Cd concentrations were observed in the gastrointestinal tract than in the gills, and this observation supports the idea of a more important uptake of this metal from food than from water. Predominant Cd uptake from the diet could explain the absence of significant competition from  $\text{Ca}^{2+}$  or the  $\text{H}^+$ -ion on Cd uptake in all studied organs. If yellow perch are truly taking up the majority of their Cd from food, then the

relationship between aqueous and accumulated metals might be further improved by taking into account differences in prey type and prey Cd concentrations among lakes.

Lastly, condition factors were related to Cd accumulation but a lot of the variability in this relationship remained unexplained, probably because of the dependence of this factor on multiple environmental parameters. Consequently, on their own, the potential of condition factors as markers of metal effects appears limited.

## Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Metals in the Environment-Research Network (MITE-RN). Financial support to A. Giguère was also granted by the Centre Inter-universitaire de recherche en toxicologie (CIRTOX). Invaluable logistical support was provided by the Société de la Faune et des Parcs de l'Abitibi-Témiscamingue (Government of Québec). We would like to thank Annick Michaud and Céline Porcher for their work in the field, as well as René Rodrigue, Michelle Geoffroy-Bordeleau, Sylvie Saint-Pierre, Pauline Fournier and Stéphane Prémont for their help in the laboratory. We also thank O. Perceval and S. Guay for their statistical advice. Constructive comments from two anonymous referees helped improve an earlier draft of this paper. P.G.C. Campbell is supported by the Canada Research Chair programme.

## References

- Aalto, S.K. and Newsome, G.E. 1990. Additional evidence supporting demic behaviour of a yellow perch (*Perca flavescens*) population. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **47**: 1959-1962.
- Andrès, S., Ribeyre, F., Tourencq, J.N., and Boudou, A. 2000. Interspecific comparison of cadmium and zinc contamination in the organs of four fish species along a polymetallic pollution gradient (Lot River, France). *Sci. Total Environ.* **248**: 11-25.
- Audet, D. and Couture, P. 2003. Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments. *Can J. Fish. Aquat. Sci.* **60**: 269-278.
- Baker, J. P. and Christensen, S.W. 1991. Effect of acidification on biological communities in aquatic ecosystems. *In Acidic deposition and aquatic ecosystems. Edited by D.F. Charles.* Springer-Verlag, New York pp. 83-106.

- Barak, N.A.E. and Mason, C.F. 1990. Mercury, cadmium and lead concentrations in five species of freshwater fish from eastern England. *Sci. Tot. Environ.* **92**: 257-263.
- Baskin, S. 1999. A comparison of zinc and cadmium uptake via the intestinal tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). MSc thesis, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada.
- Berninger, K. and Pennanen, J. 1995. Heavy metals in perch (*Perca fluviatilis* L.) from two acidified lakes in the Salpausselkä area in Finland. *Water Air Soil Pollut.* **81**: 283-294.
- Bervoets, L., Blust, R., and Verheyen, R. 2001. Accumulation of metals in the tissues of three spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) from natural fresh waters. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **48**: 117-127.
- Campbell, P.G.C. 1995. Interaction between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. *In* Metal speciation and bioavailability in aquatic system. *Edited by* A. Tessier and D.R. Turner. John Wiley & Sons Ltd, New York pp. 45-102.
- Carru, A.M., Teil, M.J., Blanchard, M., Chevreuril, M., and Chesterikoff, A. 1996. Evaluation of the roach (*Rutilus rutilus*) and the perch (*Perca fluviatilis*) for the biomonitoring of metal pollution. *J. Environ. Health* **A31**: 1149-1158.
- Centre for Hydrology and Ecology (CHE). 2001. Windermere Humic Aqueous Model (WHAM). Natural Environment Research Council. Windermere, U.K.
- Couture, P. and Kumar, P.R. 2003. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquat. Toxicol.* **64**: 107-120.
- 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. *J. Environ. Monit.* **5**: 216-221.
- Croteau, M.-N., Hare, L., and Tessier, A. 1998. Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 1348-1353.

- Cusimano, R.F., Brakke, D.F., and Chapman, G.A. 1986. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **43**: 1497-1503.
- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., and Santore, R.C. 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 2383-2396.
- Eastwood, S. and Couture, P. 2002. Seasonal variations in condition and liver metal concentrations of yellow perch (*Perca flavescens*) from a metal-contaminated environment. *Aquat. Toxicol.* **58**: 43-56.
- Girard, C., Brodeur, J.C., and Hontela, A. 1998. Responsiveness of the interrenal tissue of yellow perch (*Perca flavescens*) from contaminated sites to an ACTH challenge test in vivo. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **55**: 438-450.
- Hansen, J.A., Lipton, J., and Welsh, P.G. 2002. Relative sensitivity of bull trout (*Salvelinus confluentus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to acute copper toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* **21** : 633-639.
- Harrison, S.E. and Klaverkamp, J.F. 1989. Uptake, elimination and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) and lake whitefish (*Coregonus clupeaformis* Mitchill). *Environ. Toxicol. Chem.* **8**: 87-97.
- Hogstrand, C., Lithner, G., and Haux, C. 1989. Relationship between metallothionein, copper and zinc in perch (*Perca fluviatilis*) environmentally exposed to heavy metals. *Mar. Environ. Res.* **28**: 179-182.
- Hogstrand, C., Lithner, G., and Haux, C. 1991. The importance of metallothionein for the accumulation of copper, zinc and cadmium in environmentally exposed perch, *Perca fluviatilis*. *Pharmacol. Toxicol.* **68**: 492-501.
- Hollis, L., McGeer, J.C., McDonald, D.G., and Wood, C.M. 2000. Effects of long term sublethal Cd exposure in rainbow trout during soft water exposure: Implications for biotic ligand modelling. *Aquat. Toxicol.* **51**: 93-105.
- Hontela, A., Dumont, P., Duclos, D., and Fortin, R. 1995. Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence river. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**: 725-731.

- Ion, J., de Lafontaine, Y., Dumont, P., and Lapierre, L. 1997. Contaminant levels in St. Lawrence river yellow perch (*Perca flavescens*): spatial variation and implications for monitoring. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **54**: 2930-2946.
- Köck, G., Triendl, M., and Hofer, R. 1996. Seasonal patterns of metal accumulation in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from an oligotrophic Alpine lake related to temperature. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53**: 780-786.
- Kraal, M.H., Kraak, M.H.S., DeGroot, C.J., and Davids, C. 1995. Uptake and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotox. Environ. Safety* **31**: 179-183.
- Levesque, H.M., Moon, T.W., Campbell, P.G.C., and Hontela, A. 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquat. Toxicol.* **60**: 257-267.
- Martell, A.E., Smith, R.M., and Motekaitis, R.J. 2001. NIST Standard Reference Database 46. Critically selected stability constants of metal complexes. Version 6.0. U.S. Department of Commerce, Gaithersburg, MD, USA.
- Neely, W.B. 1979. Estimating rate constant for the uptake and clearance of chemicals by fish. *Environ. Sci. Technol.* **13**: 1506-1510.
- Olsson, P.-E. and Haux, C. 1986. Increased hepatic metallothionein content correlates to cadmium accumulation in environmentally exposed perch (*Perca fluviatilis*). *Aquat. Toxicol.* **9**: 231-242.
- Pagenkopf, G.K. 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environ. Sci. Technol.* **17**: 342-347.
- 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. *Comp. Biochem. Physiol.* **133**: 3-35.
- Playle, R.C., Dixon, D.G., and Burnison, K. 1993. Copper and cadmium binding to fish gills: modification by dissolved organic carbon and synthetic ligands. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**: 2667-2677.

- Rotchell, J.M., Clarke, K.R., Newton, L.C. and Bird, D.J. 2001. Hepatic metallothionein as a biomarker for metal contamination: age effects and seasonal variation in European flounders (*Pleuronectes flesus*) from the Severn Estuary and Bristol Channel. *Mar. Environ. Res.* **52**: 151-171.
- Schoenmakers, T.J.M., Klaren, P.H.M., Flik, G., Lock, R.A.C., Pang, P.K.T., and Wendelaar Bonga, S.E. 1992. Actions of cadmium on basolateral plasma membrane proteins involved in calcium uptake by fish intestine. *J. Membrane Biol.* **127**: 161-172.
- Schubauer-Berigan, M.K., Dierkes, J.R., Monson, P.D., and Ankley, G.T. 1993. pH-dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella atzeqa* and *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**: 1261-1266.
- Scott, W.B. and Crossman, E.J. 1973. *Freshwater Fish of Canada*. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa.
- Sherwood, G.D., Kovecses, J., Hontela, A., and Rasmussen, J.B. 2002. Simplified food webs lead to energetic bottlenecks in polluted lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **59**: 1-5.
- Sjöbeck, M.-L., Haux, C., Larsson, Å., and Lithner, G. 1984. Biochemical and hematological studies on perch, *Perca fluviatilis*, from the cadmium-contaminated river Eman. *Ecotox. Environ. Saf.* **8**: 303-312.
- Sorensen, E.M.B. 1991. *Metal poisoning in fish*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Sprenger, M.D., McIntosh, A.W., and Hoenig, S. 1988. Concentrations of trace elements in yellow perch (*Perca flavescens*) from six acidic lakes. *Water Air Soil Pollut.* **37**: 375-388.
- SPSS, Inc. 2000. *Sigmaplot 2000 for Windows*. Chicago, IL.
- StatSoft, Inc. 1999. *STATISTICA for Windows*. Tulsa, OK.
- Szebedinszky, C., McGeer, J.C., McDonald, D.G., and Wood, C.M. 2001. Effects of chronic Cd exposure via the diet or water on internal organ-specific distribution and subsequent gill Cd uptake kinetics in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 597-607.

- Taylor, L.N., McGeer, J.C., Wood, C.M., and McDonald, D.G. 2000. Physiological effects of chronic copper exposure to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in hard and soft water: Evaluation of chronic indicators. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**: 2298-2308.
- Tipping, E. 1994. WHAM-a chemical equilibrium model and computer code for waters, sediments, and soils incorporating a discrete site/electrostatic model of ion-binding by humic substances. *Computers Geosciences* **20**: 973-1023.
- Yeardley, R.B., Lazorchak, J.M., and Paulsen, S.G. 1998. Elemental fish tissue contamination in northeastern U. S. lakes: evaluation of an approach to regional risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**: 1875-1884.

**Table 1:** Location of the lakes sampled in the present study and chemical composition of their epilimnetic water (total dissolved metal concentrations, [M], dissolved organic carbon, [DOC], and free-metal ion concentrations, [M<sup>Z+</sup>]). Free Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> concentrations were estimated using the Windermere Humic Aqueous Model (WHAM 6.0) from concentrations of total dissolved metal, dissolved Al and Fe, major inorganic cations and anions, DOC as well as lakewater pH.

| Lake name and location            | [Cd] | [Cu] | [Zn] | [DOC]              | [H <sup>+</sup> ] | [Ca <sup>2+</sup> ] | [Cd <sup>2+</sup> ] | [Cu <sup>2+</sup> ] | [Zn <sup>2+</sup> ] |
|-----------------------------------|------|------|------|--------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                                   | nM   | nM   | nM   | mg•L <sup>-1</sup> | nM                | μM                  | nM                  | nM                  | nM                  |
| Dufault (DU); 48°17'N, 79°0'W     | 7.72 | 254  | 2425 | 5.5                | 32                | 592                 | 3.72                | 1.5E-1              | 1163                |
| Osisko (OS); 48°14'N, 79°0'W      | 2.44 | 119  | 466  | 3.5                | 631               | 953                 | 1.41                | 6.5E-1              | 297                 |
| Bousquet (BO); 48°13'N, 78°35'W   | 1.06 | 56   | 164  | 14.7               | 251               | 150                 | 0.28                | 1.7E-2              | 54.5                |
| Vaudray (VA); 48°05'N, 78°42'W    | 0.81 | 54   | 109  | 9.0                | 112               | 134                 | 0.18                | 7.9E-3              | 31.5                |
| Héva (HE); 48°11'N, 78°19'W       | 0.54 | 35   | 56   | 9.4                | 794               | 94                  | 0.21                | 4.5E-2              | 26.2                |
| Dasserat (DA); 48°13'N, 79°22'W   | 0.18 | 32   | 57   | 9.5                | 32                | 293                 | 0.03                | 5.1E-4              | 10.4                |
| Ollier (OL); 48°11'N, 79°17'W     | 0.12 | 46   | 23   | 6.3                | 13                | 517                 | 0.03                | 1.0E-3              | 5.6                 |
| Opasatica (OP); 48°08'N, 79°18' W | 0.11 | 44   | 31   | 7.7                | 6                 | 337                 | 0.01                | 2.3E-4              | 4.0                 |
| ratio max/min                     | 70   | 8    | 105  | 4                  | 132               | 10                  | 372                 | 2826                | 291                 |

**Table 2:** Coefficients of determination ( $r^2$ ) for relationships between fish age and Cd, Cu and Zn concentrations in various parts of yellow perch from Lake Osisko – see Fig. 1 (N = 81). Note that the significance level was adjusted according to the Bonferroni procedure to take into account the number of regressions done (15 regressions). \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ ; n.s.  $P > 0.05$ .

|                        | Body part |          |          |          |         |
|------------------------|-----------|----------|----------|----------|---------|
|                        | liver     | kidney   | gills    | GI tract | carcass |
| [Cd] body part vs. age | 0.23 ***  | 0.52 *** | 0.22 *** | n.s.     | n.s.    |
| [Cu] body part vs. age | 0.12 *    | n.s.     | n.s.     | n.s.     | n.s.    |
| [Zn] body part vs. age | n.s.      | n.s.     | n.s.     | n.s.     | 0.11*   |

**Table 3:** Coefficients of determination ( $r^2$ ) for relationships between Cd accumulation and free  $[Cd^{2+}]$ , or free  $[Cd^{2+}]$  normalized for hypothetical competition with  $Ca^{2+}$  at the sites involved in Cd uptake. Relationships were examined for whole fish and in various body parts of yellow perch from eight lakes - see Fig. 3. Estimates of the constant  $K_{Ca}$  and associated standard errors (SE) are also presented. Note that the significance level was adjusted according to the Bonferroni procedure, to take into account the number of regressions done (12 regressions). \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ ; n.s.  $P > 0.05$ .

| <u>Predictor</u>   | <u>Tissue [Cd]</u> |                 |                 |                 |          |         |
|--|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------|---------|
|  | whole fish         | liver           | kidney          | gills           | GI tract | carcass |
| ambient $[Cd^{2+}]$  | n.s.               | 0.85*           | n.s.            | n.s.            | n.s.     | n.s.    |
| ambient $[Cd^{2+}]$<br>normalized for $Ca^{2+}$<br>competition | n.s.               | 0.90**          | 0.87*           | 0.83*           | n.s.     | -       |
| <u>Apparent binding<br/>constant (eq. 3)</u>                   |                    |                 |                 |                 |          |         |
| $K_{Ca}$   | $4 \times 10^4$    | $1 \times 10^4$ | $4 \times 10^4$ | $1 \times 10^6$ | -        | -       |
| SE   | $9 \times 10^3$    | $2 \times 10^3$ | $5 \times 10^3$ | $1 \times 10^6$ | -        | -       |

**Table 4:** Metal accumulation by feral fish in the Order Perciformes.

| Reference                               | Organ     | [Cd]<br>(nmol•g <sup>-1</sup> dw) | [Cu]<br>(µmol•g <sup>-1</sup> dw) | [Zn]<br>(µmol•g <sup>-1</sup> dw) |
|---|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Perca flavescens</i>                 |           |                                   |                                   |                                   |
|   | Kidney    | 729                               | 0.19                              | 21.9                              |
| Our study                               | Liver     | 399                               | 0.50                              | 2.0                               |
| (Lake Dufault)                          | Gills     | 23                                | 0.12                              | 2.0                               |
|   | GI tract  | 62                                | 0.12                              | 1.6                               |
|   | Carcass   | 6                                 | 0.02                              | 2.0                               |
| Couture and Kumar 2003 (Lake Whitson)   | Liver     | 281                               | 1.0                               | 2.8                               |
| Eastwood and Couture 2002               | Liver     |                                   | 4.04                              | 1.56                              |
| Girard et al. 1998<br>(Iles de la Paix) | Liver     | 6.4*                              |                                   |                                   |
| Hontela et al. 1995                     | Liver     | 6.4*                              | 0.03*                             | 1.28*                             |
| Ion et al 1997                          | Muscle    |                                   | 0.01*                             | 0.0002*                           |
| Sprenger et al. 1988                    | Liver     | 166                               |                                   | 1.62                              |
| <i>Perca fluviatilis</i>                |           |                                   |                                   |                                   |
|   | Kidney    | ~ 272*                            |                                   | ~ 5.2*                            |
|   | Liver     | ~ 176*                            |                                   | ~ 1.8*                            |
| Andrès et al. 2000                      | Gills     | ~ 30.8*                           |                                   | ~ 2.02*                           |
|   | Intestine | ~ 50.4*                           |                                   | ~ 0.86*                           |
|   | Muscle    | ~ 0.54*                           |                                   | ~ 0.32*                           |
| Barak and Mason 1990                    | Liver     | 8*                                |                                   |                                   |
|   | Muscle    | 1.2*                              |                                   |                                   |
|   | Kidney    | 32.0                              |                                   | 2.3                               |
| Berninger and Pennanen 1995             | Liver     | 24.5                              |                                   | 1.4                               |
|   | Muscle    | 0.2                               |                                   | 0.6                               |
| Carru et al. 1996                       | Muscle    | 1.8                               | 0.02                              |                                   |
| Hogstrand et al. 1989                   | Liver     |                                   | 0.02*                             | 1.77*                             |
| Hogstrand et al. 1991                   | Liver     | 60.4*                             | 0.76*                             | 2.14*                             |
| Olsson and Haux 1986                    | Liver     | 56                                | 0.16                              | 1.22                              |
| Sjöbeck et al. 1984                     | Liver     | 272                               |                                   |                                   |

\* Ratio wet:dry weight used for transformations (empirical ratios from Rouyn-Noranda perch: liver = 4; kidney = 3.4; gills = 4.4; gastrointestinal tract = 2.8; muscle = 3).

## Figure captions

Figure 1: Relationships between the age of Lake Osisko yellow perch (*Perca flavescens*) and the concentrations of Cd, Cu and Zn in various body parts. Only curves for significant relationships ( $P < 0.05$ ) are shown; explained variation ( $r^2$ ) and statistical significance ( $P$ ) are presented in Table 2. Each point represents the value for a single fish ( $N = 81$ ).

Figure 2: Relationships between Cd concentrations in the gastrointestinal tract (GIT) contents and (a) fish age or (b) Cd concentrations in the gastrointestinal tract (GIT) ( $N = 65$ ).

Figure 3: Cadmium bioaccumulation in relation to  $[Cd^{2+}]$  (solid line and solid symbols) and to free  $[Cd^{2+}]$  normalised for hypothetical competition between  $Ca^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  at biological uptake sites (dashed line and open symbols) in (a) the liver, (b) the kidney, (c) the gills, (d) the gastrointestinal tract, (e) the carcass and (f) the whole body of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). Values of  $K_{Ca}$ , explained variation ( $r^2$ ) and statistical significance ( $P$ ) are presented in Table 3. Each point represents the mean ( $\pm$  standard deviation, SD) for 15 fish from each lake. Arrows indicate shifts for (from top to bottom) lakes Vaudray, Bousquet and Héva.

Figure 4: Metal accumulation in various yellow perch (*Perca flavescens*) parts in relation to free ion concentrations of: (a) and (b) copper, (c) and (d) zinc. Each point represents the mean ( $\pm$  standard deviation, SD) of 15 fish from each lake. In panel (b), different letters beside a lake indicate a significant difference. Lake abbreviations: BO = Bousquet, OS = Osisko, DU = Dufault. Symbol definitions:  $\blacktriangle$  Liver,  $\circ$  Kidney,  $\bullet$  Gills,  $\blacklozenge$  Gastrointestinal tract,  $\square$  Carcass.

Figure 5: Body part contributions to total metal burdens: (a) cadmium, (b) copper and (c) zinc. Each point represents the mean for 15 fish ( $\pm$  standard deviation, SD) from each lake. Lake abbreviations: OS = Osisko, DU = Dufault, OP = Opasatica. Symbol definitions:  $\blacktriangle$  Liver,  $\circ$  Kidney,  $\bullet$  Gills,  $\blacklozenge$  Gastrointestinal tract,  $\square$  Carcass.

Figure 6: Relationships between cadmium and various biomarkers: (a) condition factor in relation to hepatic Cd and (b) liver somatic index in relation to  $[\text{Cd}^{2+}]$  in lakewater. Each point represents the mean ( $\pm$  standard deviation, SD) for 15 fish from each lake. Lake abbreviations: OS = Osisko, DU = Dufault, OP = Opasatica, DA = Dasserat, VA = Vaudray. In panel (b), different letters beside a lake or group of lakes indicate a significant difference.

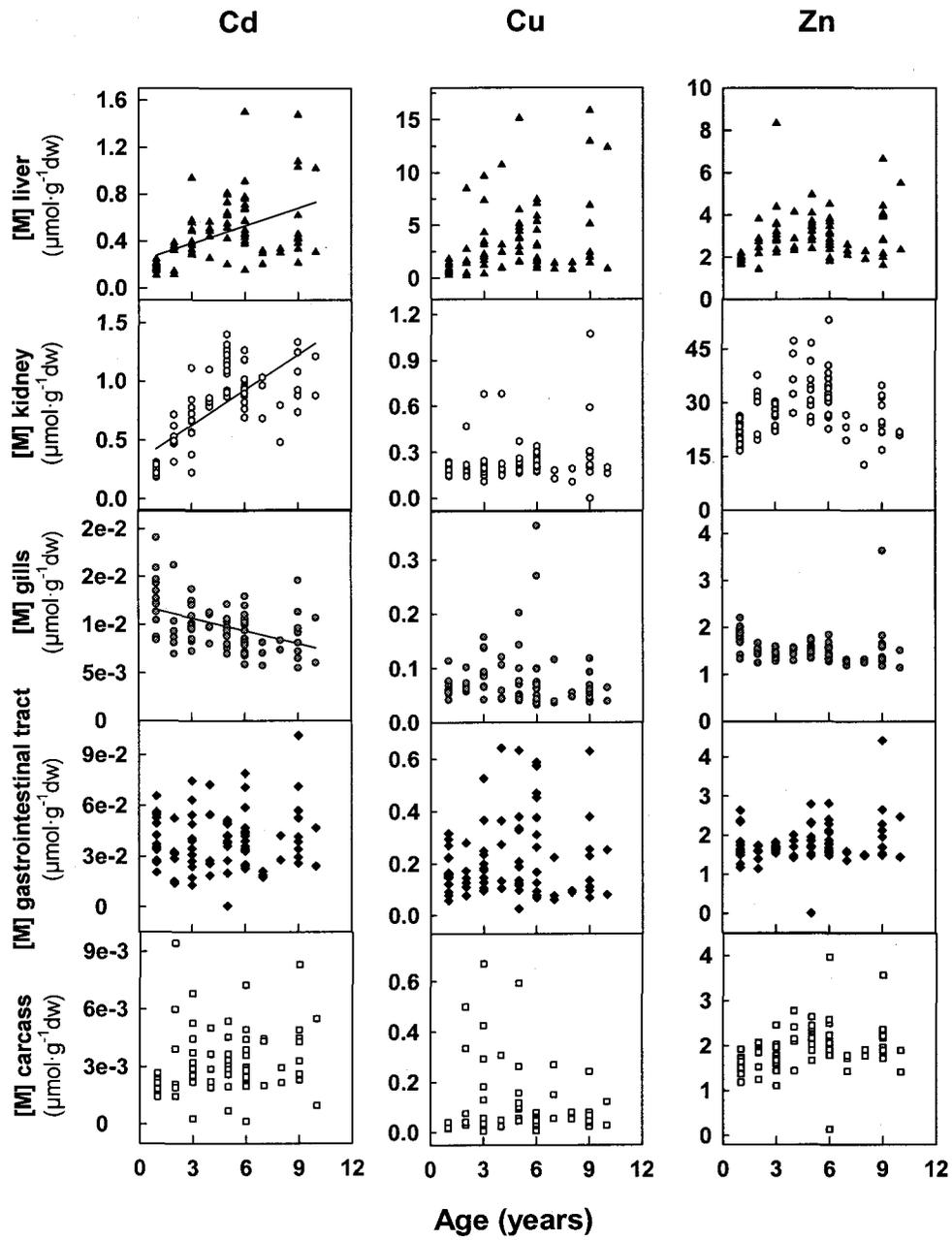


Figure 1

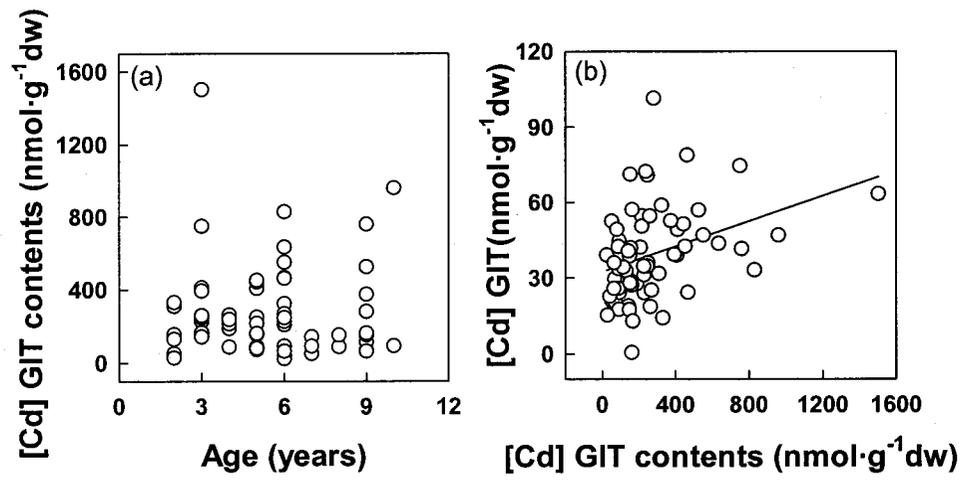


Figure 2

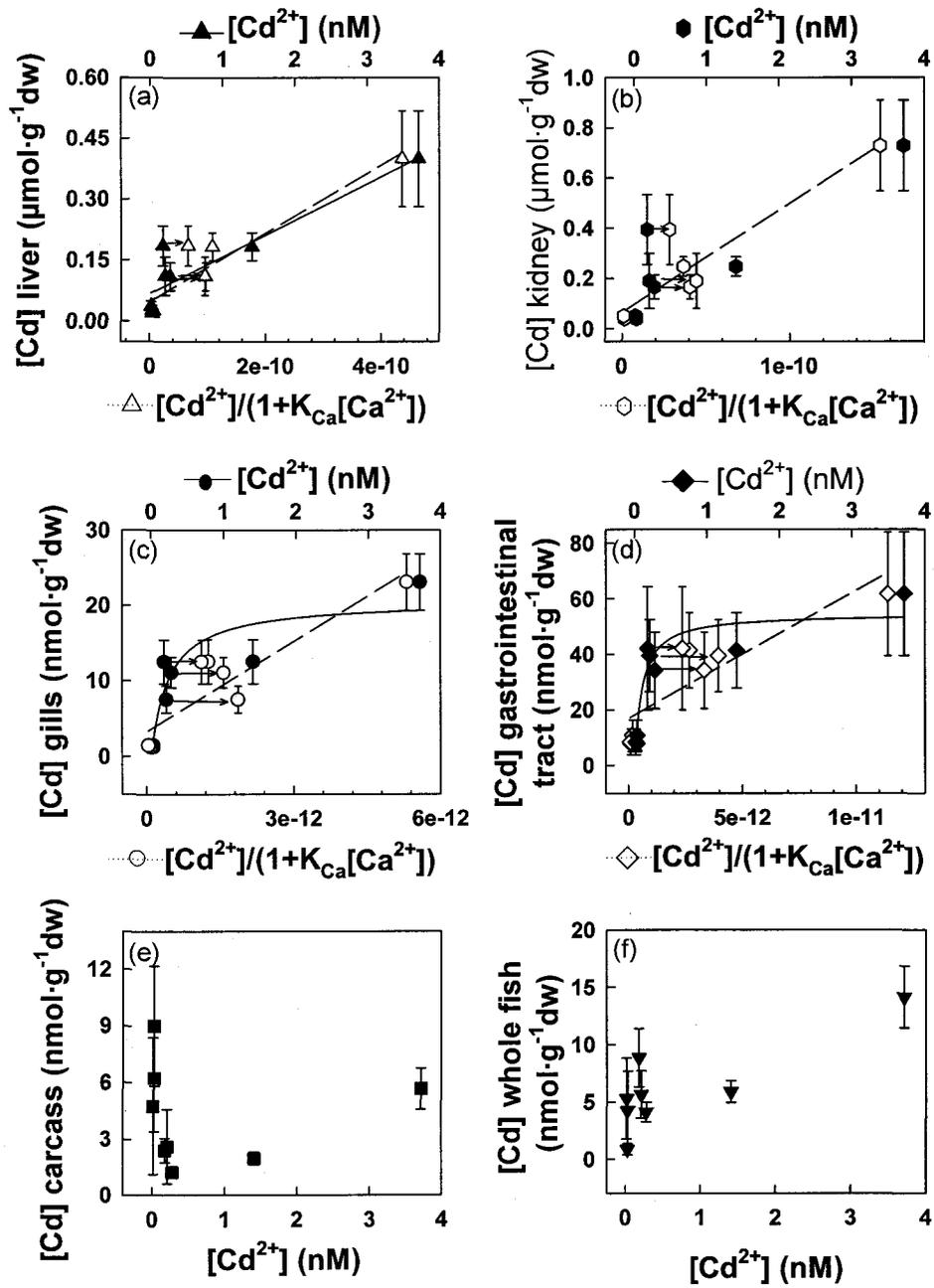


Figure 3

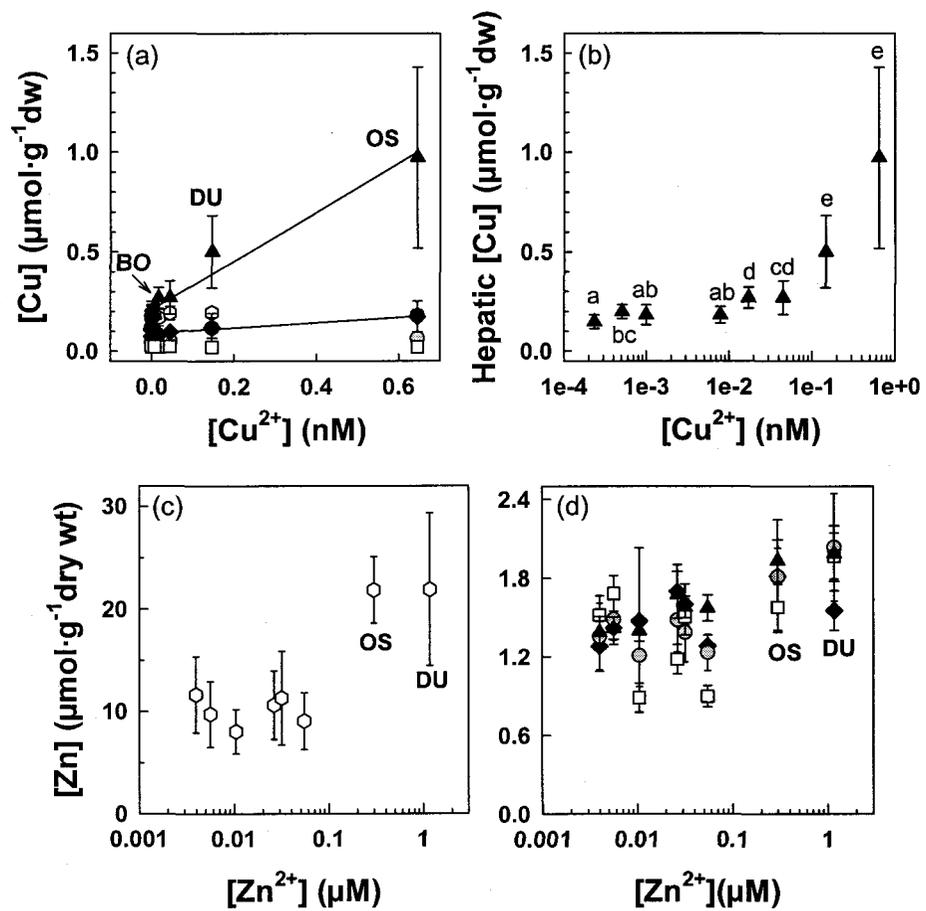


Figure 4

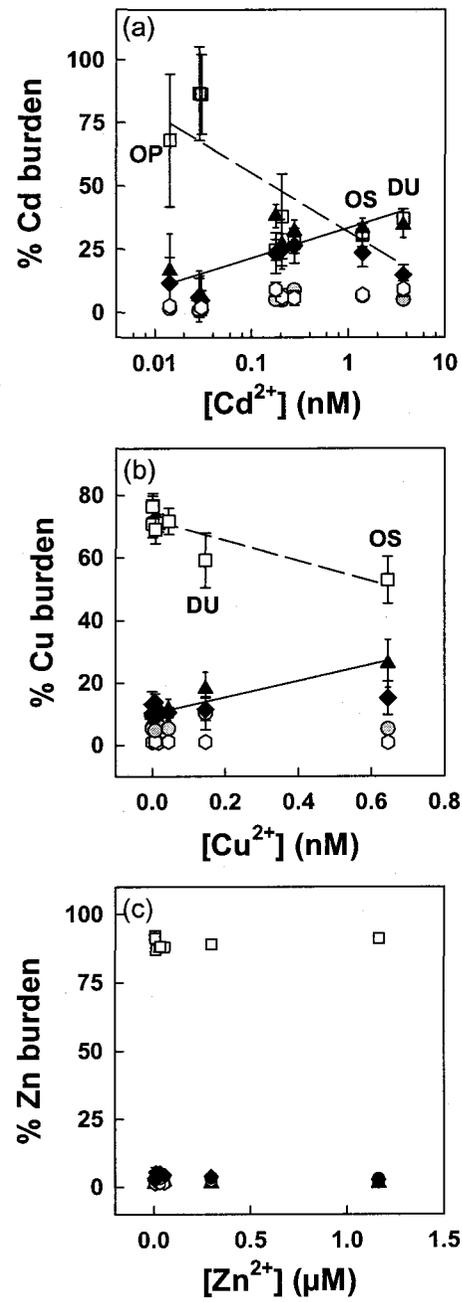


Figure 5

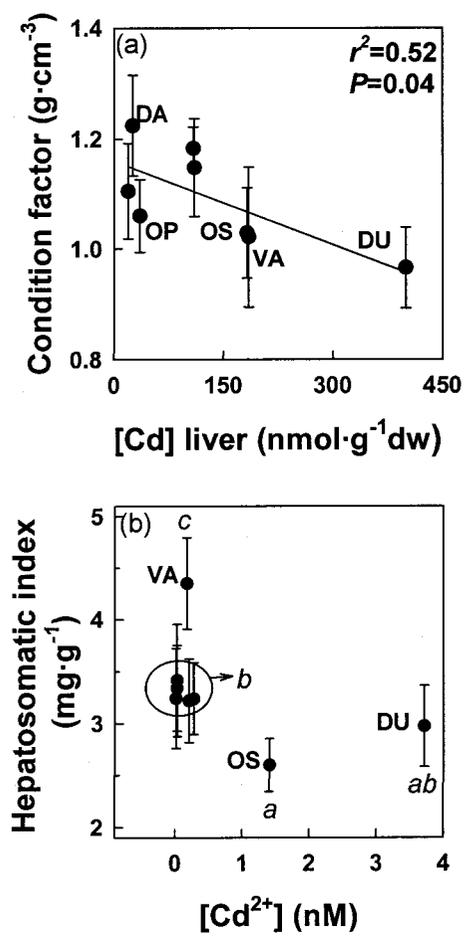
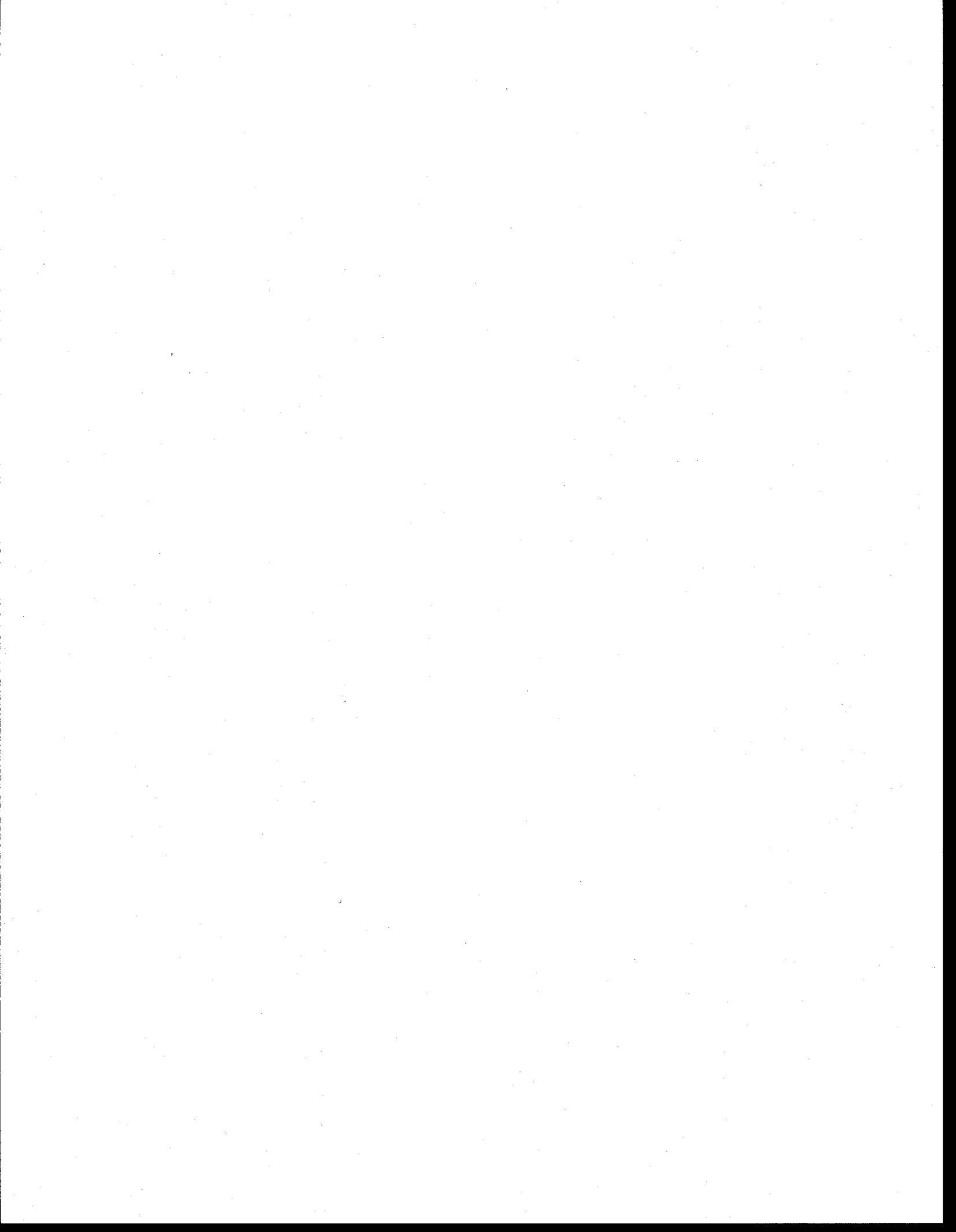


Figure 6



10 3<sup>ème</sup> article

**Répartition subcellulaire du cadmium, cuivre, zinc et nickel chez des perchaudes indigènes récoltées le long d'un gradient polymétallique.**

**Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient**

*Anik Giguère, Peter G. C. Campbell, Landis Hare and Patrice Couture*

INRS-ETE, Université du Québec, C.P. 7500, Sainte-Foy, QC, Canada G1V 4C7

Submitted on November 7<sup>th</sup>, 2003

to the Environmental Toxicology and Chemistry journal.



## Abstract

Metal detoxification mechanisms were studied in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) collected from 8 lakes located along a Cd, Cu, Ni and Zn concentration gradient. Ambient dissolved metal concentrations were measured to evaluate exposure and total hepatic metal concentrations were determined as a measure of metal bioaccumulation. Metal partitioning among metal-sensitive fractions (cytosolic enzymes, organelles) and detoxified metal fractions (metallothionein, granules), was determined by differential centrifugation of fish liver homogenates. The major proportion of hepatic Cd and Cu was found in the metallothionein-like fraction, whereas the enzymes fraction was the largest contributor to the total Ni and Zn burdens. The concentrations of Cd, Cu and Ni (but not Zn) in each sub-cellular fraction increased along the metal contamination gradient, but the relative contributions of each fraction to the total burden of each of these metals remained generally constant. For these chronically exposed fish there was thus no threshold exposure concentration above which spillover of Cd, Cu or Ni occurred from the metallothionein-like or granule pools to metal-sensitive ligands. The presence of Cd and Ni in metal-sensitive fractions, even for low chronic exposure concentrations, suggests that metal detoxification was imperfect, i.e. that *P. flavescens* was subject to some metal-related stress even under these conditions.

Keywords: granules, metallothionein, chronic toxicity, detoxification, mitochondria

## Introduction

When present in excess in living cells, trace metals may bind to physiologically sensitive target molecules (small peptides such as glutathione, metalloenzymes, DNA and RNA) or organelles (mitochondria, endoplasmic reticulum and nuclei; [1]) leading to deleterious effects. A variety of sub-cellular systems have evolved to permit the accumulation, regulation and immobilization of trace metals; these include metal binding proteins such as metallothionein, lysosomes, granules and membrane-bound vesicles. Metallothionein (MT) proteins are rich in the amino acid cysteine (~30% of total amino acid residues) which confers upon them a high affinity for soft, polarizable metal cations [2]. This characteristic explains the predominant role that MT plays in the regulation of essential metals (Cu, Zn) and in the sequestration and detoxification of non-essential metals (Cd, Hg) in a wide variety of animals (reviewed in [2]). However, the importance of metallothionein production relative to alternative strategies of metal detoxification (e.g.: storage in granules; enhanced metal elimination by exocytosis of lysosomes) remains largely unexplored in field situations.

In laboratory studies test organisms have been exposed to a range of metal concentrations, and the onset of deleterious effects has been linked to changes in sub-cellular metal partitioning ([3, 4]; also see review [2]). These studies have necessarily been of relatively short duration, and they have generally been carried out with “naïve” organisms, i.e., with organisms that had not been pre-exposed or acclimated to the metal in question. In laboratory experiments, metal concentrations are often higher than those encountered in the field and metal sources such as food are usually ignored [5]. In addition, metals are usually present in the field as metal mixtures, in contrast to typical laboratory experiments.

In the present study we have determined the relative importance of various metal pools in the livers of yellow perch (*Perca flavescens*) collected from eight lakes along a polymetallic contamination gradient. Our original hypothesis was that non-essential metals such as Cd and Ni would be effectively detoxified in fish collected from lakes at the low end of the metal exposure gradient (i.e., these lakes would correspond to the low exposures in the laboratory experiments), but that above a certain threshold metal concentration – to be determined – these metals would “spill over” into potentially metal-sensitive sub-cellular pools. In other words, we thus expected

to observe complete metal detoxification by metallothioneins and granules in the fish sampled in the reference and least contaminated lakes, but only a partial detoxification in the fish sampled from the most contaminated lakes.

Total dissolved metal concentrations in lake water were measured to evaluate fish metal exposure and whole liver metal concentrations were determined to evaluate metal bioaccumulation. Liver was chosen as the target organ on the basis of the results of a previous study on indigenous yellow perch in which this organ was shown to accumulate high Cd concentrations. The contribution of this organ to fish Cd and Cu burdens increased with increasing ambient metal concentrations [6], a trend that is consistent with the anticipated role of the liver in dealing with excess metals. Detoxification strategies were studied by measuring metal concentrations in liver sub-cellular pools associated with metal elimination (lysosomes) or sequestration (metallothionein and granules) and in potential sub-cellular targets of metal toxicity (mitochondria; endoplasmic reticulum; nuclei; cytosolic proteins other than metallothionein).

## **Material and methods**

### **Study areas**

Water samples and fish were collected in June 2001 from a total of 8 lakes (Table 1): 4 lakes in the vicinity of Rouyn-Noranda (Québec, Canada) and 4 lakes located near Sudbury (Ontario, Canada). These 2 regions have been subjected to inputs of acidic and trace metal rich materials from nearby Ni, Fe and Cu (Sudbury) or Cu, Pb and Zn (Rouyn-Noranda) mining and smelting operations. Largely as a consequence of these inputs, many Sudbury lakes present concentrations of Cu and Ni above background concentrations whereas many lakes in the Rouyn-Noranda area present high concentrations of Cd, Cu and Zn (Table 1).

### **Metal exposure**

Water samples were collected in the epilimnion of each of the 8 studied lakes, using duplicate *in situ* Plexiglass diffusion samplers (consisting of 8 adjacent 4-mL cells) separated from lake water

by a 0.2  $\mu\text{m}$  nominal pore-size polysulfone membrane (Pall Gelman Sciences, HT-200, Ville St-Laurent, QC). The two samplers were suspended 1 m above the lake bottom and at least 1.5 m under the surface in the epilimnion of each lake. They were retrieved after three days and sampled immediately. Three subsamples for metals (Cd, Cu, Zn, Ni, Al, Fe) and 2 subsamples for major cations (Ca, Mg) and organic carbon determinations were removed from each sampler. pH was also measured in water collected at a depth of 0.5 m, near the diffusion samplers, when they were retrieved. Average concentrations were calculated for each sampler, resulting in 2 values for each lake. Sample collection from the diffusion samplers is described in detail in a previous paper [6].

Zinc, Fe, Al and Ca analyses were performed by inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry (ICP-AES) (Varian, Vista AX). Cd, Cu and Ni were measured using a graphite furnace atomic absorption spectrophotometer (GFAAS) equipped with a graphite tube atomizer (Perkin-Elmer, Simaa 6000) and an autosampler (Perkin-Elmer model AS-72). Certified reference water samples (Riverine water reference material NIST 1643d, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD) were also analyzed for metals during each analytical run; measured metal concentrations were consistently within the certified range for each element. Inorganic carbon analyses were done using a hot wire detector (HWD) gas chromatograph (Perkin Elmer, Sigma 300). Organic carbon was measured using a total organic carbon analyzer (Schimazu, TOC-5000A). Blanks and appropriate standard reference materials for anion measurements and for inorganic and organic carbon determinations were analyzed in accordance with INRS-ETE quality assurance / quality control procedures.

### **Fish collection**

Yellow perch were collected from the 8 studied lakes using a seine net and they were kept alive until killed with a blow on the head, after which they were immediately dissected. Livers were kept in acid-washed polypropylene containers in liquid nitrogen until analysis. In a previous study of a Rouyn-Noranda Lake (Lake Osisko), we observed increasing bioaccumulated cadmium concentrations with increasing perch age [6]. To minimize the unwanted variability related to fish age, we collected juvenile fish of the same age class (7-10 g) for the present study.

Two observers evaluated the age of a subsample of 10 to 18 fish from each lake, by observing a section of the longest ray of the dorsal fin; this technique gave ages equivalent to those determined using fish otoliths (the 2 structures were compared in 8 yellow perch populations: both structures yielded similar results in fish < 3 years old; A. Giguère, INRS-ETE, unpublished).

## **Metal sub-cellular partitioning**

### *Differential centrifugation*

Differential centrifugation (Figure 1) was used to separate various sub-cellular compartments: (1) a fraction comprising nuclei, cell membranes, intact cells and connective tissue, termed “nuclei / debris” hereafter, (2) granules, (3) mitochondria, (4) a fraction combining microsomes and lysosomes, (5) cytosolic heat-stable proteins, likely metallothioneins, termed “MT-like” hereafter and (6) cytosolic heat denatured proteins, termed “enzymes” hereafter for simplicity [1].

Sixteen livers were combined for each replicate sample (N=3 replicates), to have a minimum of 0.8 g wet weight of tissue for each determination. Livers were manually homogenized in ice-cold NaCl 0.9% (purity 99.999%; Alfa Aesar #10862, Ward Hill, MA) at a dilution of 1: 2 (w/w) using a 2 mL Potter-Elvehjem homogenizer equipped with a glass pestle (Cole Parmer U-04368, Anjou, QC). Revolutions of the pestle inside the tube were limited to 5 to minimize organelle breakage, which had been shown to increase significantly at 15 revolutions (A. Giguère, INRS-ETE, unpublished results). Separation of the granules from the initial centrifugation pellet was performed following the method described in Wallace et al. [1] by (1) resuspension of the pellet (P1, Figure 1) in 0.5 mL ultrapure water, (2) heating this suspension at 100°C for 2 min, (3) adding 0.5 mL NaOH 1N (purity 99.998%; Aldrich #48087-8, Oakville, ON), (4) heating again at 60-70°C for an hour and (5) centrifugation at 10,000Xg for 10 min at 20°C. The granules remain in this final pellet. Separation of the enzymes and MT-like cytosolic proteins was also performed according to Wallace et al. [1] by (1) heating supernatant S4 (Figure 1) at 80°C for 10

min, (2) cooling it on ice for an hour and (3) centrifuging it at 50,000Xg for 10 min at 4°C. The heat-stable MT-like proteins remain in the final supernatant.

Various artifacts complicate centrifugal fractionation, such as, for example, breakage and agglutination of particles, leakage of soluble constituents and overlap among sub-cellular fractions [1]. Overlap among fractions can be evaluated by measuring marker enzymes, known to be associated specifically with a single organelle, such as cytochrome oxidase for mitochondria, acid phosphatase for lysosomes and glucose 6-phosphatase for microsomes. Because of tissue limitations, we chose to use the operationally defined fractions as they were, keeping in mind that they are surely impure.

#### *Metal concentrations in the fractions*

##### *Pellet and aliquot*

The aliquot taken from the whole homogenate, as well as all the centrifugation pellets, were freeze-dried and then weighed. They were first digested at room temperature with nitric acid (Fisher Scientific, trace metal grade, Nepean, ON) (~3 mL of acid per gram of tissue) directly in the centrifuge tubes for 24 h, to limit sample loss and metal adsorption onto the tubes. Digestates were then transferred into Teflon containers and a hot-digestion was performed in an autoclave at 120-125°C (1.1-1.3 kg cm<sup>-2</sup>) for 3 h. Cooled digestates were then diluted 10-fold with ultrapure water. Certified reference material (lobster hepatopancreas, NRCC TORT-1, Ottawa, ON) was submitted to the same procedure.

##### *Supernatants*

The supernatants were digested in the autoclave, at 120-125°C (1.1-1.3 kg cm<sup>-2</sup>) for 3 h, in an equal volume of nitric acid (trace metal grade, Fisher Scientific). Cooled digestates were then diluted 5-fold with ultrapure water. Certified reference material (lobster hepatopancreas, NRCC TORT-1) was submitted to the same procedure.

Concentrations of Cd, Cu, Zn, S, P, and Ca were measured by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) (Varian, Vista AX). Blanks indicated negligible

contamination (N=15): Cd<0.33 µg/L; Cu<0.61 µg/L; Zn=0.3 µg/L, S<33µg/L, P<11 µg/L and Ca=5.3 mg/L. The recovery of TORT-1 reference samples (N=12) was within the certified range for Cd (100.5 ± S.D. of 3.8%) and within 15% of the certified values for Cu (88.6 ± S.D. of 3.6%) and Zn (89.1 ± S.D. of 4.3%). Concentrations of Ni were measured by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (GFAAS: Perkin-Elmer, Simaa 6000 with Zeeman background correction). Digestion blanks indicated negligible contamination (N=5): Ni<0.11µg/L. The recovery of TORT-1 reference samples (N=2) was within the certified range (95.1%).

### *Quality control*

Aliquots from each of the whole homogenates were taken in order to measure total metal concentrations, but also to perform quality control tests to determine the recovery of metals initially present in each of the whole homogenate preparations. Average (N=24) metal mass balance recoveries were 101% (±SD of 8%) for Cd, 106% (±SD 10%) for Cu, 104% (±SD 6%) for Zn, 107% (±SD 16%) for Ca, 98% (±SD 6%) for S and 97% (±SD 6%) for P. Results for Ni were less satisfactory (mass balance recovery of 133% ± SD 43%) due to an apparent contamination of the P2 and S2 fractions with the NaOH reagent, as well as uncertainty about Ni values in the reference lake (Opasatica) because of Ni concentrations being near or below the detection limit. Because of this ambiguity, Ni concentrations in the S2 and P2 fractions were discarded from further analysis.

## **Results**

Fish collected from each lake were on average 1 year old for lakes Hannah (1.0±SD 0.0, N=15), Osisko (1.1±SD 0.3, N=10), Dufault (1.2±SD 0.4, N=15) and Laurentian (1.3±SD 0.6, N=14), and 2 years old for lakes Wavy (1.5±SD 0.7, N=15), Vaudray (1.5±SD 0.5, N=18), Opasatica (2.2±SD 0.4, N=14) and Raft (2.3±SD 0.9, N=14).

### **Metal bioaccumulation and sub-cellular partitioning**

Concentrations of total hepatic Cd, Cu, Zn and Ni were higher in fish collected from most lakes relative to fish from the reference lake, Opasatica (Figure 2). Variations in metal concentration

between the livers of fish from the most and the least contaminated lakes ( $[M]_{\max}/[M]_{\min}$ ) decreased in the order Ni (36) > Cd (14) > Cu (13) > Zn (2).

### *Cadmium*

The concentrations of Cd in all sub-cellular fractions, with the exception of the granule fraction, were significantly ( $P < 0.001$ ) linearly related to total hepatic Cd (Figs. 3A and B; MT-like,  $r^2 = 0.98$ ; enzymes,  $r^2 = 0.97$ ; mitochondria,  $r^2 = 0.89$ ; microsomes / lysosomes,  $r^2 = 0.95$ ; nuclei / debris,  $r^2 = 0.99$ ). The relationship between Cd concentrations in the mitochondrial fraction and hepatic [Cd] was also well-described by a sigmoidal relationship of the form:  $y = a / \{1 + e^{(-x+x_0/b)}\}$  ( $r^2 = 0.93$ ;  $P = 0.002$ ). Most of the total hepatic Cd burden was in the cytosolic portion of the cells (average for all lakes of  $59\% \pm \text{SD } 7\%$ ). The contribution of the enzyme fraction decreased significantly from 16% to 9% with increasing Cd accumulation in the liver ( $r^2 = 0.72$ ;  $P = 0.008$ ) (Fig. 3C).

### *Copper*

Copper concentrations in each fraction were significantly and linearly related to total hepatic Cu ( $P < 0.001$ ) (MT-like,  $r^2 = 0.99$ ; enzymes,  $r^2 = 0.95$ ; mitochondria,  $r^2 = 0.95$ ; granules,  $r^2 = 0.92$ ; microsomes / lysosomes,  $r^2 = 0.99$ ; nuclei / debris,  $r^2 = 0.88$ ) (Figs. 3D and E). The relationship of [Cu] in the nuclei / debris fraction to total hepatic [Cu] was however better related to total hepatic Cu by a sigmoidal relationship in the form:  $y = a / \{1 + e^{(-x+x_0/b)}\}$  ( $r^2 = 0.96$ ;  $P < 0.001$ ). Half of the total hepatic Cu burden was found in the cytosolic portion of the cells (average for all lakes of  $52\% \pm \text{SD } 8\%$ ). The contribution of the MT-like fraction to the total Cu burden increased from 32% to 51% with increasing hepatic [Cu] ( $r^2 = 0.64$ ;  $P = 0.02$ ) (Fig. 3F). The sum of the Cu burdens present in potentially metal sensitive fractions (mitochondria; enzymes; nuclei / debris) decreased from 49% to 33% with increasing hepatic [Cu] ( $r^2 = 0.54$ ;  $P = 0.04$ ; relationship not shown).

### *Zinc*

Zinc concentrations in each fraction were significantly linearly related to total hepatic Zn ( $P < 0.05$ ) (MT-like,  $r^2 = 0.88$ ; enzymes,  $r^2 = 0.53$ ; mitochondria,  $r^2 = 0.59$ ; microsomes / lysosomes,  $r^2 = 0.55$ ) (Figs. 4A and B) but the relations were much weaker than for Cd and Cu. Half of the Zn burden was found in the cytosolic portion of the cells (average for all lakes of  $51\% \pm \text{SD } 8\%$ ). The ratios of maximum to minimum [Zn] in the three metal-sensitive subcellular fractions were smaller (1 to 3-fold) than the same ratios calculated for Cd (8 to 21-fold) for Cu (9 to 12-fold) or for Ni (15 to 43-fold), and this can be visualized by looking at the slopes of the 3 regression lines in each of the Figures 3B and E and 4B and E. The contribution of the enzymes fraction to the total Zn burden significantly decreased from 47% to 34% with increasing hepatic [Zn] ( $r^2 = 0.64$ ;  $P = 0.004$ ). In contrast, the relative contribution of the MT-like fraction increased from 10% to 18% ( $0.76$ ;  $P = 0.004$ ) (Fig. 4C).

### *Nickel*

As mentioned in the Materials and Methods section, Ni concentrations in the granules and in the nuclei / debris fractions had to be discarded because of contamination from the NaOH reagent. Nickel concentrations in all other fractions were significantly linearly related to hepatic Ni (for each relationship:  $N = 4$ ;  $r^2 = 1.00$ ;  $P < 0.001$ ) (Figs. 4D and E). Note that Lake Opasatica was used as the reference lake in the case of Ni exposure, despite the fact that it is not located in the same sampling region; ambient [Ni] are low to negligible in the Rouyn-Noranda area. Approximately half of the total hepatic Ni burden was measured in the cytosolic portion of the liver cells (average for all lakes of  $44\% \pm \text{SD } 7\%$ ). The most important Ni bioaccumulation took place in the enzymes fraction (43-fold bioaccumulation), followed by mitochondria (38-fold), MT-like (28-fold), microsomes / lysosomes (27-fold), nuclei / debris (15-fold) and granules (4-fold) fractions. The contribution of each fraction to the total Ni burden remained constant as hepatic [Ni] increased (Fig. 4F).

### *Metallothionein*

The MT-like fraction represented a much larger proportion of the total burden of Cd (~50%) and Cu (~40%) than of the total burden of Zn (~15%) or Ni (~15%). The proportion of Ni bound to the MT-like fraction, relative to the sum of the 4 metals measured in this fraction, revealed that Ni occupied less than 2% of metallothionein metal-binding sites (results not shown). Therefore, Ni bound to the MT-like fraction was omitted from further analysis.

The proportion of MT-like metal-binding sites occupied by Cd relative to the sites occupied by all metals (Cd, Cu, Zn) increased with increasing hepatic [Cd] ( $r^2=0.52$ ;  $P=0.04$ ) (Fig. 5A). Similarly, the proportion of metallothionein metal-binding sites occupied by Cu relative to the sites occupied by all metals increased with increasing hepatic [Cu] ( $r^2=0.74$ ;  $P=0.006$ ) (Fig. 5B). In contrast, the proportion of metallothionein metal-binding sites occupied by Zn relative to sites occupied by all metals was not related to total hepatic [Zn] or [Cd] ( $P>0.05$ ), but did decrease with increasing hepatic [Cu] ( $r^2=0.83$ ;  $P=0.002$ ) (Fig. 5C). Lastly, [Zn] in the MT-like fraction increased with increasing hepatic [Cd] ( $r^2=0.68$ ;  $P=0.01$ ) and [Cu] ( $r^2=0.78$ ;  $P=0.003$ ) (data not shown).

### *Granules and lysosomes*

Concentrations of Ca, S and P in the granules fraction were not related to the total hepatic concentrations of any of the 4 metals studied ( $P>0.05$ ) but they all significantly increased with increasing [Zn] in the granules sub-cellular fraction (Fig. 6B). The contribution of each fraction to the total hepatic Ca and P burden was not related to the hepatic concentrations of any of the four metals studied (results not shown). The contribution of the mitochondrial fraction to the total S burden increased with increasing hepatic [Cd] and [Zn] ( $r^2=0.53$ ;  $P=0.04$ ), whereas the contribution of the MT-like fraction decreased with increasing hepatic [Cd] and [Zn] ( $r^2=0.79$ ;  $P=0.002$ ) (results not shown). This latter result is counter-intuitive, since absolute metallothionein concentrations increased along this same gradient. However, the contribution of metallothionein to the total amount of sulfur in the heat-stable fraction is less than 6% (calculated on the basis of 20 cysteine molecules per MT molecule); other sulfur-containing molecules must increase in concentration as hepatic Cd and Zn concentrations increase.

## Discussion

### Cadmium

In this and in most other fish studies, the major proportion of hepatic Cd is found in the MT-like fraction [7, 8]. Metallothionein induction subsequent to Cd exposure can protect animals against metal toxicity and is associated with an increased tolerance to Cd and to other metals [9, 10, 11, 12]. The steady increase of [Cd] in the MT-like fraction that we measured along our Cd exposure gradient presumably reflects a progressive Cd detoxification by metallothionein-like proteins produced in the perch liver. This interpretation is consistent with the observations of Laflamme et al. [13], who collected indigenous yellow perch from 6 Rouyn-Noranda lakes along a metal concentration gradient and analyzed for metallothionein using a mercury saturation assay – the concentration of hepatic metallothionein increased in fish from the more contaminated lakes. Other studies on indigenous perch have also described increases in MT-like proteins with increasing Cd, Cu or Zn accumulation [7, 14].

Despite these increases in metal-binding MT protein with increasing hepatic [Cd], Cd concentrations in other cell fractions (enzymes; mitochondria; nuclei / debris) also increased in the moderately and heavily contaminated lakes. Given the essential metabolic roles played by these proteins and organelles, this non-specific cadmium binding could be indicative of Cd toxicity [2, 15]. Cadmium accumulation in the enzymes fraction has also been reported for fish exposed to Cd in the laboratory [15, 16], but few studies have demonstrated a link between accumulation in this fraction and deleterious effects in the target fish [17]. In our study, although the Cd concentration increased in the enzymes fraction, the relative contribution of this fraction to the total Cd burden decreased as hepatic [Cd] increased, which suggests that partial protection is afforded by the MT-like proteins.

Cadmium accumulation in the mitochondrial cell fraction was also reported by Hamilton and Mehrle [18], in a long-term laboratory study of the effects of Cd exposure on brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Such increases might be expected to affect mitochondrial activity, and indeed mitochondrial citrate synthase activity was reported to be inhibited in the liver of yellow

perch from a highly contaminated Sudbury lake [19,20]. In addition, the integrity of mitochondrial membranes was disturbed and mitochondrial ATP reduced in rat hepatocytes [21].

A few studies have reported elevated [Cd] in the nuclei of various animal species [10, 22]. Some of these studies were able to link accumulated Cd to metallothionein accumulation in the nuclei [10, 22]. If this were the case for indigenous yellow perch, nuclear Cd would then be at least partially detoxified.

Accumulation of Cd in the microsomes / lysosomes fraction is difficult to interpret, because two organelles are combined in this fraction. On the one hand, if the Cd detected in this fraction was mostly attributable to an accumulation in the lysosomal fraction then it would be indicative of metal storage for eventual elimination. On the other hand, if Cd detected in this fraction was mostly in microsomes, then it could be indicative of toxicity since this fraction contains fragmented endoplasmic reticulum, which is generally responsible for protein synthesis and transport and for glycogen storage [23]. Olsson and Haux [7] also reported an accumulation of Cd in the microsomes of hepatocytes of indigenous perch, but we could find no studies describing the effects of metal accumulation on this organelle.

## **Copper**

As hepatic [Cu] increased, concentrations of this metal increased in all sub-cellular fractions, including the MT-like fraction. Other studies on indigenous perch found a correlation between hepatic Cu and metallothionein concentrations [14, 24]. The majority of the Cu burden (~40%) was found in the MT-like fraction of the cytosol, an indication that metallothioneins play an important role in Cu homeostasis in indigenous perch. A similar proportion of the hepatic Cu burden (47%) was reported to be bound to metallothioneins in the livers of indigenous white suckers [25]. The increased contribution of the MT-like fraction to the total Cu burden with increasing hepatic [Cu] illustrates the importance of metallothioneins for Cu sequestration. In an earlier study on the hepatocytes of indigenous perch, Hogstrand et al. [14] also observed an increased contribution of the cytosolic fraction to total the Cu burden with increasing Cu

exposure, whereas contributions of the mitochondria and microsomes fractions decreased, in agreement with our results.

Although metallothionein-like proteins sequestered most of the accumulated Cu, significant accumulations in potentially sensitive sub-cellular fractions were also observed, notably in the enzymes, the mitochondria, the nuclei / debris and the microsomes / lysosomes fractions. This Cu accumulation in potentially metal-sensitive fractions implies that Cu is imperfectly regulated, as was the case for Cd, and suggests that Cu accumulation could possibly have led to toxicity in the fish from the most contaminated lakes. Langston et al. [12] also reported a non-specific binding of Cu to the cytosolic enzymes fraction in indigenous eels (*Anguilla anguilla*).

As was the case for Cd, Cu in the microsomes / lysosomes fraction could cause toxicity if the Cu is bound to the microsomes, or it could reflect storage and excretion, if it is associated with lysosomes. It should however be emphasized that the liver is the major site of Cu excretion (in the bile) in vertebrates and hence in Cu-loaded animals the overburdening of biliary excretion pathways is typified by the sub-cellular localization of Cu in non-cytosolic fractions, especially lysosomes [25]. This subject is discussed below.

## Zinc

The pattern of Zn accumulation in perch liver contrasted with those of Cd and Cu. First, Zn was better regulated, with a ratio of hepatic  $[Zn]_{\max} : [Zn]_{\min}$  of only 2, whereas the analogous ratio for aqueous  $[Zn]_{\text{diss}}$  was ~60. Zinc regulation in indigenous fish exposed to variable ambient Zn concentrations has been observed before [26] and undoubtedly reflects the essential nature of this metal and the organism's need to control intracellular  $[Zn]$ . Second, the enzymes fraction was the fraction that contributed most to the total Zn burden either in fish collected from reference or contaminated lakes, suggesting that many of the enzymes in this fraction are metalloenzymes that use Zn as a cofactor [2]. Similarly, Roch et al. [26] also found the highest proportion of Zn in the enzymes fraction of the hepatocytes of indigenous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to metals. Hogstrand et al. [14] reported the highest Zn burden in the mitochondrial

fraction in indigenous perch collected from a reference lake, with a shift towards the cytosol in contaminated lakes.

Zn accumulation in the MT-like fraction increased with increasing total hepatic [Zn], but to a lesser extent than Cd, Cu and Ni concentrations. The contribution of the MT-like fraction to the total Zn burden increased with increasing total hepatic [Zn] whereas the contribution of the enzymes fraction decreased. This trend likely reflects the fact that metallothionein-like proteins afforded a partial protection from Zn overload to the metal-sensitive enzymes fraction. Similar correlations between hepatic metallothionein concentrations and liver [Zn] have been reported for other wild fish exposed to metals [14, 24, 26]. Despite this synthesis of metallothionein-like proteins in exposed fish, moderate zinc accumulation was observed in metal-sensitive subcellular fractions, suggesting a potential toxicity to indigenous yellow perch from Zn exposure.

Chronic exposure of scorpionfish (*Scorpaena guttata*) to high concentrations of waterborne Cd [15] was also reported to lead to an increase in Zn concentration in the MT fraction, but did not affect concentrations of this metal in the cytosolic enzymes fraction. In contrast, in a study of Zn-exposed indigenous fish, Roch et al. [26] observed Zn accumulation in the enzymes fraction of the hepatocytes. We are aware of no other studies reporting Zn accumulation in microsomes, mitochondria, lysosomes or nuclei of metal-exposed fish and the possible effects associated with such an accumulation.

## Nickel

Metallothionein-like proteins detoxified only a small proportion of Ni relative to Cd, and most of the accumulated Ni was found in the enzymes fraction. Stable contributions of the various fractions to the total Ni burden suggest a steady-state partitioning of this metal among the fractions, with the highest affinity of Ni for the enzymes fraction. This high affinity of nickel for non-thionein cytosolic proteins, its important bioaccumulation in the enzymes fraction relative to other metals and the apparent lack of detoxification of this metal at the cellular level suggest that Ni might be more toxic than Cd, Cu or Zn. We are aware of no other reports on the sub-cellular partitioning of nickel in wild fish.

Nickel has been shown to induce the production of metallothioneins in the intestine of lake whitefish exposed to a diet containing 1 mg Ni/g, but no induction was noted in the liver, kidneys or gills [27]. Only for a 10 mg Ni/g diet was metallothionein produced in the kidneys, liver, gills and muscle of the same fish species [28]. In another study, exposure of juvenile rainbow trout exposed to 0.1 or 6.6 mg Ni/L for 7 days led to elevated metallothionein concentrations in the gills relative to control fish, but only for the highest exposure treatment (G.G. Pyle, personal communication). Studies on mammals have reported contradictory results on the ability of Ni to induce metallothionein production (reviewed in [27]).

Dietborne exposure to Ni caused areas of local necrosis and altered bile ducts in the liver of lake whitefish but it did not affect their blood chemistry (concentrations of hemoglobin, hematocrit, glucose and lipid peroxidation byproducts in plasma) [27]. These alterations in the liver suggest that the bile is an important route of Ni excretion [27], and the elevated Ni concentrations found in the microsomes / lysosomes fraction could mean that Ni was excreted through the lysosomes in contaminated fish.

Nickel contamination of the granules and nuclei / debris fractions prevented us from monitoring Ni detoxification by granules, but the low levels of this contamination set an upper limit for the contribution of these fractions and allow us to conclude that only a small proportion of Ni could be accumulated in these 2 fractions.

### **Metallothionein**

Metallothionein-like cytosolic proteins played a major role in the regulation of intracellular Cd, Cu and Zn in the present study. For each of the metals studied, concentrations associated with the MT-like fraction increased with total hepatic metal concentrations. This is consistent with results from an earlier study [13] in which hepatic [MT] (measured with a Hg saturation assay) increased as metal exposure increased.

For both Cu and Cd, increasing proportions in the MT-like fraction with increases in their total hepatic concentrations suggest that Cu and/or Cd were responsible for MT induction in the fish from the studied lakes. In contrast, the proportion of Zn in the MT-like fraction decreased with increasing total hepatic Cu, suggesting that the role of MT shifted from hepatic Zn regulation to Cu regulation and Cd detoxification in the metal-exposed perch.

Lastly, the concentrations of Cu or Zn bound to the enzymes fraction did not decrease with increasing ambient Cd, as was also observed in indigenous freshwater bivalves collected along the same gradient [29]. There is thus no evidence that non-essential metals such as Cd are replacing Cu or Zn in metalloenzymes for indigenous fish.

### **Granules and lysosomes**

Copper concentrations in the granule fraction increased with increasing whole liver Cu concentrations in indigenous yellow perch (Fig. 3E), supporting some of our earlier results on organ contributions to total Cu burdens [6], in which we speculated that yellow perch may experience an imbalance in their Cu homeostasis in highly contaminated lakes. We can interpret these results as a Cu enrichment of the granule fraction since we did not measure any increase in the quantity of granules with increasing liver Cu, that is, concentrations of likely granules components (Ca, S and P) did not increase with hepatic [Cu].

In a number of invertebrate species, mineral concretions composed primarily of Ca and Mg phosphate can incorporate Zn, Cu, Cd and Ni and play a major role in metal detoxification and possibly elimination [2, 30, 31]. In laboratory studies, Lanno et al. [32] and Weis et al. [33] demonstrated the ability of fish to sequester Cu in sulfur-rich granules in hepatocytes. The observed increase in Cu concentrations in the microsomes / lysosomes fraction in perch livers in the present study could reflect a lysosomal origin of the granules, as reported in a number of earlier studies [32, 33, 34].

Positive relationships between [Ca], [S] and [P] in the granules fraction and [Zn] in the same fraction suggest a link between Zn regulation and granule formation in indigenous yellow perch, but no precedent for such a mechanism could be found.

## Conclusions

Nickel, cadmium and copper were bioaccumulated in the liver of yellow perch collected from contaminated lakes, whereas Zn was better regulated with only a 2-fold increase in hepatic Zn between most and least contaminated lakes. Cytosolic metallothioneins appear to be important for the detoxification of Cd and Cu in indigenous yellow perch, but this detoxification mechanism was insufficient to prevent Cd and Cu binding to metal sensitive sub-cellular fractions. In contrast, Ni was preferentially bioaccumulated in the enzymes fraction, in a more important proportion than any of the other metals, suggesting that Ni may be responsible for sublethal toxicity in indigenous yellow perch from the Sudbury area (cf. [37]).

To our knowledge, this study is the first to consider detoxification by granules in fish collected in the field. The observed accumulation of Cu in the granules fraction in contaminated lakes implies that sequestration in mineral concretions could be a Cu detoxification strategy in indigenous yellow perch. However, the importance of this detoxification mechanism can be questioned since no increase in granule synthesis could be observed (indirectly through Ca, P and S concentrations) in the livers of contaminated fish.

Analysis of the contributions of each sub-cellular fraction to the total metal burdens underscores the importance of two fractions for metal-binding in the liver of indigenous yellow perch: the enzymes fraction and the MT-like protein fraction. The decreasing contribution of the enzymes fraction to total hepatic Cd can presumably be interpreted as a reflection of the functioning of detoxification mechanisms. In parallel, the increase in the MT-like contribution to the total Cu burden suggests that metallothioneins were responsible for the protection of essential cellular structures from Cu toxicity.

The absolute concentrations of Cd, Cu and Ni (but not Zn) in each sub-cellular fraction increased along the metal contamination gradient, but the relative contributions of each sub-cellular

fraction to the total burden of each of these metals did not vary appreciably. This constancy contrasts with results from laboratory exposures for which a shift from the metal-detoxification fraction to metal-sensitive fractions has been reported as metal exposure concentrations increase beyond a threshold, this shift having been linked to the onset of toxicity [2]. The difference between laboratory and field results could perhaps be the result of long-term exposure of the indigenous fish, i.e., a reflection of the acclimation or adaptation of the sentinel species.

The present study revealed a non-specific binding of metals to potentially sensitive sub-cellular fractions. This binding was noted even in fish from the low end of the metal contamination gradient, suggesting that metal detoxification was imperfect, i.e., that *P. flavescens* was subject to some M-related stress even at low chronic exposure concentrations. Further research using various toxicity endpoints would be needed to determine if such metal distributions at the cellular level are indicative of toxicity at this and at higher levels of biological organization.

### **Acknowledgements**

A grant from the Metals in the Environment Research Network (MITE-RN) supported this project. The Société de la Faune et des Parcs de l'Abitibi-Témiscamingue (Government of Québec) provided invaluable logistical support. The technical assistance of Sophie Cooper and Amélie Cliche in the field is gratefully acknowledged, as is the contribution of Tiphaine Jenniard Du Dot to the development of the differential centrifugation method. Michelle Geoffroy-Bordeleau, Sylvie Saint-Pierre and Stéfane Prémont helped with various laboratory analyses. Thanks are also due to W.H. Wallace and D.J. Cain for their advice on the development of the differential centrifugation approach. P.G.C. Campbell is supported by the Canada Research Chair programme.

## References

1. Wallace WG, Lee B-G, Luoma SN. 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar Ecol Prog Ser* 249:183-197.
2. Mason AZ, Jenkins KD. 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. In Tessier A, Turner DR eds, *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. 1<sup>st</sup> ed, John Wiley & Sons Ltd., New York, NY, USA, pp. 478-608.
3. Brown DA, Parsons TR. 1978. Relationship between cytoplasmic distribution of mercury and toxic effects to zooplankton and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) exposed to mercury in a controlled ecosystem. *J Fish Res Board Can* 35:880-884.
4. Jenkins KD, Mason AZ. 1988. Relationships between subcellular distributions of cadmium and perturbations in reproduction in the polychaete *Neanthus arenaceodentata*. *Aquat Toxicol* 12:229-244.
5. Luoma, SN. 1995. Prediction of metal toxicity in nature from bioassays: limitations and research needs. In Tessier A, Turner, DR eds, *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA, pp. 609-646.
6. Giguère A, Campbell PGC, Hare L, McDonald DG, Rasmussen JB. Influence of lake chemistry and fish age on Cd, Cu and Zn concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). *Can J Fish Aquat Sci*, in review.
7. Olsson P-E, Haux C. 1986. Increased hepatic metallothionein content correlates to cadmium accumulation in environmentally exposed perch (*Perca fluviatilis*). *Aquat Toxicol* 9:231-242.
8. Dallinger R, Egg M, Köck G, Hofer R. 1997. The role of metallothionein in cadmium accumulation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from high alpine lakes. *Aquat Toxicol* 38:47-66.
9. Duncan DA, Klaverkamp JF. 1983. Tolerance and resistance to cadmium in white suckers (*Catostomus commersoni*) previously exposed to cadmium, mercury, zinc, or selenium. *Can J Fish Aquat Sci* 40:128-138.
10. Kito H, Ose Y, Sato T. 1986. Cadmium-binding protein (metallothionein) in carp. *Environ Health Persp* 65:117-124.

11. Hogstrand C, Haux C. 1991. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. *Comp Biochem Physiol* 100C:137-141.
12. Langston WJ, Chesman BS, Burt GR, Pope ND, McEvoy J. 2002. Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: an indicator of environmental quality? *Mar Environ Res* 53:263-293.
13. Laflamme J-S, Couillard Y, Campbell PGC, Hontela A. 2000. Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, and Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes. *Can J Fish Aquat Sci* 57:1692-1700.
14. Hogstrand C, Lithner G, Haux C. 1989. Relationships between metallothionein, copper and zinc in perch (*Perca fluviatilis*) environmentally exposed to heavy metals. *Mar Environ Res* 28:179-182.
15. Brown DA, Bay SM, Hershelman GP. 1990. Exposure of scorpionfish (*Scorpaena guttata*) to cadmium: effects of acute and chronic exposures on the cytosolic distribution of cadmium, copper and zinc. *Aquat Toxicol* 16:295-310.
16. DeSmet H, DeWachter B, Lobinski R, Blust R. 2001. Dynamics of (Cd, Zn)-metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Aquat Toxicol* 52:269-281.
17. Pruell RJ, Engelhardt FR. 1980. Liver cadmium uptake, catalase inhibition and cadmiumthionein production in the killifish (*Fundulus heteroclitus*) induced by the experimental cadmium exposure. *Mar Environ Res* 3:101-111.
18. Hamilton SJ, Mehrle PM. 1987. Evaluation of metallothionein measurement as a biological indicator of stress from cadmium in brook trout. *Trans Amer Fish Soc* 116:551-560.
19. Rajotte JW, Couture P. 2002. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Can J Fish Aquat Sci* 59:1296-1304.
20. Audet D, Couture, P. 2003. Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments. *Can J Fish Aquat Sci* 60:269-278.
21. Müller L. 1986. Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: Mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *Toxicology* 40: 285-295.

22. Cherian MG, Nordberg M. 1983. Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. *Toxicology* 28:1-15.
23. Fowler BA, Lucier GW, Hayes AW. 1989. Organelles as tools in toxicology. In Hayes AW ed, *Principles and Methods in Toxicology*. 1<sup>st</sup> ed, Raven Press Ltd., New York, NY, USA, pp. 815-833.
24. Hogstrand C, Lithner G, Haux C. 1991. The importance of metallothionein for the accumulation of copper, zinc and cadmium in environmentally exposed perch, *Perca fluviatilis*. *Pharmacol Toxicol* 68:492-501.
25. Klaverkamp JF, Dutton M, Majewski HS, Hunt RV, Wesson LJ. 1991. Evaluating effectiveness of metal pollution controls in a smelter by using metallothionein and other biochemical response in fish. In Newman MC, McIntosh AW, eds, *Metal Ecotoxicology. Concepts and Applications*. 1<sup>st</sup> ed, Lewis Publishers Inc, Chelsea, MI, USA, pp. 33-64.
26. Roch M, McCarter JA, Matheson AT, Clark MJR, Olafson RW. 1982. Hepatic metallothionein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as an indicator of metal pollution in the Campbell River system. *Can J Fish Aquat Sci* 39:1596-1601.
27. Ptashynski MD, Pedlar RM, Evans RE, Baron CL, Klaverkamp JF. 2002. Toxicology of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquat Toxicol* 58:229-247.
28. Ptashynski MD, Pedlar RM, Evans RE, Wautier KG, Baron CL, Klaverkamp JF. 2001. Accumulation, distribution and toxicology of dietary nickel in lake white fish (*Coregonus clupeaformis*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Comp Biochem Physiol* 130C:145-162.
29. Giguère A, Couillard Y, Campbell PGC, Perceval O, Hare L, Pinel-Alloul B, 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. *Aquat Toxicol* 64:185-200.
30. Hare L. 1992. Aquatic insects and trace metals: Bioavailability, bioaccumulation, and toxicity. *Crit Rev Toxicol* 22:327-369.
31. Bonneris E, Giguère A, Masson S, Campbell PGC. 2003. Sub-cellular partitioning of essential and non-essential metals in a freshwater mollusc, *Pyganodon grandis*, collected in the field along a polymetallic environmental gradient. *J Phys IV Proceedings* 107-vol I:197-200.

32. Lanno RP, Hicks B, Hilton JW. 1987. Histological observations on intrahepatocytic copper-containing granules in rainbow trout reared on diets containing elevated levels of copper. *Aquat Toxicol* 10:251-263.
33. Weis P, Bodgen JD, Enslee EC. 1986. Hg- and Cu-induced hepatocellular changes in the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Environ Health Persp* 65:167-173.
34. Viarengo A, Pertica M, Canesi L, Mazzucotelli A, Orunesu M, Bouquegneau JM. 1989. Purification and biochemical characterization of a lysosomal copper-rich thionein-like protein involved in metal detoxification in the digestive gland of mussels. *Comp Biochem Physiol* 93C:389-395.
35. Durand JP, Carvalho FP, Goudard F, Pieri J, Fowler SW, Cotret O. 1999. Po-210 binding to metallothioneins and ferritin in the liver of teleost marine fish. *Mar Ecol Prog Ser* 177:189-196.
36. Takeda H, Shimizu C. 1982. Existence of the metallothionein-like protein in various fish tissues. *Bull Jap Soc Sci Fish* 48:711-715.
37. Borgmann, U., Néron, R., Norwood, W.P. 2001. Quantification of bioavailable nickel in sediments and toxic thresholds to *Hyalella azteca*. *Environ. Pollut.* 111: 189-198.

**Table 1**

Location of the lakes sampled in the present study and their chemical composition (dissolved metal concentrations, dissolved organic carbon and pH).

| Lake (code)     | Region        | Location          | [Cd]<br>(nM) | [Cu]<br>(nM) | [Zn]<br>(nM) | [Ni]<br>(nM) | [DOC]<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | [Ca]<br>(μM) | pH   |
|-----------------|---------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------------------------|--------------|------|
| Opasatica (OP)  | Rouyn-Noranda | 48°08'N, 79°18' W | 0.3          | 33           | 19           | 12           | 7.7                            | 218          | 7.75 |
| Vaudray (VA)    | Rouyn-Noranda | 48°05'N, 78°42'W  | 0.5          | 42           | 59           | 12           | 8.8                            | 84           | 7.20 |
| Osisko (OS)     | Rouyn-Noranda | 48°14'N, 79°0'W   | 1.6          | 141          | 107          | 17           | 3.1                            | 637          | 9.54 |
| Dufault (DU)    | Rouyn-Noranda | 48°17'N, 79°0'W   | 6.7          | 184          | 1132         | 8            | 5.3                            | 416          | 7.46 |
| Laurentian (LA) | Sudbury       | 46°27'N, 80°57'W  | 0.6          | 139          | 28           | 839          | 4.6                            | 113          | 6.37 |
| Wavy (WA)       | Sudbury       | 46°18'N, 81°06'W  | 1.5          | 114          | 122          | 895          | 2.8                            | 39           | 5.01 |
| Raft (RA)       | Sudbury       | 46°25' N, 80°56'W | 1.7          | 125          | 163          | 1825         | 2.6                            | 88           | 6.68 |
| Hannah (HA)     | Sudbury       | 46°26'N, 81°02'W  | 2.4          | 373          | 51           | 2496         | 3.7                            | 274          | 7.02 |

## Figure caption

### Figure 1

Differential centrifugation method used to separate the various sub-cellular fractions. P=Pellet, S=Supernatant. <sup>1</sup> Durand et al. [35]; <sup>2</sup> Wallace et al. [1]; <sup>3</sup> Takeda and Shimizu [36]; <sup>4</sup> Olsson and Haux [7].

### Figure 2

Cadmium, copper, zinc and nickel concentrations (mean + SD; N=3) in the livers of yellow perch collected in 8 lakes along a metal gradient. Black bars indicate a significant ( $P<0.05$ ) difference from the reference lake (OP: Opasatica), whereas white bars indicate no significant difference (one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range post hoc test on ranks,  $P<0.05$ ). See Table 1 for lake abbreviations

### Figure 3

Relationships between total hepatic metal concentrations and metal partitioning in liver tissue. Plots (A), (B) and (C) apply to Cd; plots (D), (E) and (F) apply to Cu. Metal concentrations in the detoxified metal fractions are plotted in Figs. 3(A) and (D); metal concentrations in the metal-sensitive fractions are plotted in Figs. 3(B) and (E). The relative contribution of each sub-cellular fraction to the total metal burden is shown in Figs. 3(C) and (F). Each point represents data for fish collected at a single sampling station (mean  $\pm$  SD; N=3). See Table 1 for lake abbreviations.

**Symbol definitions:**  $\blacktriangle$  MT-like,  $\circ$  Enzymes,  $\blacksquare$  Mitochondria,  $\ominus$  Nuclei & debris,  $\nabla$  Microsomes & lysosomes,  $\blacklozenge$  Granules.

### Figure 4

Relationships between total hepatic metal concentrations and metal partitioning in liver tissue. Plots (A), (B) and (C) apply to Zn; plots (D), (E) and (F) apply to Ni. Metal concentrations in the detoxified metal fractions are plotted in Figs. 4(A) and (D); metal concentrations in the metal-sensitive fractions are plotted in Figs. 4(B) and (E). The relative contribution of each sub-cellular fraction to the total metal burden is shown in Figs. 4(C) and (F). Each point represents data for fish collected at a single sampling station (mean  $\pm$  SD; N=3). See Table 1 for lake abbreviations.

**Symbol definitions:** —▲— MT-like, —○— Enzymes, —■— Mitochondria, —●— Nuclei & debris, —▽— Microsomes & lysosomes, —◆— Granules.

### Figure 5

Proportion of metallothionein metal-binding sites occupied by (A) Cd, (B) Cu or (C) Zn relative to the sites occupied by all metals (Cd, Cu, Zn) in relation to total hepatic [Cd] (A) or [Cu] (B) and (C).

### Figure 6

Concentrations of calcium, sulfur and phosphorus with increasing Zn concentration in the granules fraction. Each point represents data for fish collected at a single sampling station (mean  $\pm$  SD; N=3). See Table 1 for lake abbreviations.

Figure 1

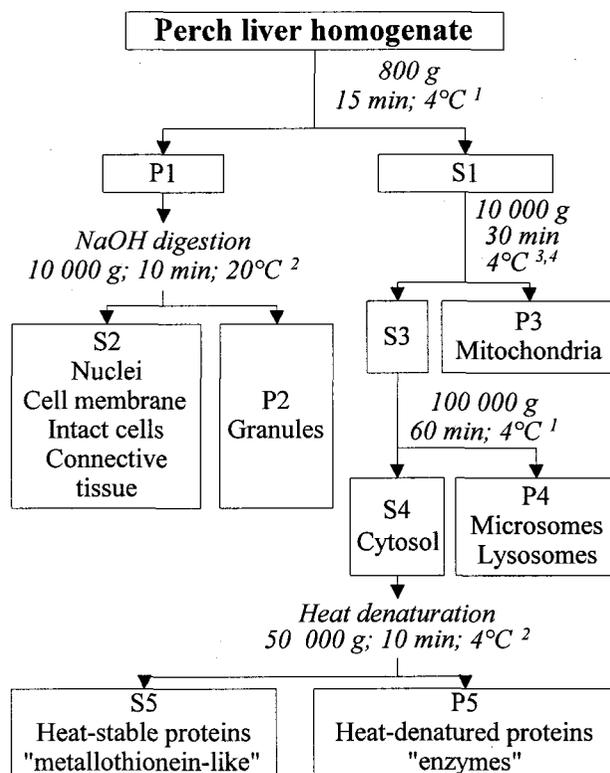


Figure 2

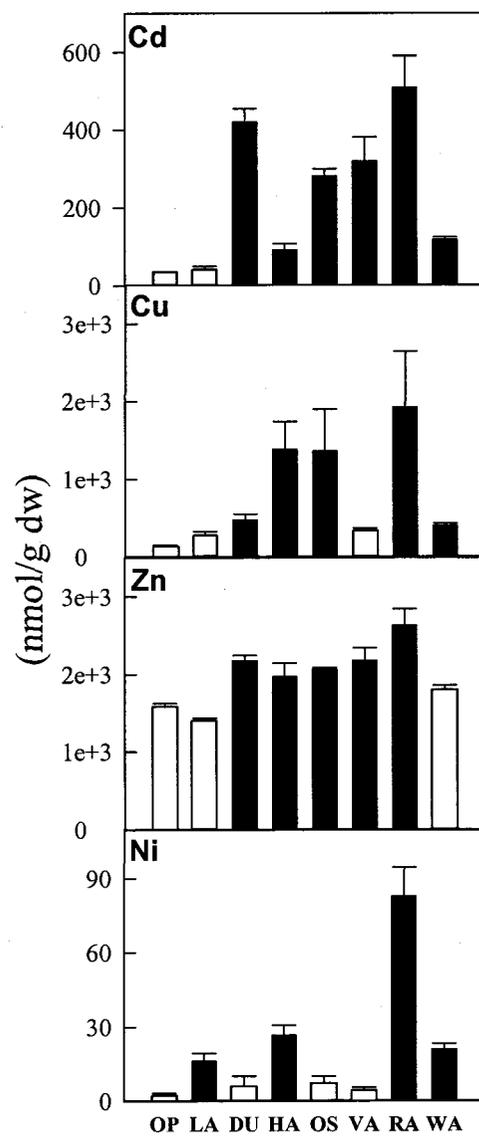


Figure 3

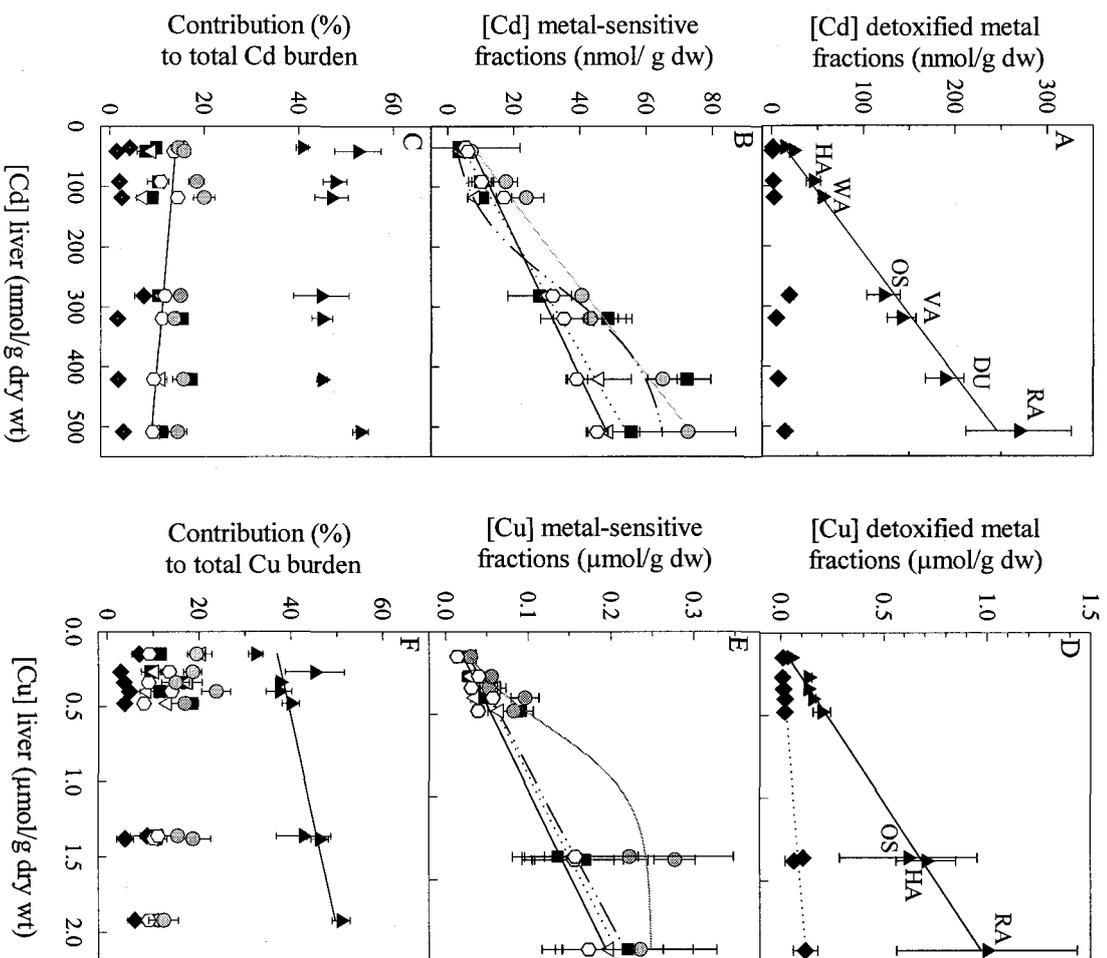


Figure 4

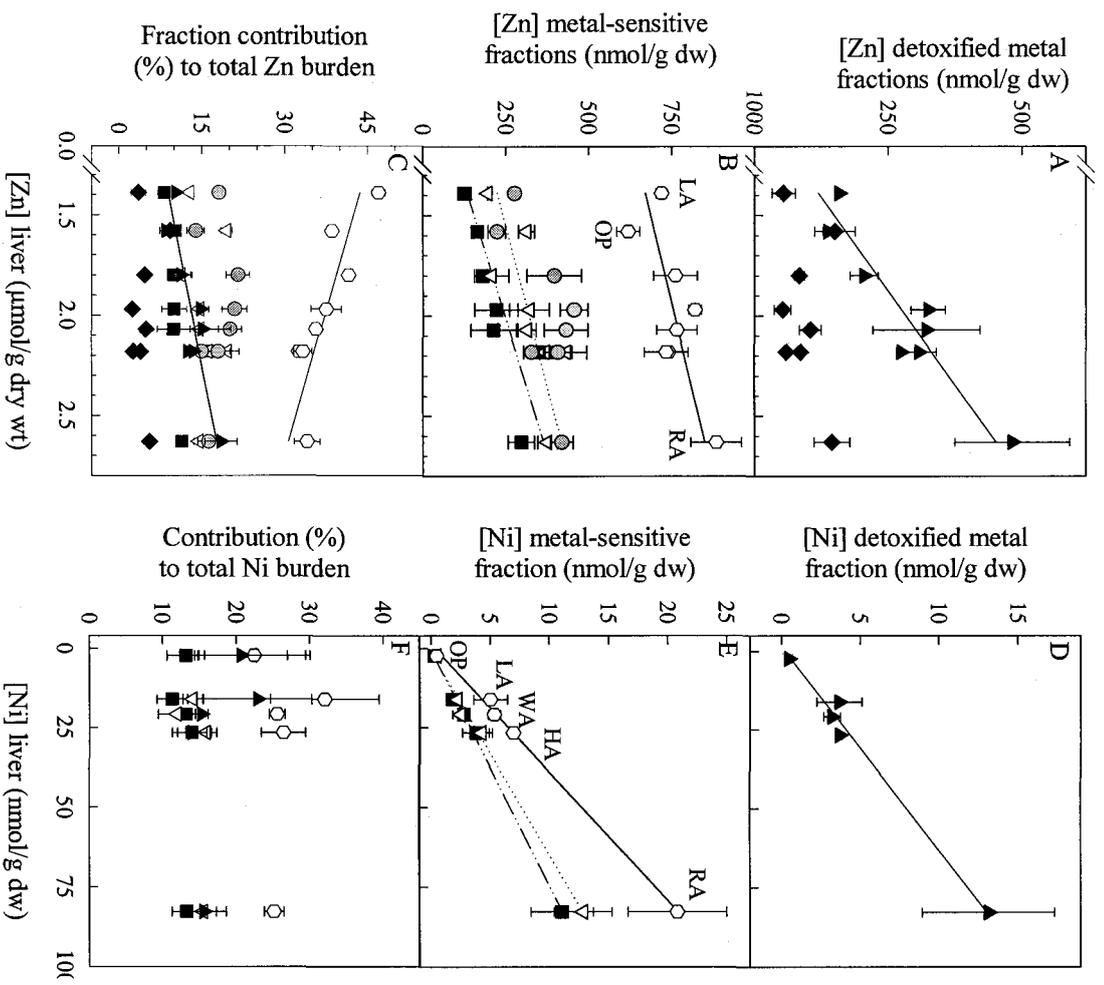


Figure 5

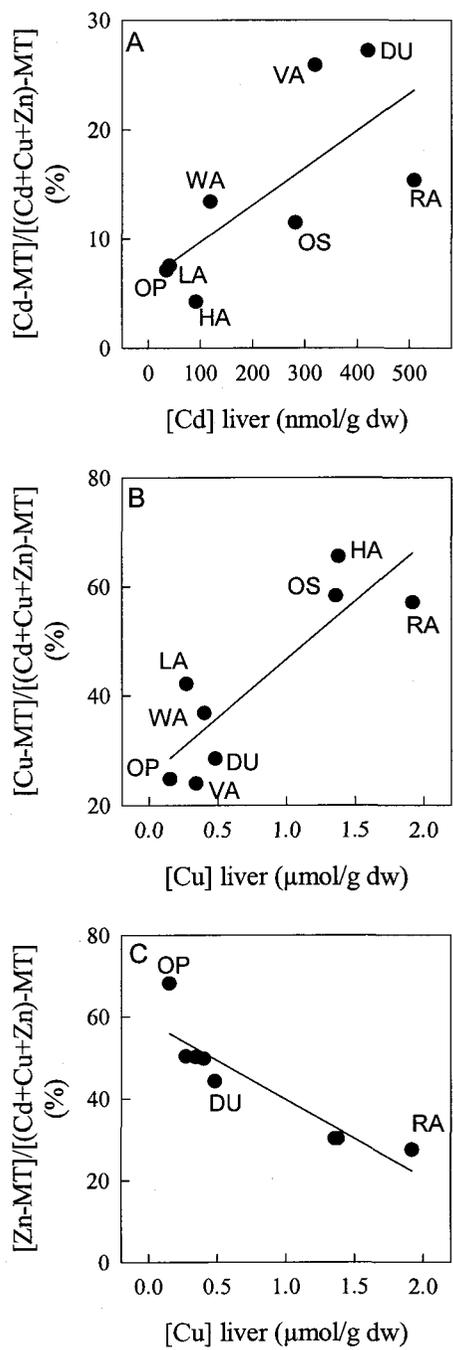
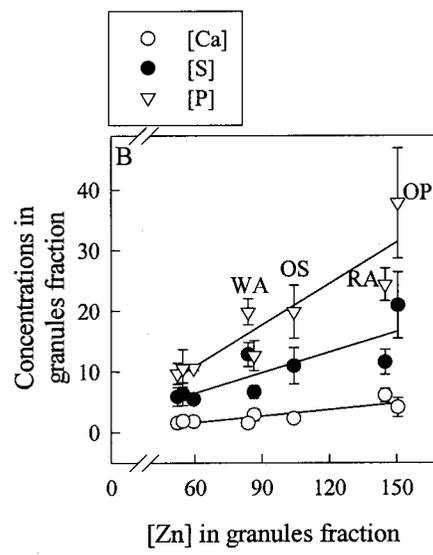
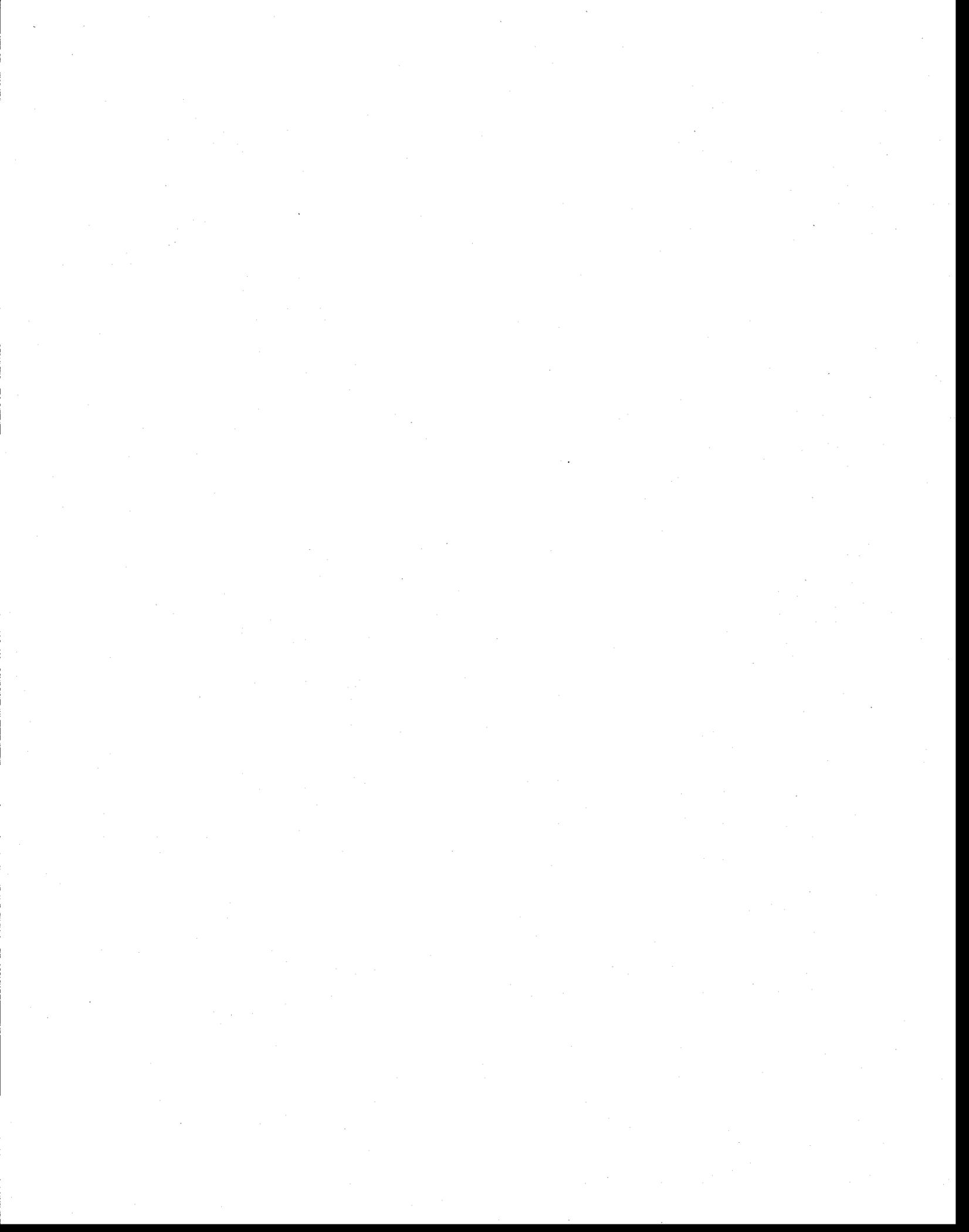


Figure 6





11 4<sup>ème</sup> article

**Bioaccumulation des métaux et évidences de stress oxydant chez des perchaudes échantillonnées dans huit lacs le long d'un gradient de contamination métallique (Cd, Cu, Zn et Ni).**

**Metal bioaccumulation and oxidative stress in yellow perch (*Perca flavescens*) collected from eight lakes along a metal contamination gradient (Cd, Cu, Zn, Ni)**

*Anik Giguère<sup>1</sup>, Peter G.C. Campbell<sup>1</sup>, Landis Hare<sup>1</sup> and Carole Cossu-Leguille<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> INRS-ETE, Université du Québec, C.P. 7500, Sainte-Foy, QC, Canada G1V 4C7

<sup>2</sup> Laboratoire EBSE, Université de Metz, Faculté des Sciences, rue du Général Delestraint, F 57070 Metz, France

Submitted on February 3<sup>rd</sup>, 2004

to the Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.



## **Abstract**

Links among metal exposure, metal accumulation and metal-induced effects were explored in indigenous yellow perch collected from eight lakes located along a metal concentration gradient in two mining regions. Fish exposure to Cd, Cu, Ni and Zn was estimated on the basis of calculated free metal ion concentrations in lake waters. Hepatic metal concentrations were determined and various markers of oxidative stress were measured to assess metal effects in liver cells. Accumulated metals were not consistently related to ambient free metal ion concentrations, possibly because of unaccounted for fluctuations in lakewater metal concentrations. Accumulated metals were associated with limited oxidative stress in perch livers, as evidenced by reductions of glutathione concentrations and glutathione reductase activities. However, this stress appeared to be minor since increasing hepatic Cu concentrations were associated with reduced lipid peroxidation, a response opposite to that predicted from basic principles. Our results suggest that oxidative stress will not have direct repercussions on the health of the perch at the individual level. We speculate that the observed increase in metallothionein concentrations with increasing accumulated metals might afford protection against reactive oxygen species.

Keywords: reactive oxygen species, glutathione, malondialdehyde, antioxidant enzymes, metallothionein

## Introduction

Effects of chemical contaminants can be viewed as occurring at various levels of biological organisation, extending from the biochemical level to the physiology of individual organisms, and ultimately to the levels of populations, communities and the ecosystem. Alteration of biochemical systems should underlie and precede effects at higher levels of organisation, rendering them potentially useful for monitoring the effects of environmental contamination (Stegeman et al. 1989). Recent reviews (Eason et al. 2002; Handy et al. 2003) have highlighted the importance of using a weight of evidence approach to assess deterioration of ecosystem health, using suites of measurements at the molecular, cellular, physiological, population and ecosystem levels.

We have been using this approach to evaluate the effects of metals on the health of indigenous yellow perch, *Perca flavescens*, collected in various lakes along a Cd, Cu, Ni and Zn exposure gradient (reviewed by Campbell et al. 2003). Recently, we demonstrated that some hepatic metals were only partially detoxified by binding to metallothionein or sequestration in granules, and that metal accumulation could be detected in metal-sensitive cytosolic proteins and organelles (Giguère et al., Environ. Toxicol. Chem.: under review). Likely as a consequence of this partial detoxification, metal-induced toxic effects on the fish were observed at the organ, the individual, the population and at the community levels. The present project was designed to complete this picture by determining if there are metal-induced effects in the same indigenous yellow perch at the cellular level, through measurements of various markers of oxidative stress, and to verify if the eventual responses are proportional to metal exposure.

Biochemical endpoints associated with oxidative stress have long been considered as markers for environmental impact assessment and are recognised as useful in the identification of subtle and early effects of contaminants (Di Giulio et al. 1989; Stegeman et al. 1989; Vasseur and Cossu 2003). However, the vast majority of experiments designed to study the mechanisms by which environmental contaminants induce oxidant-mediated responses have been carried out in the laboratory – studies of such responses in free-living organisms are rare, and the existing studies have tended to focus on organic xenobiotics. Few researchers have used measurements of markers of oxidative stress to

monitor the effects of exposure of indigenous fish to metals (Rodriguez-Ariza et al. 1993; Farag et al. 1995 and 2003; Payne et al. 1998; Lopes et al. 2001).

To quantify metal exposure and accumulation in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*), we measured metal concentrations in lake water and metals and other variables in the livers of fish collected from eight lakes located along a Cd, Cu, Ni and Zn gradient in mining regions in Quebec (Rouyn-Noranda) and Ontario (Sudbury), Canada. Biochemical measurements in perch livers included an indicator of lipid peroxidation (malondialdehyde), the activities of two enzymatic antioxidants (glutathione reductase and glutathione peroxidase), along with the concentration of a non-protein antioxidant, glutathione. To relate these responses to metal exposure and/or accumulation, regression analyses were used.

## **Material and Methods**

### **Study area**

Water samples and fish were collected from a total of eight lakes varying in their metal concentrations (especially Cd, Cu, Ni and Zn). Four lakes in the vicinity of Rouyn-Noranda (Québec, Canada) and four lakes located near Sudbury (Ontario, Canada) were sampled in June 2001 (Table 1). These two regions have been subjected to inputs of acidic and metal-rich materials from nearby mining and smelting operations (Sudbury – Ni, and Cu; Rouyn-Noranda – Cu, Pb and Zn).

### **Metal exposure quantification**

Water samples were collected in the epilimnion of each of the eight studied lakes, using duplicate *in situ* diffusion samplers (consisting of 8 contiguous cells of 4 mL each) separated from lake water by a 0.2  $\mu\text{m}$  nominal pore-size polysulfone membrane (Pall Gelman Sciences, HT-200). The two samplers were suspended 1 m above the lake bottom and at least 1.5 m under the surface, in the epilimnion of each lake. They were retrieved after an equilibration period of 3 d and sampled immediately; earlier work has shown that a 3-d period is sufficient to achieve equilibrium between the diffusion samplers and the ambient lake water. Sub-samples for analysis of trace metals (Cd, Cu, Zn, Ni; Al, Fe),

major cations (Ca, Mg, Na and K), major anions ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^{2-}$ , Cl<sup>-</sup>), and organic and inorganic carbon were removed from each sampler. Temperature and pH were also measured in water collected 0.5 m under the surface, above the samplers, at the time of retrieval. Analyses of Al, Ca, Fe and Zn were performed by inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry (ICP-AES) (Varian, Vista AX). Cadmium, Cu and Ni were measured using a graphite furnace atomic absorption spectrophotometer (GFAAS) equipped with a graphite tube atomizer (Perkin-Elmer, Simaa 6000) and an autosampler (Perkin-Elmer model AS-72). Certified reference water samples (Riverine water reference material NIST 1643d, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland, USA) were also analysed for metals during each analytical run; measured trace metal concentrations were consistently within the certified range for each element. Average concentrations were calculated for each sampler (3 cells in each diffusion sampler) resulting in two average concentrations for each lake. Metal speciation at equilibrium was calculated with the Windermere Humic Aqueous Model (WHAM version 6.0.1; CHE 2001) using total dissolved metal concentrations (including Fe and Al), the concentrations of inorganic ligands and organic carbon. Concentrations of fulvic and humic acids required as input data to the model were estimated from our measurements of dissolved organic carbon, assuming that humic substances contain 50% carbon (Tipping 1988) and that the ratio of humic to fulvic acids is 1:9 (Oliver et al. 1983).

### **Fish collection and tissue metal analysis**

We collected juvenile fish of similar size (7 – 10 g) to minimise variability related to fish age (Giguère et al., *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*: under review). Two observers evaluated the age of a subsample of 10 to 18 fish from each lake from a section of the longest ray of the dorsal fin. This procedure yields ages similar to those determined from otoliths (otoliths and the ray of the dorsal fin were compared in yellow perch of all sizes collected in a single lake and in juvenile fish collected in 8 lakes: both structures yielded similar results in fish of < 3 years old; A. Giguère, INRS-ETE, unpublished data).

Yellow perch were collected in June 2001 from each of the eight lakes using a seine net. They were kept alive until killed with a blow to the head, after which they were

dissected immediately. Livers were kept in acid-washed plastic containers and held in liquid nitrogen until analysis.

### **Liver metal analysis**

Livers from 16 perch were combined for each replicate sample ( $N = 3$  replicates per lake) and were homogenized in NaCl 0.9% (purity 99.999%; Alfa Aesar #10862) using a Potter-Elvehjem homogeniser equipped with a glass pestle (Cole Parmer U-04368). An aliquot was then taken from the whole homogenate. This aliquot was digested in nitric acid (Fisher Scientific, trace metal grade) ( $\sim 3$  mL of acid per gram of tissue) in an autoclave at 120-125 °C ( $1.1\text{--}1.3$  kg·cm<sup>-2</sup>) for 3 h. Cooled digestates were then diluted 10-fold with ultrapure water. Certified reference material (lobster hepatopancreas, NRCC TORT-1, Ottawa) was submitted to the same procedure. Concentrations of Cd, Cu and Zn were measured by ICP-AES (Varian, Vista AX). Blanks indicated negligible contamination ( $N=15$ ): Cd  $< 0.33$  µg·L<sup>-1</sup>; Cu  $< 0.61$  µg·L<sup>-1</sup> and Zn =  $0.3$  µg·L<sup>-1</sup>. The recovery of TORT-1 reference samples ( $N = 12$ ) was within the certified range for Cd ( $100.5 \pm$  standard deviation, S.D. of 3.8%) and within 15% of the certified values for Cu ( $88.6 \pm$  S.D. of 3.6%) and Zn ( $89.1 \pm$  S.D. of 4.3%). Concentrations of Ni were measured by GFAAS (Perkin-Elmer, Simaa 6000 with Zeeman background correction). Digestion blanks indicated negligible Ni contamination ( $N = 5$ : Ni  $< 0.11$  µg·L<sup>-1</sup>). Measurements of Ni in TORT-1 reference samples ( $N = 2$ ) were within the certified range (95.1%).

### **Biochemical assays**

After thawing on ice, tissues for all biochemical assays were mechanically homogenised. To limit enzymatic protein degradation, all homogenate manipulations were performed at  $\sim 4$  °C in an ice-cold buffer. All reagents used for buffer preparation were of ACS grade or the equivalent, unless specified otherwise.

Lipid peroxidation was quantified by measuring malondialdehyde concentrations according to the colourimetric method of Sunderman et al. (1985) using tetraethoxypropane (97%; Sigma T8282) as an internal standard. This method is based on the reaction of thiobarbituric acid with malondialdehyde and related chromogens. Three

livers per replicate (5 replicates) were homogenised in KCl (154 mM; 3 mL per g tissue wet weight) for malondialdehyde analyses.

Glutathione-dependent oxido-reductase enzymes were analysed on the basis of kinetic enzymatic reactions as monitored by spectrophotometric methods. The activity of the selenium-independent glutathione peroxidase was measured according to the method of Lawrence and Burk (1976). Reactant concentrations were optimized for perch liver tissues by using 0.2 mM NADPH, 1 mM EDTA, 1.6 U·mL<sup>-1</sup> glutathione reductase, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 5.5 mM glutathione (GSH;  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) and 8 mM cumene hydroperoxide (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OOH). For the measurement of glutathione peroxidase, five livers per replicate (4 replicates) were pooled and homogenised in phosphate buffer (50 mM, pH 7; 9 mL per g tissue wet weight) containing 1 mM EDTA. The activity of glutathione-reductase was determined according to the method described by Carlberg and Mannervick (1985), optimized for perch liver by using 30 mM of reduced glutathione (GSH). For the measurement of glutathione-reductase, five livers per replicate (4 replicates per lake) were pooled and homogenised in phosphate buffer (0.2 M, pH 7; 9 mL per g tissue wet weight) containing 2 mM EDTA.

For the measurement of reduced and oxidized glutathione, six livers per replicate (5 replicates) were pooled and homogenised in a solution of HClO<sub>4</sub> (10%) and EDTA (2 mM), with a ratio of 2 mL per g tissue wet weight; this solution prevents the oxidation of the glutathione sulphhydryl group. The homogenates were then centrifuged at 10,000 X g for 5 min. Reduced and oxidized glutathione were measured in the supernatant using reversed phase liquid chromatography followed by a post-column derivatisation with *ortho*-phthalaldehyde according to a method adapted from Leroy et al. (1993) by Cossu et al. (2000). The reduced form (GSH) was evaluated directly after injection of the deproteinized sample; to evaluate total glutathione content (GSH + GSSG), the biological samples were first reduced using 3.3 mM dithiothreitol for 1 h in the dark before injection. Oxidized glutathione levels (GSSG) were determined specifically by forming an adduct between the reduced glutathione contained in the biological sample and N-ethylmaleimide (NEM): deproteinized samples were incubated with 1.6 NEM for 5 min at 0 °C and then reduced by dithiothreitol, as described earlier, before the injection. The direct [GSSG] measure corresponded well to the difference between total (GSSG +

GSH) and reduced (GSH) glutathione concentrations (on average  $99.9 \pm \text{SD } 0.4\%$  similarity).

Proteins were measured according to the method of Bradford (1976) using bovine albumin (fraction V, Sigma #A-4503) as the standard. For this analysis, five livers per replicate (4 replicates) were pooled and homogenised in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0, 7 to 16 L per g tissue wet weight).

We also estimated the concentration of metallothionein-like proteins in the cytosol of the perch livers. Sixteen livers were combined for each replicate sample (N = 3 replicates per lake) and were homogenized in NaCl 0.9% (purity 99.999%; Alfa Aesar #10862) at a dilution of 1: 2 (w/w) using a 2 mL Potter-Elvehjem homogenizer equipped with a glass pestle (Cole Parmer U-04368). This homogenate was centrifuged at 100,000 x g for 60 min at 4 °C and the cytosol remained in the supernatant. The separation of the MT-like proteins from other cytosolic proteins was performed according to Wallace et al. (2003) by (1) heating supernatant at 80 °C for 10 min, (2) cooling it on ice for an hour and (3) centrifuging it at 50,000 x g for 10 min at 4 °C. The heat-stable MT-like proteins remain in the final supernatant. Metallothionein concentrations were back-calculated from the concentrations of Cd, Cu and Zn in the final supernatant, using a metallothionein binding capacity of 7 atoms of Cd and Zn and 12 atoms of Cu per MT molecule.

### **Calculations and statistics**

Condition factors were calculated as  $\{W / L^3\} \times 100$ , where W is the fish body weight (g) and L is the fish fork length (cm). The exact value of the exponent was calculated to be  $2.96 \pm \text{SE } 0.07$  ( $P < 0.001$ ) from the non-linear regression  $W = aL^b$  fitted to the data obtained from a previous study on perch of various sizes collected from Lake Osisko (Giguère et al., Can. J. Fish. Aquat. Sci.: under review). Condition factors were calculated from 120 to 300 fish from each lake (DU = 298; HA = 122; OP = 198; OS = 198; VA = 125; LA = 125; RA = 125; WA = 125). Liver somatic indices were calculated as the ratio of liver wet weight (g) to total body wet weight (g) for five replicates of three pooled samples from each lake (i.e., 1 replicate = weight of 3 pooled wet livers divided by the weight of the corresponding 3 pooled whole fish).

Relationships between variables were initially examined in bivariate scatter plots. When bivariate plots indicated a possible linear relationship, a simple regression model was tested using the Statistica computer program (Statsoft Inc. 1999). When bivariate plots appeared non-linear, non-linear regression models with least-squares fitting were tested using the Sigmaplot computer program (SPSS Inc. 2000); the explained variances were compared to those obtained from a simple regression model. For each of the significant relationships presented (a P-level of 0.05 as the threshold for statistical significance), we verified if the residuals were normally distributed, and if some outlier values biased the regression coefficients. The proportionality between hepatic Zn and Cd concentrations was tested using simple linear correlation (Pearson  $r$ ) and no outliers were identified when the scatterplot of the correlation was examined.

## Results

### Metal exposure and bioaccumulation

Important gradients in ambient free metal ion concentrations,  $[M^{2+}]$ , between the least and most contaminated lakes were found for the four studied metals (Table 1). Measurements of dissolved  $[Ni]$  confirmed that this metal only exceeded background levels in the lakes located in the Sudbury area (HA, LA, RA, WA; see Table 1 for lake abbreviations).

Hepatic Ni concentrations were significantly related ( $r^2 = 0.53$ ;  $P = 0.04$ ) to free  $[Ni^{2+}]$  (Fig. 1 D). In contrast, total Cd, Cu and Zn accumulations in the liver were not significantly related ( $P > 0.05$ ) to the corresponding ambient free metal ion concentrations (Figs. 1A, B and C), nor to total dissolved metal concentrations (data not shown). We tested possible competition between  $[M^{2+}]$  and  $Ca^{2+}$ ,  $H^+$  or other metals at biological uptake sites to explain the lack of significant relationships between aqueous Cd, Cu and Zn and the concentrations of these metals in perch (as explained in Giguère et al., *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*: under review). Taking into account such potential ionic competition did not yield significant relationships between hepatic and aqueous metal concentrations. For Cd bioaccumulation (Fig. 1A), the exposure-accumulation relationships appear to differ between the two sampling regions. The concentrations of

Cd in perch livers from the Rouyn-Noranda area reached a maximum of  $\sim 400 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$  dw (Fig. 1A), which is similar to that observed for fish sampled from eight lakes the previous year (Giguère et al., *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*: under review; the four Rouyn-Noranda lakes in the present study are a subset of the original group of eight lakes). For fish sampled in Sudbury, such a trend is not apparent, likely because hepatic metal concentrations in fish collected in Wavy and Hannah lakes (Fig. 1A, open circles) are low in comparison to those from the other lakes.

### **Fish age**

Average age (mean  $\pm$  SD) of the fish collected from each lake was one year old for lakes Dufault ( $1.2 \pm 0.4$ ,  $N = 15$ ), Hannah ( $1.0 \pm 0.0$ ,  $N = 15$ ), Laurentian ( $1.3 \pm 0.6$ ,  $N = 14$ ) and Osisko ( $1.1 \pm 0.3$ ,  $N = 10$ ) and two years old for lakes Opasatica ( $2.2 \pm 0.4$ ,  $N = 14$ ), Raft ( $2.3 \pm 0.9$ ,  $N = 14$ ), Wavy ( $1.5 \pm 0.7$ ,  $N = 15$ ) and Vaudray ( $1.5 \pm 0.5$ ,  $N = 18$ ).

### **Lipid peroxidation and antioxidant defences**

Lipid peroxidation results in the production of a complex mixture of lipid degradation by-products (malondialdehyde and other aldehydes) (Romeo et al. 2000). We evaluated lipid peroxidation in liver cells using the concentrations of one of these lipid peroxidation by-products, malondialdehyde (also referred to as TBARS in some studies because of the assay method, which involves the use of thiobarbituric acid). Although malondialdehyde concentrations tended to decrease as all hepatic metal concentrations increased, the only significant relationship was between malondialdehyde and hepatic copper concentrations ( $P < 0.05$ ; Fig. 2B). The two sampling regions contributed equally to this relationship.

Overall, for the two sampling regions, we observed significant negative relationships between total glutathione concentrations ( $[\text{GSH} + \text{GSSG}]$ ) and hepatic  $[\text{Cd}]$  (Fig. 3A) or  $[\text{Zn}]$  (Fig. 3C); comparable relationships were not significant for  $[\text{Cu}]$  and  $[\text{Ni}]$ . Furthermore, reduced glutathione (GSH) concentrations in the liver decreased as hepatic Cd or Zn concentrations increased (Figs. 4 A and C) but they were not related to hepatic Cu or Ni concentrations (Figs. 4B and D). Note that hepatic Cd and Zn

concentrations showed a strong positive correlation (Pearson correlation coefficient of 0.92;  $P < 0.005$ ), a result that precludes the unambiguous identification of one or the other metal as the causative factor. On further examination of Fig. 4, it is clear that the negative relation between [GSH] and hepatic [Cd] or [Zn] can be ascribed solely to the lakes from the Sudbury area. Indeed, hepatic GSH in the fish collected from the Sudbury lakes was linked to the concentrations of each of the four metals, including Cu and Ni. In contrast, metal exposure did not appear to affect hepatic glutathione concentrations in perch from the Rouyn-Noranda lakes.

Concentrations of oxidized glutathione (GSSG) were not related to any of the measured hepatic metal concentrations in the pooled regions (results not shown). However, whereas hepatic GSSG was unrelated to metal concentrations in the fish collected in Sudbury, it tended to decrease with increases in hepatic Cd or Zn concentrations in the fish collected from the Rouyn-Noranda lakes. To integrate these two responses, the ratio of reduced to oxidized glutathione concentrations ( $[GSH]/[GSSG]$ ) was calculated, and it varied between 0.9 (Lake Opasatica) and 4.6 (lakes Vaudray and Laurentian). A general decreasing trend in the value of this ratio with increasing [metal] was observed in the livers of fish collected in the Sudbury lakes, whereas it tended to increase with increasing hepatic metal levels in perch collected in the Rouyn-Noranda lakes (results not shown).

In the livers of fish from the combined sampling regions, glutathione reductase activity decreased as liver [Cu] increased (Fig. 5B) whereas it was not linked to concentrations of liver Cd, Zn or Ni (Figs. 5 A, C and D). In fish collected in the Sudbury region, this decrease in glutathione reductase activity was observed for all four metals. However, none of the measured hepatic metal concentrations helped explain the variability of glutathione peroxidase activity in the liver (results not shown), which varied between (average  $\pm$  SD)  $2.6 \pm 0.2$  and  $3.5 \pm 0.9$   $U \cdot g^{-1}$  protein. An increase in metallothionein concentrations with the sum of the concentrations of Cd, Cu and Zn in the whole liver was also observed (Fig. 6).

For the two sampling regions, fish condition factor decreased with an increase in the natural logarithm of hepatic [Ni] ( $\ln [Ni]$ ;  $r^2 = 0.58$ ;  $P = 0.03$ ) (Fig. 7A); fish condition was not related to the concentration of any other hepatic metal. The liver

somatic index did not vary greatly and was unrelated to any of the hepatic metal concentrations (Fig. 7B).

## Discussion

### Metal exposure and bioaccumulation

In an initial study of yellow perch from eight lakes in the Rouyn-Noranda area, we were able to explain most of the inter-lake variability in metal bioaccumulation (Cd, Cu, Zn) in terms of changes in the concentrations of the ambient free metal ion and calcium (Giguère et al., *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*: under review). However, using these same variables we could not explain the trends in metal bioaccumulation in the present study, which included four new lakes from the Sudbury area. The influence of metal bioavailability on the exposure-bioaccumulation relationships was minimised by measuring concentrations of dissolved organic carbon and inorganic ligands, together with pH, to calculate the ambient free metal ion concentrations. Similarly, given that hardness cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) and the proton ( $\text{H}^+$ ) are known to inhibit trace metal uptake by a variety of aquatic organisms, we took into account possible competition from these cationic species for binding to metal uptake sites (Croteau et al. 1998; Di Toro et al. 2001). The influence of the metabolic status of the studied species (age, water temperature, and reproductive cycles) was also minimised, by collecting fish of the same age-class (1-2 years old), at the same time of the year (month of June). Lastly, the variation that could be due to metals in various food types was minimized by collecting an age-class of yellow perch that is recognised as uniformly planktivorous in Rouyn-Noranda lakes (Sherwood et al. 2002). However, despite all these considerations, aqueous metal exposure could not explain hepatic metal bioaccumulation in perch collected across the two sampling areas.

If dietary exposure to metals were important for wild fish (Giguère et al., *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*: under review), then relations between aqueous exposure and bioaccumulation might well be masked by the influence of the food vector. In such cases, exposure-bioaccumulation relationships might be improved by taking into account differences in prey type and prey metal concentrations among lakes (Croteau et al. 2003). Also, we cannot exclude possible genetic differences among fish populations in the

various lakes. Note too that different metal mixtures are present in the lakes of the two sampling regions: Rouyn-Noranda lakes are contaminated mostly by Cd and Zn, whereas the Sudbury lakes are contaminated mostly by Cd, Cu and Ni. These different exposure regimes could lead to physiological differences in the handling of metals by perch, but this research area has been little investigated.

Another complication inherent in the study of field-exposed organisms is that metal concentrations in lake water vary over time. Metal concentrations in fish organs will not fluctuate as rapidly as those in lake water. This lag between exposure and accumulation is more important in the liver, which integrates exposure over a long period of time, than in the organs responsible for uptake such as the gills and gastrointestinal tract. For example, when juvenile yellow perch were transplanted from an uncontaminated reference lake to a metal-contaminated lake, hepatic Cd concentrations in the transplanted fish still had not reached the levels measured in the indigenous fish after 30 d of exposure (Lisa Kraemer, personal communication, INRS-ETE, Ste-Foy, Québec, Canada G1V 4C7). Consequently, a 3-day mean measure of ambient  $[Cd^{2+}]$ , as determined in the present study, would not necessarily represent the true seasonal exposure regime. Lastly, attempting to predict trace element concentrations in animal organs based on those in water may be too simplistic; this approach is insensitive to changes in the pathway of metal accumulation, it ignores the internal re-distribution of metals, as well as the physiological condition of the animal and changes in mechanisms of metal excretion as bioaccumulated metal concentrations increase.

### **Lipid peroxidation**

Lipid peroxides are formed from the oxidative deterioration of polyunsaturated lipids in the membranes of cells and organelles. Lipid peroxidation by-products, such as malondialdehyde, are used as indicators of increases in the concentrations of cellular reactive oxygen species and as signs of cellular injuries in general (Christie and Costa 1984). Diverse contaminants can initiate lipid peroxidation, including metals and some organic contaminants. One might predict that among Cd, Cu and Zn, copper would be the most likely to enhance lipid peroxidation (Di Giulio 1989). Indeed, in biological systems, Cu will readily cycle between the cupric ( $Cu^{2+}$ ) and the cuprous ( $Cu^+$ ) oxidation states, an

activity that has been associated with the generation of hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ) (Halliwell and Gutteridge 1984). In principle,  $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$  may also undergo redox cycling, especially when bound to peptides, and thus catalyze the reduction of hydrogen peroxide leading to hydroxyl radical generation (Torreilles and Guerin 1990). Metals such as Cd or Zn can also indirectly affect the intracellular redox balance and enhance lipid peroxidation of cells since they can inhibit antioxidant enzymes (Pruell and Engelhardt 1980; Reddy et al. 1981) and inactivate glutathione (Christie and Costa 1984).

In the present study, however, increasing hepatic Cu concentrations were associated with reduced lipid peroxidation, as estimated from malondialdehyde concentrations, a response opposite to the one predicted from basic principles. Most studies to date on the effects of metals on lipid peroxidation in fish have been performed in the laboratory. Some have reported increases in lipid peroxidation with increasing metal exposure (in the liver, following a chronic waterborne Cd exposure of Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus*: Wofford and Thomas 1988; in the liver, following a chronic waterborne Pb exposure of Indian catfish, *Heteropneustes fossilis*: Chaurassia and Kar 1999; in the kidney, following a Cu intraperitoneal injection of sea bass, *Dicentrarchus labrax*: Roméo et al. 2000; in the plasma, following a diet-borne Ni exposure of lake trout, *Salvelinus namaycush*: Ptashynski et al. 2001). Other workers have reported no significant response in the liver following either a waterborne or diet-borne exposure (to Cd, Cu, Pb and Zn, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Farag et al. 1994; to Cd, Atlantic croaker: Thomas and Wofford 1993) or after intraperitoneal administration of the metals (rainbow trout: Tort et al. 1996; sea bass: Roméo et al. 2000).

There have been few studies in which the oxidative stress generated by exposure to metals was measured in indigenous fish. Farag et al. (1995) reported an increase in the hepatic lipid peroxidation in brown trout (*Salmo trutta*) exposed in nature to Cd, Cu and As, even though they measured hepatic [Cd] 20-fold lower and [Cu] 5-fold lower than those measured in yellow perch in the present study. However, in a second study Farag et al. (2003) reported a similar increase in lipid peroxidation in rainbow trout having hepatic Cd, Cu and Zn concentrations similar to those we measured in perch. In contrast,

Rodriguez-Ariza et al. (1993) measured a reduction in the concentration of malondialdehyde in indigenous mullet (*Mugil* sp.) exposed to a combination of Cu (hepatic concentrations slightly higher than those measured in the present study), Fe and organic contaminants, i.e., the same response that we observed for perch. This hormesis-like response could reflect a stimulation of antioxidant mechanisms to a level exceeding the strict needs of the cells to counter the increase in reactive oxygen species resulting from exposure to Cu. In agreement with this model, Rodriguez-Ariza et al. (1993) measured increases in antioxidant enzyme activities (including glutathione reductase and glutathione peroxidase) that could explain the corresponding decrease in malondialdehyde concentrations measured in exposed fish. We also measured several antioxidants to test this possibility, and these results are discussed below.

### **Antioxidant defences**

Various endogenous antioxidants protect against the propagation of oxyradical reactions in organisms: enzymatic antioxidants, including glutathione reductase and glutathione peroxidase, and non-enzymatic antioxidants such as ascorbic acid, glutathione and tocopherols.

#### **a) Enzymatic antioxidants**

Glutathione reductase supplies reducing equivalents in the form of reduced glutathione and thus is responsible for maintaining an optimum GSH/GSSG ratio (or redox status), the value of which could serve as a biomarker (Bus and Gibson 1979; Stegeman et al. 1989) (Fig. 8). The normal value of this ratio varies among taxa, that is, it is ~ 10 in rat liver cells (Kosower and Kosower 1978), 3–5 in the digestive gland of a freshwater bivalve (Cossu et al. 2000), and ~ 30 in the liver of rainbow trout (Lange et al. 2002). We measured ratios of 1 to 5 in yellow perch. Because ours is the first report of measurements for this species, we cannot determine if the ratios we observed indicate a perturbation of the liver cells' glutathione status, or if they are within the acceptable range for this species.

To our knowledge, the only study where GSH reductase activity was measured in fish exposed to metals is that of Rodriguez-Ariza et al. (1993), who reported enhanced

activities of this enzyme following exposure to multiple xenobiotics. In the present study, however, the measured glutathione reductase activities did not help to explain the hormesis-like response in malondialdehyde concentrations, since they did not increase with increasing metal concentrations, but rather decreased with increasing hepatic [Cu] (Fig. 5B). This decrease in GSH reductase activity might reflect metal binding to the enzyme functional group. For example, Christie and Costa (1984) demonstrated that  $\text{Cu}^{2+}$  could inhibit GSH reductase activity *in vitro*. Reductase activity could also be affected by a decrease in the concentration of its second substrate, NADPH; Brigelius (1985) reported that oxidative stress could lower NADPH concentrations. Furthermore, the activity of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase, which catalyses the reduction of NADPH (Fig. 8), remained low in summer in yellow perch livers collected from contaminated lakes, whereas higher levels were measured in perch from the reference lakes (Levesque et al. 2002).

Glutathione peroxidase can limit the propagation of reduced reactive oxygen species by reducing lipid hydroperoxides to stable alcohols, and by removing hydrogen peroxide formed in the cytosol (Bus and Gibson 1979). Generally, the activity of antioxidant enzymes such as GSH peroxidase is induced in the liver following the exposure of fish to metals (waterborne exposure to Cu or Zn, carp, *Cyprinus carpio morpha*: Radi and Matkovics 1988; water- and diet-borne exposure to Cu, Fe and organic contaminants in indigenous grey mullet: Rodriguez-Ariza et al. 1993; waterborne exposure to Cd in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Almeida et al. 2002). This induction can serve as an important acclimation mechanism under these conditions (Di Giulio et al. 1989). However, several authors also reported a *status quo* in GSH peroxidase activity in the liver of fish following metal exposure (3 fish species following a whole lake Cd addition experiment: Palace and Klaverkamp 1993; chronic waterborne Cd exposure of rainbow trout: Palace et al. 1993). In the present study, exposure to metals did not appear to affect the activity of glutathione peroxidase, and thus the response of this antioxidant cannot help to explain the decreasing concentrations of malondialdehyde with increasing hepatic Cu concentrations.

## b) Glutathione

Glutathione is a sulphhydryl-rich tripeptide that serves several vital functions, including scavenging reactive oxygen species, serving as a substrate for glutathione peroxidase, and maintaining the intracellular redox balance and essential thiol status of proteins (Stegeman et al. 1989) (Fig. 8). Given its known affinity for “soft” metal ions, it can also act as an intracellular metal chelator, thereby preventing the electrophilic interaction of metals with essential cellular structures (Maracine and Segner 1998).

We could find no reports in which [GSH] had been measured in indigenous fish that were chronically exposed to metals in their natural habitat, but there have been a number of laboratory investigations of metal-GSH relationships. Most such studies report an increase in hepatic GSH concentrations following exposure to Cd, whether exposure was performed *in vitro* (Schlenk and Rice 1998), *in vivo* through intraperitoneal administration (rainbow trout: Tort et al. 1996), or following chronic waterborne exposure (mullet: Thomas et al. 1982, Thomas and Wofford 1984; blue tilapia, *Oreochromis aureus*: Allen 1995). A few investigators have reported no variation in hepatic [GSH] following either *in vitro* exposure (to Zn: Schlenk and Rice 1998) or waterborne exposure (to Cd, Atlantic croaker: Thomas and Wofford 1993; to Cd or Zn, rainbow trout: Lange et al. 2002).

In the present study, GSH concentrations and total glutathione concentrations ([GSH] + [GSSG]) tended to decrease in response to increasing metal concentrations (Cd, Zn) in the perch liver, and thus variations in GSH do not help explain the hormesis-like decrease in malondialdehyde concentrations with increasing hepatic [Cu]. We note, however, that there are differences between our study regions. In Sudbury, the decrease in total glutathione concentrations ([GSH] + [GSSG]) with increasing hepatic Cd and Zn was due to a reduction in [GSH], whereas in Rouyn-Noranda it was due to a reduction in [GSSG]. Glutathione concentrations were uniformly low in fish from lakes having high aqueous metal concentrations, which suggests that GSH is kept at low levels in the presence of excess metals. In contrast, [GSH] in fish from reference lakes varied widely, suggesting that other factors (such as variable nutrition) may have influenced [GSH] in these uncontaminated lakes. Luoma (1996) has reported a similar type of trend in a

marine system; that is, the scope for growth of bivalves varied greatly at low metal concentrations but was uniformly low at high metal concentrations.

We consider three mechanisms that might explain the observed decrease in [GSH] with increasing hepatic metal concentrations (Cd, Cu, Zn and/or Ni) in Sudbury lakes. First, whereas [GSH] tended to decrease with increasing hepatic metal concentrations in Sudbury fish, there was also a concomitant trend towards a decrease in glutathione reductase activity with increasing metal concentrations (Cu and/or Ni). Furthermore, glutathione concentrations tended to increase with the activity of glutathione reductase in fish from Sudbury lakes. These observations support a model of cytotoxicity in which exposure to metals inhibits the activity of the enzyme glutathione reductase, leading to a reduction in the concentrations of reduced glutathione. It should however be pointed out that this model is undermined by the observation that fish collected in the Rouyn-Noranda lakes did not experience an equivalent decrease in GSH concentrations with increasing Cu whereas they too exhibited decreasing GSH reductase activity with increasing [Cu] (Fig. 5B). Second, the redox cycling of  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{3+}$  or of  $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$  (or peptide-bound Ni) could directly catalyze the reduction of hydrogen peroxide leading to free oxygen radical generation in the livers of fish sampled from the Sudbury lakes. The increase in reactive oxygen species following Cu and/or Ni exposure would result in an oxidation of glutathione. Aside from well-documented lipid peroxidation in animals exposed to Cu (discussed above), there are several reports of reduced glutathione concentrations and glutathione-reductase activity in the liver and kidney of rats following intraperitoneal administration of Ni (reviewed in Chakrabarti and Bai 1999). Lastly, the formation of glutathione conjugates with 'soft' metals such as Hg, Cd and Cu could be responsible for a reduction in the efficacy of glutathione as an antioxidant since it has a high affinity for these metals (Maracine and Segner 1998; Lange et al. 2002). However, such binding cannot explain the observed decrease in GSH concentrations along the metal gradient (Figs. 4A and C); the GSH assay involves a preliminary acidification step and thus both free and metal-bound GSH are measured.

### c) Metallothioneins

The concentrations of metallothionein-like proteins in perch increased with increasing hepatic metal concentrations (Fig. 6; Laflamme et al. 2000). Elevated metallothionein levels could explain in part the apparent hormetic response whereby malondialdehyde concentrations decrease as hepatic Cu concentrations increase. Indeed, metallothionein are characterized by an important proportion of cysteinyl residues (~30%), which serve as ligands for metal chelation, but also trap reactive oxygen species (particularly  $\bullet\text{OH}$ ) efficiently (Sato and Bremner 1993). Metallothioneins may be induced in response to oxidative stress (reviewed in Sato and Bremner 1993) or protect against oxidative stress once induced by metal exposure, as has been demonstrated by *in vitro* studies on various fish cell lines (Kling et al. 1996; Schlenk and Rice 1998; Wright et al. 2000). Thomas et al. (1986), using human erythrocytes, demonstrated that as the thiolate bonds in metallothionein are oxidized, metals that were initially bound to them are released. If metallothionein were truly responsible for the observed reduction in oxidative stress, they would therefore have a second beneficial effect in metal-exposed perch besides their well-documented role of metal sequestration.

### d) Condition factor and hepatosomatic index

The observed reduction of the condition factor of yellow perch with increasing liver [Ni] signals deterioration in the health of the fish exposed to Ni relative to fish from reference lakes. This result coincides with an increase in the concentrations of Ni bound to metal-sensitive sub-cellular fractions, namely the enzymes fraction, observed in perch from contaminated lakes (Giguère, et al., Environ. Toxicol. Chem.: under review). A metal exposure-related decrease in condition factor was also observed in other studies on perch collected in metal-contaminated lakes (Rouyn-Noranda: Laflamme et al. 2000; Levesque et al. 2002; Giguère et al., Can. J. Fish. Aquat. Sci.: under review; Sudbury: Eastwood and Couture 2002; Rajotte and Couture 2002; Audet and Couture 2003). Whereas Giguère et al. (Can. J. Fish. Aquat. Sci.: under review) related decreasing condition factors to Cd only (among 3 metals), the other studies did not relate it to the concentration of any particular metal. The condition factor of native fish reflects their energy reserves such as stored liver glycogen and body fat (Goede and Barton 1990).

Sherwood et al. (2000) indeed measured a lower specific growth rate in yellow perch from contaminated lakes in Rouyn-Noranda relative to reference lakes, suggesting that these fish experienced greater energetic costs. In addition, Levesque et al. (2002) observed altered glycogen reserve-cycling and an inability to increase the lipid levels in yellow perch from our most contaminated lakes, which may have contributed to the observed decrease in condition factor.

Results from the present study provide further support for the use of condition factors as an indicator of effects in metal-contaminated yellow perch but do not support the use of the hepatosomatic index as a means to this end (Couture and Rajotte 2003).

## Conclusions

Yellow perch are a promising sentinel organism for metal contamination in Canadian lakes since they are distributed across the country and they are relatively tolerant to metals and low pH. However, the lack of a relationship between free metal ion concentrations in the lake water and metal concentrations in the livers of the yellow perch calls for further research to establish the limits of this species as a sentinel organism. Along with measurements of accumulated metals, a characterization of the metal exposure regime for at least a complete summer, together with an evaluation of metal concentrations in organisms constituting food for juvenile perch, appear to be the key steps towards a better understanding of metal accumulation in indigenous perch.

Oxidative stress seems to be well controlled in indigenous yellow perch exposed to metals. Indeed, levels of a lipid peroxidation by-product, malondialdehyde, revealed a hormesis-like response in these fish, even though the levels of two antioxidants, glutathione reductase and glutathione, were depressed. Other indicators of lipid peroxidation, such as lysosomal membrane stability, could be monitored to confirm this unexpected response.

Metallothionein-like proteins appear to have contributed significantly towards reducing the concentrations of a lipid peroxidation by-product, malondialdehyde, in metal-exposed fish. These proteins have been extensively studied for their detoxification properties but, based on our observations, future studies interested in oxidative stress

generated by metals should also consider measuring concentrations of metallothionein for its antioxidant qualities.

The potentials of malondialdehyde and glutathione concentrations or of the activities of glutathione reductase and glutathione peroxidase as biomarkers of metal-induced effects are not evident from our results. We measured contradictory responses for these various endpoints in metal-exposed yellow perch. Some of these biomarkers seem sensitive to metal exposure (glutathione and glutathione reductase), whereas one did not respond to exposure (glutathione peroxidase) and the other responded in the opposite direction from what was expected (malondialdehyde). It thus appears from our results that accumulated metals may have caused oxidative stress in the livers of indigenous yellow perch, but the decrease in malondialdehyde concentrations along the metal gradient suggests that this stress was controlled by various antioxidants at the cellular level and that thus it was probably not directly responsible for major deleterious effects at the whole fish level. The added metabolic cost for controlling oxidative stress levels could however be indirectly responsible for deleterious effects in the exposed fish.

### **Acknowledgements**

A grant from the Metals in the Environment Research Network (MITE-RN) supported this project. The Société de la Faune et des Parcs de l'Abitibi-Témiscamingue (Government of Québec) provided invaluable logistical support. The technical assistance of Sophie Cooper and Amélie Cliche in the field is gratefully acknowledged. Michelle Geoffroy-Bordeleau helped with metal analyses. P.G.C. Campbell is supported by the Canada Research Chair programme.

### **References**

- Allen, P. 1995. Changes in tissue glutathione levels in the cichlid *Oreochromis aureus* (Steindachner) following long term exposure to mercury, cadmium and lead. *In* Toxicological and Environmental Chemistry. Edited by O. Hutzinger. Gordon and Breach Science Publishers, Malaysia pp. 1-12.

- Almeida, J.A. , Diniz, Y.S., Marques, S.F.G., Faine, L.A., Ribas, B.O., Burneiko, R.C., and Novelli, E.L.B. 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environ. Int.* **27**: 673-679.
- Audet, D. and Couture, P. 2003. Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments. *Can J. Fish. Aquat. Sci.* **60**: 269-278.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brigelius, R. 1985. Mixed disulfides: biological functions and increase in oxidative stress. *In Oxidative stress. Edited by H. Sies.* Academic Press, London pp. 243-272.
- Bus, J.S. and Gibson, J.E. 1979. Lipid peroxidation and its role in toxicology. *Rev. Biochem. Toxicol.* **1**: 125-149.
- Campbell, P.G.C., Hontela, A., Rasmussen, J.B., Giguère, A., Gravel, A., Kraemer, L., Kovescs, J., Lacroix, A., Levesque, H., and Sherwood, G. 2003. Differentiating between direct (physiological) and food-chain mediated (bioenergetic) effects on fish in metal-impacted lakes. *Human Ecol. Risk Assess.* **9**: 847-866.
- Carlberg, I. and Mannervik, B. 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* **113**: 484-490.
- Centre for Hydrology and Ecology (CHE). 2001. Windermere Humic Aqueous Model (WHAM). Natural Environment Research Council. Windermere, U.K.
- Chakrabarti, S.K. and Bai, C. 1999. Role of oxidative stress in nickel chloride-induced cell injury in rat renal cortical cells. *Biochem. Pharmacol.* **58**: 1501-1510.
- Chaurasia, S.S. and Kar, A. 1999. An oxidative mechanism for the inhibition of iodothyronine 5'-monodeiodinase activity by lead nitrate in the fish, *Heteropneustes fossilis*. *Water Air Soil Pollut.* **111**: 417-423.
- Christie, N.T. and Costa, M. 1984. In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. IV. Disposition of metals in cells: interactions with membranes, glutathione, metallothionein, and DNA. *Biol. Trace Element Res.* **6**: 139-158.

- Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., and Vasseur, P. 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotox. Environ. Saf.* **45**: 106-121.
- 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. *J. Environ. Monit.* **5**: 216-221.
- Croteau, M.-N., Hare, L., and Tessier, A. 1998. Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lake. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 1348-1353.
- Croteau, M.-N., Hare, L., and Tessier, A. 2003. Difficulties in relating Cd concentrations in the predatory insect *Chaoborus* to those of its prey in nature. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **60**: 800-808.
- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., and Jewell, C.S. 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**: 1103-1123.
- DiToro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., and Santore, R.C. 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. and Chem.* **20**: 2383-2396.
- Eason, C. and O'Halloran, K. 2002. Biomarkers in toxicology versus ecological risk assessment. *Toxicology* **181-182**: 517-521.
- Eastwood, S. and Couture, P. 2002. Seasonal variations in condition and liver metal concentrations of yellow perch (*Perca flavescens*) from a metal contaminated environment. *Aquat. Toxicol.* **58**: 43-56.
- Farag, A.M., Boese, C.J., Woodward, D.F., and Bergman, H.L. 1994. Physiological changes and tissue metal accumulation in rainbow trout exposed to foodborne and waterborne metals. *Environ. Toxicol. Chem.* **13**: 2021-2029.
- Farag, A.M., Stansbury, M.A., Hogstrand, C., MacConnell, E., and Bergman, H.L. 1995. The physiological impairment of free-ranging brown trout exposed to metals in the Clark Fork River, Montana. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **52**: 2038-2050.
- Farag, A.M., Skaar, D., Nimick, D.A., MacConnell, E., and Hogstrand, C. 2003. Characterizing aquatic health using salmonid mortality, physiology, and biomass

- estimates in streams with elevated concentrations of arsenic, cadmium, copper, lead, and zinc in the Boulder River watershed, Montana. *Trans. Amer. Fish. Soc.* **132**: 450-467.
- Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., McDonald, D.G., and Rasmussen, J.B. Influence of lake chemistry and fish age on Cd, Cu and Zn concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*: under review.
- Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., and Couture, P. Subcellular partitioning of cadmium, copper, zinc and nickel in indigenous yellow perch sampled along a polymetallic gradient. *Environ. Toxicol. Chem.*: under review.
- Goede, R.W. and Barton, B.A. 1990. Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. *Am. Fish. Soc. Symp.* **8**: 93-108.
- Halliwell, B. and Gutteridge, M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**: 1-14.
- Handy, R.D., Galloway, T.S., and Depledge, M.H. 2003. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology* **12**: 331-343.
- Kling, P., Erkell, L.J., Kille, P., and Olsson, P.-E. 1996. Metallothionein induction in rainbow trout gonadal (RTG-2) cells during free radical exposure. *Mar. Environ. Res.* **42**: 33-36.
- Kosower, N.S. and Kosower, E.M. 1978. The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cyt.* **54**: 109-160.
- Laflamme, J.-S., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., and Hontela, A. 2000. Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, and Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **57**: 1692-1700.
- Lange, A., Ausseil, O., and Segner, H. 2002. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. *Comp. Biochem. Physiol.* **131C**: 231-243.

- Lawrence, R.A. and Burk, R.F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **71**: 952-958.
- Leroy, P., Nicolas, A., Wellman, M., Michelet, F., Oster, T., and Siest, G. 1993. Evaluation of *o*-phthalaldehyde as bifunctional fluorogenic post-column reagent for glutathione in LC. *Chromatographia* **36**: 130-134.
- Levesque, H.M., Moon, T.W., Campbell, P.G.C., and Hontela, A. 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquat. Toxicol.* **60**: 257-267.
- Lopes, P.A., Pinheiro, T., Santos, M.C., Mathias, M.D., Collares Pereira, M.J., and Viegas Crespo, A.M. 2001. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. *Sci. Tot. Environ.* **280**: 153-163.
- Luoma, S.N. 1996. The developing framework of marine ecotoxicology: pollutants as a variable in marine ecosystems? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **200**: 29-55.
- Maracine, M. and Segner, H. 1998. Cytotoxicity of metals in isolated fish cells: Importance of the cellular glutathione status. *Comp. Biochem. Physiol.* **120A**: 83-88.
- Oliver, B.G., Thurman, E.M., and Malcolm, R.L. 1983. The contribution of humic substances to the acidity of colored natural waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* **47**: 2031-2035.
- Palace, V.P. and Klaverkamp, J.F. 1993. Variation of hepatic enzymes in three species of freshwater fish from Precambrian Shield lakes and the effect of cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol.* **104C**: 147-154.
- Palace, V.P., Majewski, H.S., and Klaverkamp, J.F. 1993. Interactions among antioxidant defences in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cadmium. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**: 156-162.
- Payne, J.F., Malins, D.C., Gunselman, S., Rahimtula, A., and Yeats, P.A. 1998. DNA oxidative damage and vitamin A reduction in fish from a large lake system in Labrador, Newfoundland, contaminated with iron-ore mine tailings. *Mar. Environ. Res.* **46**: 289-294.

- Pruell, R.J. and Engelhardt, F.R. 1980. Liver cadmium uptake, catalase inhibition and cadmium-thionein production in the killifish (*Fundulus heteroclitus*) induced by the experimental cadmium exposure. *Mar. Environ. Res.* **3**: 101-111.
- Ptashynski, M.D., Pedlar, R.M., Evans, R.E., Wautier, K.G., Baron, C.L., and Klaverkamp, J.F. 2001. Accumulation, distribution and toxicology of dietary nickel in lake white fish (*Coregonus clupeaformis*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Comp. Biochem. Physiol.* **130C**: 145-162.
- Radi, A.A.R. and Matkovic, B. 1988. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* **90C**: 69-72.
- 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*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **59**: 1296-1304.
- Reddy, C.C., Scholz, R.W., and Massaro, E.J. 1981. Cadmium, methylmercury, mercury, and lead inhibition of calf liver glutathione s-transferase exhibiting selenium-independent glutathione peroxidase activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **61**: 460-468.
- Rodríguez-Ariza, A., Peinado, J., Pueyo, C., and López-Barea, J. 1993. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**: 2568-2573.
- Romeo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., and Girard, J.P. 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat. Toxicol.* **48**: 185-194.
- Sato, M. and Bremner, I. 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radical Biol.* **14**: 325-337.
- Schlenk, D. and Rice, C.D. 1998. Effect of zinc and cadmium treatment on hydrogen peroxide-induced mortality and expression of glutathione and metallothionein in a teleost hepatoma cell line. *Aquat. Toxicol.* **43**: 121-129.
- 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 (Cs-137) technique. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **57**: 441-450.
- Sherwood, G.D., Kovacs, J., Hontela, A., and Rasmussen, J.B. 2002. Simplified food webs lead to energetic bottlenecks in polluted lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **59**: 1-5.
- SPSS, Inc. 2000. Sigmaplot 2000 for Windows. Chicago, IL.
- Statistica for Windows. 1999. StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA.
- Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., and Van Veld, P.A. 1989. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein synthesis as indicators of chemical exposure and effect. *In* Biomarkers. *Edited by* R.J. Hugget, R.A. Kimerle, P.M.J. Mehrle, and H.L. Bergman. Lewis Publishers, London pp. 235-333.
- Sunderman, F.W., Marzouk, A., Hopfer, S.M., Zaharia, O., and Reid, M.C. 1985. Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **15**: 229-236.
- Thomas, P. and Wofford, H.W. 1984. Effects of metals and organic compounds on hepatic glutathione, cysteine, and acid soluble thiol levels in Mullet (*Mugil Cephalus* L.). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **76**: 172-182.
- Thomas, P. and Wofford, H.W. 1993. Effects of cadmium and Arochlor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues. *Aquat. Toxicol.* **27**: 159-178.
- Thomas, P.T. , Wofford, H.W., and Neff, J.M. 1982. Effect of cadmium on glutathione content of mullet (*Mugil cephalus*) tissues. *Physiol. Mechanisms Mar. Pollut. Toxicity* 109-125.
- Tipping, E., Backes, C.A., and Hurley, M.A. 1988. The complexation of protons, aluminium and calcium by aquatic humic substances: A model incorporating binding-site heterogeneity and macroionic effects. *Water Res.* **22**: 597-611.
- Torreilles, J. and Guerin, M.-C. 1990. Nickel (II) as a temporary catalyst for hydroxyl radical generation. *FEBS* **272**: 58-60.
- Tort, L., Kargacin, B., Torres, P., Giralt, M., and Hidalgo, J. 1996. The effect of cadmium exposure and stress on plasma cortisol, metallothionein levels and oxidative status

- in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Comp. Biochem. Physiol.* **114C**: 29-34.
- Vasseur, P. and Cossu-Leguille, C. 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environ. Internat.* **28**: 711-717.
- Wallace, W.G., Lee, B.-G., and Luoma, S.N. 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **249**: 183-197.
- Wofford, H.W. and Thomas, P. 1988. Effects of xenobiotics on peroxidation of hepatic microsomal lipids from striped mullet (*Mugil cephalus*) and Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Mar. Environ. Res.* **24**: 285-289.
- Wright, J., George, S., Martinez Lara, E., Carpena, E., and Kindt, M. 2000. Levels of cellular glutathione and metallothionein affect the toxicity of oxidative stressors in an established carp cell line. *Mar. Environ. Res.* **50**: 503-508.

**TABLE 1**

Total dissolved metal concentrations, [M], and free-metal ion concentrations, [M<sup>z+</sup>], dissolved organic carbon, [DOC], and pH in the epilimnetic water of the studied lakes.<sup>a</sup>

| Lake                 | [Cd]      | [Cu]      | [Ni]       | [Zn]      | [Cd <sup>2+</sup> ] | [Cu <sup>2+</sup> ]         | [Ni <sup>2+</sup> ] | [Zn <sup>2+</sup> ] | [DOC]                 | [Ca]      | pH                        |
|----------------------|-----------|-----------|------------|-----------|---------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------|---------------------------|
|                      | (nM)      | (nM)      | (nM)       | (nM)      | (nM)                | (nM)                        | (nM)                | (nM)                | (mg L <sup>-1</sup> ) | (μM)      |                           |
| Dufault (DU)         | 6.7       | 180       | 10         | 1100      | 2.3                 | 0.025                       | 4.9                 | 379                 | 5.3                   | 420       | 7.46                      |
| Wavy (WA)            | 1.5       | 110       | 900        | 120       | 1.2                 | 11                          | 752                 | 100                 | 2.8                   | 40        | 5.01                      |
| Hannah (HA)          | 2.4       | 370       | 2500       | 50        | 1.0                 | 0.44                        | 1603                | 24                  | 3.7                   | 270       | 7.02                      |
| Raft (RA)            | 1.7       | 130       | 1820       | 160       | 0.88                | 0.094                       | 1284                | 80                  | 2.6                   | 90        | 6.68                      |
| Laurentian (LA)      | 0.6       | 140       | 840        | 30        | 0.26                | 0.075                       | 518                 | 12                  | 4.6                   | 110       | 6.37                      |
| Osisko (OS)          | 1.6       | 140       | 20         | 110       | 0.25                | <0.001                      | 2.9                 | 3.4                 | 3.1                   | 640       | 9.54                      |
| Vaudray (VA)         | 0.5       | 42        | 10         | 60        | 0.03                | 0.001                       | 2.1                 | 5.9                 | 8.8                   | 80        | 7.20                      |
| Opasatica (OP)       | 0.3       | 33        | 10         | 20        | 0.02                | <0.001                      | 3.1                 | 1.7                 | 7.7                   | 220       | 7.75                      |
| <b>ratio max/min</b> | <b>22</b> | <b>11</b> | <b>250</b> | <b>55</b> | <b>115</b>          | <b>&gt;1×10<sup>5</sup></b> | <b>763</b>          | <b>223</b>          | <b>3</b>              | <b>16</b> | <b>3.4×10<sup>4</sup></b> |

<sup>a</sup> The free Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> concentrations were estimated with the Windermere Humic Aqueous Model (WHAM 6.0.1) from total dissolved metal concentrations (including Al and Fe), concentrations of inorganic ligands and organic carbon and pH of the water.

## Figure captions

Figure 1: Relationships between metal concentrations in the livers of yellow perch and free-metal ion concentrations in lakes from the Rouyn-Noranda area (●) and in lakes from the Sudbury area (○): (a) cadmium (the dashed line represents the former relationship obtained with fish collected in 2000 in Rouyn-Noranda); (b) copper; (c) zinc and (d) nickel. Each point represents data for fish collected from a single lake in 2001 (mean  $\pm$  standard deviation, S.D.;  $n=3$  composite samples of 16 individuals). See Table 1 for lake abbreviations.

Figure 2: Relationships between the concentrations of malondialdehyde (MDA) and metals in the livers of yellow perch collected in lakes near Rouyn-Noranda (●) and Sudbury (○). Each point represents data for fish collected in a single lake (mean  $\pm$  standard deviation, S.D.;  $N=5$  composite subsamples of 3 individuals). See Table 1 for lake abbreviations.

Figure 3: Relationships between the sum of the concentrations of reduced and oxidized glutathione (GSH + GSSG) and metals in the livers of yellow perch collected in lakes near Rouyn-Noranda (●) and Sudbury (○). Each point represents data for fish from a single lake (mean  $\pm$  standard deviation, S.D.;  $N=5$  composite subsamples of 6 individuals). See Table 1 for lake abbreviations.

Figure 4: Relationships between the concentrations of reduced glutathione (GSH) and metals in the livers of yellow perch collected in lakes near Rouyn-Noranda (●) and Sudbury (○). Each point represents data for fish collected in a single lake (mean  $\pm$  standard deviation, S.D.;  $N=5$  composite subsamples of 6 individuals). See Table 1 for lake abbreviations.

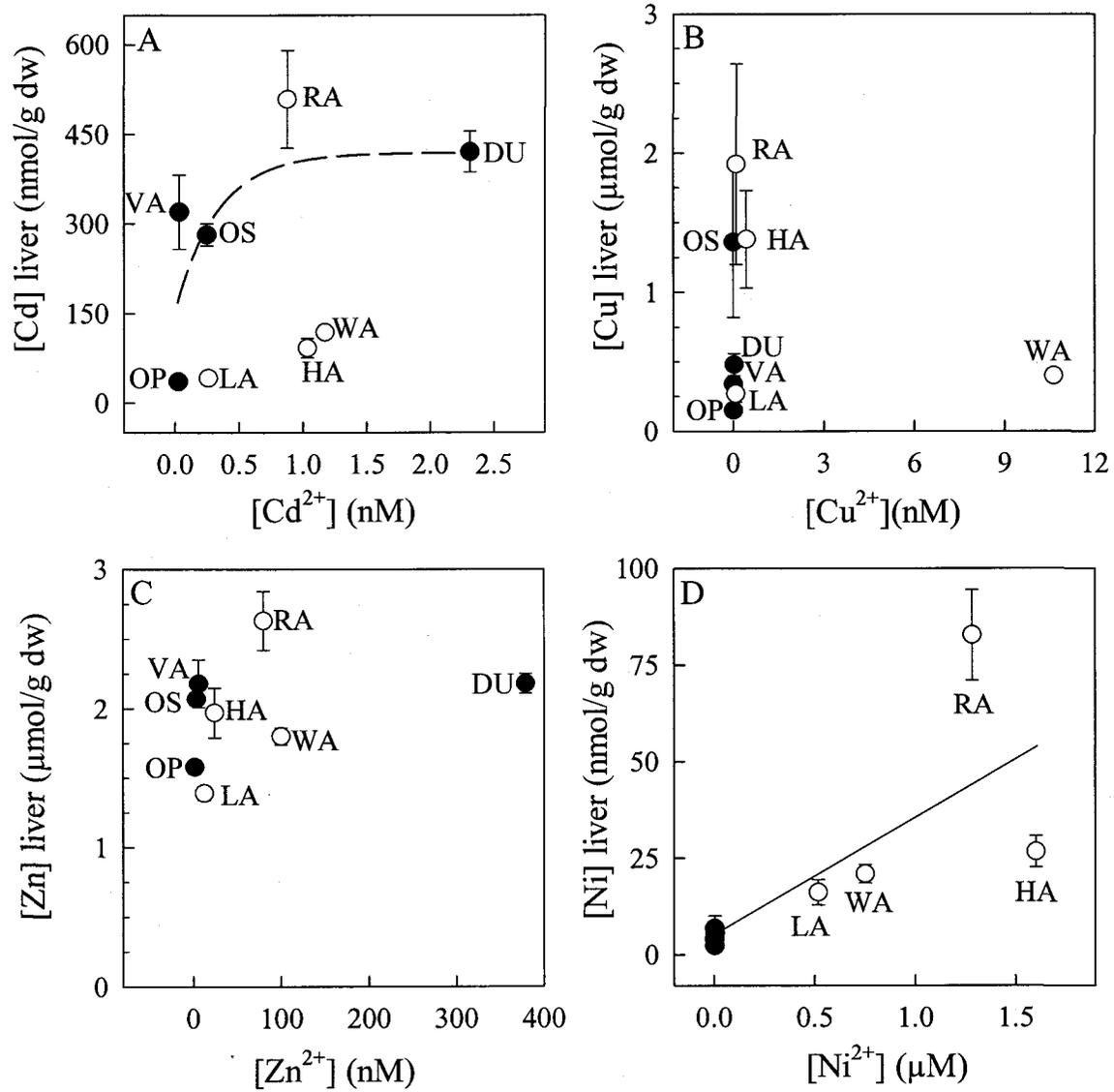
Figure 5: Relationships between the activity of glutathione reductase and metals in the livers of yellow perch collected in lakes near Rouyn-Noranda (●) and Sudbury (○). Each point represents data for fish collected in a single lake

(mean  $\pm$  standard deviation, S.D.; N=4 composite subsamples of 5 individuals). See Table 1 for lake abbreviations.

Figure 6: Estimated metallothionein concentrations in the liver cytosol of juvenile yellow perch collected in four lakes located in the Sudbury area (see Table 1 for lake abbreviations) and in four lakes in the Rouyn-Noranda area, in relation to the total concentration of Cd, Cu and Zn in the whole liver. Metallothionein concentrations were estimated from Cd, Cu and Zn concentrations measured in the metallothionein-like subcellular fraction, separated using differential centrifugation (for methodological details, see Giguère et al., *Environ. Toxicol. Chem.*: under review). A metallothionein binding capacity of 7 atoms of Cd and Zn and 12 atoms of Cu per MT molecule was used to perform the calculation.

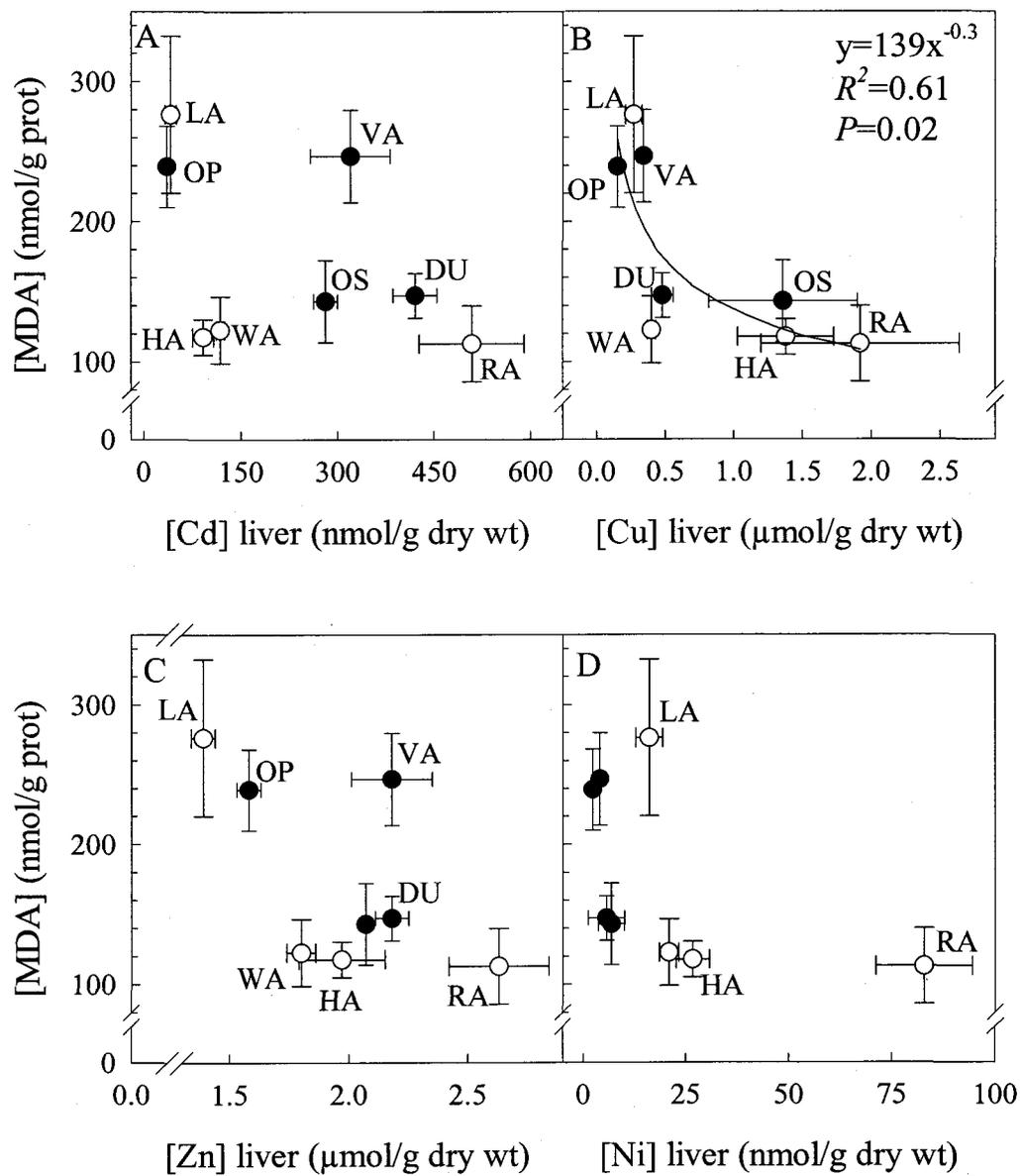
Figure 7: Relationships between (a) the condition factor of indigenous yellow perch and the natural logarithm of total hepatic Ni concentrations and (b) the hepatosomatic index and total hepatic Ni concentrations in yellow perch sampled in lakes near Rouyn-Noranda (●) and in Sudbury (○).

Figure 8: Some antioxidant defence mechanisms against reactive oxygen species in animal cells. Lipid peroxidation chain reactions are illustrated at the bottom: the lipid radical,  $\cdot L$ , reacts readily with  $O_2$  to produce the peroxy radical,  $LOO\cdot$ . This radical can remove a hydrogen from another polyunsaturated lipid, LH, yielding a lipid hydroperoxide, Lipid-OOH, and a new  $\cdot L$ , which can then continue the chain reaction, propagating additional LOOH and  $\cdot L$ . Figure modified from Bus and Gibson (1979) and Stegeman et al. (1989).



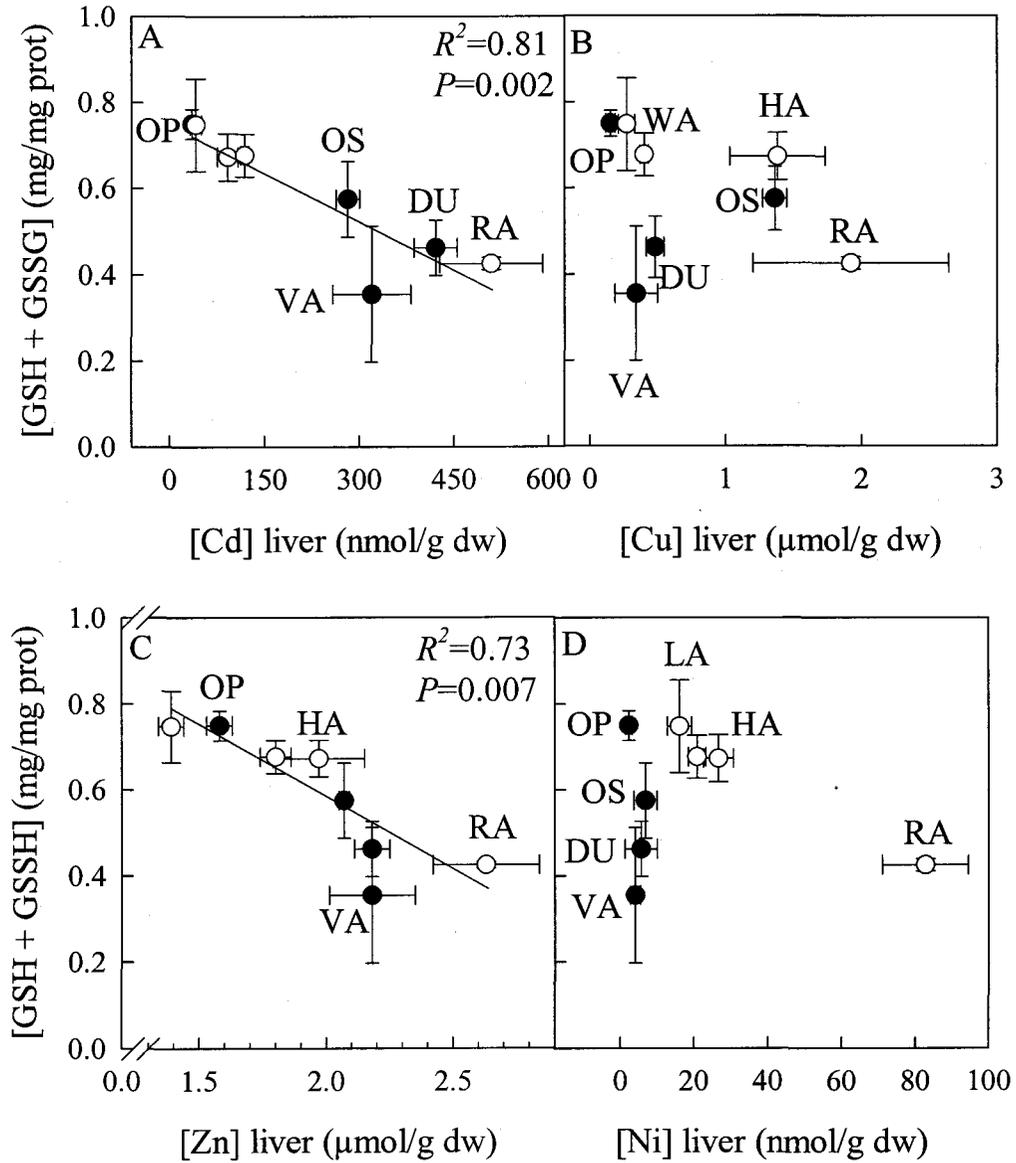
**Figure 1**

Anik Giguère, Peter G.C. Campbell, Landis Hare and Carole Cossu-Leguille



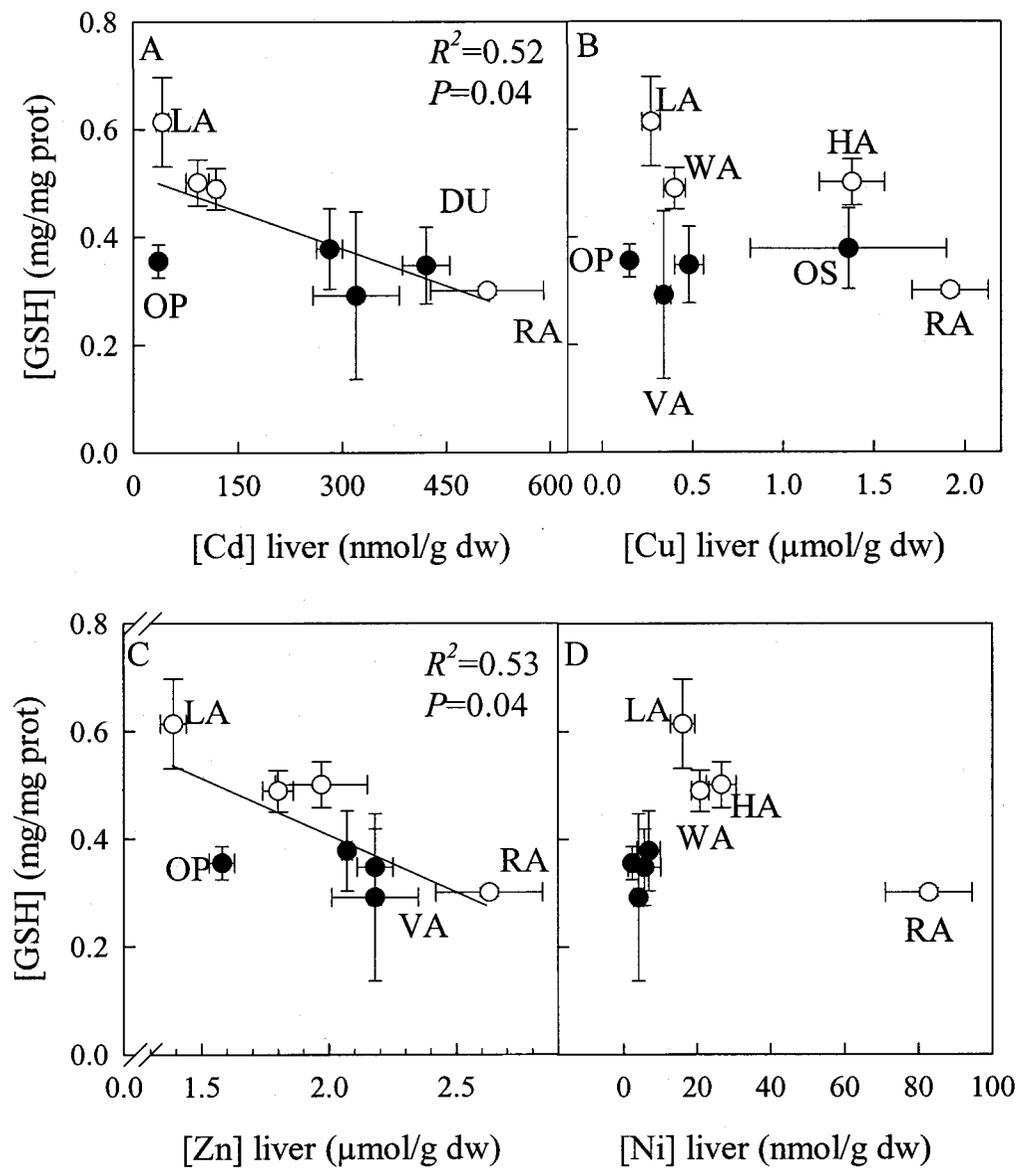
**Figure 2**

Anik Giguère, Peter G.C. Campbell, Landis Hare and Carole Cossu-Leguille



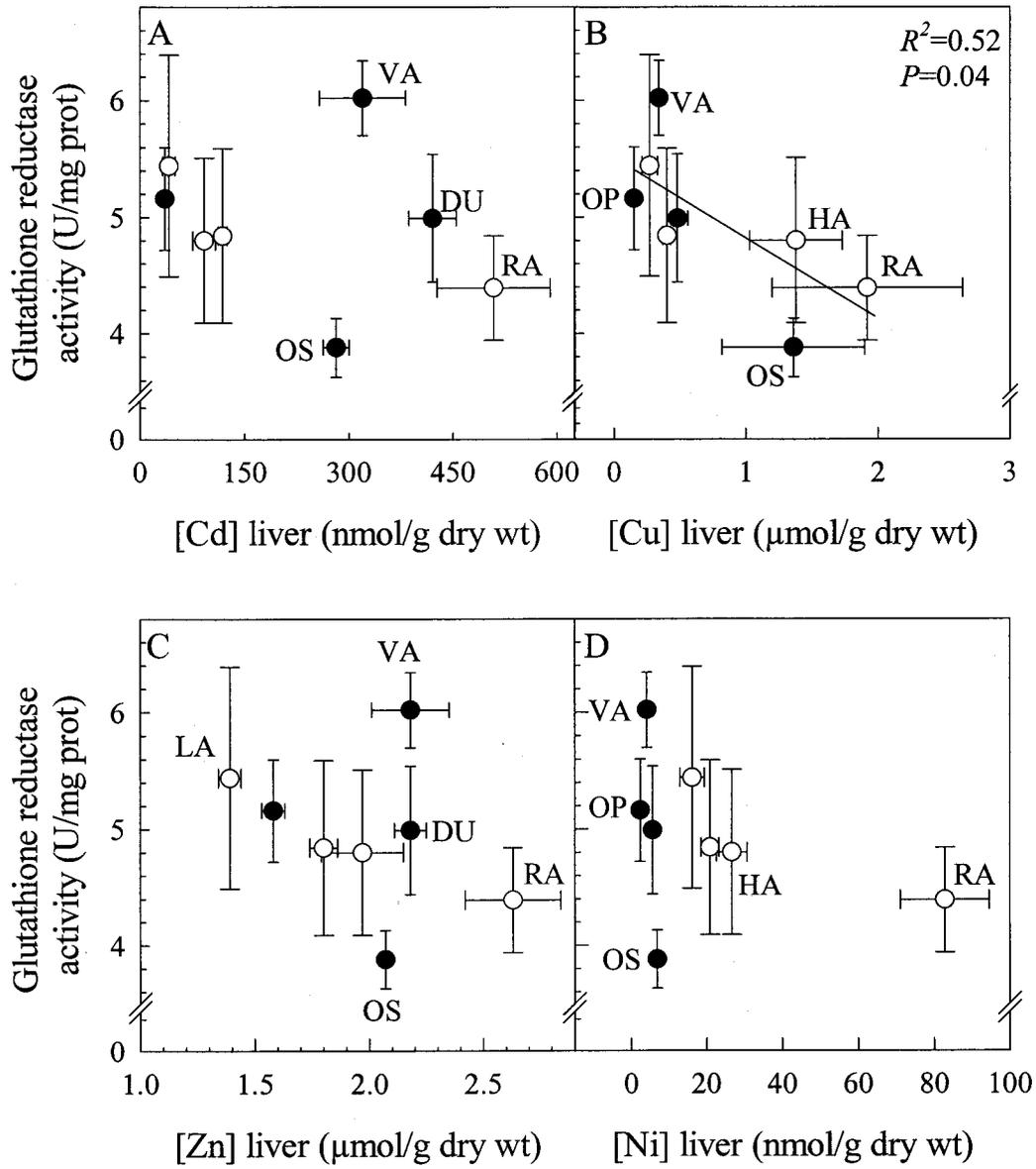
**Figure 3**

Anik Giguère, Peter G.C. Campbell, Landis Hare and Carole Cossu-Leguille



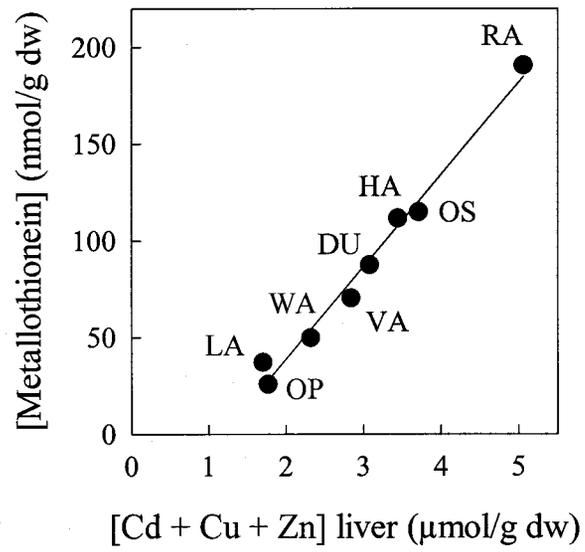
**Figure 4**

Anik Giguère, Peter G.C. Campbell, Landis Hare and Carole Cossu-Leguille



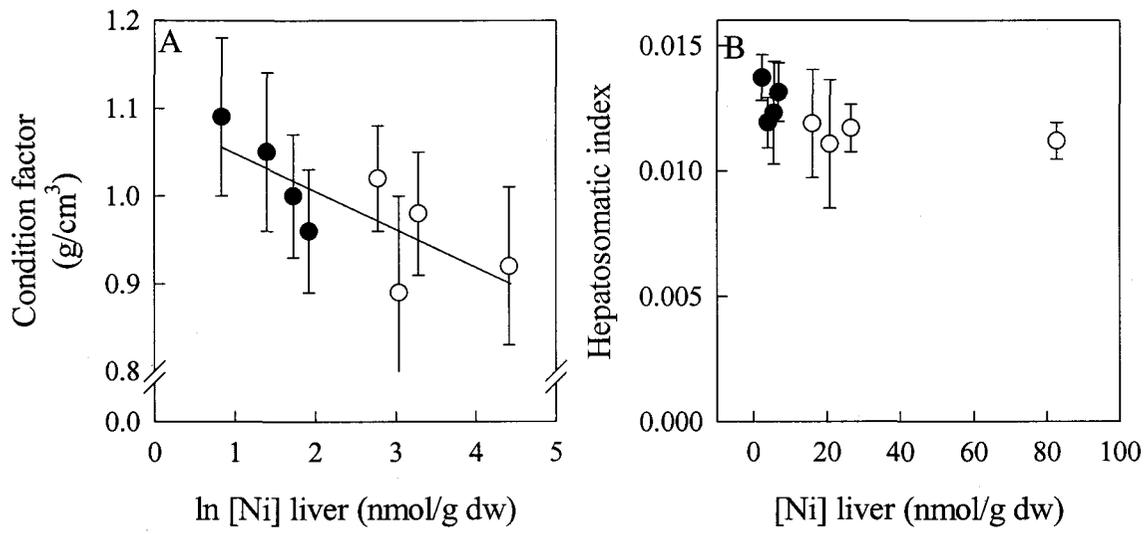
**Figure 5**

Anik Giguère, Peter G.C. Campbell, Landis Hare and Carole Cossu-Leguille



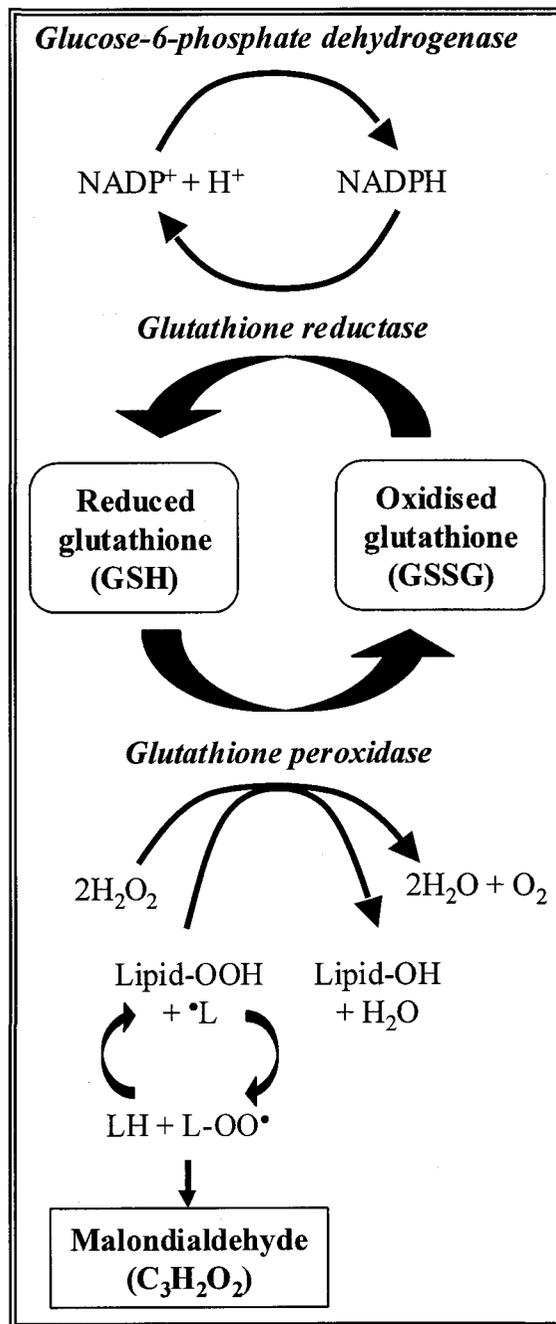
**Figure 6**

Anik Giguère, Peter G.C. Campbell, Landis Hare and Carole Cossu-Leguille



**Figure 7**

Anik Giguère, Peter G.C. Campbell, Landis Hare and Carole Cossu-Leguille

**Figure 8**

Anik Giguère, Peter G.C. Campbell, Landis Hare and Carole Cossu-Leguille



**12 Annexe A**

**Matrices des coefficients de corrélation de Pearson pour les concentrations métalliques dans l'organe entier et dans les fractions subcellulaires**



**Tableau A-1.** Matrice des coefficients de corrélation de Pearson ( $r$ ) pour les concentrations de Cd dans les branchies entières et dans les fractions subcellulaires des branchies des bivalves. \*  $P \leq 0.05$ .

|          | [Cd] branchies | [Cd-HMW] | [Cd-MT] |
|----------|----------------|----------|---------|
| [Cd-HMW] | 0.69*          |          |         |
| [Cd-MT]  | 0.98*          | 0.65*    |         |
| [Cd-LMW] | 0.84*          | 0.54*    | 0.86*   |

**Tableau A-2.** Matrice des coefficients de corrélation de Pearson ( $r$ ) pour les concentrations de Cd dans le foie entier et dans les fractions subcellulaires du foie des perchaudes. \*  $P \leq 0.05$ .

|                                   | [Cd] foie<br>entier | [Cd]<br>granules | [Cd] noyaux /<br>restes | [Cd]<br>mitochondries | [Cd] microsomes /<br>lysosomes | [Cd]<br>«enzymes» |
|-----------------------------------|---------------------|------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------------|-------------------|
| [Cd] granules                     | 0.70                |                  |                         |                       |                                |                   |
| [Cd] noyaux /<br>restes           | 0.99*               | 0.68             |                         |                       |                                |                   |
| [Cd]<br>mitochondries             | 0.94*               | 0.5              | 0.94*                   |                       |                                |                   |
| [Cd]<br>microsomes /<br>lysosomes | 0.98*               | 0.64             | 0.95*                   | 0.96*                 |                                |                   |
| [Cd]<br>"enzymes"                 | 0.99*               | 0.73*            | 0.98*                   | 0.93*                 | 0.98*                          |                   |
| [Cd] "MT"                         | 0.99*               | 0.68             | 0.98*                   | 0.90*                 | 0.95*                          | 0.98*             |

**Tableau A-3.** Matrice des coefficients de corrélation de Pearson ( $r$ ) pour les concentrations de Cu dans les branchies entières et dans les fractions subcellulaires des branchies des bivalves. \*  $P \leq 0.05$ .

|          | [Cu] branchies | [Cu-HMW] | [Cu-MT] |
|----------|----------------|----------|---------|
| [Cu-HMW] | 0.51*          |          |         |
| [Cu-MT]  | 0.84*          | 0.67*    |         |
| [Cu-LMW] | 0.12           | 0.40     | 0.27    |

**Tableau A-4.** Matrice des coefficients de corrélation de Pearson ( $r$ ) pour les concentrations de Cu dans le foie entier et dans les fractions subcellulaires du foie des perchaudes. \*  $P \leq 0.05$ .

|                                   | [Cu] foie<br>entier | [Cu]<br>granules | [Cu] noyaux /<br>restes | [Cu]<br>mitochondries | [Cu] microsomes /<br>lysosomes | [Cu]<br>«enzymes» |
|-----------------------------------|---------------------|------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------------|-------------------|
| [Cu] granules                     | 0.96*               |                  |                         |                       |                                |                   |
| [Cu] noyaux /<br>restes           | 0.94*               | 0.87*            |                         |                       |                                |                   |
| [Cu]<br>mitochondries             | 0.98*               | 0.90*            | 0.91*                   |                       |                                |                   |
| [Cu]<br>microsomes /<br>lysosomes | 0.99*               | 0.95*            | 0.94*                   | 0.98*                 |                                |                   |
| [Cu]<br>"enzymes"                 | 0.98*               | 0.95*            | 0.98*                   | 0.93*                 | 0.96*                          |                   |
| [Cu] "MT"                         | 1.00*               | 0.94*            | 0.93*                   | 0.98*                 | 0.98*                          | 0.97*             |

### 13 Annexe B

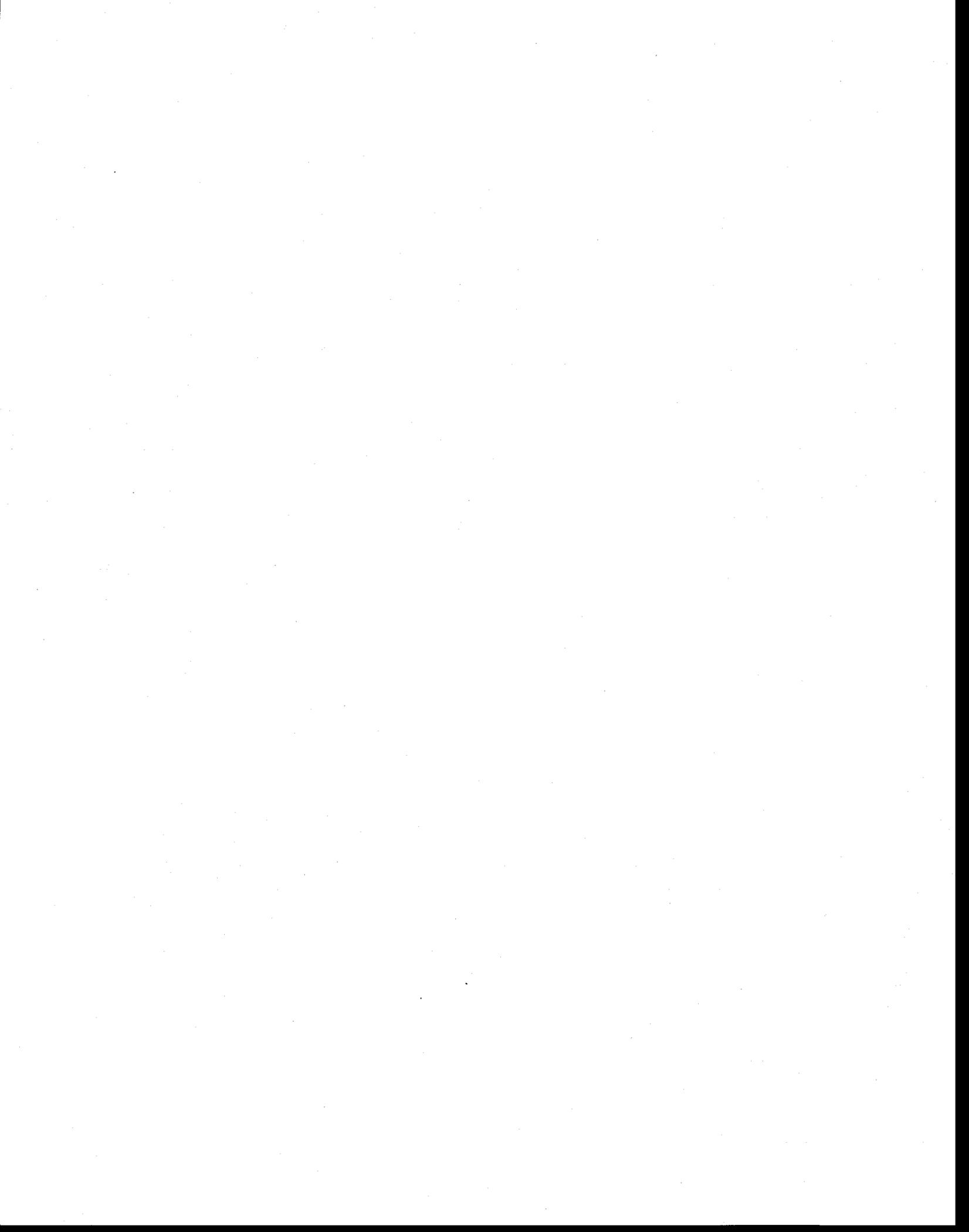
**Coefficients de détermination ( $r^2$ ) pour des relations entre un biomarqueur et les concentrations de métal dans le foie entier de perchaudes ou dans les fractions subcellulaires potentiellement sensibles à la toxicité des métaux.**



**Tableau B-1**

Coefficients de détermination ( $r^2$ ) pour des relations (toutes positives) entre un biomarqueur et les concentrations de métal dans le foie entier de perchaudes ou dans les fractions subcellulaires potentiellement sensibles à la toxicité des métaux. GSH = glutathion réduit; GSSG = glutathion oxydé. \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ ; n.s.  $P > 0.05$ .

|   | Métal | [Métal]        |                        |               |                           |            |
|---|-------|----------------|------------------------|---------------|---------------------------|------------|
|   |       | foie<br>entier | noyaux /<br>restes     | mitochondries | microsomes /<br>lysosomes | «enzymes » |
| <i>Régions de Sudbury et de Rouyn-Noranda (N=8)</i> |       |                |                        |               |                           |            |
| [Malondialdéhyde]                                   | Cu    | 0.50*          | 0.57*                  | 0.54*         | ns                        | 0.51*      |
| Activité glutathion peroxydase                      | n.s.  | -              | -                      | -             | -                         | -          |
| Activité glutathion réductase                       | Cu    | 0.52*          | 0.52*                  | n.s.          | n.s.                      | 0.59*      |
| Facteur de condition (CF)                           | In Ni | 0.58*          | fraction<br>contaminée | n.s.          | n.s.                      | n.s.       |
| Indice hépato-somatique (HSI)                       | n.s.  | -              | -                      | -             | -                         | -          |
| <i>Région de Sudbury (N=4)</i>                      |       |                |                        |               |                           |            |
| [GSH]   | Ni    | n.s.           | fraction<br>contaminée | 0.91*         | n.s.                      | n.s.       |
| <i>Région de Rouyn-Noranda (N=4)</i>                |       |                |                        |               |                           |            |
| [GSSG]  | Cd    | n.s.           | n.s.                   | n.s.          | 0.94*                     | n.s.       |
| [GSSG]  | Zn    | 0.91*          | n.s.                   | n.s.          | n.s.                      | n.s.       |



**14 Annexe C**

**Dosage du malondialdéhyde dans le foie de la perchaude (*Perca  
flavescens*)**



## **Dosage du malondialdéhyde dans le foie de la perchaude (*Perca flavescens*)**

*Méthode initialement décrite par Sunderman et al. (1985) et ensuite modifiée pour les perchaudes*

### **14.1 Description de la méthode**

#### **14.1.1 Objectif de la méthode**

Dosage colorimétrique du malondialdéhyde pour des concentrations entre 0 et 50 mM, lors du dosage. La réaction colorée, observée avec l'acide thiobarbiturique, mesure non seulement le malondialdéhyde préexistant, mais aussi le malondialdéhyde formé de manière artefactuelle par décomposition thermique des peroxydes préexistants, et de ceux générés au cours même de la réaction (Lefèvre et al., 1998). Le résultat du dosage du malondialdéhyde par l'acide thiobarbiturique est la somme du malondialdéhyde préexistant lié ou non aux molécules biologiques, des peroxydes lipidiques, des produits d'auto-oxydation des acides gras et autres substances qui donnent naissance soit à du malondialdéhyde, soit à des molécules réagissant avec l'acide thiobarbiturique en milieu acide et à chaud. C'est pourquoi à la notion initiale de dosage du malondialdéhyde s'est substituée la notion de «substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique » (*thiobarbituric acid reactive substances* ou TBARS). Une des sources de l'hétérogénéité des résultats observés avec les TBARS est liée au nombre important de molécules différentes qui ne relèvent pas forcément du stress oxydant, mais qui réagissent avec l'acide thiobarbiturique (Lefèvre et al., 1998).

#### **14.1.2 Matériel**

##### **Produits chimiques**

- KCl
- Éthanol
- Acide phosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 85%
- Acide thiobarbiturique (TBA)
- Tétraéthoxypropane (TEP)
- Butanol absolu (Fisher# A401-1)

##### **Verrerie**

- Tubes 19 ml (16 X 125 mm)
- Billes de verre
- Tubes pour centrifuger
- Cuvettes pour spectrophotomètre

##### **Instrumentation**

- Bain-marie
- Vortex
- Centrifugeuse 3000 rpm (1000 X g)

- Spectrophotomètre Beckman DU 640

#### Réactifs

- KCl, 154 mM (conserver à 4 °C)
- Acide phosphorique, 1.0 % (w/v) (conserver à 4 °C)
- Acide thiobarbiturique (TBA), 41.6 Mm (conserver à 4 °C)
- Tétraéthoxypropane (TEP), solution mère, 8.26 mM, dilué dans l'éthanol 40% (stable 1 mois à 4 °C)
- TEP, solutions filles pour la courbe standard (ajouter quantité requise de chaque standard à fiole jaugée de 25 ml et compléter à 25 ml avec éthanol 40%); Stable à 4 °C pendant 1 semaine.

#### Courbe d'étalonnage

|    | Quantité de solution mère de TEP<br>à ajouter à la fiole de 25 ml (µl) | Concentration de TEP<br>(µM) |
|----|--|------------------------------|
| S1 | 50   | 16.5                         |
| S2 | 150  | 49.5                         |
| S3 | 240  | 79.3                         |
| S4 | 350  | 116                          |
| S5 | 485  | 160                          |
| S6 | 605  | 200                          |

#### 14.1.3 Mode opératoire

##### *Préparation des tissus*

- Homogénéiser les tissus dans du KCl 154 mM froid avec une dilution constante pour toutes les analyses ;
- Pour les branchies de *P. grandis*, 1.0 g de tissu dans 10 ml de KCl ;
- Pour les foies de perchaude (*P. flavescens*), la dilution est de ¼ (p/v).

*Préparation des standards (triplicatas)*

- Préparer dans des tubes de 19 ml (16 X 125 mm):

|    | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub><br>(ml) | Éthanol<br>40%<br>(ml) | Quantité de solution<br>standard<br>(ml) | KCl<br>(ml) | Concentration<br>finale de TEP<br>(mM) |
|----|--|------------------------|--|-------------|--|
| S0 | 1.5                                    | 0.1                    | -  | 0.4         | 0.0                                    |
| S1 | 1.5                                    | -                      | 0.1                                      | 0.4         | 0.825                                  |
| S2 | 1.5                                    | -                      | 0.1                                      | 0.4         | 2.475                                  |
| S3 | 1.5                                    | -                      | 0.1                                      | 0.4         | 3.97                                   |
| S4 | 1.5                                    | -                      | 0.1                                      | 0.4         | 5.78                                   |
| S5 | 1.5                                    | -                      | 0.1                                      | 0.4         | 8.01                                   |
| S6 | 1.5                                    | -                      | 0.1                                      | 0.4         | 10                                     |

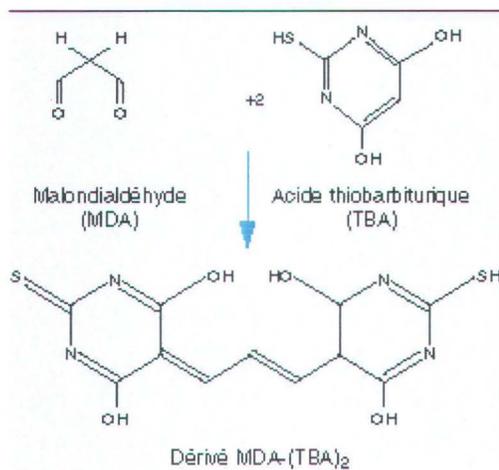
*Préparation des échantillons (duplicatas)*

- Préparer dans des tubes de 19 ml (16 X 125 mm):
  - ↳ 0.250 ml d'homogénat de tissu
  - ↳ 1.5 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> froid
  - ↳ 0.250 ml de KCl froid

*Préparation de tous les tubes et dosage*

- Ajouter 0.5 ml de TBA à chaque tube (blanc, échantillon et courbe standard);
- Mélanger au vortex;
- Recouvrir les tubes de papier d'aluminium pour les empêcher d'être exposés à la lumière ;
- Placer dans un bain-marie d'eau bouillante pour 45 minutes (billes pour recouvrir les tubes) ;
- Refroidir dans un bain d'eau courante, 5 minutes et **garder les tubes sur la glace** pour toutes les étapes subséquentes ;
- Ajouter 2.0 ml de butanol à chaque tube et mélanger 20 secondes au vortex
  - ↳ mettre le butanol dans l'eau chaude car il cristallise à température de la pièce
- Centrifuger 20 minutes à 1000 X g (3500 rpm sur la centrifugeuse Eppendorf 5415C), à 4°C ;
- À l'aide d'une pipette pasteur, transférer une partie du surnageant dans des cuvettes jetables ;
- Lire au spectrophotomètre à 532, 508 et 556 nm et calculer l'absorbance au moyen de la formule suivante :

$$\text{Absorbance corrigée} = Ab_{532nm} - \frac{Ab_{508nm} + Ab_{556nm}}{2}$$



**Figure C-1.** Réaction du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique (tiré de Lefèvre et al., 1998).

#### 14.1.4 Références

G. Lefèvre, M. Beljean-Leymarie, F. Beyerle, D. Bonnefont-Rousselot, J.-P. Cristol, P. Théron, J. Torreilles. (1998) Évaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Annales de Biologie Clinique*. Vol. 56, Numéro 3, : 305-19.

#### Développement de la méthode

##### 14.1.5 Concentrations d'acide thiobarbiturique et durée de la réaction au bain-marie

OBJECTIF: Vérifier si les concentrations d'acide thiobarbiturique étaient limitantes pour le dosage des concentrations de MDA dans le foie de la perchaude.

OBJECTIF: Vérifier si la durée de la réaction du TBA avec le tissu, dans le bain-marie, était suffisante pour que la réaction soit complète.

RÉSULTAT: Les résultats de cette série d'expériences ne semblent pas être liés au protocole expérimental, mais plutôt à l'ordre dans lequel les échantillons ont été analysés (augmentation des [MDA] pour les échantillons analysés en dernier (figure C-2). Ceci suggère que la durée d'une autre étape puisse être limitante, en l'occurrence la durée de l'étape entre l'ajout du butanol et la mesure d'absorbance.

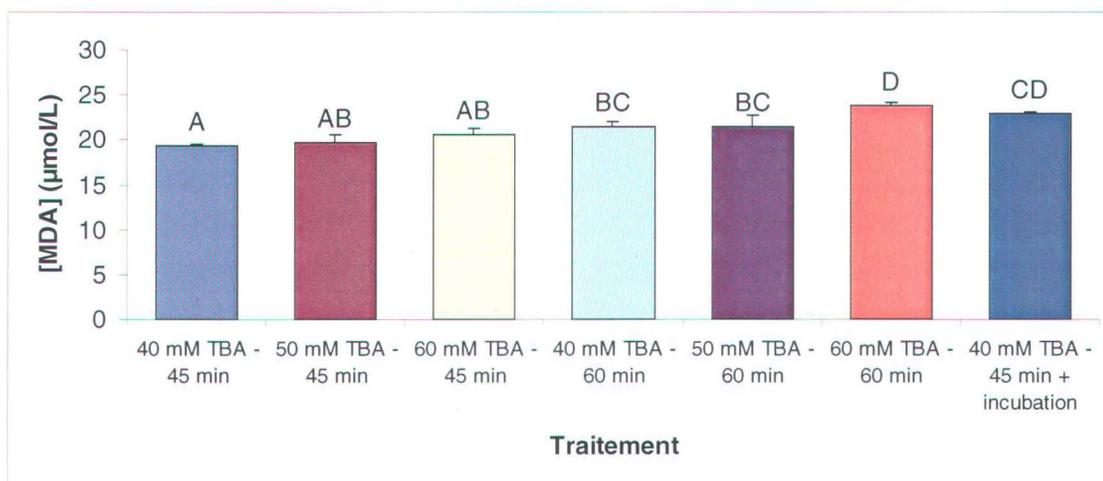


Figure C-2

#### 14.1.6 Durée et température de l'étape entre l'ajout de butanol et la mesure d'absorbance

OBJECTIF: Vérifier si la durée de l'étape entre l'ajout de butanol et la mesure d'absorbance est limitante pour le dosage de MDA dans le foie de perchaude.

OBJECTIF: Vérifier si la température du mélange de réaction pendant l'étape entre l'ajout de butanol et la mesure d'absorbance est limitante pour le dosage de MDA dans le foie de perchaude.

RÉSULTATS: Une durée d'au moins 15 minutes entre l'ajout de butanol et la mesure d'absorbance est nécessaire pour avoir une réaction maximale de l'acide TBA (figure C-3). La température du mélange de réaction, à cette étape, ne semble pas avoir d'importance.

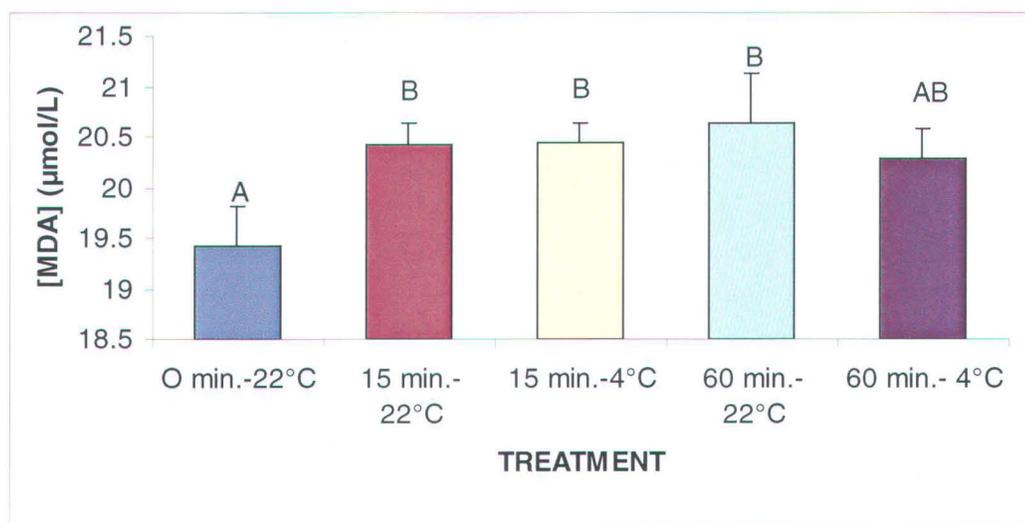


Figure C-3

#### 14.1.7 Effet de la dilution

OBJECTIF: Vérifier si la dilution de l'homogénat de foie de perchaude affecte les concentrations de MDA mesurées.

RÉSULTATS: Un homogénat plus concentré semble, à prime abord, réduire les [MDA] mesurées, ce qui pourrait être du à l'interférence spectrale causé par l'échantillon (figure C-4 a). Cependant, une deuxième expérience visant à corroborer ces résultats démontre une tendance contraire difficilement explicable (figure C-4 b).

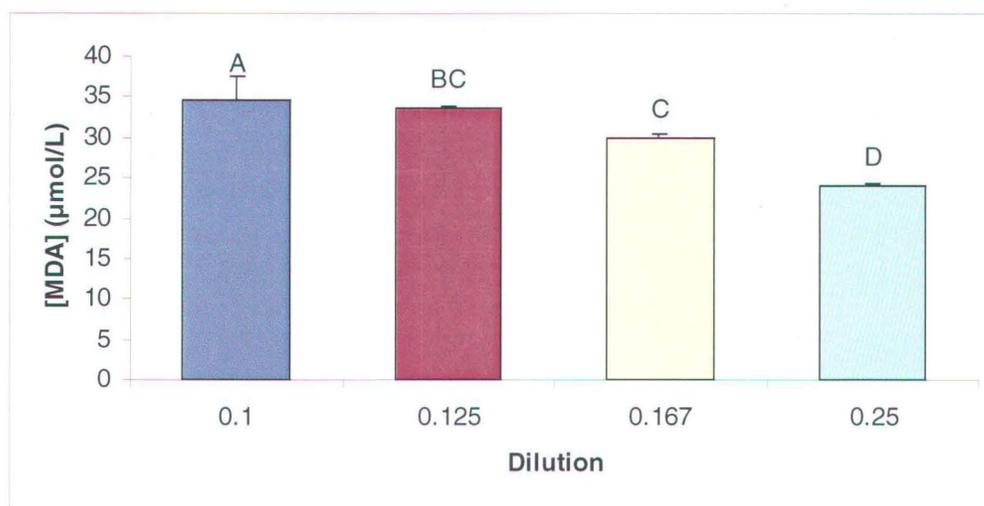


Figure C-4 a: Première expérience

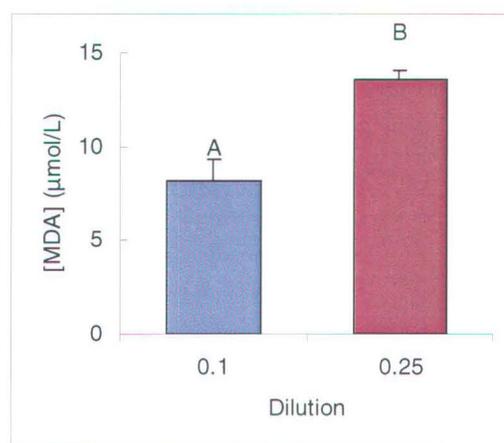


Figure C-4 b: Deuxième expérience

#### 14.1.8 Ajout de points sur la courbe d'étalonnage

OBJECTIF: Ajouter autant de points que possible sur la courbe d'étalonnage pour le dosage du malondialdéhyde, tout en gardant une relation linéaire, de manière à pouvoir utiliser la même dilution pour tous les tissus analysés.

RÉSULTAT: Nous avons pu ajouter 4 points de [MDA] supérieures aux trois qui existaient déjà (figure C-5).

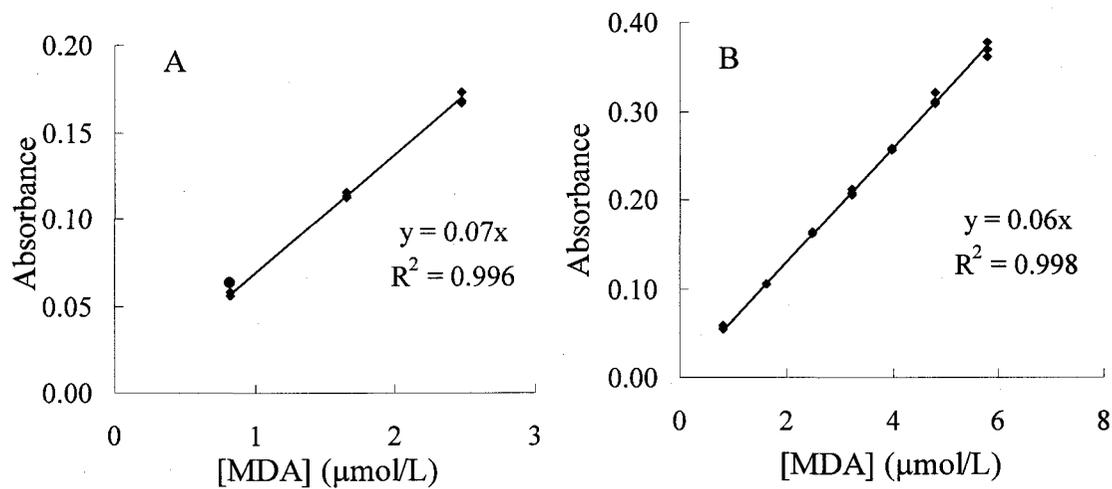


Figure C-5

#### 14.1.9 Test de l'effet de matrice

OBJECTIF: Vérifier si l'homogénat cause un effet de matrice qui pourrait affecter les mesures des [MDA], en ajoutant à 2 étalons différents (S5 et S8) un homogénat de foie de perchaudes dilué au 1/8.

RÉSULTAT: Les concentrations de MDA mesurées dans l'étalon et dans l'homogénat séparément, puis additionnées entre elles (S + homo théorique), étaient équivalentes aux concentrations de MDA de l'étalon réellement ajouté à l'homogénat (S + homo) (figure C-6). L'homogénat ne semble donc pas provoquer d'effet de matrice.

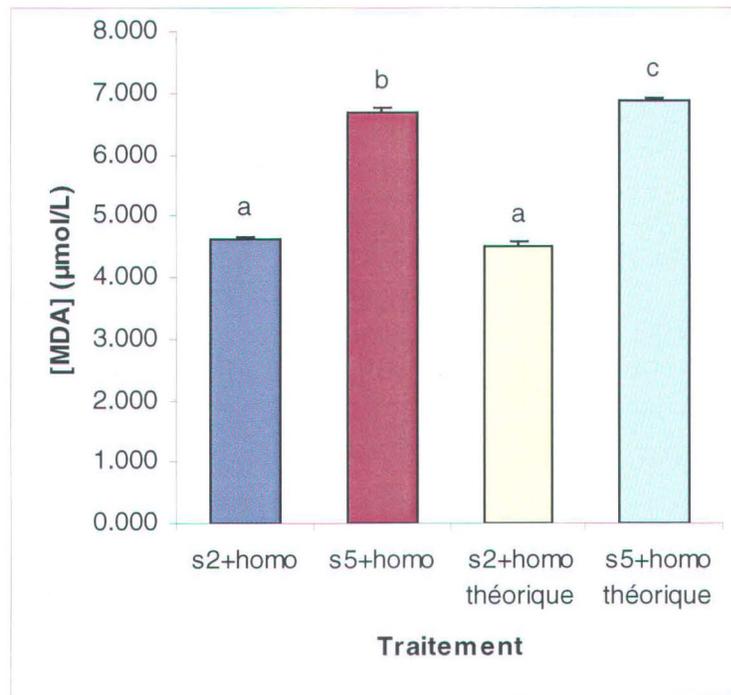


Figure C-6

**15 Annexe D**

**Dosage de l'activité de la glutathion réductase pour le foie de la perchaude (*Perca flavescens*)**



## **Dosage de l'activité de la glutathion réductase pour le foie de la perchaude (*Perca flavescens*)**

*Méthode telle que décrite par Carlberg et Mannervik (1985) et modifiée pour la perchaude*

### **15.1 Description de la méthode**

#### **15.1.1 Matériel**

- Tampon phosphate de potassium, 0.2 M, pH 7.0 avec 2 mM EDTA;
- NADPH (Sigma # N-7505);
- Tampon Tris-HCl, 10 mM, pH 7.0;
- Glutathion oxydé (GSSG; C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub>) (Sigma # G-4501);
- Glutathion réductase de levures de boulanger (Fluka # 49755);
- Cuvettes de plastique jetables spécifiques à 340 nm.

#### **15.1.2 Mode opératoire**

##### **15.1.2.1 Préparation des réactifs**

- Solution NADPH, 2 mM, dans le tampon Tris-HCl
- Solution de GSSG, 30 mM

##### **15.1.2.2 Préparation des tissus**

- Homogénéiser les tissus dans le tampon phosphate, tout en maintenant les tissus sur la glace, pour une dilution finale de 1/40;
- Centrifuger les homogénats à 4°C, à 500 × g, pendant 10 min;
- Toujours conserver les homogénats dans la glace ou bien au frigo.

##### **15.1.2.3 Dosage**

###### **Blanc**

- À une cuvette de 1.5 ml, ajouter le tampon, l'eau et la solution de GSSG;
- Placer cette cuvette dans le premier espace de l'échantillonneur automatique et faire le blanc sur l'appareil.

Échantillons (2 réplicats analytiques/échantillons)

- Dans 2 cuvettes jetables, ajouter le tampon, la solution de GSSG;
- Lorsqu'on est prêt, ajouter le NADPH d'abord puis l'enzyme (Étalon GSH-red ou homogénat);
- Placer les 2 cuvettes à la suite du blanc dans l'échantillonneur automatique et partir le chronomètre;
- Lire la décroissance de l'absorbance à 340 nm, à 20°C

|                   | Tampon<br>K-phosphate<br>(ml) | Solution<br>NADPH<br>(µl) | Solution<br>GSSG<br>(µl) | Eau<br>(µl) | Étalon<br>GSH-red<br>(µl) | Homogénat<br>(µl) |
|-------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------|---------------------------|-------------------|
| s0                | 0.5                           | 50                        | 50                       | 400         | -                         | -                 |
| Étalon<br>GSH-red | 0.5                           | 50                        | 50                       | -           | 400                       | -                 |
| essais            | 0.5                           | 50                        | 50                       | -           | -                         | 400               |

15.1.2.4 Calculs de l'activité à partir de la pente

Activité (U) = [enzymes] (µmol/L)/durée de la réaction(min) = (U/L) ou (U/g poids humide) ou (U/mg prot)

$$[\text{enzyme}](\text{moles/l}) = \frac{\text{Abs}(\text{variation densité optique})}{\varepsilon * \text{longueur trajet optique}(\text{cm})}$$

$$\text{Activité volumique (U/mL)} = \frac{\left( \frac{\text{variation densité optique}}{\text{min}} \right) * \left( \frac{\text{Dilution homogénat}}{\left( \frac{\text{g}}{\text{ml}} \right)} \right)}{\varepsilon(\text{ml} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1}) * \text{longueur trajet optique}(\text{cm})}$$

où  $\varepsilon$  = coefficient d'extinction molaire du NADPH à 340 nm =  $6.22 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$

## 15.2 Développement de la méthode

### 15.2.1 OBJECTIF:

Évaluation de la quantité de substrat (GSSG) nécessaire pour le foie de perchaude

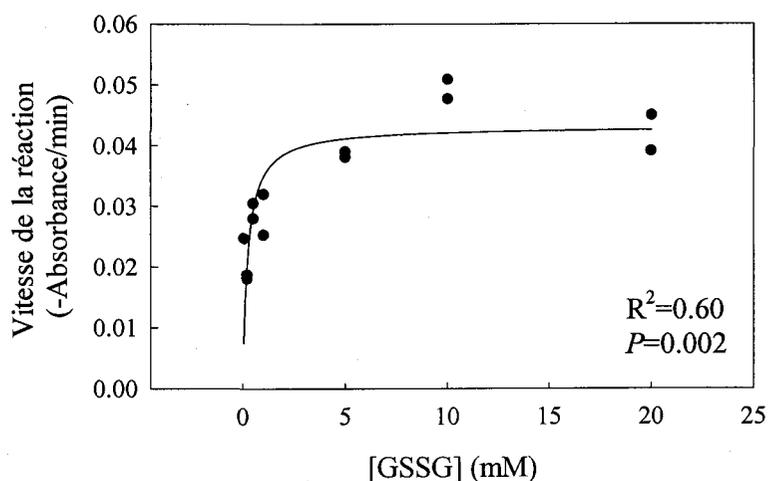
### 15.2.2 Principe:

On fait varier la concentration du substrat dans le milieu de réaction en gardant les concentrations des autres réactifs constantes. On met ensuite en relation la vitesse de la réaction avec la concentration du substrat. Selon l'équation de Michaelis-Menton, on ajuste ensuite une hyperbole rectangulaire à 2 variables (au moyen de Sigmaplot, v. 2000) sur les points, ce qui permet de calculer la vitesse maximale ( $V_{\max}$ ) ainsi que la constante d'affinité de l'enzyme pour le substrat ( $K_m$ ) de la réaction. L'équation pour le cas qui nous intéresse s'écrit donc comme suit:

$$\text{Vitesse de la réaction} = V_{\max} * [\text{GSSG}] / (K_{\text{GSSG}} + [\text{GSSG}])$$

La concentration de substrat est ensuite fixée à 10 fois la valeur du  $K_m$  calculée.

### 15.2.3 Résultats expérimentaux:



$$V_{\max} = 0.043 \pm 0.003; P < 0.001$$

$$K_{\text{GSSG}} = 0.24 \pm 0.09; P = 0.02$$

$$[\text{GSSG}] = 10 * K_{\text{GSSG}} = 10 * 0.24 = 2.4 \text{ mM}$$

Les [GSSG] utilisées dans l'essai (30 mM) étaient donc plus élevées que requis.



**16 Annexe E**

**Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase dans le foie de la perchaude (*Perca flavescens*)**





- NADPH ( $\beta$ -Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) (Sigma N-7505);
- Hydroperoxide de cumène ( $C_6H_5C(CH_3)_2OOH$ ) (Sigma C-0524)
- Tampon phosphate de potassium, 50 mM, pH 7.0 avec 1mM de EDTA
- Cuvette jetable en plastique spécifiques aux UV (1.5 ml)

### 16.1.3 Mode opératoire

#### 16.1.3.1 Préparation des réactifs

##### - MIX

Diluer dans le tampon phosphate de potassium

#1 NADPH, 0.275 mM dans le MIX (0.2 mM dans la cuvette)

#2 GSH réductase, 1.43 U/mL dans le MIX (1.6 U/mL dans la cuvette )

#3  $NaN_3$  : 1.375 mM dans le MIX (1 mM dans la cuvette)

*Ce réactif est un inhibiteur de la catalase, enzyme qui utilise aussi le  $H_2O_2$  comme substrat*

##### - GSH

60 mM (5.45 mM dans la cuvette)

##### - Hydroperoxyde de cumène

90 mM (8.182 mM dans la cuvette)

#### 16.1.3.2 Préparation des tissus

- Homogénéiser les tissus dans le tampon phosphate, tout en maintenant les tissus sur la glace, pour une dilution finale de 1/40;
- Centrifuger les homogénats à 4°C, à 500  $\times$  g, pendant 10 min;
- Toujours conserver les homogénats dans la glace ou bien au frigo.

### 16.1.3.3 Dosages (duplicats)

- Le blanc est constitué de 1 ml de tampon EDTA
- Dans une cuvette de quartz, ajouter:
  - 0.8 mL de MIX
  - 0.1 mL d'homogénat
  - 0.1 mL de GSH
- Partir le chronomètre et après *ca.* 5 minutes ajouter 0.1 mL d'hydroperoxyde de cumène.
- Agiter par inversion, 1 fois
- Prendre la densité optique chaque 30 secondes pendant environ 600 secondes
- Longueur d'onde de 340 nm
- Température de 20°C

### 16.1.3.4 Calcul de l'activité à partir de la pente

Activité (U) = [enzymes] ( $\mu\text{mol/L}$ )/durée de la réaction(min) = (U/L) ou (U/g poids humide) ou (U/mg prot)

$$[\text{enzyme}](\text{moles} / \text{l}) = \frac{\text{Abs}(\text{variation densité optique})}{\epsilon * \text{longueur trajet optique}(\text{cm})}$$

$$\text{Activité volumique} \left( \frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \frac{\left( \frac{\text{var iation densité optique}}{\text{min}} \right) * \left( \frac{\text{Dilution homogénat}}{\left( \frac{\text{g}}{\text{ml}} \right)} \right)}{\epsilon (\text{ml} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1}) * \text{longueur trajet optique} (\text{cm})}$$

où  $\epsilon$  = coefficient d'extinction molaire du NADPH à 340 nm =  $6.22 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$

## 16.2 Développement de la méthode

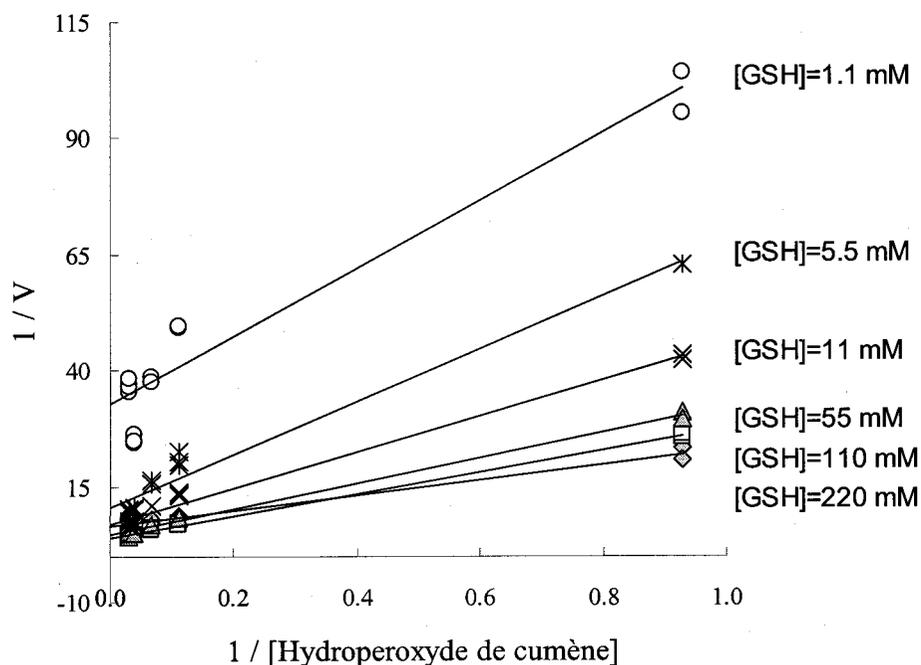
### 16.2.1 OBJECTIF:

Évaluation des concentrations des deux substrats (hydroperoxyde de cumène et GSH) requises pour le foie de la perchaude.

### 16.2.2 Principe ("Lineweaver-Burk plot"):

On fait varier les concentrations des 2 substrats dans le milieu de réaction. Pour chaque concentration de substrat#A donnée, on aura donc des essais à plusieurs concentrations de substrat#B, ce qui permettra de générer à chaque fois des valeurs *apparentes* de  $V_{\max}$  ( $V_{app}$ ) et de  $K_B$  (i.e.  $K_m$  pour le s substrat B). Les valeurs réelles de  $V_{\max}$  et de  $K_m$  étant celles générées à des concentrations infinies de substrats.

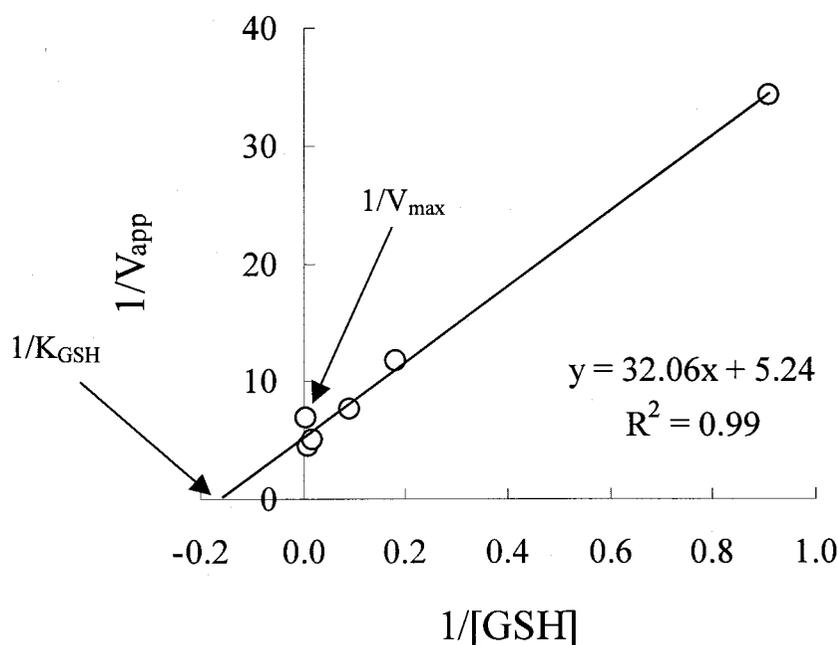
### 16.2.3 Détermination des concentrations de GSH



**Figure E-1**

Nous avons d'abord utilisé l'hydroperoxyde de cumène comme substrat variable. Six différentes concentrations de substrat fixe, [GSH], ont été utilisées, et chacune a donné une

valeur d'ordonnée et d'abscisse à l'origine qui représentent respectivement les valeurs apparentes de  $1/V_{\max}$  et de  $1/K_{\text{hydroperoxyde de cumène}}$ . Les valeurs véritable de ces constantes sont celles obtenues à des concentration infinies de GSH. Dans la relation ci-dessus (figure E-1), les ordonnées à l'origine de chacune des droites représentent les vitesses qui seraient obtenues à des concentration infinies d'hydroperoxyde de cumène ( $V_{\text{app}}$ ). Si on trace la relation de ces valeurs de  $1/V_{\text{app}}$  en relation avec la réciproque de  $1/[GSH]$  qui correspond à chacune, on obtient le graphique suivant (figure E-2):



**Figure E-2**

Dans ce cas, l'ordonnée à l'origine représente la vitesse maximale à une concentration infinie de GSH. Étant donné que les points sur cette droite représentent déjà la vitesse à une concentration infinie d'hydroperoxyde de cumène, cette ordonnée à l'origine donnera donc la véritable vitesse maximale de la réaction lorsque tous les substrats sont en concentrations saturées.

*Valeur de  $K_{GSH}$*

Lorsque  $y = 0$ , alors  $x = -0.16$  mM

$$1/K_{GSH} = -0.16$$

$$K_{\text{GSH}} = 6.1 \text{ mM}$$

$$[\text{GSH}] = 10 * K_{\text{GSH}} = 10 * 6.1 = 60 \text{ mM}$$

Les [GSH] utilisées dans l'essais (60 mM) correspondent donc aux valeurs calculées.

#### 16.2.4 Détermination des quantité d'hydroperoxyde de cumène (H.c.)

La même procédure est répétée, mais cette fois avec le GSH comme substrat variable (figures E-3 et 4).

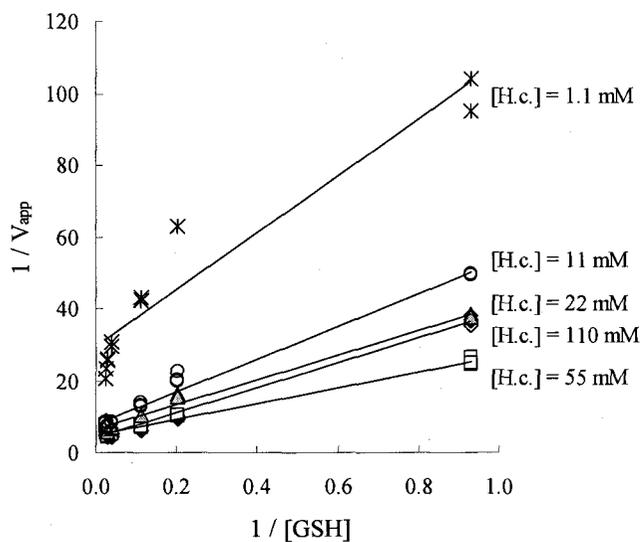


Figure E-3

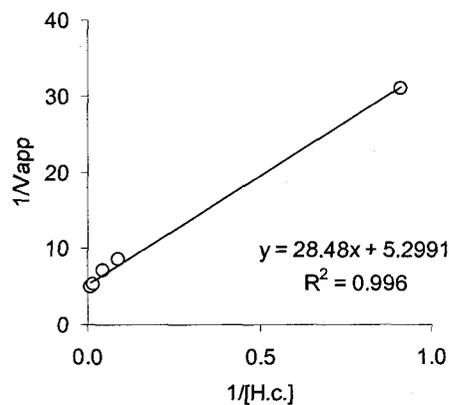


Figure E-4

Valeur de  $K_{\text{H.c.}}$

Lorsque  $y = 0$ , alors  $x = -0.19 \text{ mM}$

$$1/K_{\text{H.c.}} = -0.19$$

$$K_{\text{H.c.}} = 5.4 \text{ mM}$$

$$[\text{H.c.}] = 10 * K_{\text{GSH}} = 10 * 5.4 = 54 \text{ mM}$$

Les [hydroperoxyde de cumène] utilisées dans l'essais (90 mM) sont donc plus élevées que requises selon ce calcul.