

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

**IMPACTS D'UNE CONTAMINATION MÉTALLIQUE SUR LE
MÉTABOLISME DES RÉTINOÏDES ET LA RÉPONSE AU STRESS
OXYDANT CHEZ LA PERCHAUDE (*PERCA FLAVESCENS*)**

Par
Michel Amery Defo

Thèse présentée pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur externe	Marc Amyot Université de Montréal
Examineur externe	Karen Kidd University of New Brunswick
Examineur interne	Claude Fortin INRS-ETE
Directeur de recherche	Patrice Couture INRS-ETE
Codirecteur de recherche	Peter G.C. Campbell INRS-ETE
Codirecteur de recherche	Louis Bernatchez Université Laval

À (mes enfants)

Arel Godwill

Dave Nathan

Shaïla Abigaëlle

REMERCIEMENTS

Amateur des sciences environnementales dans l'âme, c'est avec beaucoup de plaisir que j'ai amorcé les études de maîtrise en écotoxicologie pour tenter de comprendre jusqu'à quel point les activités anthropiques pouvaient avoir un impact sur les écosystèmes. Cependant, trois années plus tard, je restais de plus en plus sur ma faim d'expertiser ce domaine. C'est pourquoi j'ai pris la décision de poursuivre mes études en m'inscrivant au cycle de doctorat, mais j'ai très vite compris que cet objectif devait difficilement se réaliser avec des moyens matériels et financiers limités. François Hollande dans l'une de ses adresses à la nation française disait : « Le plus difficile dans la vie n'est pas ce qu'on a fait, mais ce qui reste à faire ». Alors je suis reconnaissant envers la providence pour avoir mis sur mon chemin des personnes qui ont permis la traduction de ce rêve qui était gravé dans mon cœur en faits presque réalisés. Tout au long de cette thèse, vous ferez connaissance de cinq années supplémentaires d'efforts dévoués aux sciences environnementales. J'ose espérer que ces travaux de recherches doctorales auront contribué davantage à la compréhension des effets des activités humaines sur les écosystèmes, notamment sur la santé des populations des poissons d'eau douce.

Je suis infiniment reconnaissant de mon directeur de recherche, Patrice Couture, pour m'avoir recruté et intégré au sein de son équipe de recherche sur l'écotoxicogénomique chez la perchaude. Homme de cœur, il a été pour moi un encadreur exceptionnel tant sur le plan académique que moral. Alors que je traversais des moments difficiles dus à la maladie de mon fils, j'ai compris que je pouvais compter sur son soutien. Je ne peux pas compter le nombre de fois où j'ai sollicité son aide et ses conseils même en dehors

des heures de travail et il m'a toujours témoigné sa présence. Ses encouragements et ses conseils même dans des initiatives scientifiques personnelles, la permission de partager mes résultats de recherches dans plusieurs congrès ou colloques scientifiques nationaux ou internationaux, la qualité de l'écriture scientifique, de même que le cheminement des idées sont autant de choses que je retiens de lui. Actuellement, je mesure bien le sens du mot « Doctorvater » ou « Doctormutter » donné au directeur ou directrice de recherche en Allemagne. En simple mot, ce doctorat, je le lui dois. Merci Patrice !

Je tiens très sincèrement à remercier mon co-directeur de recherche, Peter Campbell pour son professionnalisme et sa minutie dans la critique scientifique. Ses judicieux conseils, ses encouragements de même que son tact et son approche dans la gestion des hommes resteront gravés dans ma mémoire. Je voudrais aussi lui dire merci pour ses suggestions déterminantes lors des expositions des poissons au laboratoire, ainsi que pour sa disponibilité à répondre à mes questions malgré son horaire chargé, à corriger mes manuscrits même dans les périodes de vacances. Merci, Peter, pour le soutien financier durant les derniers mois de ma thèse.

De tout cœur je tiens aussi à remercier mon co-directeur de recherche, Louis Bernatchez pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire afin de réaliser les travaux de biologie moléculaire. Le souci du travail bien fait, la rigueur scientifique, la patience, la passion et l'enthousiasme pour la recherche, le côté social avec les étudiants, sont autant de qualités qui m'ont marqué au cours de ces années passées auprès de lui, qualité que j'espère pouvoir appliquer à ma propre vie. Merci pour les encouragements

et les conseils. Je suis très reconnaissant pour le soutien financier que tu m'as accordé afin que je puisse participer au dernier congrès international de mes années doctorales.

Il est certain que cette thèse n'aurait pas vu le jour si Fabien Pierron n'avait pas participé à la conception du projet de recherche sur l'écotoxicogénomique chez la perchaude. Je tiens à lui dire merci pour tout le travail abattu. Aussi, je voudrais lui témoigner ma reconnaissance pour l'initiation à la pêche scientifique, au travail de terrain et à la dissection des poissons.

Je désire sincèrement dire ma reconnaissance à Philip Spear, pour m'avoir accepté dans son laboratoire à l'UQAM et de m'avoir initié dans les analyses des rétinoïdes.

Je remercie tous les autres membres de l'équipe de recherche et tous mes collègues du laboratoire de Patrice Couture pour leur aide et leurs collaborations multidimensionnelles. Je pense à : Bérénice Bougas, Julie Grasset, Charles Gauthier, Sébastien Belanger Deschênes, Éric Normandeau, Audrey Moffett, Mariem Fadhlaoui, Géraldine Patey, Antoine Caron, Isabelle Fournier et Ophélie Drevet.

Merci également aux membres du laboratoire Bernatchez, particulièrement à Guillaume Côté qui m'a encadré de bout en bout sur la paillasse lors de la mise au point des paramètres de la RT-PCR. J'ai énormément apprécié le fait de travailler avec lui.

Je suis reconnaissant à l'équipe du LARSA de l'université Laval pour son soutien dans la mise en place de l'animalerie pour les expositions, pour le suivi bihebdomadaire des paramètres physicochimiques et pour son soutien dans la dissection des poissons; je pense à Serge Higgins, Jean-Christophe Therrien, Marie Christine Dion et Jade

Larivière. J'exprime ma sincère gratitude à Raymond Gauthier de Trois-Rivières sans qui je n'aurai pas pu obtenir les poissons pour les expériences de laboratoire.

Je veux aussi dire merci à tous les stagiaires pour leur concours année après année lors des campagnes de terrain et de travaux de laboratoire. Je pense ici à : Maxime Belanger, Maxime Gérin-Ouellet, Charlotte Tingaud, Karine Bertrand et Elodie Ollivier. Vous obtiendrez un jour une médaille pour service rendu!

Je dis merci au personnel du laboratoire de l'INRS-ETE pour son soutien technique dans la chimie analytique des métaux ou des rétinoïdes, pour l'ambiance, l'attention et la minutie dans le travail. Je remercie particulièrement Stéfane Prémont, Stéphane Moïse, Anissa Bensadoune, Julie Perrault, Sébastien Duval et René Rodrigue.

Mes remerciements s'adressent aussi au personnel administratif de l'INRS-ETE particulièrement à : Suzanne Dussault, Linda Aubert et Johanne Desrosiers pour l'attention dans mon cheminement académique.

J'aimerais aussi souligner ces moments précieux que j'ai passés avec les chercheurs du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec au Ministère du Développement durable, Environnement et Lutte contre les Changements Climatiques (MDDELCC), alors que je réalisais mon stage académique. Je pense à : Mélanie Desrosiers, Gaëlle Triffault-Bouchet, Nicolas Gruyer et Nathalie Paquet. Vous m'avez fait découvrir de façon pratique comment on pouvait appliquer sur le terrain les connaissances scientifiques acquises, ce qui a apporté une dimension spéciale à ma formation.

Je ne peux évidemment pas oublier de remercier tous mes collègues de biogéochimie de l'INRS-ETE avec qui j'ai suivi des cours, partagé quelque temps sur le terrain ou dans les congrès et discuter de nos projets respectifs. Merci Benjamin, Maikel, Isabelle, Dominic et Anne.

J'ai également apprécié la compagnie de IB avec qui j'ai souvent discuté des progrès de mes travaux et partagé des instants de joie et de peine. Les moments de diner à deux m'ont souvent permis de changer les idées entre deux demi-journées de travail.

Ma reconnaissance va aussi aux organismes de subventions (CRSNG) et par ricochet aux payeurs de taxe du Canada, de même qu'à la compagnie Vale, particulièrement à Mike Dutton pour leur soutien financier.

Durant cette thèse je me suis presque oublié, mais il y'avait toujours une personne qui se souciait plus de moi. Guilène même dans l'ombre tu as contribué à ma formation académique. La situation qui me vient tout le temps à l'esprit est lorsque tu m'as suivi un jour à Trois-Rivières pour la pêche avec un enfant dans tes bras. Je suis désolé pour mes sautes d'humeur et pour mes absences alors que j'étais soit sur le terrain soit dans les conférences scientifiques. Je te dois une partie de cette thèse, car sans un équilibre moral, je ne serai probablement pas en train d'écrire cette thèse actuellement. Merci pour ta présence aux côtés de nos enfants durant mes moments d'absences, merci pour ton soutien spirituel. Pour finir merci pour ce que tu es : une femme qui a laissé tout pour me supporter dans la recherche. Reçois ici l'expression de ma gratitude et mon amour. Je suis privilégié d'être quotidiennement à tes côtés.

Merci à tous ceux que j'oublie de citer.

AVANT PROPOS

Mon projet de doctorat s'inscrit dans le cadre d'un grand projet de recherche intitulé « Écotoxicogénomique chez la perchaude » faisant intervenir des partenaires tant universitaires qu'industriels. L'objectif général de ce grand projet de recherche est de mettre sur pied un nouvel outil (micropuce à ADNc) de détection du stress métallique chez les populations de perchaudes sauvages vivant dans deux régions minières au Canada. Il vise de façon ultime à contribuer à la compréhension des mécanismes de toxicité des métaux chez cette espèce. Pour atteindre cet objectif, deux grands axes de recherche sont abordés dans ce projet de recherche à savoir : l'examen des effets exclusivement liés à une exposition des perchaudes aux métaux et une approche complémentaire discriminant les réponses métalliques à celles dues aux facteurs confondants par exemple la température, l'hypoxie ou la ration alimentaire. Cette dernière partie fait l'objet d'un projet de thèse à part. Concernant l'examen des effets des métaux sur les perchaudes trois approches y sont abordées :

- 1- Une approche d'écotoxicologie évolutive, où l'impact d'une contamination métallique sur la diversité génétique des populations est abordé. Cette partie a fait l'objet d'une maîtrise.
- 2- Une approche visant à comprendre les mécanismes moléculaires et neurophysiologiques associés à un dysfonctionnement chimio-sensoriel chez les perchaudes exposées aux métaux, qui fait aussi l'objet d'un projet de thèse.
- 3- Une approche visant à élucider les mécanismes moléculaires et métaboliques mis à contribution par les perchaudes pour s'adapter et survivre dans des

conditions d'exposition chronique aux métaux.

Mon projet de doctorat s'inscrit dans le sillage de cette dernière approche. À l'issue de deux investigations successivement menées dans l'exploration de l'impact d'une contamination métallique sur le niveau de transcription des gènes chez les perchaudes, il ressort d'une part, une corrélation négative entre le niveau de transcription des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes et les concentrations en Cd hépatique chez les poissons chroniquement exposés aux métaux en milieux naturels (Pierron et al., 2011). D'autre part, afin d'investiguer les mécanismes de toxicité du Cd et du Ni chez les perchaudes, des poissons provenant d'un aquaculteur ont été exposés par voie directe pendant six semaines à chacun de ces métaux. Les résultats montrent non seulement qu'il existe des signatures transcriptomiques spécifiques à chacun des métaux d'intérêt, mais que le Cd et le Ni affectent le niveau de transcription des gènes impliqués dans plusieurs voies métaboliques incluant la réponse au stress oxydant et le métabolisme de la vitamine (Bougas et al., 2013).

Notre étude s'inscrit directement dans la suite des deux études précédentes. Ayant ainsi délimité notre champ d'investigation, ce qui suit est organisé en trois parties. La première partie est une synthèse de l'ensemble des travaux menés dans le cadre de notre recherche. Ici, les idées principales contenues dans les articles et un lien entre elles y sont résumées. Quant à la deuxième partie, elle présente les publications scientifiques réalisées dont trois sont publiées dans des revues avec comité de lecture et deux sont en préparation. Enfin la troisième partie est constituée des annexes.

RÉSUMÉ

Généralement le terme « vitamine A » réfère à un groupe de molécules d'origine naturelle ayant une structure proche de celle du rétinol et capable d'exercer une activité biologique. En plus de jouer un rôle essentiel dans diverses fonctions physiologiques, certains rétinoïdes possèdent des propriétés antioxydantes. Cependant, l'action de lutte contre le stress oxydant ne sera efficace que si toutes les composantes du système de défense antioxydante, y compris enzymatiques, interagissent ensemble. Des études suggèrent qu'une exposition des poissons à certains métaux engendre un accroissement des espèces réactives à l'oxygène pouvant entraîner des dommages cellulaires graves. L'utilité de la perchaude (*Perca flavescens*) comme biomonitrice d'évaluation du risque des métaux en milieu naturel n'est plus à démontrer. C'est une espèce qui tolère la présence des métaux et les accumule dans ses tissus. Ubiquitaire en Amérique du Nord, elle domine dans certains lacs des zones minières et des fonderies du Canada, telle que la région de Rouyn-Noranda, Québec. Des preuves substantielles établissant un lien entre une exposition aux contaminants organiques et la perturbation du métabolisme des rétinoïdes existent. Cependant très peu d'études font état de l'impact des contaminants inorganiques, notamment celui des métaux, sur ce métabolisme. Ce projet de doctorat vise donc à évaluer les risques associés à la présence des métaux sur le métabolisme des rétinoïdes et à améliorer notre compréhension de l'impact des métaux sur les réponses au stress oxydant chez les poissons.

L'hypothèse principale de l'étude postulait que les métaux, principalement le Cd, provoquent une perturbation du métabolisme des rétinoïdes par altération de l'action

des enzymes clés, entraînant par la même occasion une accumulation anormale des métabolites dans les tissus des poissons. Quatre objectifs principaux ont été à la base de ce projet de doctorat. Le premier consistait à déterminer non seulement les impacts d'un gradient métallique sur le métabolisme des rétinoïdes, mais aussi la réponse des biomarqueurs du stress oxydant chez les populations de perchaudes sauvages. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons échantillonné plusieurs lacs représentant un gradient de contamination métallique. Les résultats montrent que les poissons des lacs contaminés présentent des concentrations en rétinoïdes hépatiques et plasmatiques plus élevées. Ils suggèrent ainsi la mise en œuvre des mécanismes de lutte contre le stress oxydant chez les poissons. De plus, bien que ces résultats concordent avec une augmentation du niveau de transcription du gène impliqué dans la synthèse de la rétinol déshydrogénase-2, ils contrastent cependant avec la diminution du pourcentage du déhydrorétinol libre observée dans le foie, traduisant alors un effet négatif des métaux sur les enzymes et/ou les protéines de liaison impliquées dans l'homéostasie des rétinoïdes. Conformément au postulat selon lequel une augmentation du niveau de transcription de la rétinol déshydrogénase-2 (*rdh-2*) accroît la protection contre le stress oxydant, nous avons observé une augmentation du niveau de transcription de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (*g6pdh*) accompagnée d'une activité élevée de cette enzyme dans le foie. Par contre l'activité de la superoxide dismutase était faible. Cette faiblesse révèle que les métaux ont une influence négative sur les activités de certaines enzymes antioxydantes.

Des études ont montré qu'en milieu naturel les variations saisonnières avaient une influence sur l'accumulation des métaux et sur la disponibilité des ressources alimentaires. C'est pourquoi le deuxième objectif de ce projet de doctorat a été de

vérifier si une variation saisonnière des concentrations métalliques tissulaires avait des effets sur le métabolisme des rétinoïdes et sur la réponse des biomarqueurs du stress oxydant chez des perchaudes sauvages. Pour ce faire, nous avons échantillonné dans les mêmes lacs pendant deux saisons (printemps et automne). Les résultats indiquent une forte fluctuation saisonnière des concentrations des métabolites des rétinoïdes. De même, les valeurs du pourcentage du déhydrorétinol libre et celles du niveau de transcription de la *rdh-2* dans le foie étaient plus importantes au printemps qu'en automne. Ces résultats seraient probablement liés à une fluctuation des facteurs qui affectent la biodisponibilité et la prise en charge des métaux et à une variation des ressources alimentaires entre les deux saisons. Une fluctuation temporelle dans l'expression de la *g6pdh*, de même que dans les activités de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) ont été observées dans le foie des perchaudes échantillonnées dans les lacs contaminés, avec des valeurs de ces paramètres plus élevées au printemps qu'en automne. Ce résultat dénoterait une présence accrue d'espèces réactives à l'oxygène au printemps qu'en automne et supporterait l'hypothèse selon laquelle une variation des concentrations tissulaires entraîne une variation des biomarqueurs impliqués dans les réponses au stress oxydant.

La dépendance temporelle des changements dans le niveau de transcription des gènes est d'une importance considérable dans la détermination des impacts des polluants sur les organismes vivants. De ce fait, le troisième objectif de ce projet de doctorat consiste en l'étude, chez les perchaudes, de la dynamique temporelle de l'accumulation des métaux d'une part et de leurs conséquences sur le métabolisme des rétinoïdes et sur la réponse des biomarqueurs du stress oxydant d'autre part. Dans cette optique, des perchaudes juvéniles issues d'un lac de référence ont été transplantées dans un lac

contaminé en métaux. L'exposition dans ces conditions a duré 1 et 4 semaines. Nos résultats montrent l'apparition d'une bioaccumulation significative durant les 4 premières semaines d'exposition avec pour conséquence une diminution des concentrations des métabolites des rétinoïdes (déhydrorétinyl palmitate), une réduction du pourcentage du déhydrorétinol libre et une baisse du niveau de transcription de la *rdh-2* dans le foie. Ils suggèrent qu'une exposition aux métaux en milieu naturel affecte négativement les biomarqueurs du métabolisme des rétinoïdes. En outre, comparées à leurs homologues restées captives dans leur lac d'origine, les perchaudes transplantées dans le lac contaminé présentaient un niveau de transcription de la *g6pdh*, de la glutathion-S-transférase-3 microsomale (*mgst-3*) et de la Cu/Zn superoxyde dismutase-1 (*Cu/Zn sod-1*) plus élevé suivi d'une augmentation des activités des enzymes correspondantes, sauf celle de la superoxyde dismutase (SOD). De plus une augmentation des activités de la SOD et de la catalase (CAT) musculaires a été observée. Ces résultats traduiraient une réponse plastique du phénotype qui permet à l'organisme de mieux lutter contre le stress oxydant.

Les expositions en milieux naturels impliquent rarement un seul facteur de stress responsable des effets biologiques néfastes. Pour définir la base sur laquelle les réponses à plusieurs facteurs de stress peuvent être comparées, les expositions de perchaudes à un seul métal dans des conditions contrôlées de laboratoire sont nécessaires. C'est la raison pour laquelle le dernier objectif de cette thèse réside dans le test au laboratoire des réponses obtenues de l'étude précédente. Pour ce faire, nous avons exposé les poissons aux Cd par voie directe durant six semaines. À l'instar des résultats obtenus au cours de l'étude de transplantation, il apparaît que le Cd affecte négativement les concentrations des métabolites de rétinoïdes dans le plasma et le

muscle. Par contre, il induit une réponse synchrone et positive dans le niveau de transcription de la *rdh-2* et dans les activités de la rétinyl ester hydrolase (REH) et de la lécithine déhydrorétinyl acyl transférase (LdRAT) du foie, suggérant une fois de plus un besoin pour la cellule de mieux lutter contre le stress oxydant. De plus, une augmentation du niveau de transcription de la catalase, de la *g6pdh* et de la *mgst-3* a conduit à une augmentation des activités des enzymes correspondantes, sauf pour la dernière voie métabolique. De plus une baisse dans les activités de la GST musculaire a été notée laissant présumer l'existence d'autres mécanismes alternatifs de protection de la cellule contre le stress oxydant.

Ce projet de doctorat nous a permis de mieux comprendre les mécanismes utilisés par la perchaude pour lutter contre le stress oxydant induit par une exposition métallique en milieu naturel. Ces mécanismes impliquent l'augmentation des concentrations des rétinoïdes et l'accroissement du niveau de transcription de certains gènes impliqués dans le métabolisme des rétinoïdes et dans la lutte contre le stress oxydant. Dans un contexte d'évaluation du risque environnemental des métaux, notre étude a permis de faire ressortir l'intérêt de combiner les études transcriptomiques et biochimiques dans la recherche de biomarqueurs d'effets. Finalement, ce projet de doctorat a illuminé notre compréhension des stratégies adoptées par les perchaudes pour s'adapter et vivre dans des milieux naturels en proie à la contamination métallique.

Mots clés : Rétinoïdes, stress oxydant, transcriptomique, tissus, activité enzymatique, perchaude, métaux, exposition au laboratoire, gradient de concentration, transplantation réciproque, variation saisonnière, plasticité phénotypique.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	v
Avant propos	xi
RÉSUMÉ	xiii
TABLE DES MATIÈRES	xix
LISTE DES TABLEAUX	xxiii
LISTE DES FIGURES	xxv
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xxvii
PARTIE I SYNTHÈSE	1
CHAPITRE 1. INTRODUCTION ET PROBLÉMATIQUE GÉNÉRALE DE L'ÉTUDE	3
1.1. Notion de bioindicateurs environnementaux : les biomarqueurs	6
1.2. Rôles des enzymes antioxydantes dans le système de défense cellulaire	9
1.3. Impacts des métaux sur les réponses des biomarqueurs au stress oxydant chez les poissons ...	11
1.4. Les rétinoïdes comme biomarqueurs d'une contamination aux métaux	14
1.5. L'écotoxicogénomique dans l'évaluation du risque	14
1.6. Présentation du modèle biologique : la perchaude	19
1.6.1. Identification, distribution et biologie.....	19
1.6.2. Une espèce sentinelle de pollution aquatique	20
CHAPITRE 2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE L'ÉTUDE	23
2.1. Impact d'un gradient de concentrations polymétalliques sur le métabolisme des rétinoïdes et la réponse des biomarqueurs du stress oxydant chez les populations de perchaudes sauvages	26
2.2. Variations saisonnières des concentrations métalliques et leurs impacts sur le métabolisme des rétinoïdes et la réponse des biomarqueurs du stress oxydant chez les populations de perchaudes sauvages	26
2.3. Dynamique temporelle de l'accumulation des métaux et leurs conséquences sur le métabolisme des rétinoïdes et la réponse des biomarqueurs du stress oxydant chez les perchaudes juvéniles	27

2.4. Effets du Cd aqueux sur le métabolisme des rétinoïdes et la réponse des biomarqueurs du stress oxydant chez les perchaudes exposées au laboratoire	29
CHAPITRE 3. BASES METHODOLOGIQUES	31
3.1. Présentation de la région et des lacs d'étude	33
3.2. Métaux d'intérêt dans cette étude	34
3.3. Choix des voies métaboliques d'intérêt dans cette étude	37
3.4. Procédure d'échantillonnage dans un gradient de concentration polymétallique.....	38
3.5. Procédure d'échantillonnage dans l'expérimentation de transplantation	40
3.6. Expérimentation dans les conditions contrôlées de laboratoire.....	42
3.7. Présentation des techniques utilisées.....	44
3.7.1. Calculs des paramètres biométriques	44
3.7.2. Analyse des concentrations métalliques tissulaires	44
3.7.3. Analyse des activités enzymatiques du stress oxydant	44
3.7.4. Analyse des rétinoïdes.....	45
3.7.5. Analyse de l'expression des gènes (RT-PCR)	47
3.7.6. Analyses statistiques.....	48
CHAPITRE 4. RESULTATS.....	49
4.1. Accumulation rénale des métaux chez les perchaudes	51
4.1.1. Études de gradient polymétalliques et de variations saisonnières.....	51
4.1.2. Expérimentation de transplantation et de laboratoire	53
4.2. Analyses des paramètres biométriques	54
4.2.1. Indice d'embonpoint relatif.....	54
4.2.2. Masse des cæca pyloriques.....	55
4.2.3. Indice hépatosomatique.....	56
4.3. Impacts des métaux sur le métabolisme des rétinoïdes.....	57
4.3.1. Effet des métaux sur la concentration des métabolites.....	57
4.3.2. Effet des métaux sur la proportion de déhydrorétinol libre	62
4.3.3. Effet des métaux sur les activités de la REH et la LdRAT hépatique.....	64
4.3.4. Effet des métaux sur l'expression de la <i>rdh-2</i> hépatique	65
4.4. Impacts des métaux sur la réponse des biomarqueurs du stress oxydant.....	67
4.4.1. Foie	67

4.4.2. Muscle	73
CHAPITRE 5. DISCUSSION ET INTEGRATION DES RESULTATS	77
5.1. Bioaccumulation des métaux	79
5.2. Effet d'une contamination métallique sur le métabolisme des rétinoïdes	86
5.2.1. Effet sur les concentrations des métabolites	87
5.2.2. Effet des métaux sur la proportion de dROH libre et sur les activités enzymatiques de la REH et la LdRAT	94
5.2.3. Effet des métaux sur l'expression de la <i>rdh-2</i>	95
5.3. Effet d'une contamination métallique sur la réponse au stress oxydant	97
5.3.1. Echantillonnage suivant un gradient de concentration métallique	97
5.3.2. Expérimentation de transplantation en milieu naturel	100
5.3.3. Expérimentation dans les conditions contrôlées de laboratoire.....	103
5.4. Implication d'un changement du niveau de transcription sur les réponses biochimiques	105
5.5. Stratégies qu'utilisent les perchaudes pour s'adapter et vivre dans un milieu naturel perturbé par les métaux	107
CHAPITRE 6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....	109
6.1. Retour sur les objectifs et hypothèses de l'étude	111
6.1.1. Effets des métaux sur le métabolisme des rétinoïdes.....	111
6.1.2. Effets des métaux sur les réponses des biomarqueurs traditionnels du stress oxydant	116
6.2. Perspectives de recherche.....	120
CHAPITRE 7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123
PARTIE II PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES.....	151
CHAPITRE 8. ARTICLE 1.....	153
CHAPITRE 9. ARTICLE 2.....	199
CHAPITRE 10. ARTICLE 3.....	243
CHAPITRE 11. ARTICLE 4.....	299
CHAPITRE 12. ARTICLE 5.....	351
PARTIE III ANNEXE.....	411
ANNEXE A	413

ANNEXE B 415
ANNEXE C..... 417
ANNEXE D 419
ANNEXE E..... 421
ANNEXE F..... 423
ANNEXE G 425
ANNEXE H 427
ANNEXE I 429
ANNEXE J 431
ANNEXE K 433

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: AUTRES CONDITIONS D'EXPOSITION DES POISSONS.....	43
TABLEAU 2 : PARAMÈTRES BIOMÉTRIQUES MESURÉS DANS LES EXPÉRIMENTATIONS DE GRADIENT AUX PRINTEMPS 2011 ET 2012 ET EN AUTOMNE 2012.	55
TABLEAU 3 : PARAMÈTRES BIOMÉTRIQUES MESURÉS DANS LES EXPOSITIONS DES PERCHAUDS AUX MÉTAUX EN MILIEU NATUREL ET EN LABORATOIRE.	56
TABLEAU 4 : CONCENTRATIONS HÉPATIQUES DE DEHYDROTÉTINOL, DÉHYDRORÉTINYL PALMITATE DE FOIE DE PERCHAUDS ISSUES DES ÉCHANTILLONNAGES DE GRADIENT ET DE SAISON.....	59
TABLEAU 5 : CONCENTRATIONS HÉPATIQUES DE DEHYDRORÉTINOL, DÉHYDRORÉTINYL PALMITATE DE FOIE CHEZ LES PERCHAUDS EXPOSÉS AUX MÉTAUX EN MILIEU NATUREL ET EN LABORATOIRE	60
TABLEAU 6 : CONCENTRATIONS MUSCULAIRES DE DÉHYDROTÉTINOL, DÉHYDRORÉTINYL STÉARATE CHEZ LES PERCHAUDS ISSUES DES ÉCHANTILLONNAGES DE GRADIENT ET DE SAISON.....	61
TABLEAU 7 : CONCENTRATIONS MUSCULAIRES DE DÉHYDROTÉTINOL, DÉHYDRORÉTINYL STÉARATE CHEZ LES PERCHAUDS ISSUES DES EXPÉRIMENTATIONS DE TRANSPLANTATIONS ET DE LABORATOIRE.....	62
TABLEAU 8 : NIVEAU DE TRANSCRIPTION DES GÈNES ET ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DANS LE FOIE DES PERCHAUDS ISSUES DES EXPÉRIMENTATIONS DE GRADIENT ET DE SAISON.....	68
TABLEAU 9 : NIVEAU DE TRANSCRIPTION DES GÈNES ET ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DANS LE FOIE DES PERCHAUDS ISSUES DES EXPÉRIMENTATIONS DE TRANSPLANTATION ET DE LABORATOIRE.....	70
TABLEAU 10: ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DANS LE MUSCLE DES PERCHAUDS ISSUES DES EXPÉRIMENTATIONS DE GRADIENT ET DE SAISON.....	73
TABLEAU 11 : ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DANS LE MUSCLE DES PERCHAUDS ISSUES DES EXPÉRIMENTATIONS DE TRANSPLANTATION ET DE LABORATOIRE	74

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : PRODUCTION MONDIALE DE MÉTAUX AU COURS DES DERNIÈRES DÉCENNIES (MILLIERS DE TONNES)	5
FIGURE 2 : MÉCANISMES D'ACTION DE QUELQUES ENZYMES IMPLIQUÉES DANS LA RÉPONSE AU STRESS OXYDANT.....	11
FIGURE 3: CHANGEMENT DE RÉGIME ALIMENTAIRE CHEZ LA PERCHAUDE EN FONCTION DU STADE DE CROISSANCE.....	21
FIGURE 4 : DIFFÉRENTS LACS D'ÉTUDE DANS L'ÉCHANTILLONNAGE DE GRADIENT..	36
FIGURE 5 : PHOTO D'UNE CAGE SERVANT DANS LES EXPÉRIMENTATIONS DE TRANSPLANTATION.....	41
FIGURE 6 : MONTAGE SIMPLIFIÉ DE LA TRANSPLANTATION DES PERCHAUTES.....	41
FIGURE 7 : LES CONCENTRATIONS TOTALES DE Cd (A) ET DE Cu (B) MESURÉES DANS LES REINS DES PERCHAUTES CAPTURÉES LORS DES ÉCHANTILLONNAGES DE GRADIENT ET DE SAISONS ET DANS L'EXPÉRIMENTATION DE TRANSPLANTATION C (Cd) ET D (Cu).....	52
FIGURE 8: CONCENTRATIONS TOTALES DE Cd MESURÉES DANS LES REINS DES PERCHAUTES APRÈS SIX SEMAINES D'EXPOSITION EN LABORATOIRE AU Cd.....	54
FIGURE 9 : CONCENTRATIONS DE DÉHYDRORÉTINOL PLASMATIQUE DES PERCHAUTES ISSUES DES ÉCHANTILLONNAGES DE GRADIENT (A) OU D'EXPOSITION AU Cd EN LABORATOIRE (B).	58
FIGURE 10 : POURCENTAGE DE DÉHYDRORÉTINOL HÉPATIQUE (SECTION DU HAUT) ET MUSCULAIRE (SECTION DU BAS) DES PERCHAUTES CAPTURÉES LORS DES ÉTUDES DE GRADIENT (SECTION DE GAUCHE) ET DE TRANSPLANTATION (SECTION DE DROITE).....	63
FIGURE 11 : ACTIVITÉS DE LA REH ET DE LA LDRAT DES PERCHAUTES ISSUES DE L'EXPOSITION AU CADMIUM EN LABO.....	65
FIGURE 12 : NIVEAU DE TRANSCRIPTION DE LA <i>RDH-2</i> HÉPATIQUE LORS DES ÉTUDES DE GRADIENT (A), DE TRANSPLANTATION (B) OU DE LABORATOIRE (C).....	66
FIGURE 13 : DIAGRAMME ILLUSTRANT LES MÉCANISMES D'ACTION DES MÉTAUX SUR LE MÉTABOLISME DES RÉTINOÏDES ET LES RÉPONSES AU STRESS OXYDANT CHEZ LES PERCHAUTES CHRONIQUEMENT EXPOSÉES EN MILIEU NATUREL (ÉCHANTILLONNAGES DE GRADIENT ET DE SAISON)	112
FIGURE 14 : DIAGRAMME ILLUSTRANT LES MÉCANISMES D'ACTION DES MÉTAUX SUR LE MÉTABOLISME DES RÉTINOÏDES ET LES RÉPONSES AU STRESS OXYDANT CHEZ LES PERCHAUTES EXPOSÉES EN MILIEU NATUREL PENDANT QUATRE SEMAINES.....	114
FIGURE 15 : DIAGRAMME ILLUSTRANT LES MÉCANISMES D'ACTION DU CADMIUM SUR LE MÉTABOLISME DES RÉTINOÏDES ET LES RÉPONSES AU STRESS OXYDANT CHEZ LES PERCHAUTES EXPOSÉES AU LABORATOIRE PENDANT SIX SEMAINES	116

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADNc : ADN complémentaire

ANOVA : Analyse des variances

CAT : Catalase

CCO-1 : Cytochrome C oxydase sous unité 1

dROH : Déhydrorétinol

ERO : Espèces réactives à l'oxygène

G6PDH : Glucose-6-phosphate déshydrogénase

GSH : Glutathion réduit

GST : Glutathione-S-transférase

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

Hsp-70 : Heat-shock protein sous unite 70

IHS : Indice hépatosomatique

Kn : Indice d'embonpoint relatif

LARSA : LAboratoire de Recherche en Sciences Aquatiques

LdRAT : Lécithine déhydrorétinyl acyl transférase

GST : Glutathion-S-transférase

MGST-3 : Glutathion-S-transférase-3 microsomale

gst-pi : Glutathion-S-transférase sous famille pi

MT : Métallothionéine

NDPK : Nucléoside diphosphate kinase

RDH-2 : Rétinol déshydrogénase-2

REH : Rétinyl ester hydrolase

ROH : Rétinol

RQ : Quantification Relative

SOD : Superoxide dismutase

Note : Les lettres minuscules en italique indiquent le nom du gène (par exemple *g6pdh*) alors qu'en majuscules elles dénotent l'enzyme (par exemple G6PDH).

PARTIE I : SYNTHÈSE

Chapitre I : Introduction et problématique générale de l'étude

1. INTRODUCTION

La production de certains métaux a mondialement augmenté au cours des 60 dernières années (Fig. 1; Annuaire Statistique Mondial des Minerais et Métaux, 2008; World Statistics, 2014). Bien que les métaux soient naturellement présents dans la croûte terrestre, les activités anthropiques ont grandement contribué à l'accroissement de leurs concentrations dans les systèmes d'eaux douces et particulièrement dans les régions d'exploitation minière. Sur le plan biologique, une exposition à des concentrations excessives à court terme ou à des faibles concentrations à long terme, pourrait entraîner des perturbations physiologiques et biochimiques, des réponses adaptatives (Hansen et al., 2012) ou des changements dans la biodiversité (Eisler, 2004).

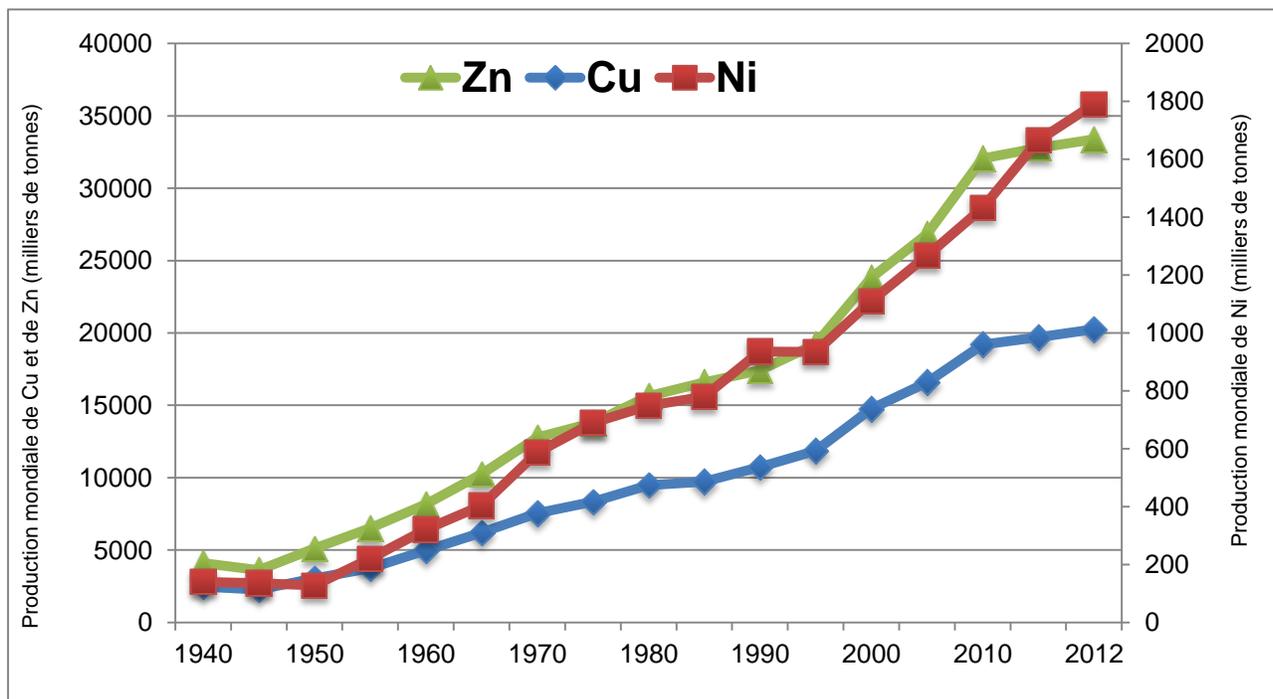


Figure 1 : Production mondiale annuelle (milliers de tonnes) de métaux au cours des six dernières décennies. Les productions de Cu et de Zn sont représentées sur l'axe vertical de gauche et le Ni sur l'axe vertical de droite. Les graphiques sont établis à partir des données de l'Annuaire Statistique Mondial des Minerais et Métaux (2008) jusqu'en 2005 et complétés par des données de World Statistics (2014), pour les années 2010 et après.

Le défi auquel sont confrontés les gouvernements est de chercher à concilier l'exploitation des ressources naturelles (poursuivre le développement économique) et la protection de l'environnement (préserver l'intégrité des milieux aquatiques par exemple). Tenter de répondre à cette préoccupation revient à promouvoir le développement durable, c'est-à-dire un développement responsable qui vise la protection des ressources environnementales tout en répondant aux besoins des générations du présent sans compromettre la capacité des générations futures à satisfaire les leurs. Depuis plusieurs décennies des actions conjointes et considérables ont été entreprises par les compagnies d'exploitation minière et les gouvernements pour réduire les émissions des métaux dans les milieux récepteurs et, de ce fait, de contrôler la pollution (Mahler et al., 2006). Ces efforts ont eu pour effet une atténuation significative des quantités de métaux dans l'eau et dans les sédiments, souvent accompagnée de signes de récupération dans les écosystèmes locaux des zones contaminées. Cependant, les perchaudes vivant dans ces zones présentent des altérations en termes de croissance, d'indice d'embonpoint et elles manifestent des effets biologiques et biochimiques délétères (Campbell et al., 2008; Couture et Rajotte, 2003; Laflamme et al., 2000; Rasmussen et al., 2008). Ces observations suggèrent que les concentrations métalliques actuelles excèdent toujours les limites qui sont acceptables pour l'environnement.

1.1. Notion de bio-indicateurs environnementaux : les biomarqueurs

Les écoindicateurs et les biotraceurs (biomoniteurs) constituent avec les biomarqueurs les trois classes de bio-indicateurs généralement utilisés comme outils

écotoxicologiques (Van Coillie et Parent, 2011). Les écoindicateurs réfèrent à une indication sur la diversité biologique par exemple l'indice biologique global ou l'indice biologique des diatomées. Les biotraceurs représentent généralement des organismes sédentaires pouvant témoigner d'une exposition aux contaminants puisqu'ils les bioaccumulent sur le long terme. Dans ce groupe on peut citer les perchaudes, les moules et les vers (Van Coillie et Parent, 2011).

Dans la biosurveillance, une priorité qui apparaît est d'identifier chez les biomoniteurs les impacts biologiques pertinents pouvant fournir des éléments d'information sur les effets délétères engendrés par les agents stressants environnementaux (Chandurvelan et al., 2013). Les biomarqueurs décrivent les changements biochimiques, cellulaires, physiologiques ou comportementaux qui peuvent être mesurés dans les cellules, des tissus ou des organismes entiers suite à une bioaccumulation ou une exposition à des polluants (Depledge et al., 1995; Tsangaris et al., 2010). En fournissant des liens de causalité entre la présence de substances toxiques et un effet écologique, ces marqueurs biologiques peuvent être utilisés comme signaux d'avertissement prémonitoires des perturbations environnementales (Walker et al., 2006). Dans un contexte d'écotoxicologie, deux types de biomarqueurs sont couramment utilisés à savoir les biomarqueurs d'exposition et les biomarqueurs d'effets (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Lorsque le biomarqueur signale que les mécanismes de régulation inhérents aux systèmes d'adaptation et de défense de l'organisme sont activés, on parle de biomarqueur d'exposition (Garric et al., 2010). Dans ce type de biomarqueur, on peut citer par exemple la synthèse des métallothionéines (MTs), protéines non enzymatiques de faible poids moléculaire capables de capter les métaux non essentiels « mous » (ex.

Ag, Cd) et de participer ainsi à la détoxification cellulaire (Campbell et Couillard, 2004). Lorsque le biomarqueur signale un débordement même transitoire des capacités de l'organisme à s'auto-réguler et pouvant avoir des impacts négatifs sur le métabolisme, on parle de biomarqueurs d'effet (Garric et al., 2010). Par exemple on peut citer la mesure des activités d'enzymes antioxydantes qui peuvent donner une indication sur l'état de stress d'un organisme suite à une exposition aux toxiques (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003).

Les effets des contaminants peuvent être analysés à plusieurs niveaux d'organisation biologiques, du niveau moléculaire au niveau des communautés. Dans cette échelle d'organisation biologique, évaluer les impacts à des niveaux bas contribuerait à caractériser les mécanismes pouvant permettre d'établir une liaison entre une exposition et un effet (Galloway et al., 2004a). Déterminer les relations entre les réponses aux interactions chimiques à différents niveaux d'organisation biologique fournit une base essentielle dans les approches visant à prédire les risques de ces substances dans l'environnement (Ankley et al., 2010). De plus, cette approche met en exergue le poids des évidences permettant de consolider l'impact d'un toxique sur les organismes vivants (Van der Oost et al., 2003). L'usage des biomarqueurs dans l'étude des effets des contaminants dans les écosystèmes se fonde sur le postulat selon lequel le temps mis par un organisme pour répondre à la présence d'un polluant dans son milieu de vie est fonction du niveau d'organisation biologique étudié (Garric et al., 2010). Ainsi donc, une variation dans le niveau de transcription d'un gène entrainerait des changements au niveau biochimique et qui pourraient se traduire au niveau de la cellule, de l'organisme et même de la population (Garric et al., 2010). Cependant un changement dans

l'expression des gènes ne conduit pas nécessairement à une modification dans les activités des enzymes correspondantes (Giuliani et al., 2013; Regoli et al., 2011). De plus, vu la complexité et la diversité des facteurs stressants en milieu naturel, un problème de spécificité du biomarqueur peut se poser. Il est donc important d'adopter une approche multi-biomarqueurs basée sur l'évaluation d'autres marqueurs biologiques permettant d'avoir une analyse intégrée des effets à plusieurs niveaux d'organisation biologique (Flammarion et al., 2002; Galloway et al., 2004b). Dans le domaine de la contamination par les métaux, le biomarqueur couramment utilisé est la synthèse des MTs. Cependant d'autres paramètres liés au fonctionnement de la cellule, et qui expriment souvent directement la capacité de celle-ci à synthétiser ou à dégrader ses substrats, peuvent aussi être considérés comme des paramètres écotoxicologiques prémonitoires aux effets observés au niveau de l'organisme ; donc considérés aussi à ce titre comme des biomarqueurs. Parmi ces paramètres on peut citer certaines activités enzymatiques ou la concentration des rétinoïdes dans les tissus des organismes. Ces paramètres seront discutés plus en détail dans les sections suivantes.

1.2. Rôles des enzymes antioxydantes dans le système de défense cellulaire

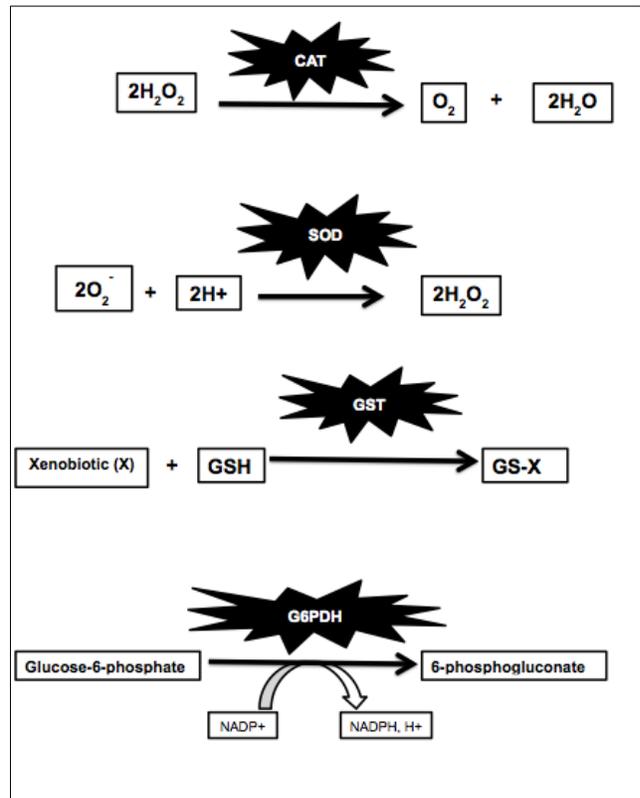
Après leur prise en charge cellulaire, le devenir des métaux peut être de quatre ordres : implication dans les processus métaboliques (Atli and Canli, 2011; Campbell and Couillard, 2004; Niyogi et al., 2007), séquestration par divers ligands biologiques (Giguère et al., 2006; Raimundo et al., 2008), excrétion hors de la cellule (Harrison and Klaverkamp, 1989) ou formation de radicaux libres (Bury et al., 2003).

Les peroxysomes contiennent deux principales enzymes qui interviennent dans le nettoyage de la cellule des excès de radicaux libres. En effet la catalase (CAT) va dégrader le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en molécules d'eau et en oxygène, alors que la superoxyde dismutase (SOD) transforme les radicaux libres peroxydés en H_2O_2 , molécule moins réactive (Fig. 2) (Van Coillie and Parent, 2011). La glutathione-S-transférase (GST) et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) sont des enzymes anti-oxydantes impliquées dans la réduction du glutathion (Kubrak et al., 2012). Considérée comme l'enzyme la plus importante du système de détoxification cellulaire (Choi et al., 2008), la GST assure la conjugaison du glutathion réduit (GSH) à des xénobiotiques lipophiles (Fig. 2) et a pour rôle d'inactiver les agents xénobiotiques nocifs. De ce fait la GST inactive les produits issus de la lipo-peroxydation et leurs dérivés (Salinas et Wong, 1999). De plus *via* sa fonction thiol (SH), elle contribue directement à l'inactivation des radicaux libres (Doyon et al., 2008). Première enzyme dans la voie des pentoses phosphates, la G6PDH catalyse la conversion du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate avec production de la NADPH (Fig. 2) et s'avère indispensable dans le maintien du niveau de NADPH cytosolique (Ho et al., 2007) nécessaire pour la formation du glutathion réduit, qui à son tour joue un rôle dans la protection contre les dommages oxydatifs (Efferth et al., 2006). Ceci signifie qu'une cellule ayant une moindre activité de la G6PDH aura une susceptibilité élevée au stress oxydant (Berg et al., 2002).

Les métaux utilisent divers modes d'action pour générer ou augmenter la production des radicaux libres dans la cellule, soit par une induction de synthèse de ces substances, soit par une altération des mécanismes de défense cellulaire (Vasseur et Cossu-

Leguille, 2003). Une formation excessive de radicaux libres dans la cellule pourrait stimuler une expression des gènes impliqués dans la défense du stress oxydant et augmenter les activités des enzymes impliqués dans cette voie métabolique (Uren Webster et al., 2013).

Figure 2 : Mécanismes d'action de quelques enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydant (adaptée de Van Coillie et Parent (2011) ; Guderley et al. (2003) ; Scandalios (2005))



1.3. Impacts des métaux sur les réponses des biomarqueurs au stress oxydant chez les poissons

Presque sans exception, la plupart des processus biologiques comme les changements morphologiques, la reproduction, la croissance ou les réponses toxicologiques sont coordonnés par des bases moléculaires (Auslander et al., 2008). Des variations dans les profils d'expression de gènes spécifiques chez plusieurs espèces de poissons sont associées aux expositions métalliques (Auslander et al., 2008), et ces changements dépendent de plusieurs facteurs, incluant le temps d'exposition. Considérant que l'exposition à court terme déclenche une réaction de stress commun (par exemple, une régulation des protéines de choc thermique), une augmentation du niveau de transcription des gènes permettant à l'organisme non seulement de s'adapter dans les nouvelles conditions, mais aussi de compenser le niveau d'expression des gènes

impactés se ferait avec un long temps d'exposition. Cependant, l'augmentation du temps d'exposition peut concomitamment occasionner des effets indésirables graves. En plus des gènes d'adaptation et de compensation, le niveau d'expression des gènes impliqués dans la croissance, la reproduction ou la mort cellulaire (apoptose) et dans d'autres voies métaboliques serait affecté (Denslow et al., 2007; Price-Haughey et al., 1986).

Chez les organismes aérobies, bien qu'il existe un « background » de concentration d'espèces réactive à l'oxygène (ERO) (Pellerin et al., 2004), la concentration cellulaire d'ERO peut rapidement augmenter suite à un changement défavorable dans les conditions environnementales ou métaboliques de l'organisme (Gliszczyńska-Świgło 2006; Scandalios, 2005). La conséquence d'une surproduction d'ERO est le passage de la cellule d'un état normal à un état de stress oxydant pouvant entraîner des dommages irréversibles incluant la peroxydation des lipides, la dénaturation des protéines ou la perturbation des acides nucléiques et d'autres effets délétères dans la cellule (Chen et al., 2013; Leonard et al., 2004; Regoli, 2000). Les gènes codant pour la CAT et la SOD, deux enzymes impliquées dans le combat contre le stress oxydant, sont reconnus pour répondre à des expositions métalliques (Gupta et al., 2010). Différentes enzymes ont été utilisées pour étudier la résistance au stress oxydant induite par une exposition au Ni chez le cyprin doré (*Carassius auratus*). Dans ces conditions (par exemple, exposition par voie aqueuse pendant 96 h), ces résultats indiquent que les effets du Ni aqueux sur la réponse au stress oxydant dans les branchies, tissus directement en contact avec les contaminants, sont de deux ordres (Kubrak et al., 2013). En effet l'activité de la SOD décroît de presque 50% alors que celle de la CAT augmente un peu plus dans les

mêmes proportions (Kubrak et al., 2013). Bien que ces deux enzymes soient connues pour agir en première ligne dans la défense contre le stress oxydatif (Serpil Mişe Yonar, 2013), leurs actions peuvent être antagonistes ou complémentaires (Regoli et al., 2011). De plus, les activités de la GST et la G6PDH ont aussi augmenté dans les branchies des poissons exposés au Ni corroborant ainsi l'implication de ces deux enzymes dans le combat contre le stress oxydant (Kubrak et al., 2013). La réponse des biomarqueurs du stress oxydant va dépendre de plusieurs facteurs tels que l'intensité des stimuli. Par exemple, une exposition chronique des anguilles européennes à des sédiments pollués par un cocktail de contaminants incluant le Cd, Cu, Ni et Zn à différentes concentrations montre une augmentation du niveau de transcription de la *g6pdh* hépatique lorsque les poissons sont exposés à des sédiments ayant une concentration faible de ces contaminants, alors qu'on observe une baisse du niveau de transcription de ce gène lorsque les poissons sont exposés à une concentration élevée en sédiment (Regoli et al., 2011). La réponse au stress oxydant peut aussi dépendre du type de biomarqueur analysé. Une augmentation des activités de la GST hépatique a été notée chez les anguilles exposées non seulement à une concentration élevée de sédiments, mais aussi à la concentration modérée. Cependant l'augmentation de cette activité a été précédée d'une augmentation du niveau de transcription de la *gst pi* seulement dans le dernier cas (Regoli et al., 2011). La MT dont le rôle dans la protection cellulaire est universellement reconnu est induite au niveau transcriptionnel en réponse à la présence de certains métaux et d'autres agents stressants environnementaux (Andrews, 2000; Ferencz et Hermes, 2014; Heikkila et al., 1982; Price-Haughey et al., 1986). Outre son rôle bien reconnu, de séquestrer les métaux dans le cytosol, la MT peut aussi agir comme antioxydant et protéger la cellule contre les effets des ERO (Giguère et al.,

2005 ; Viarengo et al., 2000).

1.4. Les rétinoïdes comme biomarqueurs d'une contamination aux métaux

Aussi appelés vitamine A, les rétinoïdes représentent un groupe de molécules organiques ayant une structure proche de celle du rétinol. Ils se forment à partir des caroténoïdes alimentaires et sont capables d'exercer une activité biologique dans la cellule. Les rétinoïdes jouent un rôle essentiel dans l'organisme puisqu'ils interviennent dans diverses fonctions physiologiques telles que la reproduction, la vision, la réponse immunitaire, la minéralisation de l'os, la différenciation cellulaire et la croissance (revue dans D'Ambrosio et al. (2011) ; Debier et Larondelle (2005) ; Novák et al. (2008)). En outre, certains composés possèdent des propriétés anti-oxydantes. Des preuves substantielles établissent un lien entre une exposition à une contamination d'origine organique avec une perturbation du métabolisme des rétinoïdes chez les vertébrés, cependant très peu d'études mentionnent un lien avec les contaminants inorganiques, comme les métaux (Boily et al., 2004). Nous avons présenté en détail dans le chapitre 8 (article 1) les impacts d'une contamination métallique sur le niveau d'expression des gènes, l'activité des enzymes et les concentrations des métabolites des rétinoïdes chez les vertébrés. De plus les modes d'action possibles des métaux sur le métabolisme des rétinoïdes et leurs rôles comme antioxydants et leur potentiel en tant que biomarqueurs d'une contamination métallique y sont discutés.

1.5. L'écotoxicogénomique dans l'évaluation du risque

Depuis l'émergence en 1990 des technologies modernes de biologie moléculaire, leur application n'a cessé d'être intégrée dans les études écotoxicologiques (Ankley et al.,

2006); dès lors, les recherches sur les impacts des produits chimiques au niveau génomique ont donné naissance à l'écotoxicogénomique (Neumann et Galvez, 2002). Elle apparaît comme une discipline émergente en écotoxicologie qui intègre l'étude d'un changement dans l'expression des gènes (transcriptomique), le niveau des protéines (protéomique) et/ou les produits métaboliques (métabolomique) dans un tissu (Snape et al., 2004 ; Villeneuve et al., 2007). La détermination des mécanismes qui sont à la base des changements dans le niveau de transcription des gènes en réponse à une contamination métallique devrait permettre d'améliorer l'utilité qu'offrent les outils de biologie moléculaire dans l'identification des modes d'action des polluants. Cette discipline se présente donc comme un moyen complémentaire aux approches traditionnelles d'évaluation du risque écologique des contaminants environnementaux (par exemple le taux de mortalité ou le temps d'éclosion).

En milieu naturel, les organismes aquatiques font face à un mélange complexe de contaminants environnementaux pouvant avoir des effets létaux et sublétaux sur ces derniers et capable d'impacter les niveaux trophiques supérieurs (Rasmussen et al., 2008). Si les effets létaux des polluants sont faciles à prendre en charge, les effets sublétaux découlant d'une toxicité chronique sont difficilement contrôlables, tout simplement parce qu'ils agissent de façon insidieuse sur le long terme et à des concentrations d'exposition généralement faibles. Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires influencés par une exposition aux métaux, et pour évaluer l'impact des métaux sur le fonctionnement des gènes des organismes aquatiques chroniquement exposés en milieu naturel, l'approche « omique » apparaît comme une technologie prometteuse. Elle devrait permettre de spécifier et de caractériser la signature moléculaire (ARN messager, protéines et métabolites) des contaminants

environnementaux (Jayapal et al., 2010). De plus, cette approche intégrée a l'avantage de permettre la mesure simultanée de plusieurs paramètres toxicologiques dans un échantillon biologique donné (Van Aggelen et al., 2010 ; Villeneuve et al., 2007). Dans l'évaluation du risque environnemental, les tests normés se sont avérés efficaces, cependant les informations issues de ces tests demeurent limitées (Robbens et al., 2007), d'où la nécessité de mener des évaluations non seulement complémentaires, mais plus informatives. L'écotoxicogénomique se veut être cette discipline qui répond aux questions qui ne peuvent pas trouver solution par des tests normés couramment utilisés en écotoxicologie (Fedorenkova et al., 2010).

En outre, l'expression différentielle des gènes peut servir d'indicateur précoce des effets environnementaux tout comme elle peut être considérée comme un biomarqueur d'exposition des organismes aux substances toxiques (Thomas et al., 2001, Pennie et al., 2004), étant donné que la détection se fait même à faible concentration du toxique et avant que les impacts au niveau morphologique ou reproductif ne deviennent visibles (Nuwaysir et al., 1999). Poynton et collaborateurs ont pu, à partir des techniques de puces à ADNc, établir une relation dose-réponse dans le niveau d'expression de certains biomarqueurs chez *Daphnia magna* lorsque ces crustacés étaient exposés pendant 24 heures ou 21 jours à des concentrations biologiquement tolérables de Cd, Cu et Zn (Poynton et al., 2008a, Poynton et al., 2008b).

L'utilité des approches « omiques » dans l'évaluation du risque environnemental est reconnue. En effet, plusieurs chercheurs sont d'avis que les outils de biologie moléculaire et les paramètres toxicologiques qui y sont associés ont beaucoup amélioré la compréhension des mécanismes d'action des polluants chez les êtres vivants et

pourraient même révolutionner l'évaluation du risque et la gestion de l'environnement (Van Aggelen et al., 2010).

La plupart des études écotoxicologiques menées jusqu'ici sur la perchaude se sont concentrées sur les aspects écologiques, morphologiques, physiologiques et biochimiques des dommages dont la spécificité limitée ne permet généralement pas d'en identifier la cause précise. Le niveau de transcription des gènes est un indicateur sensible de l'exposition aux contaminants, de l'état de santé et du métabolisme cellulaire (Snape et al., 2004). Par conséquent, l'analyse du niveau de transcription des gènes représente un moyen unique de caractériser la réponse des cellules, des organismes et même des populations aux changements naturels ou anthropiques se produisant dans leur environnement externe.

Bien que le génome de la perchaude ne soit pas encore séquencé, plusieurs travaux de recherche récents démontrent la faisabilité et l'intérêt d'intégrer les approches transcriptomiques à l'étude écotoxicologique de la perchaude. Dans leurs investigations portant sur la compréhension des mécanismes moléculaires mis à contribution par les perchaudes pour vivre en présence des métaux, des chercheurs ont rapporté des changements du niveau de la transcription des gènes chez les perchaudes suite à leur exposition chronique à des concentrations métalliques élevées en milieu naturel (Pierron et al., 2009 ; Pierron et al., 2011) ou dans les conditions contrôlées de laboratoire (Bougas et al., 2013). En effet, Pierron et al. (2009) ont rapporté une corrélation négative entre l'accumulation du Cd hépatique et les niveaux de transcription de *cco-1* et de la *sod-1*. Par contre une relation positive entre les concentrations en Cu hépatique et les niveaux de transcription de la *cco-1*, de la *mts* et de la *hsp-70* a été observée.

Bien qu'une association positive entre le niveau de transcription de la *cco-1* et l'accumulation du Cu hépatique a été rapportée, une corrélation négative entre l'activité de la CCO et les concentrations en Cu dans le foie a été observée. Dans cette étude, ces auteurs ont aussi rapporté que les changements dans le niveau de transcription des gènes dépendent non seulement de la nature du métal, mais aussi du tissu cible. En effet, en présence du Cd le changement dans le niveau de transcription des gènes serait plus important dans le foie que dans le muscle alors que c'est tout le contraire avec le Cu (Pierron et al., 2009). Dans une autre étude, Pierron et al. (2011) ont rapporté 71% de corrélation négative entre le niveau de transcription des gènes codant pour les enzymes impliquées dans plusieurs voies métaboliques et les concentrations en Cd et Cu hépatique chez les perchaudes juvéniles chroniquement exposées aux métaux en milieu naturel. Parmi ces voies métaboliques, appartiennent entre autres, la biosynthèse des protéines, le système immunitaire, les métabolismes lipidiques, énergétiques et rétinoïques (Pierron et al., 2011). De même des signatures transcriptomiques spécifiques au Cd (176 gènes) et au Ni (287 gènes) ont été rapportées chez les perchaudes adultes provenant d'un aquaculteur lorsque celles-ci étaient exposées par voie directe à ces métaux pendant 6 semaines (Bougas et al., 2013). Ces auteurs ont noté que le Cd et le Ni affectaient le niveau de transcription des gènes impliqués dans plusieurs voies métaboliques telles que les réponses au stress oxydant, les processus de transcription et de traduction et les métabolismes du fer, des vitamines, de la coagulation sanguine ou du transport du calcium (Bougas et al., 2013).

1.6. Présentation du modèle biologique : la perchaude

1.6.1. Identification, distribution et biologie

La perchaude (*Perca flavescens*) est un poisson osseux de la superclasse des ostéichthyens. Son corps latéralement comprimé et la présence de rayons épineux aux nageoires permettent de la regrouper dans l'ordre des perciformes. Elle forme, avec les dards et les dorés, la famille des percidés caractérisée par une nageoire dorsale très distinctement divisée en deux parties (Bernatchez et Giroux, 1991). Sa coloration, variant de vert foncé au vert jaune dépendamment de sa taille et de son habitat, couplée à la présence de sept barres sombres en forme de «V» sur les côtés du corps, lui procurent une identification facile (Bernatchez et Giroux, 1991).

Espèce des milieux dulcicoles, la perchaude peuple les milieux lenticules et lotiques nord-américains, principalement la côte Nord-Est. Sa large répartition et la diversité d'habitats reflètent sa grande adaptabilité écologique. On la retrouve particulièrement dans la région des Grands Lacs, le long du fleuve Saint-Laurent et dans les eaux avoisinant les métropoles de l'Est du Canada comme Toronto, Ottawa, Montréal et Québec (Malison, 2000).

La perchaude fraie généralement au printemps dans la seconde moitié du mois d'avril jusqu'au début mai. La température optimale de reproduction est située entre 7,8°C et 11,1°C ; les adultes déposent leurs œufs dans des cachettes de faible profondeur près de la végétation (racines ou plantes submergées) ou des matières sablonneuses (Bernatchez et Giroux, 2000). Elle croît de façon optimale dans les gammes de température variant entre 21°C et 24°C (Bernatchez et Giroux, 2000), cependant elle est capable de supporter de fortes variations de températures (entre 0°C et 33°C) et même

de faibles concentrations en oxygène (≤ 3 mg/L) (Landry et al., 2000). Après une période de stockage de réserves énergétiques qui se fait durant l'été et l'automne, les perchaudes passent l'hiver au fond des lacs gelés, période durant laquelle se fait la maturation des gonades préparant ainsi une fraie printanière. C'est un poisson grégaire qui se déplace en bande d'individus de la même taille et se nourrit activement au crépuscule. Son régime alimentaire (Fig. 3) dépend beaucoup de son stade de développement et donc de sa croissance (Rasmussen et al., 2008; Sherwood et al., 2000). Au stade juvénile, elle va s'alimenter de zooplancton alors qu'adulte elle va préférer les invertébrés benthiques et même de petits poissons lorsqu'elle atteint une taille plus grande (Lott et al., 1996; Rasmussen et al., 2008). Alors qu'un comportement cannibale a été relevé chez les perchaudes (Sanderson et al., 1999), ces dernières constituent des proies préférées des prédateurs comme les achigans et les dorés (Bernatchez et Giroux, 2000).

Les perchaudes vivant dans des lacs très faiblement contaminés en métaux sont souvent en proie à un parasitisme aigu (observation personnelle). Probablement les parasites de la chair des poissons vivant dans les lacs contaminés par les métaux ne toléreraient pas les métaux comme leurs hôtes. Cette hypothèse rejoint celle de Marcogliese et al. (2012), qui ont relevé expérimentalement que plusieurs parasites de *Perca fluviatilis* seraient sensibles à la contamination. Cette observation illustre un effet synergique entre la contamination et le parasitisme, qui pourrait être bénéfique pour la santé des perchaudes qui vivent dans les lacs pollués (Couture et al., 2015).

1.6.2. Une espèce sentinelle de pollution aquatique

Considérés comme des organismes sentinelles de pollution dans les environnements

aquatiques, les poissons sont en général utilisés comme outils de biosurveillance pour évaluer les effets dus à l'exposition des produits chimiques (Tyler et al., 2008).

Contrairement aux autres biomoniteurs tels que les insectes (*Chaoborus* par exemple), les poissons dans les écosystèmes dulcicoles représentent le plus souvent le dernier maillon de la chaîne alimentaire et constituent de ce fait un modèle biologique important dans l'étude de l'impact d'une contamination métallique sur les populations puisqu'ils intègrent à la fois les effets directs (exposition par l'eau) et les effets indirects (exposition par la diète) (Audet et Couture, 2003; Farag et al., 1994; Giguère et al., 2004).

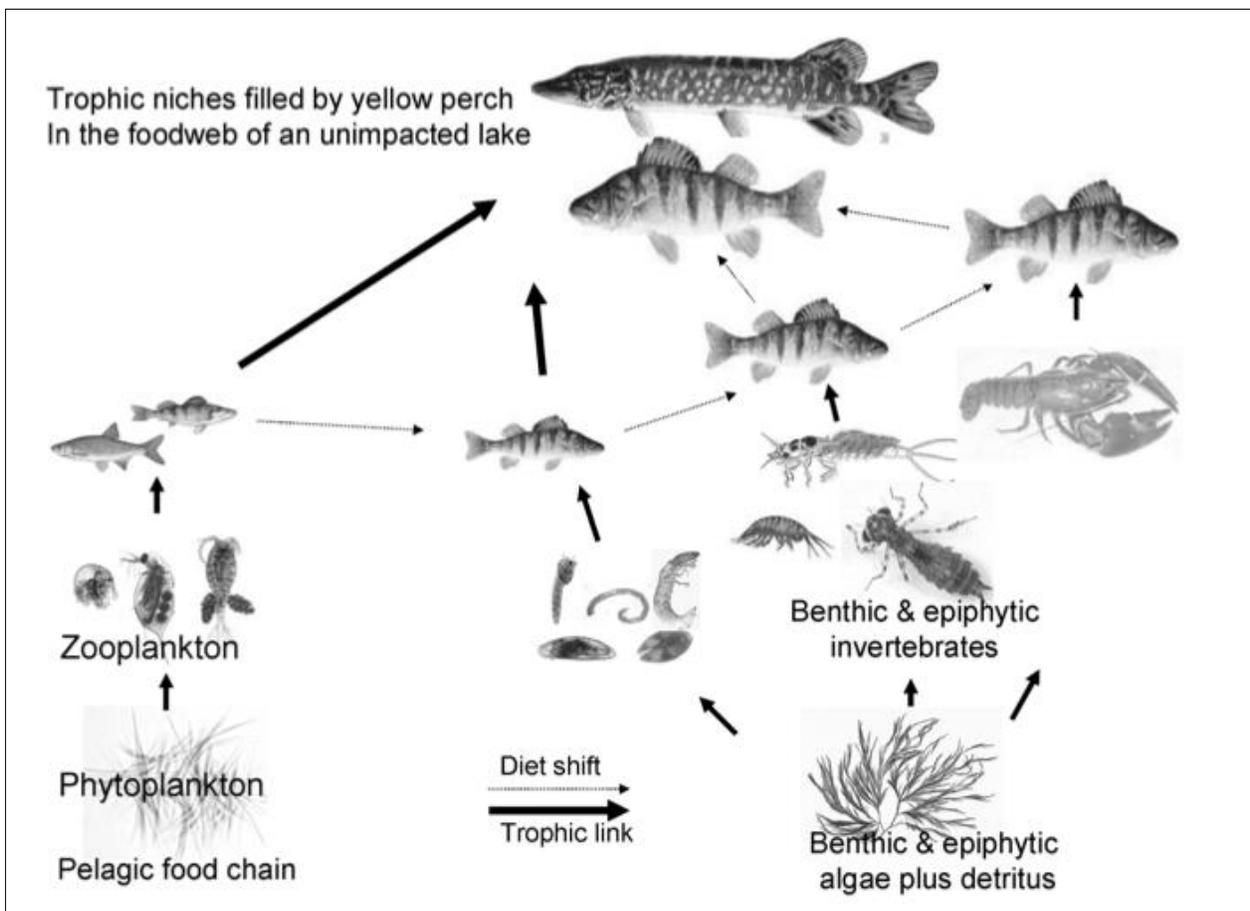


Figure 3: Changement de régime alimentaire chez la perchaude en fonction du stade de croissance (Figure empruntée de Rasmussen et al. (2008)).

Tout comme le tête-de-boule (*Pimephales promelas*), la truite arc-en-ciel (*Onchorhynchus mykiss*) a longtemps été la cible principale dans les investigations des

effets des métaux sur les poissons en Amérique du Nord. Dans ces études le plus souvent conduites dans les conditions contrôlées de laboratoire, les poissons sont fréquemment exposés à un seul métal et par voie aqueuse. Cependant, du fait de leur sensibilité et de leurs aires de distribution naturelle, ces deux espèces ne sont pas toujours présentes dans les environnements exposés à la contamination métallique. Ubiquitaire en Amérique du Nord, la perchaude est un poisson facile à capturer. C'est l'espèce dominante dans les lacs de Rouyn-Noranda et de Sudbury (Couture et al., 2008a). Dans le contexte de l'écotoxicologie des métaux, elle apparaît comme étant l'espèce la plus pertinente pour la simple raison que non seulement c'est un poisson qui tolère la présence des métaux (Eaton et al., 1992), mais aussi, elle est capable de les accumuler dans ses tissus (Kraemer et al., 2005a). De plus c'est souvent la seule espèce que l'on trouve dans certains lacs ayant une concentration de métaux élevée (Couture et Rajotte, 2003), ce qui explique sa large distribution et son abondance dans les zones minières et de fonderies du Canada (Hontela et al., 1995; Hontela et al., 1992). Par ailleurs, du fait de son sédentarisme, la bioaccumulation des métaux dans ses tissus témoigne d'une contamination locale (Aalto et Newsome, 1990; Campbell et al., 2003).

Chapitre II : Objectifs et hypothèses de l'étude

2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE L'ÉTUDE

Nombre de travaux ont documenté l'ampleur des effets de la pollution métallique sur les populations indigènes de perchaudes. Ces recherches conduites parfois en étroite complémentarité avec des approches biogéochimiques ont permis de déceler non seulement des altérations biochimiques et physiologiques (Couture et al., 2008b), des modifications comportementales telles que le changement de régime alimentaire (Iles and Rasmussen, 2005), mais aussi ont mis en évidence certaines stratégies de résistance et de défense développées par ces organismes pour assurer leur maintien dans leur biotope (Campbell et al., 2005; Campbell et al., 2008; Laflamme et al., 2000). Toutefois, les connaissances sur les mécanismes moléculaires mis en jeu par les perchaudes pour vivre dans des conditions d'exposition chronique aux métaux demeurent encore à l'état embryonnaire. L'objectif général de cette étude est d'investiguer, à deux niveaux d'organisation biologique (moléculaire et biochimique), l'impact de l'exposition chronique de la perchaude aux métaux sur certains paramètres du stress oxydant et sur le métabolisme des rétinoïdes, et ultimement de développer les biomarqueurs d'exposition aux métaux.

Spécifiquement 3 types d'approches méthodologiques ont été adoptées :

- La quantification par la technique de RT-PCR du niveau de transcription de certains gènes d'intérêt (*cat*, *Cu/Zn sod-1*, *mgst-3*, *g6pdh* et *rdh-2*) tel que révélé par la puce à ADN, utilisée pour suivre la réponse des perchaudes à l'exposition aux métaux en milieu naturel ou en laboratoire.
- L'analyse de fonctions biochimiques subséquentes (mesure d'activités

enzymatiques et de la concentration des métabolites des rétinoïdes) afin de vérifier si le niveau de transcription des gènes étudiés se traduit effectivement par des changements biochimiques et physiologiques tangibles.

- La détermination des liens entre le niveau de transcription des gènes ciblés, les réponses biochimiques correspondantes et la bioaccumulation des métaux.

Cette étude va contribuer à une meilleure compréhension du rôle des perturbations d'ordre métallique dans le métabolisme des rétinoïdes et la réponse au stress oxydant chez la perchaude. Afin de répondre à notre objectif général, quatre objectifs spécifiques complémentaires de terrain et de laboratoire ont été explorés.

2.1. Impact d'un gradient de concentrations polymétalliques sur le métabolisme des rétinoïdes et la réponse des biomarqueurs du stress oxydant chez les populations de perchaudes sauvages

Hypothèse 1 : Il y aura une accumulation anormalement élevée des métabolites de rétinoïdes dans le foie des perchaudes vivants dans les milieux impactés par les métaux suite à un blocage de la synthèse des formes biologiquement actives des déhydrorétinoïdes (l'acide déhydrorétinoïque et le déhydrorétinal) par les métaux non essentiels (Cd). De plus, en milieu naturel cette réponse au niveau des rétinoïdes s'accompagnera d'une réponse au niveau des biomarqueurs du stress oxydant traditionnellement mesurés.

2.2. Variations saisonnières des concentrations métalliques et leurs impacts sur le métabolisme des rétinoïdes et la réponse des

biomarqueurs du stress oxydant chez les populations de perchaudes sauvages

Plusieurs études font état de l'importance d'examiner les variations saisonnières de l'état des poissons et de la contamination métallique puisqu'une fluctuation saisonnière des concentrations métalliques tissulaires est établie (Audet et Couture, 2003 ; Levesque et al., 2002). En plus du fait que la quantité des métabolites des rétinoïdes dépend de plusieurs facteurs tels que l'âge ou le sexe, la qualité et la quantité de la diète, il est nécessaire d'examiner les variations saisonnières dans les lacs témoins et les comparer avec celles des lacs contaminés pour en déduire les impacts des variations saisonnières de contamination métallique sur ce métabolisme. Les comparaisons saisonnières nous permettront d'affiner notre compréhension des effets exclusivement liés aux métaux sur les niveaux de transcription des gènes après s'être débarrassés des effets reliés aux variables confondantes naturelles (température, disponibilité alimentaire reproduction) sur les profils du niveau de transcription génique.

Hypothèse 2 : Les variations saisonnières des biomarqueurs du métabolisme des rétinoïdes et ceux impliqués dans les réponses au stress oxydant varient en fonction des concentrations tissulaires des métaux.

2.3. Dynamique temporelle de l'accumulation des métaux et leurs conséquences sur le métabolisme des rétinoïdes et la réponse des biomarqueurs du stress oxydant chez les perchaudes juvéniles

Les études de transplantations sont intéressantes à plus d'un titre :

- Technique communément utilisée pour surveiller les effluents puisqu'elle permet d'évaluer la qualité de l'habitat hors du point de décharge des effluents et l'impact de la contamination sur la biote.
- Technique qui intègre mieux les vraies conditions ambiantes tant pour la qualité et la quantité des contaminants et permet d'interpréter l'effet d'une exposition à un mélange complexe.
- Technique qui permet aussi de savoir exactement le point de départ et les durées de l'exposition.
- Technique qui se situe à mi-chemin entre les études longitudinales de terrain, dans lesquelles les organismes sont collectés dans plusieurs sites ayant des variations dans plusieurs facteurs incluant la contamination, et les études de laboratoire où toutes les variables à l'exception d'une, sont souvent maintenues constantes.
- La transplantation intéresse souvent aussi les agences gouvernementales et les industries où, un site propre et un site contaminé sont souvent sélectionnés sur la base d'être similaire autant que possible, mise à part la contamination.

Il est essentiel de déterminer non seulement la concentration métallique requise pour induire des changements du niveau de transcription des gènes et de la réponse physiologique, mais aussi la dépendance temporelle des changements dans le niveau de transcription des gènes, car ce sont des considérations importantes lorsqu'il s'agit de déterminer les impacts des polluants sur les organismes vivants.

Dans cette partie de l'étude, nous tenterons de comprendre :

- Comment se défendent les perchaudes contre une exposition métallique subite

en milieu naturel.

- L'échelle de temps au cours de laquelle les changements dans le niveau de transcription des gènes et une réponse métabolique apparaissent.

Hypothèse 3 : Une transplantation des perchaudes juvéniles d'un milieu métalliquement propre vers un milieu contaminé entraînerait un dépassement des capacités de régulation de l'organisme ce qui serait traduit par une induction des indicateurs de stress oxydant.

2.4. Effets du Cd aqueux sur le métabolisme des rétinoïdes et la réponse des biomarqueurs du stress oxydant chez les perchaudes exposées au laboratoire

Les expositions en milieux naturels impliquent rarement un seul facteur de stress responsable des effets biologiques néfastes. Alors, des expositions de perchaudes à un paramètre unique dans des conditions contrôlées de laboratoire sont importantes parce qu'elles définissent la base sur laquelle les réponses à plusieurs facteurs de stress peuvent être comparées. Pour mieux appréhender l'effet des métaux sur la santé des perchaudes, il est important de faire des tests complémentaires de laboratoire. Ces tests vont permettre de comprendre non seulement la signature spécifique de chaque métal telle qu'exprimée par les réponses transcriptomiques et métaboliques, mais aussi de comparer cette signature à celle observée sur le terrain.

Hypothèse 4 : Étant donné que le Cd est le métal responsable des effets négatifs dans notre région d'échantillonnage, nous postulons que les réponses entre les deux expérimentations temporelles (transplantation et laboratoire) seront comparables.

Chapitre III : Bases méthodologiques

3. BASES MÉTHODOLOGIQUES

3.1. Présentation de la région et des lacs d'étude

Située dans la partie Nord-Ouest de la province du Québec, la région de Rouyn-Noranda offre un cadre de recherche exceptionnel pour examiner le lien entre la contamination métallique et les effets sur les populations biologiques en milieu aquatique et constitue aujourd'hui une zone de prédilection pour de nombreux scientifiques au Canada. En effet, des activités minières et métallurgiques qui ont lieu dans cette région depuis 1927 ont eu pour conséquence majeure, sur le plan biogéochimique, une contamination régionale en métaux (Cd, Cu et Zn) et subséquemment des effets néfastes sur la vie des organismes aquatiques. La propagation dans l'atmosphère des émissions issues de l'extraction du cuivre et du zinc serait responsable de la contamination de plusieurs plans d'eau de la région de Rouyn-Noranda. Malgré le fait que les émissions des fonderies soient aujourd'hui mieux contrôlées, la récupération des plans d'eau est loin d'être complète. Les vents dominants de l'Ouest expliqueraient l'inégale répartition des contaminants dans les différents lacs de cette région (Bonham-Carter et al., 2006). Un gradient de concentration polymétallique (principalement en Cd, Cu et Zn) existe donc dans cette région (Borgmann et al., 2004; Couillard et al., 2004).

En plus de ces apports directs de la fonderie, certains lacs de cette région seraient également contaminés par des effluents miniers ainsi que par des eaux de ruissellement ayant été en contact avec les résidus miniers ou des zones minéralisées. Cependant, en raison de la présence dans les bassins versants de dépôts argileux, les émissions de la

fonderie Horne n'ont pas provoqué d'acidification des lacs de la région de Rouyn-Noranda (Cattaneo et al., 2004). Les différents lacs échantillonnés sont représentés à la figure 4 : les lacs de « référence » (Opasatica et Hélène), le lac moyennement contaminé (Bousquet) et les lacs contaminés (Vaudray, Marlon et Dufault). Les lacs de « référence » sont situés en amont de la fonderie Horne, à une distance d'environ 50 km de celle-ci, alors que les lacs contaminés sont soit proche (Marlon et Dufault) soit situés en aval (Bousquet et Vaudray) de cette fonderie.

3.2. Métaux d'intérêt dans cette étude

Plusieurs études ont été conduites dans certains lacs de la région de Rouyn-Noranda, entre autres, celles examinant : les réponses de la concentration de la MT chez les perchaudes (Laflamme et al., 2000), les changements dans le régime alimentaire de la perchaude au cours de sa croissance (Rasmussen et al., 2008), l'influence des métaux sur l'indice d'embonpoint (Audet et Couture, 2003; Eastwood et Couture, 2002) ; sur les capacités biosynthétiques (Audet et Couture, 2003) ou sur l'accumulation des réserves énergétiques (Levesque et al., 2002). Bien que le cuivre soit le principal métal exploité dans cette région, les effets délétères sur les organismes aquatiques en relation avec la contamination métallique sont beaucoup plus associés au Cd (Borgmann et al., 2004; Campbell et al., 2003; Hare et al., 2008; Rasmussen et al., 2008). Les principaux métaux retrouvés dans les lacs de la région de Rouyn-Noranda sont le Cd, le Cu et le Zn. En vertu de la Loi Canadienne de Protection de l'Environnement (LCPE), ces métaux sont classés parmi ceux ayant une haute importance (Campbell et al., 2003). Probablement à cause de leur toxicité élevée, leur relative accessibilité et la perturbation

de leur cycle géochimique naturel par l'homme (Campbell et Couillard, 2004), ces métaux sont identifiés comme des substances d'intérêt prioritaire (Environnement Canada, 1997).

Le Cd étant un sous-produit d'extraction de métaux comme le Zn et le Cu, sa production serait proportionnellement dépendante de celle de ces métaux. Le Cd est principalement utilisé dans la fabrication des piles de Ni, les industries de revêtements, de pigments, d'alliages, des plastiques et des produits synthétiques (CCME, 1999b). On utilise le Ni principalement dans la fabrication des alliages (ex. acier), les industries chimiques (fabrication de piles), alimentaires, électriques et même en médecine (CCME, 1999d). Les domaines d'application du Cu sont aussi variés ; on peut citer entre autres les industries de textiles, de plomberies et de peintures. Le Cu sert aussi à la conservation du bois et dans certains pesticides (CCME, 1999c). Le Zn est abondamment utilisé comme agent de galvanisation des automobiles et les matériaux de construction. Il est aussi important dans la production du laiton et de bronze servant dans la plomberie, les systèmes de chauffage et de climatisation. On utilise aussi le Zn dans la fabrication des pneus et des piles (CCME, 1999e).

Certains métaux traces comme le Cu et le Zn sont essentiels pour la vie animale (Mason et Jenkins, 1995). Par exemple le Zn assure le maintien de la structure et la stabilité des protéines (McCall et al., 2000) et exerce un rôle de cofacteur essentiel pour la fonction biologique de certains métalloenzymes. Le Cu joue aussi un rôle de cofacteur pour plusieurs protéines clés (exemple SOD) et est important dans la respiration cellulaire (Bury et al., 2003). Cependant à des concentrations cellulaires « anormalement » élevées, ces métaux se lieraient à des sites physiologiquement

sensibles des biomolécules (telles que enzymes, ADN) et organites (mitochondries par exemple) provoquant ainsi une toxicité (Mason et Jenkins, 1995). Le Cd est un métal non essentiel pour la très grande majorité des organismes aquatiques (CCME, 1999a). Xu et Morel (2013) font mention des effets bénéfiques du Cd chez certaines espèces marines de phytoplancton ayant une carence en Zn. En effet, le Cd peut se substituer pour le Zn en stimulant la croissance ou en jouant un rôle de co-facteur chez ces algues. Une restauration de l'activité de l'anhydrase carbonique (enzyme catalysant l'inter-conversion du dioxyde de carbone en bicarbonate) a été observée après ajout du Cd aux cultures de diatomées (*Thalassiosira weissflogii*) montrant une limitation en Zn (Xu et Morel, 2013).

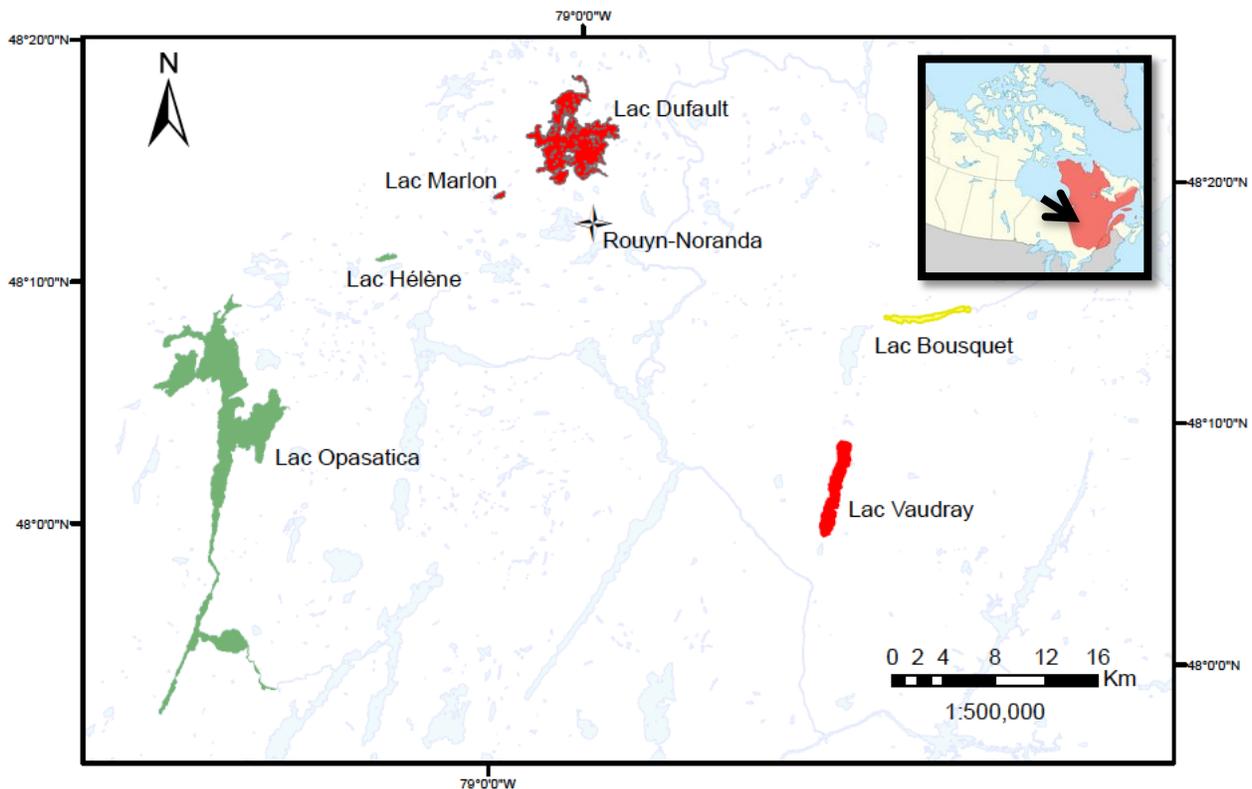


Figure 4 : Les lacs échantillonnés dans les études de gradient. Les couleurs verte, jaune et rouge indiquent respectivement les lacs de référence, le lac ayant une concentration métallique aqueuse relativement faible et les lacs ayant une concentration métallique aqueuse relativement élevée. L'étoile représente la fonderie Horne dans la ville de Rouyn-Noranda.

3.3. Choix des voies métaboliques d'intérêt dans cette étude

Plusieurs biomarqueurs potentiels de contamination métallique appartenant à diverses voies métaboliques, parmi lesquelles le métabolisme des rétinoïdes et la réponse au stress oxydant ont été identifiés à la suite des études préalables de dépistage des effets des métaux sur la santé des perchaudes. Le choix des voies métaboliques étudiées dans cette thèse s'est donc faite sur la base des réponses transcriptomiques issues des analyses de séquençage de l'ADNc des perchaudes chroniquement exposées aux métaux en milieu naturel (Pierron et al., 2011) et des perchaudes exposées aux métaux dans les conditions contrôlées de laboratoire par des analyses des micro-puces à ADN (Bougas et al., 2013). En bref, dans la première étude, les auteurs ont établi des corrélations négatives (71%) entre le niveau de transcription des gènes et une exposition chronique aux métaux dans le foie des poissons (Pierron et al., 2011). Dans la seconde étude, Bougas et al. (2013) ont relevé que 176 et 287 gènes respectivement en association avec une contamination au Cd et au Ni étaient de façon significative différemment exprimés dans le foie des perchaudes exposées au laboratoire pendant 6 semaines. Établir un lien dans les réponses aux interactions chimiques à différents niveaux d'organisation biologique est nécessaire, puisqu'il fournit une base essentielle aux approches prédictives d'évaluation des risques pour l'environnement (Ankley et al., 2010). Alors, pour chacune des voies métaboliques choisies, notre approche visait à évaluer non seulement les effets des métaux au niveau moléculaire, mais aussi au niveau biochimique afin de vérifier si les changements dans le niveau de transcription des gènes s'accompagnent par des modifications fonctionnelles tangibles.

3.4. Procédure d'échantillonnage dans un gradient de concentration polymétallique

Des échantillonnages de poissons se sont déroulés au printemps 2011 (fin mai-début juin). Selon le niveau d'exposition métallique (faible, modéré, élevé), six lacs (Opasatica, Hélène, Bousquet, Vaudray, Dufault et Marlon) aux concentrations métalliques variées ont été échantillonnés dans la région de Rouyn-Noranda (Fig. 4). De la même manière, au printemps et en automne 2012 (début septembre), les mêmes lacs, sauf Bousquet et Vaudray, ont été échantillonnés. En plus de ce critère de contamination, les autres facteurs qui nous ont orientés dans le choix des lacs étaient leur accessibilité et la disponibilité de données biologiques et géochimiques pertinentes. Dans chaque lac, 20 perchaudes juvéniles (moins de 8 cm) et 12 perchaudes adultes (plus de 10 cm) ont été capturées à chaque échantillonnage. Afin d'avoir les individus de tailles souhaitées, nous avons utilisé principalement une senne de rivage et occasionnellement la pêche à la ligne. Une fois capturées, les perchaudes étaient maintenues en vie dans une glacière remplie d'eau du lac d'origine et aérée en permanence jusqu'à la dissection complète de tous les poissons. Afin de minimiser les risques de stress et d'éviter toute dégradation du matériel génétique et biologique, quelques gouttes de Stress Coat® étaient ajoutées dans de l'eau aérée et les poissons étaient disséqués 1 à 2 h après capture. Les poissons étaient mis à mort, suivant un protocole approuvé par le comité d'éthique de l'INRS, par un coup à la tête et utilisés pour les déterminations suivantes :

- Paramètres biométriques : avant la dissection de chaque individu, la masse (en g) et la longueur (en cm) ont été déterminées de même que la masse des cæca pyloriques et du foie. Ces paramètres nous ont permis d'évaluer l'effet des métaux sur la biométrie des perchaudes. L'indice de condition relatif (Kn) a été

utilisé dans cette étude plutôt que l'indice de Fulton (K), dans le but de comparer nos résultats à ceux obtenus dans d'autres études (par exemple Gauthier et al. (2009)). Les cæca pyloriques sont des digitations de l'intestin capables d'augmenter leur surface d'absorption. Ce facteur est utilisé dans cette thèse comme pouvant être un indicateur biométrique des activités alimentaires récentes des poissons. Des études de laboratoire ont montré qu'il existe une relation positive entre la masse des cæca pyloriques et le taux d'ingestion alimentaire (Gauthier et al., 2008), d'une part, et l'efficacité de conversion des aliments chez les poissons (Bergot et al., 1981), d'autre part.

- Concentrations métalliques : le rein, organe destiné à l'analyse des métaux d'intérêt.
- Analyses transcriptomiques : le foie et dans une moindre mesure le muscle blanc ont servi de matériel génétique pour les études d'expression des gènes
- Analyses biochimiques : une portion du muscle blanc et du foie a aussi servi à l'analyse des réponses fonctionnelles telles que l'analyse des activités enzymatiques ou la concentration des métabolites des rétinoïdes.

Nous avons utilisé la concentration rénale métallique comme étant une indication de l'exposition des perchaudes aux métaux. Plutôt que dans le foie, les concentrations des métaux bioaccumulés ont été mesurées dans les reins parce que le foie avait été réservé pour d'autres analyses. Par ailleurs, certaines études antérieures ont montré qu'il existe une bonne corrélation entre les concentrations des métaux dans le rein et celles dans le foie chez les perchaudes sauvages (Couture et al., 2008a; Kraemer et al., 2005a, b).

Après dissection, le matériel biologique était maintenu dans des cryotubes correctement libellés, puis ces derniers étaient conservés dans l'azote liquide pendant la phase de terrain et entreposés après à -80°C dans un congélateur de l'INRS-ETE pour des analyses subséquentes.

Afin d'avoir la signature saisonnière dans notre expérimentation, des échantillonnages de poissons se sont déroulés au printemps (fin mai) et à l'automne 2012 (début septembre) dans quatre lacs (Opasatica, Hélène, Dufault et Marlon) à raison de deux lacs par niveau de contamination (faible ou élevé). Le protocole de pêche, le principe d'échantillonnage et de dissection étaient identiques à la description précédente. Il convient de préciser que trois paramètres physico-chimiques (oxygène dissous, température et pH) (annexe A ; section de gauche) de chaque lac étaient déterminés dans les zones d'échantillonnage lors de chaque pêche.

3.5. Procédure d'échantillonnage dans l'expérimentation de transplantation

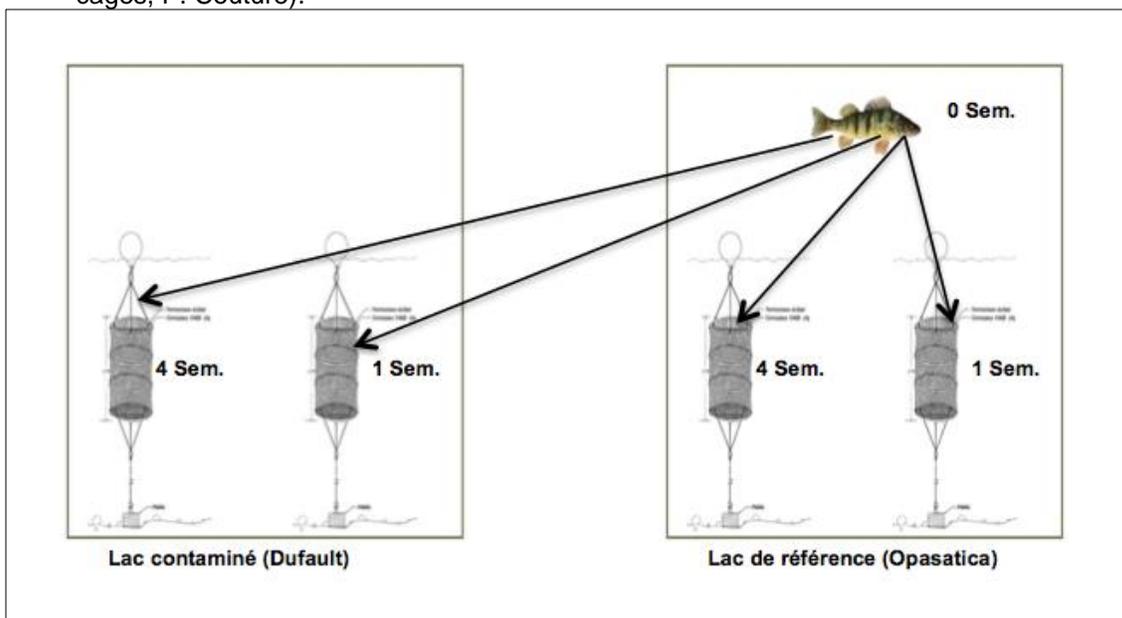
Les études de transplantation réciproque se sont déroulées au printemps 2012 dans le lac Opasatica, considéré comme lac de référence, et dans le lac Dufault considéré comme lac contaminé en métaux (Fig. 4). Les méthodes pour les études de transplantation *in situ* sont bien documentées (Kraemer et al., 2005a, b). Des perchaudes juvéniles planctonophages (moins de 8 cm) ont été capturées dans chaque lac et placées dans des cages d'une profondeur de 1,3 m et d'un diamètre de 1,4 m chacune (Fig. 5). L'ouverture des mailles du filet de chaque cage était égale à 5 mm pour permettre un libre échange d'eau et du plancton entre les cages et le lac, reflétant ainsi une exposition par voie aqueuse et par la diète, telle que normalement rencontrée

en milieu naturel.

Figure 5 : Photo d'une cage servant dans les expérimentations de transplantation (crédit Michel A. Defo et Maxime Belanger).



Figure 6 : Montage simplifié de la transplantation des perchaudes d'un lac de référence vers un lac contaminé en métaux (crédit du schéma des cages, P. Couture).



En pratique, deux cages contenant des poissons du même lac, et deux cages contenant les poissons de l'autre lac sont installées dans chaque lac. Parallèlement à cette expérimentation, des perchaudes en nage libre ont été capturées dans leur lac d'origine après 0, 1 et 4 semaines, ceci dans le but d'analyser les effets « cage » sur les poissons appartenant au même lac; l'analyse des effets « cage » n'est cependant pas directement intégrée dans cette thèse. Respectivement, 40 perchaudes juvéniles capturées dans le lac Opasatica étaient transférées dans des cages dans les lacs Dufault et Opasatica (Fig. 6). De même, 40 perchaudes juvéniles capturées dans le lac Dufault étaient transférées dans des cages dans les lacs Opasatica et Dufault. Au bout de 1 et 4 semaines d'exposition, les cages correspondant au temps d'exposition ont été relevées et le nombre de poissons morts déterminé. Tout comme dans l'expérimentation de gradient, vingt poissons ont été disséqués pour les mêmes déterminations. En outre, la température, le pH et l'oxygène dissous étaient mesurés dans les lacs, c'est-à-dire en dehors des cages, lors de l'échantillonnage (annexe A; section de droite).

3.6. Expérimentation dans les conditions contrôlées de laboratoire

Vu l'importance relative des différentes voies d'internalisation des métaux sur leur bioaccumulation et leur toxicité chez les poissons (Klinck et al., 2007; Lapointe et Couture, 2009; Niyogi et al., 2008), la voie d'exposition est susceptible de générer différentes réponses transcriptomiques et métaboliques. Contrairement aux expositions en milieu naturel où la prise en charge des métaux par les poissons s'opère *via* l'eau et la diète, dans cette étude de laboratoire, les expositions se sont faites uniquement par la voie directe (eau).

A l'automne 2011, des perchaudes juvéniles provenant d'un aquaculteur (Trois-Rivières,

Québec, Canada) ont été pendant six semaines exposées au Cd dans les laboratoires du LARSA (Laboratoire régional des sciences aquatiques) de l'Université Laval. Avant l'exposition au métal, elles ont été pendant un mois acclimatées dans un grand bassin (1 m³) puis dans des conditions expérimentales pendant une semaine supplémentaire. Les deux concentrations nominales de métaux ont été choisies sur la base des valeurs environnementales à savoir 0,8 µg/L (7 nmol/L) et 8 µg/L (71 nmol/L) pour les expositions au Cd. En effet 0,8 µg/L correspondait environ à la concentration en Cd mesurée dans certains lacs contaminés de la région de Rouyn-Noranda, tel le lac Dufault par exemple (Giguère et al. 2006), alors qu'en exposant les poissons à 8 µg/L on a mesuré une concentration environnementalement pertinente dans les reins des perchaudes, au terme de 6 semaines. L'exposition s'est faite de façon continue à un débit de 300 mL d'eau/h dans les aquariums de 40 L à l'aide d'une pompe péristaltique reliée au bassin contenant l'eau contaminée. Les autres conditions expérimentales sont résumées dans le tableau 1 et de manière plus détaillée dans l'article 5 (chapitre 12). Tout comme dans l'expérimentation de terrain, les poissons ont été disséqués à la fin des expériences pour les mêmes déterminations. En outre, une fois par jour, la température, le pH ajusté à l'aide d'une solution de Na₂CO₃ et l'oxygène dissous ont été mesurés; de même, une fois par semaine, les nitrates, nitrites et ammonium ont été dosés et de l'eau prélevée pour l'analyse des métaux (annexe B).

Tableau 1: Autres conditions d'exposition des poissons

Température	pH	O ₂	Ration alimentaire	Type de proies	Nombre poissons/aquarium	Biomasse/aquarium	Nombre d'aquariums/condition	Photo-période
20°C	7,2-7,3	100%	2 à 3 % de biomasse/j	artémies congelées (<i>Artemia salina</i>)	15	250 g	2	12h/ 12h

3.7. Présentation des techniques utilisées

3.7.1. Calculs des paramètres biométriques

Les paramètres biométriques utilisés dans cette étude étaient de trois ordres à savoir : l'indice d'embonpoint relatif (Kn), la masse corrigée des cæca pyloriques et l'indice hépatosomatique (IHS). Les détails de calcul de ces paramètres sont rapportés dans les articles 2 et 5 (chapitres 9 et 12).

3.7.2. Analyse des concentrations métalliques tissulaires

Dans toutes les expérimentations, pour estimer le niveau d'accumulation métallique par les perchaudes, nous nous sommes servis d'un organe excréteur ayant un fort potentiel de bioaccumulation des métaux : le rein. Pour chaque individu ce tissu a été lyophilisé avant sa digestion dans l'acide nitrique concentré (grade métal trace ; 67-70%). Afin d'assurer un contrôle de qualité, des échantillons certifiés de référence (TORT-2) ainsi que des blancs (acide pur, témoin d'une éventuelle contamination métallique) ont été analysés dans chaque séquence. La technique utilisée pour la détermination des concentrations métalliques tissulaires est le plasma à couplage inductif relié à la spectrométrie de masse (ICP-MS Model X-7; Thermo Electron Corp., Waltham, Massachusetts, Etats-Unis d'Amérique) ou relié à la spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES ; Varian Vista AX, Victoria, Australie). Le principe et la méthode de dosage des métaux sont consignés dans l'annexe C.

3.7.3. Analyse des activités enzymatiques du stress oxydant

Les activités de plusieurs enzymes impliqués dans la défense contre le stress oxydant à savoir la CAT (EC 1.11.1.6), la SOD (EC 1.15.1.1.), la G6PDH (EC 1.1.1. 49) et la GST

(EC 2.5.1.18)) ont été déterminées dans les tissus des perchaudes issues soit de l'échantillonnage de terrain soit des expositions en laboratoire. Les mesures se sont faites à l'aide d'un spectrophotomètre (UV visible, type Varian 50 Bio) utilisant un lecteur de microplaque du même type (Varian Cary 50MPR) et relié à un système informatisé. Dans le but de déterminer la concentration en substrat et la dilution pour lesquelles les activités des enzymes étudiées sont optimales, une mise au point était préalablement réalisée pour chaque enzyme et dans chacun des tissus. La méthode de mesure des activités enzymatiques est détaillée dans l'annexe E.

3.7.4. Analyse des rétinoïdes

3.7.4.1. Extraction des rétinoïdes tissulaires

L'extraction et la quantification des rétinoïdes plasmatiques, musculaires et hépatiques sont détaillées dans les articles 2 et 5.

3.7.4.2. Système d'HPLC

Tous les solvants utilisés dans nos analyses étaient des produits de qualité HPLC. Les caractéristiques du système d'HPLC de même que ceux des colonnes utilisées pour la séparation des rétinoïdes sont détaillées dans les articles 2 et 5. Le détecteur était calibré à 354 nm, longueur d'onde correspondant au maximum d'absorbance des all-trans-3,4-déhydrorétinoïdes, rétinoïdes majoritaires dans les tissus des perchaudes. L'identification des pics des composés a été faite en comparant les temps d'élution et leur spectre d'absorption avec ceux des standards certifiés (ROH and ROH-palmitate) d'une part, et les résultats obtenus dans Doyon et al. (1998) d'autre part. La quantification des dROH s'est faite en se basant sur la courbe d'étalonnage du ROH multiplié par 1,26, facteur de correction correspondant au ratio entre les coefficients

d'extinction du ROH et du dROH (1832/1450). De la même façon, les concentrations des dROH-esters ont été calculées en se basant sur la courbe d'étalonnage du ROH-palmitate multiplié par le même facteur (Doyon et al., 1998). Pour le foie, les composés élués dans ces conditions étaient du dROH, ROH, dROH-myristate, ROH-myristate, dROH-palmitate, ROH-palmitate, dROH-stéarate et ROH-stéarate comme rétinoïdes hépatiques. Cependant pour le muscle, seulement du dROH et dROH-stéarate ont été élués dans nos conditions expérimentales.

3.7.4.3. Préparation des microsomes hépatiques

L'analyse des microsomes pour la détermination des activités de la mGST, la LdRAT et la REH hépatiques a été faite seulement avec des échantillons provenant de l'expérimentation au laboratoire. Les microsomes hépatiques ont été individuellement extraits des perchaudes en utilisant des méthodes déjà connues (Boily et al., 2005; Ndayibagira et Spear, 1999), mais avec une légère modification. En effet, une portion de tissu a été homogénéisée dans du tampon Tris-KCl, puis centrifugé à 10000 g pendant 20 min. à 4°C. Par la suite une ultracentrifugation (100000 g) du surnageant a eu lieu pendant 60 min. toujours à 4°C. Le culot a été dissous dans du tampon sucrose et une partie directement utilisée pour l'analyse de l'activité de la mGST alors que le reste était stocké à -80°C jusqu'à la mesure de ces activités des enzymes du métabolisme des rétinoïdes.

3.7.4.4. Détermination des activités de la REH et la LdRAT hépatiques

Contrairement aux autres enzymes, l'activité de ces deux enzymes a été déterminée avec le système HPLC. Avant les analyses proprement dites, des essais préliminaires ont été menés afin d'optimiser le pH, le temps d'incubation, les concentrations de

substrats (dROH et ROH-palmitate) de même que la concentration des protéines (annexe D). L'activité de la REH était forte dans les conditions acides (pH 4,2) et après 45 min. d'incubation. De plus, 5 µL de ROH-palmitate (solution stock) et 5 µL de microsomes ont été utilisés pour mesurer cette activité. Par contre, l'activité de la LdRAT était plus élevée dans les conditions alcalines (pH 11,0) après un temps d'incubation de 60 min. Deux aliquotes de 5 µL de microsomes et de 2,5 µL de dROH ont été utilisées pour l'analyse de la LdRAT dans le foie. Le protocole d'analyse de ces enzymes est également détaillé dans le chapitre 12 (article 5).

3.7.5. Analyse de l'expression des gènes (RT-PCR)

L'analyse des niveaux de transcription de gènes a été réalisée en conformité avec les méthodes et les procédures de normalisation technique (Bustin et al., 2009). L'approche consiste à quantifier par la RT-PCR le niveau d'expression de quelques gènes obtenus en réponse à une exposition des perchaudes aux contaminants métalliques en milieu naturel ou au laboratoire. En d'autres termes, la RT-PCR est utilisée pour évaluer l'effet d'une contamination métallique sur la production d'ARNm d'un gène donné à un temps t , en comparaison aux individus témoins. Cette technique se déroule en trois étapes à savoir :

- Extraction et purification des ARN totaux
- La transcription inverse des ARN en ADN complémentaire (ADNc)
- La réaction de polymérisation en chaîne des ADNc synthétisés

Les détails d'analyses sont présentés dans les articles 4 et 5. La quantification relative (RQ) du niveau de transcription de chaque gène d'intérêt a été normalisée par rapport à celui de la β -actine, un gène de référence pertinent dans les analyses de la RT-PCR

chez la perchaude (Pierron et al., 2009; Pierron et al., 2011). Pour diminuer la variabilité lors de l'analyse, un nombre suffisant d'échantillons d'ADNc provenant du même individu et jouant le rôle de contrôle biologique a été utilisé (Bustin et al., 2009).

3.7.6. Analyses statistiques

Tous les tests statistiques étaient réalisés à l'aide du programme JMP version 8 ou 9. Les différences dans les paramètres biométriques, les concentrations métalliques, le niveau de transcription des gènes, l'activité des enzymes et la concentration des différents métabolites des rétinoïdes analysés entre chaque condition expérimentale pour chacun des modes d'exposition étaient comparés à l'aide des ANOVA, après vérification de la normalité (test de Levene, $p > 0,05$) et de l'homoscédasticité. Au besoin, des transformations \log_{10} ou Box-Cox (Peltier et al., 1998) ont été appliquées afin de normaliser les données lorsqu'elles ne l'étaient pas. Lorsque la probabilité était significative ($p < 0.05$), un test de comparaison multiple était utilisé pour identifier les différences entre chaque condition. Par contre, si, malgré la transformation, aucune distribution normale n'était observée, des tests non paramétriques (paired Wilcoxon tests) étaient utilisés. L'analyse des corrélations entre différents paramètres a été faite à l'aide des tests de Pearson ou les tests non paramétriques de Spearman.

Chapitre IV : Résultats

4. RÉSULTATS

Les résultats complémentaires de cette section peuvent être obtenus dans les articles scientifiques (chapitre 9, 10, 11 et 12) et dans la partie annexe.

4.1. Accumulation rénale des métaux chez les perchaudes

4.1.1. Études de gradient polymétallique et de variations saisonnières

Que ce soit aux printemps 2011 et 2012 ou en automne 2012, les concentrations rénales en Cd ont clairement reflété le gradient inter-lac de contamination (Fig. 7A). Les concentrations tissulaires en Cd étaient de 3 à 5 fois supérieures chez les perchaudes des lacs contaminés échantillonnées au printemps 2011 (poissons adultes) par rapport à celles échantillonnées au printemps 2012 (poissons juvéniles) dans les mêmes lacs. En 2012, les concentrations de Cd varient entre les deux saisons avec des valeurs plus faibles au printemps sauf dans le lac Dufault (Du) (Fig. 7A). Aucune différence dans l'accumulation du Cd rénal n'a été observée entre les deux saisons dans le lac Hélène (He).

Une légère hausse des concentrations rénales en Cu dans les lacs les plus contaminés a été observée seulement au printemps 2012 confirmant une fois de plus un effet gradient de concentration en Cu rénal, sauf chez les poissons du lac Hélène (Fig. 7B). Cela traduirait un certain impact de l'exposition, mais cette hypothèse reste à clarifier. De même les concentrations rénales de Cu varient fortement entre les deux saisons de 2012 avec des valeurs plus fortes au printemps sauf dans le lac Opasatica. Pour les mêmes saisons (printemps), les concentrations tissulaires en Cu sont environ deux fois

plus élevées chez les perchaudes capturées en 2011 que chez celles pêchées en 2012

(Fig. 7B).

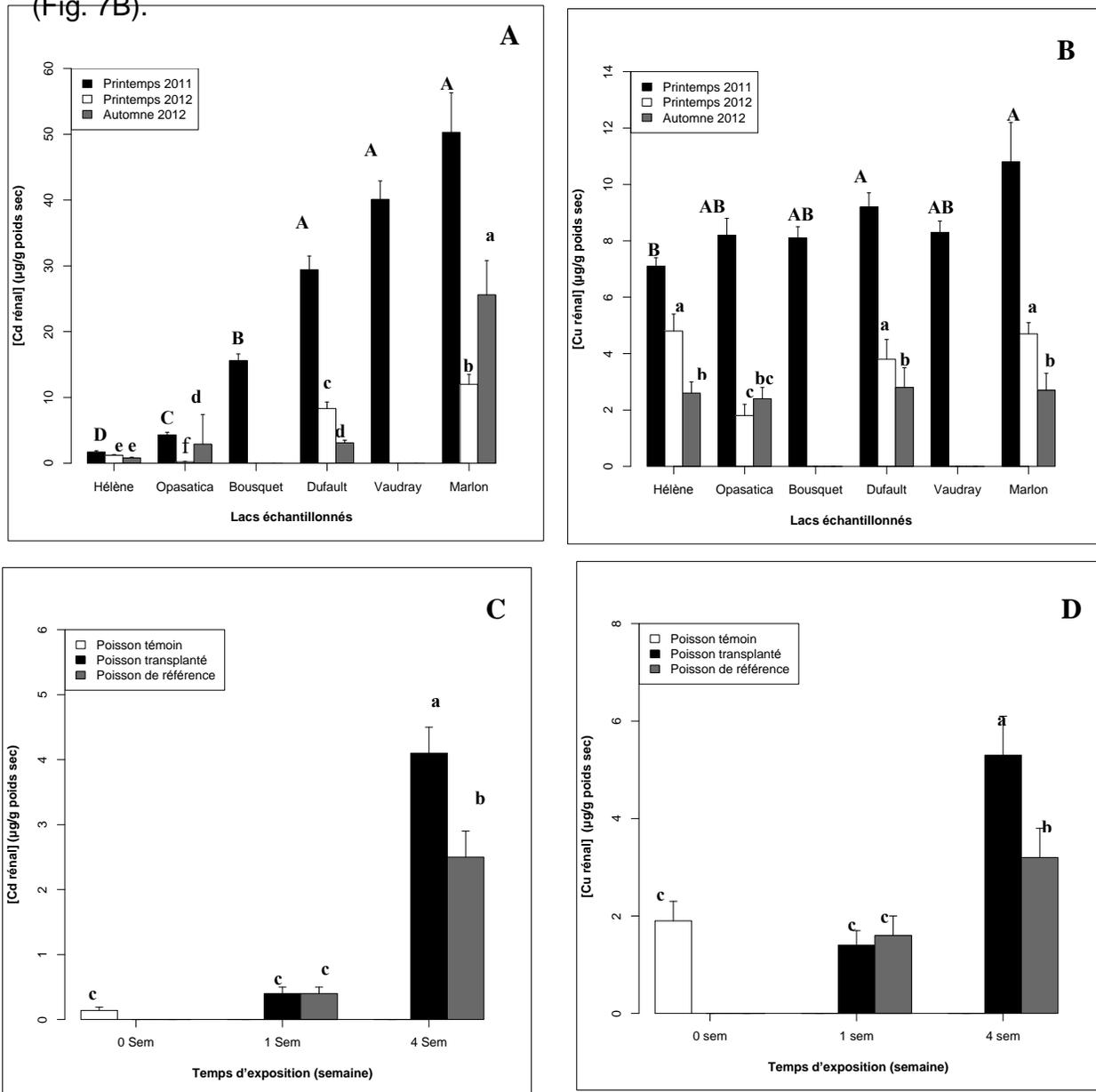


Figure 7 : Les sections du haut représentent les concentrations totales de Cd (A) et de Cu (B) mesurées dans les reins des perchaudes capturées lors des échantillonnages de gradient polymétallique et des variations temporelles des métaux dans les lacs de la région de Rouyn-Noranda. Ces lacs sont classés suivant un gradient croissant de la concentration en Cd rénal. Les sections du bas représentent les concentrations totales de Cd (C) et de Cu (D) dans l'expérimentation de transplantation (Opasatica vers Dufault). Les poissons de référence représentent les témoins des poissons transplantés. Les données sont présentées par : moyenne \pm erreur type de la moyenne (N = 20/lac ou condition). Les moyennes portant des lettres majuscules et minuscules différentes dénotent une différence significative entre les lacs échantillonnés au printemps 2011 et aux printemps et automne 2012 respectivement (section du haut). Dans la section du bas, le groupe témoin représente les perchaudes capturées en dehors des cages au début de l'expérimentation. Les moyennes portant des lettres différentes indiquent une différence significative entre les conditions (valeur de $p < 0,05$).

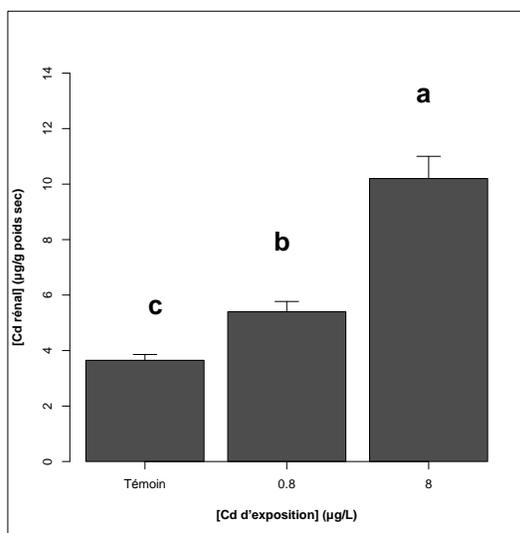
Les concentrations rénales en Zn chez les perchaudes adultes sont quasi identiques dans tous les lacs échantillonnés au printemps 2011 sauf dans les lacs Bousquet (Bo) et Vaudray (Va). Les concentrations tissulaires en Zn sont environ deux fois plus élevées chez les perchaudes échantillonnées au printemps 2011 que chez les poissons capturés au printemps 2012, surtout dans les lacs contaminés (Annexe F; Fig. A). Comme pour le Cd et le Cu, un effet saison a été observé dans la bioaccumulation du Zn rénal. En effet, les concentrations rénales de Zn varient fortement entre les deux saisons de 2012 avec des valeurs plus fortes au printemps dans les lacs contaminés sauf dans le lac Marlon et des valeurs plus fortes en automne dans les lacs témoins (Annexe F; Fig. A).

4.1.2. Expérimentation de transplantation et de laboratoire

Dans l'expérience de transplantation en milieu naturel, on a observé une accumulation du Cd (Fig. 7C) et du Cu (Fig. 7D) dans les reins des perchaudes juvéniles capturées dans le lac de référence (Opasatica) et maintenues captives pendant quatre semaines dans le lac impacté par la contamination métallique (Dufault), comparativement à leurs homologues restés captifs dans leur lac d'origine. Par contre, aucune différence significative dans l'accumulation du Zn rénal n'a été observée (Annexe F; Fig. B).

Proportionnellement à la concentration d'exposition, une accumulation de Cd a été observée dans les reins des perchaudes, après six semaines dans les conditions contrôlées de laboratoire (Fig. 8)

Figure 8: Concentrations totales de Cd mesurées dans les reins des perchaudes après 6 semaines d'exposition au Cd par voie aqueuse. Les données sont présentées par moyenne \pm erreur type de la moyenne (N = 30/condition). Les lettres différentes indiquent une différence significative entre les conditions (valeur de $p < 0,05$).



4.2. Analyses des paramètres biométriques

4.2.1. Indice d'embonpoint relatif

L'indice d'embonpoint des poissons provenant du lac Opasatica était plus faible que celui des poissons capturés dans les autres lacs au printemps 2011. Cependant la différence était seulement significative lorsque comparée aux lacs Marlon et Bousquet (Tableau 2). Au printemps 2012, le Kn était encore plus faible dans les lacs propres par rapport aux lacs contaminés sauf dans le lac Dufault, où ce paramètre était plus faible par comparaison au lac Hélène (Tableau 2). Par contre en automne, aucune différence n'a été observée entre le Kn des poissons des lacs métalliquement propres et celui des poissons des lacs contaminés (Tableau 2). De plus, un effet saison a été aussi observé dans l'indice d'embonpoint des perchaudes des lacs Opasatica et Dufault. En effet les poissons échantillonnés au printemps présentaient un faible Kn faible comparativement à ceux pêchés en automne dans ces deux lacs (Tableau 2).

Les poissons transplantés dans le lac contaminé présentaient après 1 ou 4 semaines d'exposition aux métaux un Kn plus important que leurs homologues restés captifs dans le lac propre durant la même période (Tableau 3). Cependant aucune différence dans le Kn n'a été observée chez les perchaudes juvéniles exposées pendant 6 semaines au Cd en laboratoire comparativement aux individus non exposés (Tableau 3).

4.2.2. Masse des cæca pyloriques

Au printemps 2011, la masse corrigée des cæca pyloriques des perchaudes ne variait pas beaucoup entre les populations des différents lacs, sauf chez les poissons provenant du lac Bousquet (Bo), où cette masse était la plus lourde, et statistiquement différent de ceux provenant du lac Marlon, seulement (Tableau 2). Une différence inter-saison a aussi été notée dans la masse des cæca pyloriques. En effet, la masse corrigée des cæca pyloriques des perchaudes était plus importante au printemps qu'en automne (Tableau 2).

Tableau 2 : Paramètres biométriques mesurés (moy. \pm ET)[§] dans les expérimentations de gradient aux printemps 2011 et 2012 et en automne 2012. Les lettres différentes en majuscules (gradient 2011) ou en minuscules (saison 2012) dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les lacs ou les saisons. Les lacs sont classés du haut vers le bas, suivant un gradient croissant en Cd rénal des perchaudes.

Expérimentations	Année	Lacs	Kn [*]	Masse cæca pyloriques (mg)	IHS [♣]	
		Printemps				
Expérience de gradient	2011	Hélène	0,55 \pm 0,02 ^{BC}	34,0 \pm 5,9 ^{AB}	/	
		Opasatica	0,50 \pm 0,01 ^C	24,7 \pm 1,0 ^{AB}	/	
		Bousquet	0,63 \pm 0,01 ^A	38,7 \pm 4,0 ^A	/	
		Dufault	0,550 \pm 0,005 ^{BC}	25,7 \pm 3,0 ^{AB}	/	
		Vaudray	0,55 \pm 0,01 ^{BC}	26,7 \pm 3,0 ^{AB}	/	
		Marlon	0,57 \pm 0,01 ^{AB}	22,0 \pm 2,0 ^B	/	
		Printemps				
Variation saisonnière	2012	Hélène	0,66 \pm 0,01 ^{bc}	8,13 \pm 0,66 ^{ab}	1,41 \pm 0,10 ^{abc}	
		Opasatica	0,62 \pm 0,01 ^{cd}	8,10 \pm 0,64 ^{ab}	1,56 \pm 0,20 ^{ab}	
		Dufault	0,59 \pm 0,01 ^d	10,35 \pm 0,98 ^a	1,65 \pm 0,10 ^a	
		Marlon	0,73 \pm 0,01 ^a	9,65 \pm 0,96 ^a	1,44 \pm 0,11 ^{abc}	
			Automne			
			Hélène	0,69 \pm 0,01 ^{ab}	4,88 \pm 0,30 ^c	1,18 \pm 0,06 ^{bc}
			Opasatica	0,70 \pm 0,01 ^{ab}	5,01 \pm 0,31 ^c	1,00 \pm 0,05 ^c
			Dufault	0,65 \pm 0,01 ^{bc}	6,60 \pm 0,76 ^{bc}	1,63 \pm 0,10 ^{ab}
		Marlon	0,70 \pm 0,01 ^{ab}	4,64 \pm 0,26 ^c	1,18 \pm 0,07 ^{bc}	

§ Moyenne \pm erreur type à la moyenne ; ♣ Indice d'embonpoint relatif ; ♠ Indice hépatosomatique

Après 1 ou 4 semaines d'exposition aux métaux, les poissons transplantés dans le lac contaminé ne présentaient pas une masse corrigée de cæca pyloriques différente de

leurs homologues gardés captifs dans le lac propre durant la même période de temps (Tableau 3). De même aucun changement avec le temps d'exposition dans ce paramètre n'a été observé chez les poissons exposés pendant 6 semaines au Cd en laboratoire (Tableau 3).

Tableau 3 : Paramètres biométriques mesurés (moy. \pm ET)[§] dans les expositions des perchaudes aux métaux en milieu naturel et en laboratoire. Pour chaque paramètre, les lettres différentes en minuscule (exposition en milieu naturel) et en majuscule (exposition au laboratoire) dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les différentes conditions.

Expérimentations	Conditions*	Kn [♣]	Masse cæca pyloriques (mg)	IHS [♣]
Transplantation en milieu naturel	0Ind-Op	0,620 \pm 0,010 ^{bc}	10,0 \pm 0,7 ^a	0,035 \pm 0,002 ^a
	1Ref-Op	0,610 \pm 0,009 ^c	9,2 \pm 0,9 ^{ab}	0,038 \pm 0,001 ^a
	1Con-Op	0,695 \pm 0,035 ^{ab}	11,2 \pm 1,0 ^a	0,034 \pm 0,002 ^a
	4Ref-Op	0,650 \pm 0,015 ^b	5,8 \pm 0,4 ^{bc}	0,035 \pm 0,003 ^a
	4Con-Op	0,769 \pm 0,022 ^a	4,8 \pm 0,3 ^c	0,037 \pm 0,003 ^a
Exposition des poissons au Cd (μ g/L) en laboratoire	Contrôle	0,028 \pm 0,003 ^A	27,0 \pm 2,0 ^A	0,069 \pm 0,004 ^A
	0,8	0,030 \pm 0,004 ^A	30,0 \pm 3,0 ^A	0,070 \pm 0,004 ^A
	8	0,024 \pm 0,002 ^A	25,0 \pm 3,0 ^A	0,065 \pm 0,003 ^A

§ Moyenne \pm erreur type à la moyenne ; ♣ Indice d'embonpoint relatif ; ♣ Indice hépatosomatique

*Le chiffre indiqué dans les conditions de l'expérience de transplantation indique la durée de l'exposition (semaine) ; **Ind-Op**= Individu en nage libre dans le lac Opasatica ; **Ref-Op**= Poisson du lac de référence (Opasatica) mis en cage dans le même lac ; **Con-Op**= Poisson du lac de référence transplanté dans le lac contaminé (Dufault).

4.2.3. Indice hépatosomatique (IHS)

Dans l'étude saisonnière, l'indice hépatosomatique des poissons échantillonnés au printemps était pareil dans tous les lacs. Par contre, en automne, on a noté que les poissons du lac Opasatica avaient un IHS significativement inférieur à ceux des poissons des lac Dufault (Tableau 2). De plus, une variation saisonnière dans l'IHS a été observée seulement dans le lac Opasatica, avec un indice plus faible en automne qu'au

printemps (Tableau 2). Concernant les expositions des perchaudes aux métaux en milieu naturel ou au laboratoire, aucune différence significative n'a été observée dans l'IHS des poissons (Tableau 3).

4.3. Impacts des métaux sur le métabolisme des rétinoïdes

À partir des tissus issus des différents échantillonnages décrits précédemment, les impacts des métaux ont été en partie ou totalement analysés sur divers paramètres du métabolisme des rétinoïdes incluant le stockage et la libération des métabolites, l'activité enzymatique ou l'expression des gènes.

4.3.1. Effet des métaux sur la concentration des métabolites

4.3.1.1. Plasma

L'analyse des extraits plasmatiques a révélé une seule forme majeure de rétinoïdes libre, le dROH. Dans l'étude de gradient, il semble ne pas y avoir de différence significative dans la concentration en dROH plasmatique des perchaudes issues des lacs, malgré une tendance à la hausse dans les lacs les plus contaminés en métaux. Cependant les poissons du lac Opasatica montrent clairement une faible teneur en dROH plasmatique par rapport à ceux des lacs Bousquet, Vaudray et Marlon.(Fig. 9A). Par contre, après 6 semaines d'exposition, la concentration plasmatique du dROH avait significativement diminué ($p < 0,05$) chez les poissons exposés à la plus grande concentration aqueuse (8 $\mu\text{g/L}$) comparativement à ceux ayant été exposés à 0,8 $\mu\text{g/L}$ ou pas du tout exposés au Cd (témoin) (Fig. 9B).

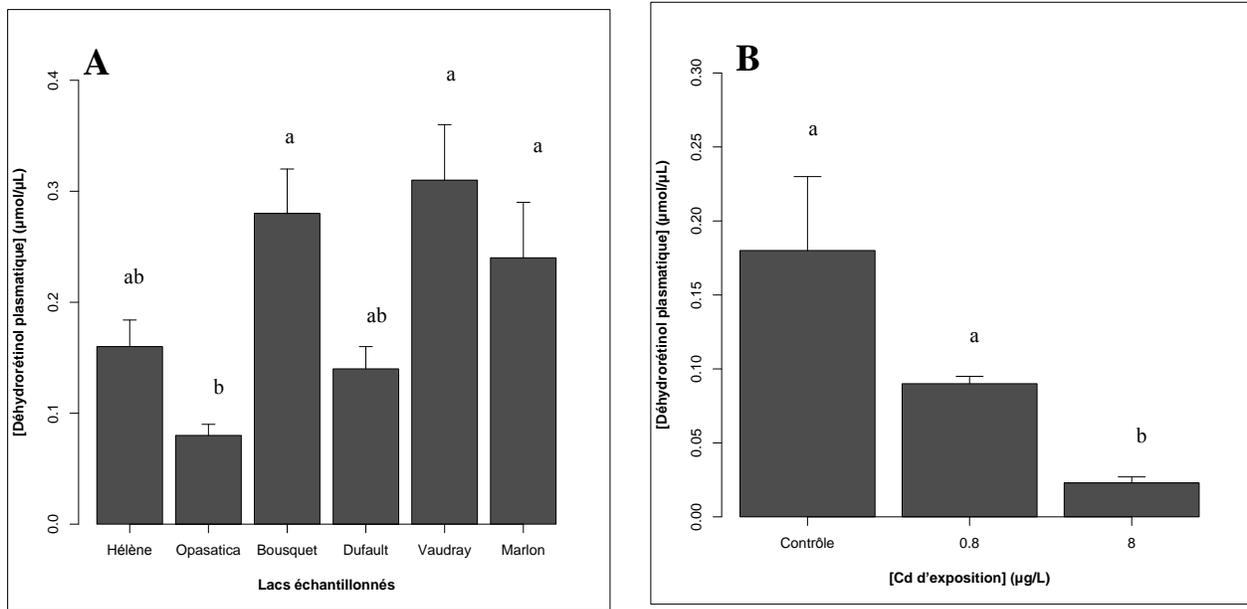


Figure 9 : Concentrations de déhydrorétinol plasmatique des perchaudes issues des échantillonnages de gradient (printemps 2011; A) ou d'exposition au Cd en laboratoire (B) Les données sont présentées comme par moyenne \pm erreur type de la moyenne ($10 \leq N \leq 30$). Les lettres différentes indiquent une différence significative entre les conditions (valeur de $p < 0,05$). Les lacs sont classés sur l'axe des abscisses suivant un gradient croissant de la concentration en Cd rénal.

4.3.1.2. Foie

Les formes all-trans-3,4- didéhydrorétinoïdes (vitamine A₂) ont constitué les molécules prédominantes de vitamine A analysées dans le foie des perchaudes. Dans l'expérimentation de gradient, au cours d'une même saison, une tendance à l'augmentation des concentrations hépatiques de dROH, de déhydrorétinyl palmitate et d'esters totaux de vitamine A a été observée chez les poissons issus des lacs contaminés par comparaison à ceux issus des lacs propres (Tableau 4). Au printemps, ces concentrations de métabolites étaient respectivement 3,15, 8,6 et 8,55 fois plus élevées dans le foie des poissons issus du lac Marlon (contaminé) que ceux du lac Hélène (propre). Par contre, en automne les rapports Marlon/Hélène étaient de 5,2, 2,6 et 2,7 respectivement. De plus, une très forte variation saisonnière dans les

concentrations de dROH a été observée entre les deux saisons, avec des valeurs plus élevées au printemps (Tableau 4), alors que pour le déhydrorétinyl palmitate et les esters totaux la variation printemps -> automne était nettement plus modeste sauf dans le lac Hélène.

Tableau 4 : Concentrations hépatiques (moy. \pm ET)[§] de dehydrotétinol, déhydrorétinyl palmitate et des esters totaux de vitamine A exprimées en nmol g⁻¹ poids frais de foie chez les perchaudes issues des échantillonnages de gradient et de saison (printemps et automne 2012). Les lettres différentes dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les lacs ou les saisons.

Études	Lacs	Déhydrorétinol	Déhydrorétinyl palmitate	Esters totaux de vitamine A
	Printemps			
	Hélène	16,0 \pm 5,0 ^b	23,0 \pm 6,0 ^d	40,0 \pm 10,0 ^d
	Opasatica	24,3 \pm 7,8 ^b	79,0 \pm 17,5 ^c	125,0 \pm 28,3 ^c
	Dufault	45,3 \pm 13,2 ^a	103,4 \pm 31,4 ^b	175,8 \pm 55,6 ^b
Variation saisonnière	Marlon	50,4 \pm 11,2 ^a	197,2 \pm 28,1 ^a	342,3 \pm 52,3 ^a
	Automne			
	Hélène	1,6 \pm 0,2 ^d	26,2 \pm 10,1 ^d	41,1 \pm 15,3 ^d
	Opasatica	1,2 \pm 0,5 ^d	30,0 \pm 11,4 ^d	44,0 \pm 16,3 ^d
	Dufault	6,2 \pm 1,6 ^c	69,5 \pm 24,4 ^c	110,0 \pm 41,1 ^c
	Marlon	2,3 \pm 1,2 ^d	41,0 \pm 13,1 ^d	66,2 \pm 21,2 ^d

§ Moyenne \pm erreur type à la moyenne

Dans l'expérimentation de transplantation, après une semaine d'exposition aux métaux dans le lac contaminé les concentrations des métabolites de rétinoïdes dans le foie des perchaudes n'étaient pas différentes de celles des poissons de référence restés encagés dans le lac Opasatica (Tableau 5). Cependant, après 4 semaines d'exposition les concentrations de dROH, de déhydrorétinyl palmitate et d'esters totaux de vitamine A ont respectivement diminué de 1,5 ; 1,7 et 1,4 fois dans le foie des poissons provenant du lac Opasatica et mis en cage dans le lac Dufault comparativement à ceux restés encagés dans le lac Opasatica, bien que la différence soit significative seulement pour le déhydrorétinyl palmitate (Tableau 5). La même tendance à la diminution dans la concentration de ces métabolites a été observée chez les poissons exposés en

laboratoire au Cd, bien que cette baisse ne soit pas significative chez les perchaudes exposées à la plus forte concentration en Cd (Tableau 3 B).

Tableau 5 : Concentrations hépatiques (moy. \pm ET)[§] de déhydrorétinol, déhydrorétinyl palmitate et des esters totaux de vitamine A exprimées en nmol g⁻¹ poids frais de foie chez les perchaudes exposées aux métaux en milieu naturel et en laboratoire. Les lettres différentes en minuscules (exposition en milieu naturel) et en majuscule (exposition au laboratoire) dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les différentes conditions.

Expérimentations	Conditions*	Déhydrorétinol	Déhydrorétinyl palmitate	Esters totaux de vitamine A
Transplantation en milieu naturel	0Ind-Op	24 \pm 8 ^a	78 \pm 17 ^b	124 \pm 28 ^b
	1Ref-Op	16 \pm 7 ^a	72 \pm 31 ^b	120 \pm 52 ^b
	1Con-Op	15 \pm 6 ^a	84 \pm 3 ^b	145 \pm 53 ^b
	4Ref-Op	12 \pm 2 ^{ab}	250 \pm 35 ^a	319 \pm 70 ^a
	4Con-Op	8 \pm 3 ^b	144 \pm 27 ^b	224 \pm 37 ^{ab}
Exposition des poissons au Cd (μ g/L) en laboratoire	Contrôle	479,7 \pm 2,5 ^A	1012,6 \pm 316,3 ^A	1702,2 \pm 511,3 ^A
	0,8	27,3 \pm 14,7 ^B	65,6 \pm 40,9 ^B	138,3 \pm 65,7 ^B
	8	337,5 \pm 86,6 ^A	647,8 \pm 428,0 ^A	1092,6 \pm 685,2 ^A

§ Moyenne \pm erreur type à la moyenne

*Le chiffre indiqué dans les conditions de l'expérience de transplantation indique la durée de l'exposition (semaine) ; **Ind-Op**= Individu en nage libre dans le lac Opatatica ; **Ref-Op**= Poisson du lac de référence (Opatatica) mis en cage dans le même lac ; **Con-Op**= Poisson du lac de référence transplanté dans le lac contaminé (Dufault).

4.3.1.3. Muscle

Contrairement à l'extrait hépatique, l'extrait musculaire a révélé que le déhydrorétinyl stéarate était la seule forme d'ester majeure présente dans le muscle des perchaudes. Comparativement au lac Opatatica (et non au lac Hélène), on a observé une augmentation de la concentration du déhydrorétinol dans le muscle des poissons issus des lacs contaminés (Tableau 6).

Tableau 6 : Concentrations musculaires (moy. \pm ET)[§] de déhydrorétinol, déhydrorétinyl stéarate exprimées en nmol g⁻¹ poids frais de muscle chez les perchaudes issues des échantillonnages de gradient et de saison (printemps et automne 2012). Les lettres

différentes dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les lacs ou les saisons. Les comparaisons statistiques se font dans chaque colonne, pas entre les deux colonnes.

Études	Lacs	Déhydrorétinol	Déhydrorétinyl stéarate
	Printemps		
	Hélène	0,160 ± 0,030 ^a	0,200 ± 0,010 ^a
	Opasatica	0,093 ± 0,005 ^b	0,220 ± 0,010 ^a
	Dufault	0,150 ± 0,010 ^a	0,170 ± 0,010 ^b
	Marlon	0,160 ± 0,020 ^a	0,170 ± 0,010 ^b
Variation saisonniers	Automne		
	Hélène	0,077 ± 0,007 ^b	0,130 ± 0,006 ^c
	Opasatica	0,080 ± 0,007 ^b	0,120 ± 0,006 ^c
	Dufault	0,160 ± 0,020 ^a	0,150 ± 0,010 ^b
	Marlon	0,100 ± 0,010 ^b	0,130 ± 0,010 ^c

§ Moyenne ± erreur type à la moyenne

De plus, une certaine variation saisonnière dans les concentrations en dROH a été observée entre les deux saisons, avec des valeurs plus élevées au printemps sauf dans le lac Dufault. Par contre, on observe une diminution des concentrations en déhydrorétinyl stéarate dans le muscle des perchaudes échantillonnées dans les lacs contaminés aux métaux comparativement à celles provenant des lacs propres uniquement au printemps (Tableau 6). De même, une variation saisonnière dans les concentrations en déhydrorétinyl stéarate a été observée entre les deux saisons, avec des valeurs plus élevées au printemps sauf dans le lac Dufault.

Dans l'expérimentation de transplantation, après une semaine d'exposition aux métaux dans le lac contaminé les concentrations des métabolites de rétinoïdes (dROH et déhydrorétinyl stéarate) dans le muscle des perchaudes avaient significativement diminué en comparaison à celles des poissons de référence restés engagés dans le lac Opasatica (Tableau 7).

Tableau 7 : Concentrations musculaires (moy. \pm ET)[§] de déhydrorotétinol, déhydrorotétinyl stéarate exprimées en $\eta\text{mol g}^{-1}$ poids frais de muscle chez les perchaudes issues des expérimentations de transplantations et de laboratoire. Les lettres différentes en minuscules (exposition en milieu naturel) et en majuscule (exposition au laboratoire) dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les différentes conditions.

Expérimentations	Conditions*	Déhydrorotétinol	Déhydrorotétinyl stéarate
Transplantation en milieu naturel	0Ind-Op	0,093 \pm 0,005 ^d	0,22 \pm 0,0 ^c
	1Ref-Op	1,633 \pm 0,390 ^b	1,20 \pm 0,10 ^b
	1Con-Op	0,299 \pm 0,060 ^c	0,40 \pm 0,08 ^c
	4Ref-Op	1,836 \pm 0,090 ^{ab}	2,99 \pm 0,10 ^a
	4Con-Op	3,099 \pm 0,498 ^a	3,20 \pm 0,30 ^a
Exposition des poissons au Cd ($\mu\text{g/L}$) en laboratoire	Contrôle	0,032 \pm 0,008 ^A	0,077 \pm 0,009 ^A
	0,8	0,026 \pm 0,002 ^A	0,047 \pm 0,004 ^B
	8	0,022 \pm 0,003 ^B	0,055 \pm 0,005 ^B

§ Moyenne \pm erreur type à la moyenne

* Le chiffre indiqué dans les conditions de l'expérience de transplantation indique la durée de l'exposition (semaine) ; **Ind-Op**= Individu en nage libre dans le lac Opasatica ; **Ref-Op**= Poisson du lac de référence (Opasatica) mis en cage dans le même lac ; **Con-Op**= Poisson du lac de référence transplanté dans le lac contaminé (Dufault).

4.3.2. Effet des métaux sur la proportion de déhydrorotétinol libre

4.3.2.1. Foie

Dans les échantillonnages de gradient et de saison, même si les concentrations de déhydrorotétinoïdes hépatiques étaient plus élevées chez les poissons vivant dans les lacs contaminés, le pourcentage de dROH libre était plus faible dans le foie des poissons de ces lacs (Fig. 10A).

De même, une forte variation saisonnière dans les pourcentages de dROH hépatique a été observée entre les deux saisons, avec des valeurs plus élevées au printemps (Fig. 10A). Cette baisse du pourcentage de dROH libre a été aussi observée chez les poissons provenant du lac Opasatica et transplantés pendant 4 semaines dans le lac Dufault comparativement à leurs homologues restés captifs dans leur lac d'origine (Fig.

10B). Par contre aucune différence significative dans le pourcentage de dROH hépatique n'a été observée chez les perchaudes exposées au Cd en laboratoire malgré une tendance à la baisse chez celles exposées à 0,8 µg/L de Cd (chapitre 12 ; article 5).

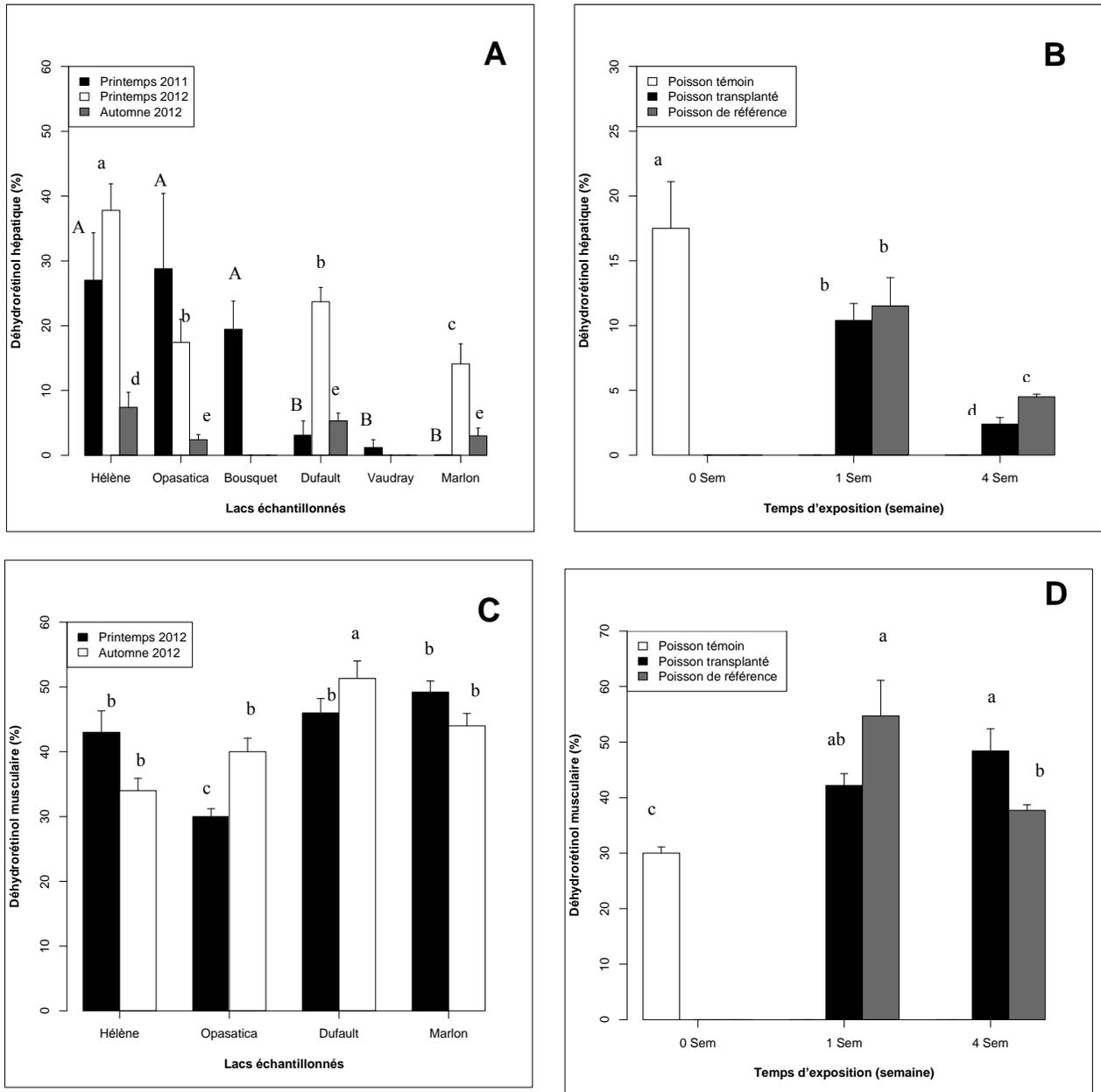


Figure 10 : Pourcentage de déhydrorétinol hépatique (section du haut) et musculaire (section du bas) des perchaudes capturées lors des études de gradient (section de gauche) et de transplantation (section de droite). Le groupe contrôle représente les perchaudes en nage libre capturées au début de l'expérimentation. Les données sont présentées par : moyenne ± erreur type de la moyenne (6 ≤ N ≤ 8 /lac). Les moyennes indiquées par des lettres différentes dénotent une différence significative entre les lacs ou les saisons et les conditions d'exposition (valeur de p < 0,05). Les lacs sont classés suivant un gradient croissant de la concentration en Cd rénal.

4.3.2.2. Muscle

Dans les échantillonnages de gradient et de saison, le pourcentage de dROH libre varie relativement peu dans le muscle des poissons, avec une très légère tendance d'augmentation selon le gradient de contamination (Fig. 10C), et ces valeurs semblent plus élevées en automne qu'au printemps pour certains lacs (Opasatica et Dufault ; Fig. 10C).

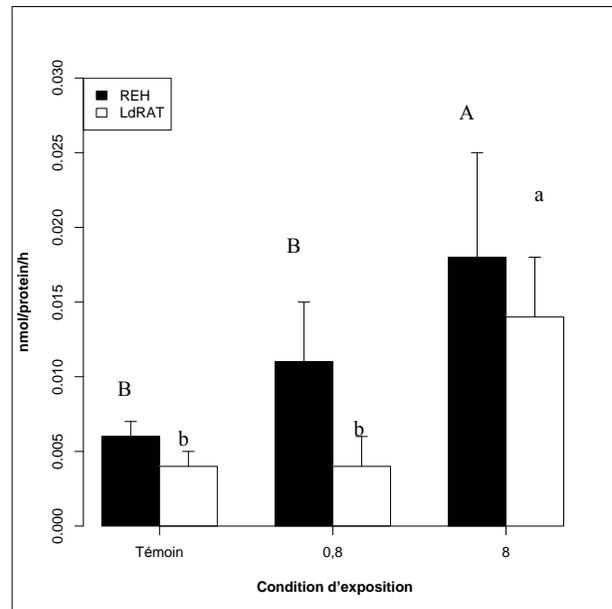
Une augmentation un peu plus évidente dans le pourcentage de dROH libre a été observée dans le muscle des poissons provenant du lac Opasatica et transplantés pendant 4 semaines dans le lac Dufault, comparativement à leurs homologues restés captifs dans leur lac d'origine (Fig. 10D).

Une hausse dans le pourcentage de dROH musculaire a été observée chez les perchaudes exposées au Cd en laboratoire malgré une différence non significative chez celles exposées à la plus forte concentration (8 µg/L) de Cd (chapitre 12 ; article 5).

4.3.3. Effet des métaux sur les activités de la REH et la LdRAT hépatique

Vu la petitesse de la masse du foie des perchaudes, les effets des métaux sur les activités de la REH et la LdRAT ont été déterminés seulement dans les poissons issus des expositions au laboratoire. Après 6 semaines d'exposition des poissons au Cd (8 µg/L), on a observé une augmentation des activités de la REH et de la LdRAT hépatique. Cette augmentation était respectivement de 3 et 3,5 fois plus élevée chez ces perchaudes comparativement aux poissons contrôles (Fig. 11).

Figure 11 : Activités de la REH et de la LdRAT des perchaudes issues de l'exposition au cadmium en laboratoire. Les données sont présentées par : moyenne \pm erreur type de la moyenne. Les moyennes indiquées par des lettres différentes majuscules (activité de la REH ou minuscules (activité de la LdRAT) dénotent une différence Significative entre les conditions d'exposition (valeur de $p < 0,05$).



4.3.4. Effet des métaux sur l'expression de la *rdh-2* hépatique

Dans les études de gradient et de saison, le niveau de transcription de la *rdh-2* hépatique était plus élevé chez les poissons provenant des lacs contaminés que chez ceux capturés dans les lacs propres, au printemps (Fig. 12 A). Par contre en automne aucune différence significative dans le niveau de transcription de la *rdh-2* hépatique des poissons entre les lacs n'a été relevée. Cependant, une variation saisonnière dans le niveau de transcription de ce gène a été observée entre les deux saisons, seulement dans les lacs contaminés, avec des valeurs plus élevées au printemps (Fig. 12A). Contrairement à l'expérimentation de gradient, chez les poissons provenant du lac Opasatica et transplantés pendant 4 semaines dans le lac Dufault, le niveau de transcription de ce gène était faible comparativement à celui des poissons de référence (Fig. 12B).

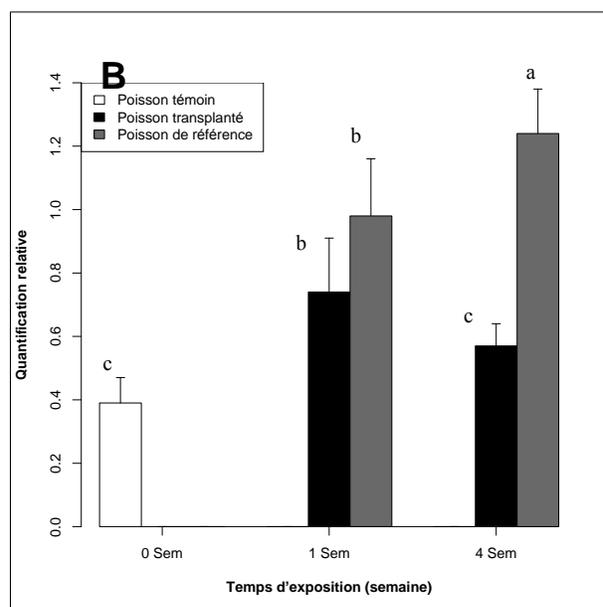
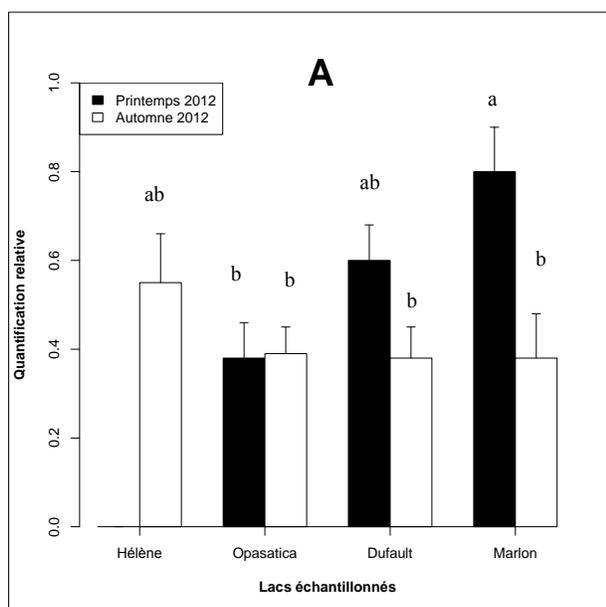
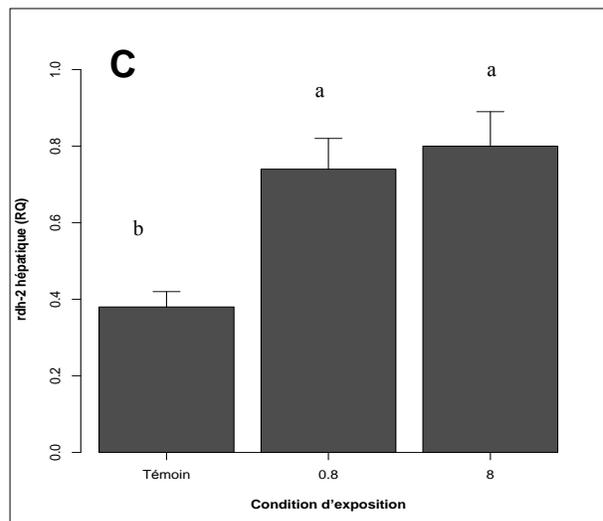


Figure 12 : Niveau de transcription de la *rdh-2* hépatique lors des études de gradient (A), de transplantation (B) ou de laboratoire (C). Le groupe contrôle dans « B » représente les perchaudes en nage libre capturées au début de l'expérimentation. Les données sont présentées par : moyenne \pm erreur type de la moyenne. Les valeurs indiquées par des lettres différentes dénotent une différence significative (valeur de $p < 0,05$) entre les lacs ou saison (A) et les conditions d'exposition (B et C). Dans la figure A, les lacs sont classés suivant un gradient croissant en Cd rénal.



Après 6 semaines d'exposition des poissons au Cd, on a observé un niveau de transcription de la *rdh-2* hépatique plus élevé par rapport aux individus contrôle. Ce niveau de transcription était respectivement 1,9 et 2,1 fois plus élevée chez les perchaudes exposées à 0,8 $\mu\text{g/L}$ et 8 $\mu\text{g/L}$ comparativement aux poissons témoins (Fig. 12C).

4.4. Impacts des métaux sur la réponse des biomarqueurs du stress oxydant

4.4.1. Foie

Les analyses de l'impact des métaux sur les réponses au stress oxydant dans le foie ont été déterminées à la fois en évaluant leurs effets sur le niveau de transcription des gènes et sur les activités des enzymes correspondantes.

4.4.1.1. Catalase

Il n'y a pas eu de variation saisonnière dans le niveau de transcription de la catalase hépatique (Tableau 8). En effet les poissons provenant des lacs propres et des lacs contaminés en métaux montrent un niveau de transcription de la catalase statistiquement similaire variant de 0,43 à 0,68 au printemps contre 0,38 à 0,52 en automne (Tableau 8). De même l'activité de la catalase hépatique était identique chez les poissons échantillonnés dans les lacs pendant les deux saisons, sauf dans le lac Dufault où les poissons présentaient une activité de plus de deux fois supérieure à celle des poissons issus d'autres lacs (Tableau 8). Contrairement au niveau de transcription de ce gène, où on a noté une absence de variation saisonnière, l'activité de la catalase hépatique des perchaudes provenant du lac Dufault était quasiment deux fois supérieures au printemps qu'en automne (Tableau 8).

Tableau 8 : Niveau de transcription des gènes et activités enzymatiques (moy. ± ET)[§] dans le foie des perchaudes issues des expérimentations de gradient et de saison (printemps et automne 2012). Les lettres différentes dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les lacs ou les saisons. Les lacs sont classés suivant un gradient croissant en Cd rénal.

Expérimentations	Lacs	Niveau de transcription des gènes*				Activités enzymatiques			
		<i>cat</i>	<i>Cu/Zn sod-1</i>	<i>g6pdh</i>	<i>mgst-3</i>	CAT★	SOD★	G6PDH*	GST*
Printemps									
	Hélène	/	/	/	/	/	/	/	/
Variation saisonniers	Opasatica	0,43 ± 0,08 ^a	0,64 ± 0,15 ^{ab}	0,19 ± 0,04 ^c	0,67 ± 0,14 ^a	0,24 ± 0,05 ^{bc}	51,4 ± 9,4 ^a	0,016 ± 0,004 ^c	0,035 ± 0,001 ^b
	Dufault	0,44 ± 0,10 ^a	0,54 ± 0,10 ^b	0,55 ± 0,08 ^b	0,52 ± 0,12 ^a	0,60 ± 0,11 ^a	33,5 ± 3,7 ^c	0,054 ± 0,005 ^a	0,030 ± 0,001 ^b
	Marlon	0,68 ± 0,15 ^a	0,88 ± 0,14 ^a	1,26 ± 0,21 ^{ab}	0,99 ± 0,14 ^a	0,26 ± 0,02 ^b	35,7 ± 4,2 ^{bc}	0,047 ± 0,007 ^{ab}	0,037 ± 0,003 ^{ab}
Automne									
	Hélène	0,38 ± 0,07 ^a	0,55 ± 0,08 ^b	1,50 ± 0,30 ^a	0,60 ± 0,12 ^a	0,12 ± 0,03 ^c	45,3 ± 4,6 ^{abc}	0,056 ± 0,007 ^a	0,049 ± 0,008 ^a
	Opasatica	0,44 ± 0,08 ^a	0,57 ± 0,07 ^b	1,21 ± 0,16 ^{ab}	0,63 ± 0,11 ^a	0,21 ± 0,02 ^{bc}	49,3 ± 2,9 ^{ab}	0,039 ± 0,005 ^b	0,058 ± 0,005 ^a
	Dufault	0,52 ± 0,12 ^a	0,49 ± 0,08 ^b	0,59 ± 0,11 ^b	0,85 ± 0,20 ^a	0,28 ± 0,02 ^b	34,1 ± 2,9 ^c	0,037 ± 0,003 ^b	0,045 ± 0,003 ^a
	Marlon	0,51 ± 0,13 ^a	0,54 ± 0,10 ^b	0,93 ± 0,14 ^b	0,83 ± 0,16 ^a	0,21 ± 0,02 ^{bc}	43,8 ± 4,1 ^{abc}	0,035 ± 0,003 ^b	0,045 ± 0,005 ^a

§ Moyenne ± erreur type à la moyenne

★ Exprimée en U mg/protéine

* Exprimée en U g/protéine

‡ Exprimée en quantification relative (RQ)

/ Paramètres non analysés

Dans l'expérimentation de transplantation, bien que le niveau de transcription de la catalase soit élevé après 4 semaines dans le foie des poissons mis en cage dans les deux lacs, il n'existe pas de différence significative dans le niveau de transcription de ce gène entre les poissons issus du lac de référence et transplantés dans le lac contaminé et ceux restés encagés dans le lac de référence (Tableau 9). Par contre, on observe une baisse significative de l'activité de la catalase dans le foie des perchaudes transplantées du lac de référence vers le lac contaminé (Tableau 9).

L'exposition des poissons au Cd dans les conditions contrôlées de laboratoire révèle qu'après 6 semaines d'exposition, le niveau de transcription de la *cat* et l'activité de la CAT hépatique étaient élevés chez les perchaudes exposées aux deux concentrations en Cd comparativement aux poissons de contrôle (Tableau 9).

4.4.1.2. Superoxyde dismutase

Les poissons capturés dans les lacs durant les deux saisons ont montré un niveau de transcription de la *Cu/Zn sod-1* similaire sauf chez les individus échantillonnés dans le lac Marlon, où l'expression du gène était plus élevée au printemps qu'en automne (Tableau 8). Par contre aucune variation saisonnière n'a été observée dans l'activité de la SOD des perchaudes (Tableau 8).

Après une semaine d'exposition des poissons aux métaux en milieu naturel, le niveau de transcription de la *Cu/Zn sod-1* était significativement élevé comparativement à leurs homologues restés en cage dans leur lac d'origine (Tableau 9). Cette tendance s'est maintenue après 4 semaines d'exposition. Par contre, et indépendamment du temps d'exposition, aucune différence n'a été observée dans l'activité de la SOD hépatique chez ces poissons (Tableau 9)

Tableau 9 : Niveau de transcription des gènes et activités enzymatiques (moy. ± ET)[§] dans le foie des perchaudes issues des expérimentations de transplantation et de laboratoire. Les lettres différentes en minuscules (exposition de transplantation) et en majuscule (exposition au laboratoire) dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les différentes conditions.

Expérimentations	Conditions*	Niveau de transcription des gènes ⁺				Activités enzymatiques			
		<i>cat</i>	<i>Cu/Zn sod-1</i>	<i>g6pdh</i>	<i>mgst-3</i>	CAT [★]	SOD [★]	G6PDH [★]	GST/MGST [✱]
Transplantation en milieu naturel	0Ind-Op	0,43 ± 0,08 ^b	0,64 ± 0,15 ^b	0,19 ± 0,04 ^c	0,67 ± 0,13 ^c	0,24 ± 0,05 ^b	51,4 ± 9,6 ^a	0,016 ± 0,004 ^{ab}	0,035 ± 0,001 ^{ab}
	1Ref-Op	0,34 ± 0,04 ^b	0,33 ± 0,03 ^c	0,58 ± 0,17 ^a	0,32 ± 0,03 ^d	0,31 ± 0,08 ^b	40,2 ± 8,7 ^a	0,010 ± 0,002 ^b	0,030 ± 0,003 ^{bc}
	1Con-Op	0,36 ± 0,11 ^b	0,64 ± 0,15 ^b	0,66 ± 0,20 ^a	0,60 ± 0,10 ^c	0,21 ± 0,03 ^b	35,2 ± 4,7 ^a	0,014 ± 0,002 ^b	0,028 ± 0,002 ^{bc}
	4Ref-Op	0,72 ± 0,06 ^a	0,94 ± 0,07 ^b	0,46 ± 0,06 ^b	0,99 ± 0,08 ^b	0,52 ± 0,06 ^a	40,6 ± 4,0 ^a	0,014 ± 0,001 ^b	0,020 ± 0,002 ^c
	4Con-Op	0,64 ± 0,11 ^a	1,71 ± 0,27 ^a	0,92 ± 0,18 ^a	1,47 ± 0,18 ^a	0,32 ± 0,10 ^b	41,0 ± 1,7 ^a	0,032 ± 0,014 ^a	0,034 ± 0,003 ^{ab}
Exposition des poissons au Cd (µg/L) en laboratoire	Contrôle	0,64 ± 0,06 ^B	/	0,61 ± 0,15 ^B	0,45 ± 0,04 ^B	0,41 ± 0,06 ^B	43,5 ± 7,3 ^A	0,015 ± 0,002 ^B	0,139 ± 0,008 ^A
	0,8	1,10 ± 0,09 ^A	/	0,51 ± 0,12 ^B	0,79 ± 0,08 ^A	0,50 ± 0,07 ^B	44,8 ± 7,8 ^A	0,027 ± 0,005 ^A	0,159 ± 0,005 ^A
	8	1,08 ± 0,11 ^A	/	1,04 ± 0,20 ^A	0,84 ± 0,17 ^A	0,60 ± 0,06 ^A	49,1 ± 5,5 ^A	0,030 ± 0,010 ^A	0,163 ± 0,011 ^A

§ Moyenne ± erreur type à la moyenne

* Le chiffre indiqué dans les conditions de l'expérience de transplantation indique la durée de l'exposition (semaine) ; **Ind-Op**= Individu en nage libre dans le lac Opasatica ; **Ref-Op**= Poisson du lac de référence (Opasatica) mis en cage dans le même lac ; **Con-Op**= Poisson du lac de référence transplanté dans le lac contaminé (Dufault)

★ Exprimée en U mg/protéine

✱ Exprimée en U g/protéine

† Exprimée en quantification relative (RQ)

✓ Dans l'expérimentation issue des expositions au laboratoire, c'est la mesure de l'activité de la MGST qui a été déterminée

/ Paramètre non analysé

Tout comme dans l'exposition en milieu naturel, l'exposition des perchaudes au Cd dans les conditions contrôlées de laboratoire n'a pas affecté l'activité de la SOD hépatique après 6 semaines, et ce, quelle que soit la concentration d'exposition (Tableau 9).

4.4.1.3. Glucose-6-phosphate déshydrogénase

Dépendamment de la saison, le niveau de transcription de la *g6pdh* était élevé dans les poissons capturés dans les lacs contaminés au printemps et était faible dans les poissons de ces lacs en automne. Cependant il n'existe pas de variation inter saisonnière dans l'expression de ce gène sauf dans le lac Opasatica, où l'expression de ce gène était six fois plus élevée en automne qu'au printemps (Tableau 8). De même l'activité de la G6PDH était élevée dans le foie des poissons issus des lacs contaminés au printemps. Par contre on observe une faible activité de cet enzyme dans le foie des poissons provenant de ces lacs en automne, comparativement aux poissons provenant des lacs propres. Une variation inter saisonnière dans l'activité de la G6PDH a été observée dans le foie des poissons capturés dans les lacs contaminés avec une activité plus forte en automne qu'au printemps (Tableau 8).

Après une semaine d'exposition des poissons aux métaux en milieu naturel le niveau de transcription de la *g6pdh* hépatique n'était pas significativement élevé comparativement à leurs homologues restés en cage dans leur lac d'origine (Tableau 9). Par contre après 4 semaines d'exposition, l'expression de ce gène était deux fois supérieure chez les poissons transplantés dans le lac contaminé par rapport à ceux restés dans les cages dans le lac de référence. En accord avec le taux de transcription de ce gène, on a observé une différence dans l'activité de la G6PDH hépatique (deux fois plus élevée) chez ces poissons (Tableau 9).

Tout comme dans l'exposition en milieu naturel, l'exposition des perchaudes à la plus grande concentration en Cd (8 µg/L) dans les conditions contrôlées de laboratoire a non seulement augmenté le niveau de transcription de la *g6pdh*, mais aussi à augmenté de deux fois l'activité de la G6PDH hépatique après six semaines d'exposition (Tableau 9).

4.4.1.4. Glutathione-S-transférase

Bien qu'il existe une légère hausse du niveau de transcription de la *mgst-3* dans le foie des perchaudes capturées dans les lacs contaminés comparativement à celles obtenues dans les lacs propres, il n'y a pas eu de variation saisonnière dans le niveau de transcription de ce gène (Tableau 8). De plus, d'un lac à l'autre, il n'y a pas eu de variation dans l'activité de la GST hépatique au cours de la même saison d'échantillonnage. Cependant une tendance à l'augmentation dans l'activité de cette enzyme était observée chez les poissons capturés en automne (Tableau 8).

Dans l'expérimentation de transplantation, après une semaine d'exposition des poissons aux métaux en milieu naturel le niveau de transcription de la *mgst-3* hépatique a doublé comparativement à leurs homologues restés en cage dans leur lac d'origine. Après 4 semaines d'exposition, ce niveau de transcription n'est plus que de 1,5 fois supérieure (Tableau 9). Par contre, après une semaine, aucune différence n'a été observée dans l'activité de la GST hépatique alors que cette activité était significativement élevée après 4 semaines d'exposition des perchaudes aux métaux en milieu naturel (Tableau 9).

L'exposition des perchaudes au Cd (0,8 µg/L et 8 µg/L) au laboratoire a significativement augmenté le niveau de transcription de la *mgst-3* hépatique, mais n'a pas engendré un effet mesurable sur l'activité de la MGST après 6 semaines comparativement aux poissons de contrôle (Tableau 9).

4.4.2. Muscle

La plupart des analyses de l'impact des métaux sur les réponses musculaires au stress oxydant ont été déterminées en évaluant leurs effets sur les activités des enzymes, contrairement au foie, où nous avons non seulement des données sur les activités enzymatiques, mais aussi sur le niveau de transcription des gènes.

4.4.2.1. Catalase

D'un lac à l'autre et d'une saison à l'autre, il n'y a pas eu de variation significative dans l'activité de la CAT musculaire des perchaudes échantillonnées, sauf chez celles capturées dans le lac Opasatica où cette activité était quatre fois moins élevée au printemps qu'en automne (Tableau 10). Dans l'expérimentation de transplantation, après 4 semaines d'exposition des poissons aux métaux en milieu naturel, l'activité de la CAT a doublé comparativement à celle de leurs homologues restés en cage dans leur lac d'origine. Cette tendance dans l'activité de la CAT a été aussi observée chez les poissons exposés à 0,8 µg/L et à 8 µg/L de Cd au laboratoire bien que non significative pour la plus grande concentration d'exposition (Tableau 11).

Tableau 10: Activités enzymatiques (moy. ± ET)[§] dans le muscle des perchaudes issues des expérimentations de gradient et de saison (printemps et automne 2012). Les lettres différentes dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les lacs ou les saisons. Les lacs sont classés suivant un gradient croissant en Cd rénal.

Expérimentations	Lac	Activités enzymatiques		
		CAT [★]	SOD [★]	GST [✱]
	Printemps			
	Hélène	0,0033 ± 0,0004 ^{ab}	4,15 ± 0,17 ^b	0,013 ± 0,001 ^c
	Opasatica	0,0007 ± 0,0001 ^c	3,58 ± 0,64 ^b	0,028 ± 0,005 ^a
	Dufault	0,0023 ± 0,0002 ^{abc}	5,80 ± 1,02 ^{ab}	0,020 ± 0,004 ^b
	Marlon	0,0039 ± 0,0005 ^a	6,57 ± 1,36 ^{ab}	0,010 ± 0,002 ^c
Variation saisonnière	Automne			
	Hélène	0,0021 ± 0,0004 ^{abc}	7,86 ± 0,78 ^a	0,012 ± 0,001 ^c
	Opasatica	0,0030 ± 0,0006 ^{ab}	5,59 ± 0,89 ^{ab}	0,013 ± 0,001 ^c
	Dufault	0,0033 ± 0,0004 ^{ab}	3,94 ± 0,32 ^b	0,015 ± 0,001 ^{bc}
	Marlon	0,0020 ± 0,0003 ^{bc}	3,76 ± 0,65 ^b	0,015 ± 0,001 ^{bc}

§ Moyenne ± erreur type à la moyenne ; ★ Exprimée en U mg/protéine ; ✱ Exprimée en U g/protéine

4.4.2.2. Superoxyde dismutase

Les poissons capturés dans les lacs durant les deux saisons ont montré une activité de la SOD musculaire similaire sauf chez les individus échantillonnés dans le lac Hélène, où cette activité était presque deux fois moins élevée au printemps qu'en automne (Tableau 10). L'activité de la SOD a aussi doublé dans le muscle des poissons capturés dans le lac Opasatica et transplantés dans le lac Dufault pendant 4 semaines. Par contre aucune différence significative n'a été relevée dans ce paramètre lorsque les poissons étaient exposés au Cd pendant 6 semaines au laboratoire, malgré une tendance à la hausse chez ceux exposés à la plus grande concentration (Tableau 11).

Tableau 11 : Activités enzymatiques (moy. \pm ET)[§] dans le muscle des perchaudes issues des expérimentations de transplantation et de laboratoire. Les lettres différentes en minuscules (exposition de transplantation) et en majuscule (exposition au laboratoire) dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les différentes conditions.

Expérimentations	Conditions*	Activités enzymatiques		
		CAT★	SOD★	GST*
Transplantation en milieu naturel	0Ind-Op	0,0007 \pm 0,0001 ^c	3,58 \pm 0,64 ^b	0,027 \pm 0,006 ^b
	1Ref-Op	0,0010 \pm 0,0002 ^{bc}	4,28 \pm 0,18 ^b	0,040 \pm 0,004 ^{ab}
	1Con-Op	0,0012 \pm 0,0002 ^b	4,67 \pm 0,39 ^b	0,046 \pm 0,012 ^{ab}
	4Ref-Op	0,0023 \pm 0,0004 ^b	5,40 \pm 1,37 ^b	0,049 \pm 0,009 ^a
	4Con-Op	0,0040 \pm 0,0001 ^a	10,53 \pm 2,62 ^a	0,052 \pm 0,008 ^a
Exposition des poissons au Cd (μ g/L) en laboratoire	Contrôle	0,0150 \pm 0,0070 ^B	16,9 \pm 4,8 ^A	0,0140 \pm 0,0050 ^A
	0,8	0,0300 \pm 0,0200 ^A	13,4 \pm 3,3 ^A	0,0070 \pm 0,0010 ^{AB}
	8	0,0020 \pm 0,0003 ^B	23,9 \pm 4,1 ^A	0,0057 \pm 0,0004 ^B

§ Moyenne \pm erreur type à la moyenne ; ★ Exprimée en U mg/protéine ; * Exprimée en U g/protéine

*Le chiffre indiqué dans les conditions de l'expérience de transplantation indique la durée de l'exposition (semaine) ; **Ind-Op** = Individu en nage libre dans le lac Opasatica ; **Ref-Op** = Poisson du lac de référence (Opasatica) mis en cage dans le même lac ; **Con-Op** = Poisson du lac de référence transplanté dans le lac contaminé (Dufault).

4.4.2.3. Glutathion-S-transférase

Il n'y a eu ni variation saisonnière ni variation inter lac dans l'activité de la GST musculaire des perchaudes échantillonnées, sauf chez celles capturées dans le lac Opasatica où cette activité était deux fois plus élevée au printemps qu'en

automne (Tableau 10). L'activité de la GST musculaire était quasi identique chez les poissons capturés dans le lac Opasatica et transplantés dans le lac Dufault pendant 1 et 4 semaines comparativement à ceux restés encagés dans leur lac d'origine durant la même période de temps (Tableau 11). Cependant on a noté une baisse significative de plus de deux fois dans ce paramètre lorsque les poissons étaient exposés au Cd pendant 6 semaines dans les conditions contrôlées de laboratoire (Tableau 11).

Chapitre V : Discussion et Intégration des Résultats

5. DISCUSSION ET INTÉGRATION DES RÉSULTATS

L'objectif général de cette étude était d'évaluer à deux niveaux d'organisation biologique l'impact d'une contamination métallique sur le métabolisme des rétinoïdes et sur certains paramètres du stress oxydant, chez les poissons. Ayant comme paramètre toxicologique le stress oxydant, et comme espèce biomonitrice la perchaude, nous voulions comprendre comment ces organismes s'y prennent pour s'adapter à la présence de métaux dits non essentiels (Cd par exemple) en milieu naturel.

Pour atteindre notre objectif, trois approches complémentaires ont été adoptées : (i) une étude spatiale comprenant un aspect saisonnier, dans laquelle les perchaudes ont été échantillonnées dans des lacs représentant un gradient de concentration au Cd principalement; (ii) une étude temporelle, dans laquelle les perchaudes juvéniles ont été collectées dans un lac de référence (faible concentration en Cd dans l'eau et dans les sédiments) puis transplantées dans un lac ayant une concentration en Cd élevée dans l'eau et dans les sédiments, pendant une et quatre semaines; et (iii) une étude de laboratoire, dans laquelle des perchaudes juvéniles provenant d'une aquaculture ont été exposées dans les conditions contrôlées par voie directe au Cd ou au Ni pendant six semaines.

5.1. Bioaccumulation des métaux

Dans la région de Rouyn-Noranda, le Cd s'avère être le principal contaminant d'intérêt puisqu'il est responsable des effets délétères rencontrés chez les organismes vivants de cette région (Borgmann et al., 2004; Campbell et al., 2003; Hare et al., 2008; Rasmussen et al., 2008). En effet, contrairement au Cu, on a observé une très haute

concentration en Cd rénal chez les perchaudes capturées dans les échantillonnages de gradient. Ce résultat témoignerait de son statut d'élément non essentiel et de sa très haute biodisponibilité par comparaison au Cu. Des preuves d'un gradient de concentration en métaux (notamment en Cd) dans les eaux et les sédiments des lacs à l'étude existent dans la littérature (Borgmann et al., 2004, Fortin et al., 2010, Giguère et al., 2004, Hare et Tessier, 1998, Kövecses et al., 2005). Pour cette raison, nous n'avons pas directement mesuré les concentrations en métaux dissous dans les lacs à l'étude. Au cours de toutes ces études donc, nous avons utilisé les concentrations tissulaires métalliques comme étant une indication de l'exposition des perchaudes aux métaux. Étant donné l'importance relative de la diète dans l'internalisation de certains métaux par les perchaudes (Kraemer et al., 2006b), la mesure des concentrations métalliques tissulaires s'avère la plus fiable, par rapport à ne mesurer les concentrations des métaux que dans la matrice (eau, sédiment). Cette approche intègre à la fois les facteurs pouvant affecter la biodisponibilité (chimie de l'eau) et la prise en charge des métaux par voie alimentaire. Plutôt que dans le foie, les concentrations des métaux dans les tissus ont été mesurées dans les reins parce que d'autres analyses ont été priorisées pour le foie. Par ailleurs, certaines études ont montré qu'il existe une corrélation entre les concentrations des métaux dans le rein et dans le foie chez les perchaudes sauvages (Couture et al., 2008a; Kraemer et al., 2005a, b).

Bien qu'un gradient de concentration en Cd rénal soit clairement présent chez les poissons des lacs échantillonnés, avec un facteur de 30, 60 et 32 entre les poissons provenant du lac le plus propre et celui le plus contaminé pour le printemps 2011, le printemps 2012 et l'automne 2012 respectivement, il était moins évident pour le Cu et le Zn. En effet les concentrations de Cu et Zn mesurées dans les reins des perchaudes

des lacs contaminées étaient similaires à celles des lacs de référence. Le Zn et le Cu étant deux métaux essentiels, cela implique que des mécanismes de régulation sont en place pour maintenir une homéostasie interne de ces éléments. Des études distinctes réalisées dans différents tissus des perchaudes sauvages des régions minières du Canada ont rapporté des concentrations similaires en Cu rénal (environ 20 µg/g de poids sec ; Levesque et al., 2002), Cu hépatique et musculaire (en moyenne 38 et 5 µg/g de poids sec, respectivement ; Rajotte et Couture 2002), entre les perchaudes provenant des lacs les plus contaminés en métaux et celles des lacs les moins contaminés. De même, les concentrations de Zn mesurées dans le foie et le muscle étaient aussi comparables entre les poissons des lacs propres et ceux issus des lacs impactés par les métaux (Rajotte et Couture 2002).

Nous avons remarqué qu'il existait un facteur de 2 à 3 dans la concentration en métaux rénal entre les deux printemps, avec des valeurs plus élevées au printemps 2011. Cette différence pourrait être le reflet d'un effet interannuel (revue dans Couture and Pyle, 2011). Cependant, il est difficile de conclure ainsi, car les poissons échantillonnés en 2011 étaient des adultes (taille > 8 cm) alors que ceux de 2012 étaient des juvéniles (taille < 8 cm), suggérant que l'âge jouerait un rôle dans la bioaccumulation des métaux chez les perchaudes. Ces résultats quoique non surprenant contrastent avec la perception générale qui existe quant à l'absence de lien entre la bioaccumulation des métaux (sauf Hg) et l'âge ou la taille des poissons (revue dans Couture and Pyle, 2011). Couture et al. (2008a) ont rapporté que les concentrations en Cd rénal et hépatique augmentaient avec l'âge des perchaudes dans la région de Rouyn-Noranda, mais pas dans la région de Sudbury et que la relation était plus importante dans les reins que

dans le foie. Par contre les concentrations tissulaires de Cu et Zn diminuaient avec l'âge des poissons (Couture et al. 2008a). De même, des corrélations positives entre l'âge et la bioaccumulation du Cd rénal (0,52 ; $p \leq 0,01$), hépatique (0,23 ; $p \leq 0,01$) et branchial (0,22 ; $p \leq 0,01$) chez les perchaudes vivant dans un lac contaminé (Osisko) de la région de Rouyn-Noranda ont été rapportées (Giguère et al., 2004). Cependant, dans cette même étude les métaux essentiels étudiés (Cu et Zn) n'ont montré aucune corrélation entre l'accumulation des métaux dans les trois organes et l'âge des perchaudes, sauf pour la concentration du Cu hépatique où cette relation était très faible (0,12 ; $p \leq 0,05$) (Giguère et al., 2004). Notre étude, conduite pendant deux années consécutives, a montré une augmentation de la concentration tissulaire des métaux en fonction de la taille des poissons, cependant pour spécifiquement établir une relation entre l'âge et la bioaccumulation des métaux (en particulier Cu et Zn), il convient non seulement d'échantillonner à la même période dans la même année et même dans une même région, mais aussi de déterminer l'âge des poissons.

L'échantillonnage durant deux saisons au cours de la même année nous a permis de comparer les concentrations métalliques rénales tout en intégrant les potentielles variabilités physico-chimiques de l'eau, la disponibilité alimentaire, les interactions sociales et même la croissance des perchaudes. Qu'ils soient essentiels ou pas, une variation saisonnière des concentrations des métaux contenus dans les reins des perchaudes a été observée. Par exemple en s'intéressant seulement aux lacs contaminés, il a été constaté que les poissons échantillonnés au printemps 2012 avaient une concentration en métaux tissulaires supérieure à ceux capturés à l'automne 2012, sauf dans le lac Marlon (Ma) où la concentration en Cd rénal était inférieure au

printemps. Une étude compilée des travaux de bioaccumulation des métaux chez les poissons en milieu naturel a montré que l'accumulation de métaux dans les tissus dépend de plusieurs facteurs, notamment la concentration des métaux dans l'eau et/ou dans la diète et leur biodisponibilité dans la chaîne trophique (Luoma and Rainbow, 2005). D'une part, des fluctuations temporelles de la chimie de l'eau pourraient expliquer ces observations, notamment celles de la concentration en carbone organique dissous ou de la concentration des ions H^+ , deux paramètres pouvant influencer la biodisponibilité des métaux, et d'autre part, une variation de concentrations métalliques dans l'eau durant les deux saisons. En accord avec ce postulat, Kraemer et al. (2006a), ont observé des concentrations en Cd dissous de 2 à 3,5 fois plus élevées dans les lacs contaminés au printemps qu'en automne. Par contre aucune différence dans la concentration en carbone organique dissous n'a été notée entre les deux saisons (Kraemer et al., 2006a).

Le taux d'ingestion alimentaire pourrait aussi expliquer ces fluctuations de concentrations rénales des métaux. Au printemps, il serait plus élevé qu'en automne dans les lacs contaminés et traduirait ainsi une probable contamination *via* la diète. L'indice d'embonpoint relatif (Kn), qui donne une indication sur les activités alimentaires récentes des poissons et sur l'accumulation des réserves énergétiques (Lambert et Dutil, 1997), n'était pas plus élevé au printemps qu'en automne dans ces lacs. De même, le poids des *cæca pyloriques*, un autre indicateur de la consommation, était moins lourd chez les poissons capturés au printemps que chez ceux échantillonnés en automne dans le lac Dufault. Ceci laisse présager une prédominance de la contamination par l'eau que par la diète au printemps. Exceptionnellement, chez les

perchaudes du lac Marlon, une concentration en Cd rénal plus importante en automne par rapport au printemps a été observée, coïncidant avec un poids des cæca pyloriques plus lourd durant cette saison.

Pour rappel, dans la région de Rouyn-Noranda, les lacs Opasatica et Dufault choisis pour l'expérimentation de transplantation représentent les lacs ayant l'un des plus grands écarts de concentration en Cd aqueux (environ un facteur 70 ; Giguère et al., 2004) et en Cd sédimentaire avec un facteur pouvant aller jusqu'à 50 entre les deux lacs (Kövecses et al., 2005). En réponse à la différence de concentration en métaux ambiants, nous avons mesuré une accumulation importante de Cd et de Cu, mais pas du Zn dans les reins des perchaudes provenant du lac Opasatica et transplantées dans le lac Du après 4 semaines, comparativement à leurs homologues restés captifs dans leur lac d'origine (Opasatica). Les résultats obtenus suggèrent que 4 semaines d'exposition seraient suffisantes pour qu'il y ait un changement dans l'internalisation rénale du Cd et du Cu en milieu naturel. Notre étude concorde avec celle de Kraemer et al. (2005a), qui ont observé une augmentation des concentrations de Cd rénal à la suite d'une exposition des perchaudes juvéniles issues du lac Op dans le lac Du pendant 30 jours. Cependant, ces auteurs n'ont observé aucune tendance temporelle claire dans l'accumulation du Cu rénal. Le Zn étant un métal essentiel, nous avons interprété l'absence de différence dans la bioaccumulation de ce métal comme étant liée soit à une saturation rapide (contrairement au Cu) des sites d'entrée de cet microélément soit à une régulation interne qui aurait limité la prise en charge du Zn et subséquemment sa bioaccumulation.

Nos résultats combinés à ceux de Kraemer et al. (2005a) suggèrent que l'accumulation tissulaire des métaux ne dépend pas seulement de l'espèce cible, du temps d'exposition ou de la nature du métal d'intérêt, mais également d'autres paramètres.

En milieu naturel, l'influence d'autres facteurs tels que la concurrence pour la nourriture, la température ou l'hypoxie rend difficile l'évaluation des effets réels des métaux chez les poissons sauvages. Des tests complémentaires en laboratoire sont donc requis pour mieux comprendre la signature spécifique du métal sur les réponses biochimiques et moléculaires observées sur le terrain. Afin que ces résultats puissent refléter au mieux le milieu naturel normal, nous avons exposé des poissons à deux concentrations pertinentes pour l'environnement : la première (Cd faible ; 0,8 µg/L) représentait la concentration métallique mesurée dans l'eau des lacs contaminés de la région de Rouyn-Noranda et la seconde (Cd fort ; 8 µg/L), celle qui permettrait en un temps relativement court (6 semaines) d'obtenir une concentration tissulaire en métaux semblable à celle mesurée dans les tissus des perchaudes vivant dans les lacs contaminés. Les résultats montrent que l'accumulation rénale du Cd dissous a été significative pour les deux concentrations étudiées après six semaines d'exposition et la prise en charge du métal était proportionnelle à la concentration d'exposition. Tel que prévu, les poissons exposés à la plus grande concentration en Cd avaient des valeurs en Cd rénal comparables à celles mesurées dans l'étude de variation saisonnière et dans les tissus des perchaudes vivant dans les lacs pollués (Bourret et al., 2008; Kraemer et al., 2006a). Cependant en comparant les valeurs avec celles obtenues en milieu naturel il ressort que l'état stationnaire n'était pas toujours atteint même après six semaines d'exposition à la plus petite concentration. Ce résultat renforce davantage

l'idée selon laquelle la diète a une importance relative dans la prise en charge du Cd chez les poissons et corrobore celui de Harrison et Klaverkamp (1989) qui ont montré que les truites exposées au Cd par voie directe accumulaient relativement moins de Cd que celles exposées au même métal par voie alimentaire.

5.2. Effet d'une contamination métallique sur le métabolisme des rétinoïdes

Possédant une structure semblable à celle du rétinol, les rétinoïdes, plus connus sous le nom de vitamine A, sont des molécules naturelles ou synthétiques susceptibles d'exercer une activité biologique (Debier and Larondelle, 2005; Novák et al., 2008). Ils jouent un rôle important dans la croissance, le développement, la différenciation cellulaire, le système immunitaire, la reproduction et la vision (revue dans D'Ambrosio et al. (2011), Debier et Larondelle (2005), Novák et al. (2008)). Certaines formes comme le rétinol, le déhydrorétinol et leurs esters exercent des propriétés antioxydantes dans la cellule (Miller et al., 2009, Rodríguez-Estival et al., 2011a, b) et peuvent de ce fait être utilisées comme des biomarqueurs d'une exposition aux contaminants (Boily et al., 2004). Il existe plusieurs formes de rétinoïdes chez les poissons, cependant la prévalence et l'abondance des différentes formes dépendent des traits biologiques du poisson par exemple ses habitudes alimentaires, son potentiel migratoire ou son habitat (Goswani et Barua, 1981). Selon une classification faite par ces auteurs, les poissons peuvent être catégorisés en deux groupes à savoir : les poissons de type rétinol (vitamine A₁) et les poissons de type déhydrorétinol (vitamine A₂). La perchaude appartient à cette dernière catégorie.

5.2.1. Effet sur les concentrations des métabolites

5.2.1.1. Foie

Dans nos différentes investigations, les formes all-trans-3,4- didéhydrorétinoïdes (vitamine A₂) ont constitué les molécules prédominantes de vitamine A analysées dans les tissus des perchaudes. Dans les études spatiales (de gradient), l'accumulation des métaux dans les reins et notamment le Cd s'est accompagnée d'une augmentation des concentrations des métabolites des rétinoïdes hépatiques analysés (déhydrorétinol, déhydrorétinyl palmitate et d'autres formes d'esters). Nous avons alors interprété ce constat comme étant une nécessité pour la cellule de lutter contre le stress oxydant induit par la présence du Cd. Mais cette augmentation était beaucoup plus importante chez les perchaudes adultes que chez les perchaudes juvéniles. S'il est attesté que la prise des rétinoïdes se fait par l'entremise des aliments, il est aussi avéré que les perchaudes sauvages changent de régime alimentaire au cours de leur croissance (Kövecses et al., 2005). Il serait facile de conclure que la hausse dans les concentrations des rétinoïdes obtenue dans le foie des perchaudes adultes serait due non pas à une présence accrue de Cd mais exclusivement à une plus grande prise de rétinoïdes dans l'alimentation. Mais en échantillonnant toujours au printemps les perchaudes juvéniles de l'année susceptibles de maintenir plus ou moins un même régime alimentaire (zooplanctivore) dans les lacs propres ou contaminés (Sherwood et al., 2002), nous sommes arrivés à la même conclusion. L'importante hausse des concentrations des rétinoïdes dans le foie des perchaudes adultes est probablement attribuable à une combinaison de facteurs incluant l'âge, la quantité et qualité de la diète, mais aussi la présence d'une concentration élevée en Cd dans les tissus. Pour une analyse intégrée et afin de déterminer l'influence de la diète dans les concentrations

des rétinoïdes tissulaires, il serait important de mesurer les concentrations de rétinoïdes présentes dans les contenus stomacaux des perchaudes.

Dans une autre mesure, une hausse des concentrations des rétinoïdes hépatiques pourrait s'expliquer par le fait que les métaux (principalement le Cd) inhiberaient la synthèse de l'acide déhydrorétinoïque ou du déhydrorétinal, les deux principales formes biologiquement actives des déhydrorétinoïdes. Dans leur étude de terrain sur l'impact des métaux sur le transcriptome chez les perchaudes sauvages, Pierron et al. (2011) ont observé que le niveau de transcription de plusieurs gènes contrôlés par l'acide rétinoïque à savoir la rétinol déshydrogénase (RDH), l'alcool déshydrogénase (ADH) et l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), avait diminué chez les perchaudes exposées au Cd en permanence au cours de leur vie. Les esters de déhydrorétinol mesurés dans le foie des perchaudes proviennent non seulement de la conversion *in situ* du déhydrorétinol, mais aussi de l'intestin *via* les chylomicrons (Gesto et al., 2012a). Donc l'accumulation des rétinoïdes dans le foie des perchaudes vivant dans les milieux impactés par le Cd serait due à une incapacité du foie à métaboliser les esters de déhydrorétinol en provenance de l'intestin, et l'inhibition de la synthèse de l'acide déhydrorétinoïque aurait entraîné l'accumulation du déhydrorétinol dans le foie. Une inhibition de l'expression de 11-*cis*-rétinol déshydrogénase a eu pour conséquence l'accumulation du rétinol et du rétinyl esters dans les cellules visuelles des souris (Driessen et al., 2000). En outre, chez les souris mutantes dépourvues du gène *adh-1* (alcool déshydrogénase) on a observé une hausse des concentrations de rétinol et du rétinyl esters coïncidant avec une baisse importante d'acide rétinoïque (Molotkov et al., 2004) dans le foie de ces souris.

L'échantillonnage au printemps et en automne de la même année a permis d'observer une très forte variabilité saisonnière dans les concentrations de ces métabolites avec en général des valeurs plus élevées au printemps. Ceci serait dû à un facteur ou à une combinaison de facteurs incluant une variabilité temporelle de la concentration tissulaire en métaux, une faible concentration de rétinoïdes ou de caroténoïdes (précurseurs de vitamine A) dans les aliments des perchaudes, un effort élevé de capture de la proie, un manque de proie ou un stockage de la vitamine A dans d'autres tissus que le foie (Gesto et al. 2012b), tel que les gonades pour leur maturation. À notre connaissance, bien que des effets délétères dans l'accumulation saisonnière des réserves énergétiques chez les perchaudes aient été rapportés (Levesque et al., 2002), aucune étude avant celle-ci n'a fait état d'un lien entre les fluctuations temporelles en métaux tissulaires et le stockage des rétinoïdes chez cette espèce de poisson.

Au cours des expositions des poissons soit en milieu naturel à un cocktail de métaux dont le Cd dissous à une concentration élevée durant 4 semaines ou en laboratoire au Cd durant 6 semaines, nous avons obtenu un effet contraire comparativement aux expositions chroniques suivant un gradient de concentration polymétallique. Ces résultats laissent présager que les concentrations des métabolites des rétinoïdes hépatiques seraient influencées par le temps d'exposition, le type de proies ou la différence dans le régime alimentaire (labo *versus* terrain). En effet les concentrations de déhydrorétinol, de déhydrorétinyl palmitate et d'esters totaux de vitamine A ont diminué à la suite d'une exposition aux métaux. Ces résultats suggèrent que les métaux exercent des effets délétères sur les concentrations des métabolites de rétinoïdes dans le foie. Certaines similitudes existent entre les deux expérimentations temporelles par

exemple la concentration aqueuse d'exposition au Cd en milieu naturel était la même que celle utilisée dans un groupe de poisson au laboratoire (0,8 µg/L), le temps d'exposition était relativement pareil (6 et 4 semaines respectivement), le bruit de fond de la concentration en Cd rénal était pareil dans les deux groupes de poissons lors du démarrage des expérimentations et les concentrations de Cd bioaccumulé au terme des deux investigations étaient comparables avec le groupe de poisson exposé à 0,8 µg/L au laboratoire. Bien que le type d'exposition soit soudain dans les deux cas, la concentration métallique d'exposition diminuerait avec le temps d'exposition au laboratoire alors qu'en milieu naturel les poissons sont le plus souvent exposés à une concentration relativement stable. Afin de minimiser cette éventualité, un ajustement quasi hebdomadaire de la concentration d'exposition était fait dans l'expérimentation de laboratoire. Cependant une différence importante demeure dans la voie d'exposition qui le plus souvent est directe en laboratoire contre une voie mixte (l'eau et la nourriture) couplée à plusieurs facteurs stressant (cocktail de métaux, disponibilité alimentaire) en milieu naturel.

Plus spécifiquement, en ce qui concerne les expositions au laboratoire, même si les concentrations de toutes les formes de rétinoïdes étaient faibles à la petite concentration d'exposition au Cd (0,8 µg/L) (par comparaison aux individus témoins), nous avons trouvé intéressant qu'à la grande concentration d'exposition au Cd (8 µg/L), ces concentrations de rétinoïdes remontent pour être comparables aux grandeurs mesurées chez les individus contrôles. C'est comme si, à 0,8 µg/L la perchaude n'a pas vraiment mis en branle toute sa capacité à détoxiquer le Cd, alors qu'à 8 µg/L les perchaudes se sont « réveillées » et ont réussi à éliminer le Cd.

Fort de ce qui précède, les études de terrain combinées à celles de laboratoire nous permettent de suggérer que le Cd serait le principal métal responsable des effets sur les concentrations des rétinoïdes dans le foie des perchaudes en milieu naturel. Afin d'évaluer les effets des métaux traces sur le métabolisme des rétinoïdes, une comparaison des réponses de sept espèces différentes de poissons parmi ceux vivant dans un milieu propre et ceux vivant dans un milieu recevant des effluents miniers de Fe a été effectuée (Pereira et al., 2012). Les auteurs ont observé une corrélation positive entre les concentrations hépatiques de Fe, de Cu et de Zn et la concentration de rétinol dans le foie. Par contre une association entre une exposition à des concentrations élevées en Al, As et Cd et une faible concentration de déhydrorétinol et de déhydrorétinyl palmitate a également été observée (Pereira et al., 2012). Ce résultat suggère que d'autres facteurs tels que l'espèce cible ou la nature du métal peuvent influencer l'impact des métaux sur le métabolisme des rétinoïdes (Chapitre 8).

5.2.1.2. Plasma

Dans les conditions normales, les rétinoïdes sont estérifiés sous leur forme inactive telle que le déhydrorétinyl palmitate et principalement stockés dans le foie. Cependant en fonction de la prise en charge de la vitamine A alimentaire et des besoins physiologiques, ces esters peuvent être hydrolysés et transportés vers des tissus extra hépatiques sous leur forme libre (déhydrorétinol) *via* la circulation sanguine (Branchaud et al., 1995). Tout comme nous avons noté pour les concentrations de rétinoïdes hépatiques, j'ai relevé que les perchaudes issues des lacs les plus contaminés en métaux avaient une forte concentration plasmatique en dROH. Ces résultats suggèrent que les concentrations des rétinoïdes plasmatiques dépendent des niveaux de

rétinoïdes présents dans le foie. L'augmentation du niveau de dROH dans le plasma en même temps que son niveau dans le foie traduirait l'ampleur de la lutte contre le stress oxydant induit par le Cd. Ce résultat est en accord avec les travaux de Pierron et al., (2011), qui ont observé une corrélation positive entre la concentration de Cd hépatique et le niveau de transcription du gène codant pour la synthèse de la transthyréline (TTR), protéine impliquée dans le transport du rétinol plasmatique vers les organes extra hépatiques, dans le foie des perchaudes vivant dans les lacs contaminés aux métaux, probablement dans le but de stimuler une synthèse accrue de la TTR qui serait inhibée par le Cd. Sans surprise, nous avons observé une baisse dans le rapport dROH plasmatique : dROH hépatique chez les perchaudes vivant dans les lacs les plus contaminés, ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle la synthèse de la TTR ou son action de liaison au rétinol serait perturbée par le Cd.

Plus spécifiquement dans l'expérimentation de laboratoire, où nous avons exposé les perchaudes uniquement au Cd et donc à un seul facteur stressant par opposition au milieu naturel (plusieurs facteurs stressant), nous avons noté une baisse dans les concentrations de dROH plasmatique. Ce résultat bien qu'en accord avec notre hypothèse pourrait aussi signifier que soit le Cd inhiberait de la synthèse des protéines de liaison du rétinol (RBP), soit il interférerait à l'action de liaison du dROH au RBP, soit il entraverait la liaison du complexe dROH-RBP à la TTR qui joue un rôle de protection contre la dégradation de ce complexe au cours de son transfert vers les cellules extra-hépatiques (Berry et al., 2012).

5.2.1.3. Muscle

Contrairement aux observations faites au niveau du foie, l'extrait musculaire a révélé que le déhydrorétinyl stéarate était la seule forme d'ester majeure analysée dans le muscle des perchaudes. Mais probablement en fonction des variations des besoins en vitamine A de ces tissus, les concentrations de rétinoïdes étaient beaucoup plus faibles dans le muscle que dans le foie. Dans notre étude, les concentrations de dROH musculaire étaient élevées chez les poissons échantillonnés dans les lacs contaminés durant les deux saisons, suggérant probablement le rôle des rétinoïdes dans la lutte contre le stress oxydant engendré par les métaux. Une baisse de la concentration du déhydrorétinyl stéarate musculaire beaucoup plus marquée au printemps a également été constatée. Ce résultat révèle qu'une exposition aux métaux en milieu naturel a des effets néfastes sur le stockage des rétinoïdes musculaires. Toutefois, une variation saisonnière des concentrations de ces métabolites a été observée entre les deux saisons, avec des valeurs plus élevées au printemps sauf dans le lac Dufault. Cette fluctuation saisonnière serait une fois de plus engendrée par une combinaison de facteurs inhérents à la variation temporelle soit des ressources alimentaires soit des concentrations des métaux dans l'eau et/ou de la diète. Dans l'expérimentation de transplantation de même que dans celle conduite au laboratoire, nous avons observé une diminution des concentrations des deux formes de déhydrorétinoïdes musculaires analysées chez les perchaudes exposées aux métaux. D'après nos connaissances, cette étude est la toute première à établir un lien entre le stockage ou la libération des rétinoïdes musculaires et l'accumulation des métaux chez les poissons. Il ressort de l'analyse des données recueillies que le déhydrorétinyl stéarate est la principale forme de stockage des rétinoïdes musculaires chez les perchaudes et que les métaux

altèreraient les activités des enzymes responsables de l'hydrolyse et/ou de l'estérification des rétinoïdes dans le muscle.

5.2.2. Effet des métaux sur la proportion de dROH libre et sur les activités enzymatiques de la REH et la LdRAT

Le rapport de la forme libre sur la forme estérifiée des rétinoïdes (pourcentage) est considéré comme un indice du métabolisme de stockage ou de la libération des rétinoïdes dans le foie (Boily et al., 2005). Lorsque ce pourcentage est élevé, cela indique une stimulation des enzymes responsables de l'hydrolyse des esters de rétinol (REH) alors qu'une baisse de ce pourcentage traduirait une inhibition de l'activité de cette enzyme. Bien que nous ayons mis en évidence une augmentation de la concentration des métabolites rétinoïdiens (dROH et déhydrorétinyl palmitate) dans le foie des poissons vivant en permanence dans des lacs contaminés, une baisse du pourcentage de dROH hépatique a été observée dans ces lacs. L'examen des résultats obtenus dans la baisse du pourcentage du déhydrorétinol hépatique chez les poissons exposés aux Cd en milieu naturel traduirait une conséquence directe de l'inhibition des activités des enzymes impliquées dans l'hydrolyse des esters (REH). Cette interprétation est en accord avec la baisse observée dans le pourcentage du ROH hépatique chez les ouaouarons exposés aux pesticides en milieu naturel (Boily et al., 2005), bien que les deux types de contaminants soient différents. Par contre, toujours chez ces poissons, une hausse relative de ce pourcentage a été observée dans le muscle. Ce résultat serait quant à lui relié à une inhibition des activités des enzymes responsables de l'estérification du déhydrorétinol (LdRAT). La LdRAT est une enzyme qui convertit le déhydrorétinol en déhydrorétinyl ester et donc une perturbation de son

activité pourrait entraîner une accumulation accrue de déhydrorétinyl ester dans le tissu. Ce résultat concorde avec les travaux de (Rodríguez-Estival et al., 2011a) qui ont noté une hausse du pourcentage de rétinol hépatique suite à une exposition des cerfs et les sangliers au Pb en milieu naturel.

Bien que nous n'ayons pas observé un changement significatif du pourcentage du dROH libre dans le foie après 6 semaines d'exposition des perchaudes au Cd, une augmentation des activités de ces deux enzymes dans ce tissu a été notée. Une hausse des activités de la REH signifie une plus grande conversion du rétinyl palmitate en rétinol et donc un mécanisme compensatoire pour mieux juguler le stress oxydant induit par le Cd. Certaines études utilisant le rétinol comme substrat ont rapporté des effets délétères des pratiques agricoles sur les activités de la LRAT chez les ouaouarons (Boily et al., 2009) et des polluants organiques chez les poissons (Ndayibagira et Spear, 1999). Mais à notre connaissance, la présente étude est la première à utiliser le dROH comme substrat pour l'analyse des impacts des métaux sur l'estérification des rétinoïdes chez les vertébrés. L'augmentation des activités de la LdRAT serait liée à une forte conversion du dROH en déhydroretinyl palmitate (antioxydant) dans l'optique de lutter potentiellement contre le stress oxydant induit par une exposition des perchaudes au Cd.

5.2.3. Effet des métaux sur l'expression de la *rdh-2*

En réponse à la baisse des activités des enzymes impliqués dans le métabolisme des rétinoïdes (baisse du pourcentage de dROH libre), nous avons constaté une augmentation du niveau de transcription de la *rdh-2* dans le foie des perchaudes capturées dans les lacs contaminés aux Cd au printemps, mais pas en automne,

probablement dans le but de maintenir la disponibilité en vitamine A à un niveau viable. Ce résultat, bien qu'illustrant davantage les mécanismes mis en place pour combattre le stress oxydant induit par les métaux, contraste avec les récents travaux où une corrélation négative entre le niveau de transcription du gène *rdh-2* et les concentrations en Cd hépatique chez les poissons chroniquement exposés aux métaux en milieux naturels a été observée (Pierron et al., 2011). Même si certains lacs échantillonnés étaient communs dans les deux études et les perchaudes analysées capturées durant les mêmes saisons (printemps), les concentrations de métaux accumulés étaient néanmoins au minimum deux fois supérieures dans l'étude de Pierron et al. (2011) que les concentrations en métaux tissulaires dans la présente étude. Ces résultats suggèrent qu'au cours d'une exposition chronique et permanente à un cocktail de métaux en milieu naturel, le niveau de transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des rétinoïdes serait fonction des concentrations métalliques accumulées dans les tissus.

L'observation d'une baisse du niveau de transcription de la *rdh-2* hépatique en concordance avec une baisse du pourcentage du dROH libre dans l'expérimentation de transplantation traduit encore un impact négatif du Cd sur le métabolisme des rétinoïdes à deux niveaux d'organisation biologique. Cet abaissement du niveau de transcription de la *rdh-2* en comparaison avec la hausse observée dans l'expérimentation de gradient permet vraisemblablement d'expliquer que le temps d'exposition au Cd influence aussi l'expression de ce gène. Conformément à notre hypothèse selon laquelle une augmentation des activités de la REH et la LdRAT offre une protection accrue contre le stress oxydant induit par le Cd, nous avons observé une augmentation du niveau de transcription de la *rdh-2* dans le foie des perchaudes issues de l'expérimentation au

laboratoire. Nous avons interprété cette divergence de réponse entre les deux expérimentations comme pouvant être liée à la présence d'un seul agent stressant au laboratoire (Cd), contre une combinaison de plusieurs facteurs stressants en milieu naturel (par exemple la présence d'un cocktail de métaux, une exposition à deux voies).

5.3. Effet d'une contamination métallique sur la réponse au stress oxydant

Le deuxième volet de notre projet de recherche consistait en l'évaluation de l'impact des métaux sur certains biomarqueurs traditionnellement impliqués dans la réponse au stress oxydant.

5.3.1. Échantillonnage suivant un gradient de concentration métallique

5.3.1.1. Foie

En comparant les réponses des poissons des lacs propres à ceux des lacs contaminés au printemps, on constate que l'activité de la CAT hépatique chez les poissons vivant en permanence dans les lacs contaminés au Cd était élevée alors que celle de la SOD était faible. Le foie joue un rôle de premier plan dans la lutte contre le stress oxydant induit par des polluants chimiques chez les poissons (Benedetti et al., 2007). L'interprétation faite de cette réponse opposée entre les deux biomarqueurs traduirait une parfaite corrélation négative entre les activités de la SOD et de la CAT. C'est-à-dire qu'une hausse de l'activité de la SOD sera suivie d'une baisse de l'activité de la CAT et vice versa (Cao et al., 2012; Qu et al., 2014). Une justification à ce constat est qu'une augmentation de l'activité de la SOD entraînerait une accumulation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui inhiberait l'action de la CAT. Par contre la capacité de dégrader

le H₂O₂ par la CAT augmente lorsque l'activité de la SOD est faible (Qu et al., 2014). En effet leurs fonctions dans le contrôle des ERO sont liées. À titre d'exemple, la SOD catalyse la dismutation du superoxyde en dioxygène et H₂O₂ toxique alors que la CAT va dégrader le H₂O₂ en molécule d'eau et en oxygène. En même temps ce résultat dénote une synergie ou une coopération entre les deux voies métaboliques qui constituent les premières lignes de défense vitale de la cellule contre le stress oxydant (Asagba et al., 2008). L'inhibition de l'activité de la SOD, bien que contre-intuitive, peut aussi s'expliquer par un déséquilibre entre la génération des ERO (plus rapide) et la production de la SOD (moins rapide) (Qu et al., 2014), puisque l'activité de la SOD augmente normalement avec la production des ERO (Qu et al., 2014). Contrairement à la *cat*, le niveau de transcription de la *Cu/Zn sod-1* hépatique était élevé chez les poissons capturés dans les lacs contaminés par rapport à ceux provenant des lacs « propre ». La réponse positive à un seul niveau d'organisation biologique traduirait une régulation qui se fait au niveau catalytique (CAT) et au niveau moléculaire (SOD) dans l'exposition chronique des poissons sauvages aux métaux. L'augmentation du niveau de transcription de la *Cu/Zn sod-1* bien que contrastant avec les résultats de Pierron et al. (2009) qui ont observé une baisse du niveau de transcription de ce gène dans le foie des perchaudes vivant dans les lacs impactés par le Cd, pourrait être attribuable à la forte concentration tissulaire en métaux (Cd et Cu) observée dans leur étude comparativement à la mienne.

L'exposition des perchaudes aux métaux en milieu naturel dans les échantillonnages de gradient polymétallique a induit une augmentation de l'expression de la *g6pdh* hépatique suivie d'une augmentation de l'activité de la G6PDH. Typiquement les réponses transcriptomiques devraient se traduire en des réponses biochimiques

(Nikinmaa and Rytönen, 2011), ce qui a été le cas pour la G6PDH dans cette étude. Les réactions synchroniques obtenues dans les réponses moléculaires et biochimiques de la G6PDH expriment un besoin de mieux lutter contre le stress oxydant causé par la présence des métaux. Ce résultat suggère aussi que dans un environnement contaminé par les métaux, la régulation de la voie métabolique de la G6PDH se ferait aux deux niveaux d'organisation biologique. Levesque et al. (2002), ont rapporté que l'activité de la G6PDH hépatique était faible chez les perchaudes vivant dans les lacs les plus contaminés en métaux, en été, mais cette activité restait élevée comparativement à celle de leurs homologues capturés en automne de la même année (Levesque et al., 2002). Première enzyme dans la voie des pentoses phosphates, la G6PDH catalyse la conversion du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate avec production de la NADPH et est indispensable dans le maintien du niveau de NADPH cytosolique (Ho et al., 2007) nécessaire pour la formation du glutathion réduit, qui à son tour joue un rôle dans la protection contre les dommages oxydatifs (Efferth et al., 2006). Contrairement aux trois voies métaboliques précédentes où on a observé au moins à un niveau d'organisation biologique une réponse antioxydante suite à une exposition des perchaudes aux métaux en milieu naturel, aucune différence inter-lac au cours de la même saison n'a été observée dans la réponse de la GST hépatique, que ce soit au niveau transcriptomique ou au niveau enzymatique. Ce paramètre ne serait donc pas un bon biomarqueur de la réponse au stress oxydant chez les poissons sauvages chroniquement exposés aux métaux.

5.3.1.2. Muscle

De tous les biomarqueurs de la réponse au stress oxydant dans le muscle, aucun n'a répondu à une exposition des poissons aux métaux dans l'échantillonnage de gradient polymétallique. Une interprétation à l'absence de réponse des biomarqueurs du stress oxydant dans le muscle est que, après leur prise en charge, les métaux sont transportés en grande partie directement aux organes ayant des capacités de détoxification élevées tels que le foie et les reins. La faible accumulation de métaux dans le muscle par rapport à d'autres tissus précédemment rapportée chez les perchaudes sauvages (Rajotte et Couture, 2002) suggère que le muscle pourrait être moins susceptible au stress oxydant ou aurait des besoins de défense antioxydante limités, ou que ce tissu serait métaboliquement moins actif.

5.3.2. Expérimentation de transplantation en milieu naturel

5.3.2.1. Foie

Dans l'expérimentation de transplantation des poissons d'un lac « propre » vers un lac contaminé, nous avons observé une diminution de l'activité de la CAT après 4 semaines d'exposition au Cd sans qu'il y ait un changement significatif de l'expression de ce gène. Par contre, bien que le niveau de transcription de la *Cu/Zn sod-1* hépatique ait augmenté chez ces poissons, ceci n'a pas conduit à un changement de l'activité de la SOD. Ce résultat suggère que la régulation à la hausse de l'expression de la *Cu/Zn sod-1* avait pour but de maintenir les capacités antioxydantes de la SOD. Ces résultats, quoique différents de ceux obtenus dans l'échantillonnage suivant un gradient de concentration métallique ne sont pas surprenants. En effet, nonobstant le fait que les poissons proviennent tous d'un même macro-environnement, le mode et le temps

d'exposition sont différents dans les deux études. Pour les échantillonnages de gradient, l'exposition était permanente et chronique, alors qu'elle était soudaine et temporelle dans l'expérimentation de transplantation. En inhibant une ou plusieurs enzymes impliquées dans la lutte contre le stress oxydant, le Cd est connu comme un métal pouvant induire un stress oxydant (Hsu et al., 2013; Kubrak et al., 2013). L'inhibition observée de la CAT est donc logique et conforme avec d'autres travaux. En effet suite à une exposition chronique aux métaux en milieu naturel, les perchaudes des lacs contaminés de la région de Rouyn-Noranda présentaient une faible concentration de la malondialdéhyde et une diminution de l'activité de la glutathionne réductase hépatique (Giguère et al., 2005). Ces auteurs ont lié cette baisse à une augmentation de la concentration des MTs qui auraient alors réagi avec les ERO, protégeant ainsi la cellule contre le stress oxydant. En accord avec l'hypothèse formulée, ce résultat suggère aussi que d'autres mécanismes peuvent intervenir dans la capture des ERO générées par les métaux dans le foie. Les MTs sont des protéines non-enzymatiques riches en cystéine et ayant une forte affinité pour les ERO et qui contribuent à la détoxification cellulaire des métaux (Amiard et al., 2006; Viarengo et al., 2000). Par ce mécanisme, les MTs pourraient être considérées comme faisant partie du système de défense antioxydante cellulaire (Uren Webster et al., 2013). Cependant, nous n'avons constaté aucune différence du niveau de transcription de la *mts-1* hépatique des poissons exposés aux métaux comparativement à leurs homologues restés captifs dans leur lac d'origine (Annexe I).

Tout comme dans l'exposition des perchaudes aux métaux dans les échantillonnages de gradient polymétallique, une augmentation de l'expression de la *g6pdh* hépatique

suivie d'une augmentation de l'activité de la G6PDH a été obtenue dans l'expérimentation de transplantation. L'exposition temporelle des poissons aux métaux en milieu naturel a aussi induit une augmentation du niveau de transcription de la *mgst-3* hépatique accompagnée d'une réponse catalytique (augmentation de l'activité de la GST) traduisant une réponse synchrone à la neutralisation des ERO produites par une exposition aux métaux (Uren Webster et al., 2013). La GST contribue à la détoxification cellulaire en favorisant l'excrétion des ERO. Plus spécifiquement, elle catalyse la réaction de conjugaison du glutathion réduit (GSH) avec des composés xénobiotiques électrophiles les rendant plus hydrosolubles (Elia et al., 2006). Nos données suggèrent que lorsqu'une exposition des poissons à des concentrations de métaux pertinentes pour l'environnement est limitée dans le temps, une protection contre le stress oxydant s'opère au moins au niveau de la transcription *via* le métabolisme du glutathion (Kowara et al., 2005).

5.3.2.2. Muscle

Une augmentation des activités de la CAT et de la SOD musculaires a été observée dans l'expérimentation de transplantation des poissons en milieu naturel. De toute évidence l'augmentation des activités de ces enzymes antioxydantes révèle une réponse à une probable forte présence des ERO dans le muscle et laisse présager que le muscle serait aussi susceptible (mais dans une mesure moindre que le foie) au stress oxydant induit par les métaux en milieu naturel.

5.3.3. Expérimentation dans les conditions contrôlées de laboratoire

Contrairement aux poissons capturés dans la région de Rouyn-Noranda, pour les expérimentations de terrain les poissons utilisés au laboratoire provenaient de Trois-Rivières.

5.3.3.1. Foie

Six semaines d'exposition des perchaudes au Cd en laboratoire n'ont pas significativement affecté l'activité de la SOD dans le foie. Par contre une exposition de 4 h a suffi pour augmenter cette activité dans le foie des daurades royales (*Sparus aurata*) exposées à une concentration en Cd plutôt forte (0,5 mg Cd/L) (Souid et al., 2013), suggérant qu'à la suite d'une exposition au Cd, la réponse de la SOD dépend du temps d'exposition, de la concentration du polluant et/ou de l'espèce d'intérêt. Par contre, l'exposition des perchaudes aux métaux en laboratoire a induit une augmentation du niveau de transcription de la *cat* et de la *g6pdh* hépatique suivie d'une augmentation des activités de la CAT et de la G6PDH. De même, une augmentation du niveau de transcription de la *mgst-3* hépatique a été observée, mais aucune différence dans l'activité catalytique n'a été notée. Bien que certaines similitudes existent entre les deux expérimentations temporelles, la différence d'origine pourrait expliquer certaines disparités obtenues dans la réponse des enzymes antioxydantes analysées dans les deux types d'expositions temporelles. Nous pourrions aussi spéculer en argumentant que l'influence de plusieurs facteurs (par exemple, la présence d'un mélange complexe de métaux ; une température et une disponibilité alimentaire variables) qui agissent dans l'environnement naturel fait que la réponse des biomarqueurs du stress oxydant soit différente entre le milieu naturel et le laboratoire.

5.3.3.2. Muscle

Par comparaison au groupe contrôle (non exposé), une diminution de l'activité de la GST musculaire a été observée chez les perchaudes exposées à la plus grande concentration au Cd (8 µg/L) en laboratoire. Une baisse dans l'activité de la GST en concordance avec une exposition au Cd illustre le fait que cette enzyme subit des effets délétères à la suite d'une pollution métallique (Benedetti et al., 2009). Une diminution de l'activité de certaines enzymes antioxydantes est aussi souvent compensée par une augmentation des activités d'autres enzymes antioxydantes, faisant de ce fait une preuve de l'existence de mécanismes alternatifs d'enlèvement des ERO (Regoli et al., 2011). De plus les enzymes antioxydantes agissent soit en coopération, soit en synergie afin d'assurer une protection optimale contre le stress oxydant (Bagnyukova, 2006).

Par contre aucune différence dans les activités de la SOD et la CAT n'était notable dans le muscle des perchaudes exposées au laboratoire pendant 6 semaines par rapport aux individus non exposés. Bien qu'aucune différence dans le niveau de transcription de la *mts-1* n'ait été mesurée dans le muscle de ces poissons (Tableau 2 ; annexe J), ce résultat serait probablement lié à une protection accrue exercée par les ligands intracellulaires comme les métallothionéines, qui auraient capté les métaux et minimisé ainsi leurs effets. Même si dans la présente étude nous n'avons observé aucun effet sur la *mts-1*, Pierron et al. (2009) ont observé que les perchaudes vivant dans les environnements contaminés par les métaux dans la région de Rouyn-Noranda avaient un niveau de transcription de la *mts* musculaire plus élevé que leurs homologues des lacs « propres ».

5.4. Implication d'un changement du niveau de transcription sur les réponses biochimiques

L'analyse de nos résultats a montré une très bonne concordance entre les réponses transcriptomiques et biochimiques de certaines voies métaboliques du foie. Par exemple une augmentation du niveau de transcription de la *rdh-2* et de la *cat* a été suivie respectivement par une hausse dans l'activité de la REH et de CAT lorsque les poissons étaient exposés au Cd dans les conditions contrôlées de laboratoire. De même en milieu naturel une exposition à un cocktail de métaux a induit une augmentation de l'expression de la *g6pdh* suivie d'une augmentation de l'activité de G6PDH. Cette observation correspond à la réponse typique attendue entre les deux niveaux d'organisation biologique (Nikinmaa et Rytönen, 2011). Cependant étant donné les différentes étapes de régulation qui existent entre les deux processus, cette réponse synchronique n'est pas toujours observée (Regoli et al., 2011). Par exemple aucun changement dans l'activité de la SOD n'a été observé alors que le niveau de transcription de la *Cu/Zn sod-1* hépatique a augmenté chez les poissons transplantés. Ce résultat n'est pas surprenant puisque, contrairement aux cellules procaryotes où la transcription est couplée à la traduction, il existe une différence temporelle entre ces deux processus dans les cellules eucaryotes (Giuliani et al., 2013). De plus, les relations entre les réponses moléculaires et enzymatiques dépendent de plusieurs paramètres incluant la nature du tissu, le mode d'exposition, l'intensité du facteur stressant et l'activation des facteurs de transcription (Nikinmaa et Rytönen, 2011; Regoli et al., 2011). Cette relation entre les deux processus va aussi dépendre de la quantité de la protéine en question préexistante dans la cellule. En clair, bien que nos données

montrent une cohérence entre l'expression des gènes et l'activité catalytique correspondante, une réponse asynchrone peut aussi s'observer entre les deux processus (Henrik Hansen et al., 2007), suggérant qu'un changement dans le niveau de transcription d'un gène n'implique pas toujours une modification dans l'activité de l'enzyme correspondante (Giuliani et al., 2013; Regoli et al., 2011).

Nous pouvons nous poser la question suivante : est-il nécessaire d'étudier parallèlement l'impact d'une contamination métallique sur l'expression des gènes et sur l'activité des enzymes correspondantes ? Ou bien quel est le meilleur biomarqueur d'effet d'une exposition des métaux sur le métabolisme des rétinoïdes et sur la réponse au stress oxydant ? Bien qu'il soit important de prendre en compte les informations moléculaires et fonctionnelles dans la conception de certaines études, notamment génomique (Furlong, 2011), au lieu de simplement discuter des implications fonctionnelles sur la base des données moléculaires (Nikinmaa et al., 2013), nos résultats font penser qu'en fonction du type d'exposition, du tissu analysé, et de la voie métabolique, une étude à un seul ou à deux niveaux d'organisation biologique chez la perchaude est nécessaire. Par exemple en prenant la G6PDH hépatique comme biomarqueur, l'étude pourrait se faire soit au niveau moléculaire soit au niveau biochimique selon les conditions d'exposition utilisées dans cette étude. Par contre il serait nécessaire d'utiliser les deux niveaux d'organisation biologique pour évaluer l'impact d'une contamination chronique des métaux sur les perchaudes sauvages si la SOD est choisie comme biomarqueur.

5.5. Stratégies qu'utilisent les perchaudes pour s'adapter et vivre dans un milieu naturel perturbé par les métaux

Nous avons aussi interprété l'observation selon laquelle les perchaudes sauvages vivant continuellement dans un milieu perturbé par les métaux ont certains paramètres du métabolisme des rétinoïdes plus élevés (par exemple une concentration en déhydrorétinol) que leurs homologues des milieux propres comme une réponse sélective à la contamination. En effet, par une acclimatation physiologique ou une adaptation, ces poissons auraient acquis une certaine tolérance aux métaux (Cd notamment). Une telle interprétation est conforme avec des études précédentes sur la même espèce, où, par exemple, la sélection allélique des gènes qui augmenterait le *fitness* des perchaudes vivant dans les lacs contaminés aux métaux (Bélanger-Deschênes et al., 2013), l'augmentation de l'activité de la nucléoside diphosphate kinase (NDPK), indicatrice des capacités biosynthétiques chez les perchaudes indigènes de la région de Sudbury (Rajotte and Couture, 2002) ou la capacité relativement importante de tolérer une détoxification incomplète des métaux (Campbell et al., 2008). Cependant, et probablement en raison d'une exposition chronique (> 80 ans) aux métaux, ces populations de poissons ont montré une certaine incapacité à répondre de manière plastique à un changement d'environnement (article 4 ou chapitre 11), possiblement à cause d'une perte de diversité génétique (Bourret et al., 2008).

Chapitre VI : Conclusion et perspectives de recherche

6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Les figures 13, 14 et 15 résument les principaux résultats obtenus dans ce travail de doctorat.

6.1. Retour sur les objectifs et hypothèses de l'étude

L'hypothèse principale postulée au début de l'étude était que les métaux dits non essentiels, principalement le Cd, provoquent une perturbation du métabolisme des rétinoïdes par altération de l'action des enzymes clés. Il s'est avéré que nous avons raison, cependant le mécanisme d'action du Cd serait différent selon le type (*via* l'eau *versus* nourriture ou *versus* les deux à la fois) et le temps d'exposition.

6.1.1. Effets des métaux sur le métabolisme des rétinoïdes

Dans nos études spatiales, au cours desquelles nous avons échantillonné des perchaudes qui ont fait l'objet d'une exposition chronique aux métaux et même passé toute leur vie en faisant face à une pollution métallique, nous avons émis un postulat selon lequel la synthèse de principales formes biologiquement actives des déhydrorétinoïdes, à savoir l'acide déhydrorétinoïque et le déhydrorétinal, serait inhibée par les métaux principalement le Cd. Ceci devrait avoir pour conséquence une accumulation anormalement élevée des métabolites de rétinoïdes dans le foie des perchaudes vivants dans ces milieux impactés par les métaux. Conformément à notre hypothèse, nos résultats indiquent que ces poissons présentent des concentrations en déhydrorétinol (dROH) plasmatique, de dROH et déhydrorétinyl palmitate hépatiques plus élevées et que ces concentrations étaient beaucoup plus importantes chez les poissons adultes que chez les juvéniles.

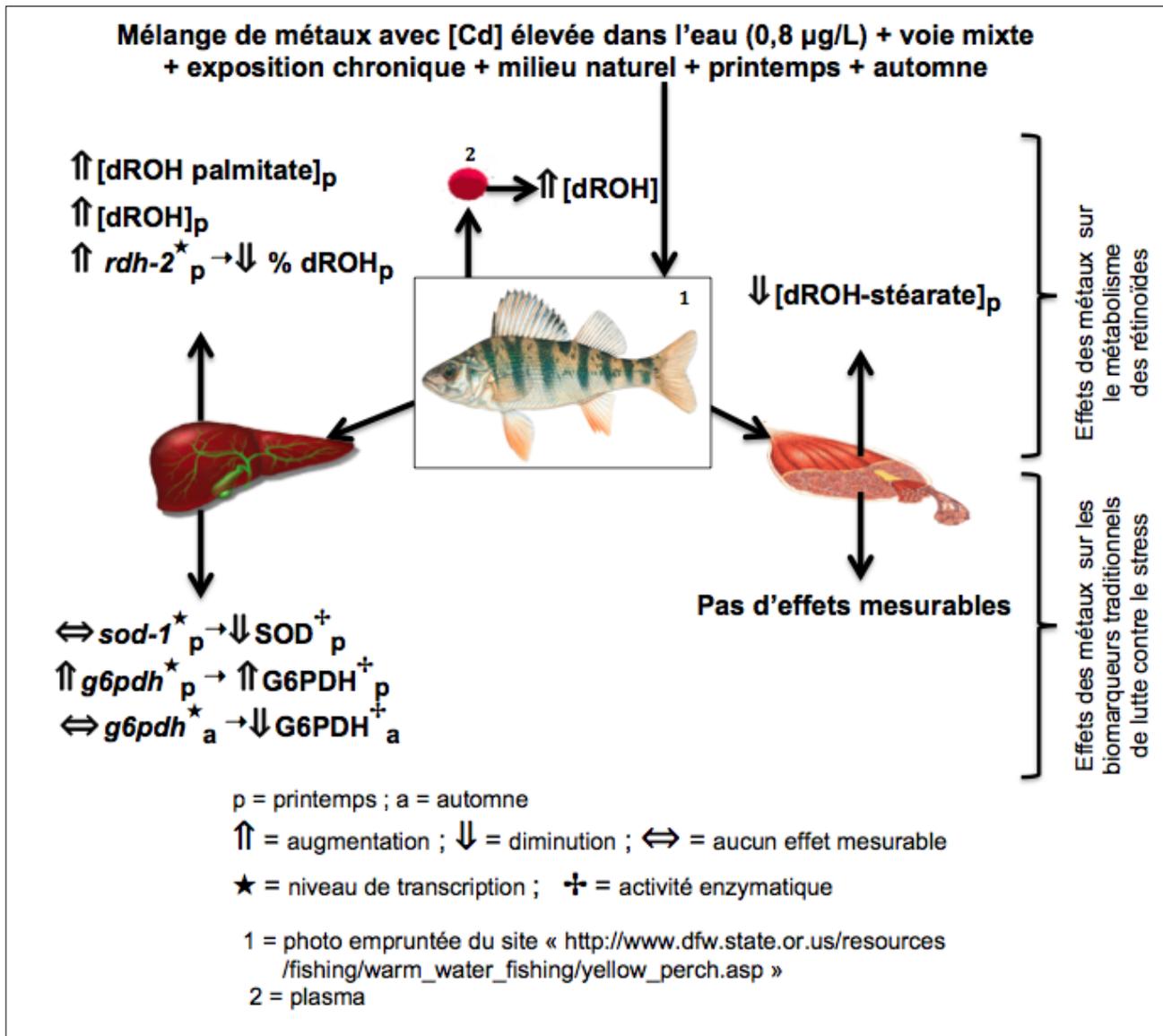


Figure 13 : Diagramme illustrant les mécanismes d'action des métaux sur le métabolisme des rétinoïdes et les réponses au stress oxydant chez les perchaudes chroniquement exposées en milieu naturel (échantillonnages de gradient et de saison).

Ces résultats traduiraient soit un besoin de mieux lutter contre le stress oxydant engendré par les métaux, soit une incapacité à métaboliser ces métabolites. De plus, bien que les concentrations de ces métabolites augmentent dans le foie, le pourcentage de dROH libre diminue, suggérant des effets négatifs des métaux sur les enzymes et/ou les protéines de liaison impliquées dans l'homéostasie des rétinoïdes. Probablement en réponse à cette inhibition des activités enzymatiques, une augmentation du niveau de

transcription de la rétinol deshydrogénase-2 (*rdh-2*) a été observée au printemps. À l'opposé du foie, les concentrations en déhydrorétinyl stéarate étaient plus faibles dans le muscle des perchaudes capturées dans les lacs contaminés que celles issues des lacs « propres ». Ce résultat indiquerait que les métaux ont aussi un effet négatif sur le métabolisme des rétinoïdes musculaires et que les besoins en vitamine A₂ sont spécifiques d'un tissu à l'autre.

Nous avons aussi proposé que les variations saisonnières des biomarqueurs du métabolisme des rétinoïdes varient en fonction des concentrations tissulaires des métaux. Il s'est avéré que nous avons raison puisque nous avons mis en évidence pour la première fois qu'une fluctuation saisonnière des concentrations tissulaires en métaux avait des implications sur les réponses des biomarqueurs du métabolisme des rétinoïdes chez les perchaudes juvéniles sauvages. Une forte variation saisonnière des concentrations des métabolites, du pourcentage de dROH libre et du niveau de transcription du gène *rdh-2* a été observée dans le foie avec des valeurs généralement plus importantes au printemps qu'en automne, probablement causées par une différence dans les facteurs qui affectent la biodisponibilité et la prise en charge des métaux et par une répartition inégale des ressources alimentaires pendant les deux saisons.

pourcentage de dROH libre et même du niveau de transcription de la *rdh-2* dans le foie. Ce résultat indique clairement qu'une exposition relativement longue des poissons aux métaux en milieu naturel affecte négativement les biomarqueurs du métabolisme des rétinoïdes dans ce tissu. De tous ces biomarqueurs utilisés, aucun n'a montré un effet différent lorsque le muscle était considéré comme organe cible, indiquant que le muscle ne serait pas un organe pertinent dans l'évaluation des effets des métaux sur le métabolisme des rétinoïdes des perchaudes exposées pendant un temps relativement long en milieu naturel. Les deux études mises ensemble révèlent que les réponses des biomarqueurs du métabolisme des rétinoïdes suite à une exposition des perchaudes aux métaux en milieu naturel dépendraient fortement du type d'exposition.

Dans notre étude de laboratoire au cours de laquelle nous voulions comparer les observations du terrain à celles des conditions contrôlées, nous avons proposé qu'étant donné que le Cd est le métal responsable des effets négatifs dans notre région d'échantillonnage, les réponses entre les deux expérimentations temporelles (transplantation et laboratoire) seraient comparables. Nos résultats illustrent que nous avons partiellement vu juste, car contrairement aux études de transplantation, une réponse synchrone et positive dans le niveau de transcription de la *rdh-2* et les activités des enzymes rétinoïdiennes (REH et LdRAT) a été observée dans le foie. Cette réponse dénote une fois de plus la nécessité pour les hépatocytes de lutter efficacement contre le stress oxydant engendré par le Cd. Par contre, tout comme dans l'étude de terrain le Cd affecte négativement les concentrations des métabolites de rétinoïdes dans le foie (exposition à 0,8 µg/L de Cd). De plus, le niveau de transcription de la *rdh-2* musculaire

et les concentrations des métabolites de rétinoïdes dans le plasma et le muscle diminuaient chez les perchaudes exposées au Cd.

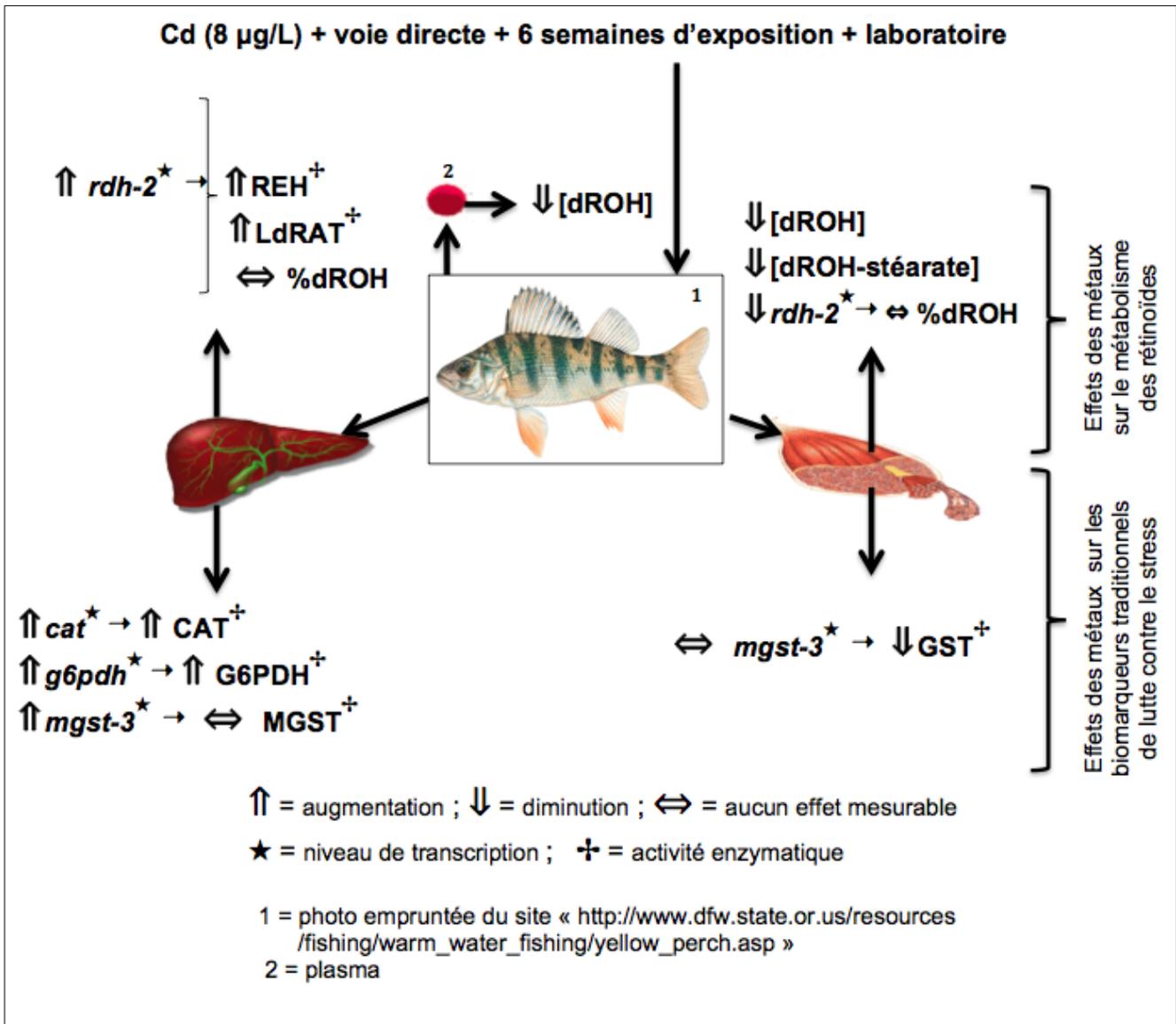


Figure 15 : Diagramme illustrant les mécanismes d'action du cadmium sur le métabolisme des rétinoïdes et les réponses au stress oxydant chez les perchaudes exposées au laboratoire pendant six semaines.

6.1.2. Effets des métaux sur les réponses des biomarqueurs traditionnels du stress oxydant

Les résultats de l'étude de gradient indiquent des différences dans les niveaux de transcription des gènes et des activités enzymatiques de certains bio-indicateurs

traditionnels de la réponse au stress oxydant dans les lacs contaminés comparativement aux lacs de référence. Au printemps, on a observé que le niveau de transcription de la *g6pdh* et l'activité de la G6PDH étaient plus élevés dans le foie des perchaudes des lacs contaminés en métaux. Par contre, chez ces individus, une faible activité de la SOD et de la G6PDH hépatique a été mesurée respectivement au printemps et en automne. Une fluctuation temporelle a été notée dans l'expression de la *Cu/Zn-sod-1* et dans les activités de la CAT et de la G6PDH dans le foie des perchaudes échantillonnées dans les lacs contaminés, avec des niveaux généralement plus élevés au printemps qu'en automne. En conformité avec notre hypothèse, ces résultats coïncidant avec les concentrations plus élevées en Cd rénal chez ces poissons traduisent probablement une augmentation plus importante des concentrations d'ERO au printemps qu'en automne chez les perchaudes vivant dans les lacs contaminés aux métaux.

Nous avons aussi proposé qu'une transplantation des perchaudes juvéniles d'un milieu métalliquement « propre » vers un milieu contaminé entraînerait en fonction de la durée d'exposition un dépassement des capacités de régulation de l'organisme traduit par une induction des indicateurs de stress oxydant. L'acclimatation physiologique représente une forme de plasticité phénotypique permettant à un organisme d'ajuster son métabolisme dans le but de répondre à un changement dans les conditions environnementales (contamination métallique dans notre cas). Nos travaux démontrent qu'une telle réponse apparaît durant les 4 premières semaines d'exposition. Après cette période, comparativement à leurs homologues restés captifs dans leur lac d'origine, les poissons transplantés dans le lac contaminé avaient un niveau de transcription de la

g6pdh, *mgst-3* et de la *Cu/Zn sod-1* plus élevé, conformément à notre postulat. Cette régulation à la hausse des gènes était suivie d'une augmentation des activités des enzymes correspondantes sauf pour la dernière voie métabolique. Cependant, bien qu'aucun effet ne soit mesurable dans le niveau de transcription de la *cat*, une baisse de l'activité de la CAT a été observée dans le foie suggérant ainsi que la réponse au stress oxydant dépend du biomarqueur analysé. De même une augmentation des activités de la CAT et SOD musculaires a été mesurée chez les perchaudes transplantées dans un milieu contaminé en métaux, suggérant que le muscle serait aussi susceptible au stress oxydant suite à une exposition soudaine aux métaux en milieu naturel pendant 4 semaines.

Tout comme dans l'expérimentation de transplantation en milieu naturel et en concordance avec notre hypothèse, nous avons observé dans l'expérimentation conduite au laboratoire des réponses synchrones et positives entre les analyses transcriptomiques et enzymatiques dans la plupart des voies métabolites analysées. En effet une augmentation du niveau de transcription de la *cat*, la *g6pdh* et de la *mgst-3* dans le foie a conduit à une augmentation des activités des enzymes correspondantes, sauf dans la dernière voie métabolique où l'augmentation de l'activité de la MGST n'était pas mesurable. De tous les biomarqueurs du stress oxydant analysés dans le muscle, seule la GST a répondu par une faible activité laissant présumer l'existence d'autres mécanismes alternatifs de protection de la cellule contre le stress oxydant.

Le système de défense antioxydante est complexe et sa capacité à protéger la cellule dépend des interactions entre les composantes individuelles qui les caractérisent, incluant la vitamine A et plusieurs enzymes antioxydantes. Les données recueillies dans

nos études de terrain et de laboratoire ont permis de mieux comprendre les mécanismes utilisés par la perchaude pour lutter contre le stress oxydant induit par une exposition aux métaux. Ces mécanismes impliquent simultanément des paramètres bien établis de réponse au stress oxydant et des paramètres du métabolisme des rétinoïdes. Notre approche combinant l'examen tant au niveau transcriptomique que biochimique met en évidence les avantages de l'utilisation de plusieurs niveaux d'organisation biologique aussi bien dans l'identification des stratégies utilisées par les poissons pour lutter contre le stress oxydant engendré par le métal que dans l'évaluation des risques pour l'environnement.

Si l'importance de l'utilisation du foie dans l'analyse des impacts d'une contamination métallique a été établie, nous pouvons cependant nous poser la question sur la pertinence de l'utilisation du muscle comme organe d'intérêt dans l'évaluation des effets des métaux sur les réponses au stress oxydant chez les poissons chroniquement exposés en milieu naturel ; dans la plupart des cas, nous avons observé soit seulement des tendances, soit aucun effet mesurable. Suite à ce qui précède, nous pouvons dire sans aucune ambiguïté que le muscle n'est pas un organe d'intérêt pour répondre aux objectifs assignés à cette partie de l'étude.

En définitive, ces études ont aussi contribué à une meilleure compréhension de la façon dont les perchaudes s'y prennent pour s'adapter et vivre dans des environnements naturels impactés par les métaux.

6.2. Perspectives de recherche

Nous avons étudié l'impact des métaux sur le stockage et la libération des rétinoïdes dans le foie. Cependant d'autres paramètres, tels que l'alimentation, influencent aussi les concentrations tissulaires des rétinoïdes (Garner et al., 2010). Afin de mieux comprendre dans quelle mesure les métaux sont directement responsables des réponses observées (*versus* indirectement *via* la diète), il serait important d'analyser les formes et les concentrations des rétinoïdes présents dans les proies des perchaudes, par exemple en les mesurant directement dans les contenus stomacaux des perchaudes. Cette avenue permettrait de discriminer la part due à une ingestion directe des aliments de celle due à une perturbation du métabolisme des rétinoïdes. Les concentrations anormales des métabolites des rétinoïdes mesurées dans le foie des perchaudes des lacs contaminés seraient liées à une altération du travail des enzymes clés. Une avenue à explorer serait de mesurer directement les activités des enzymes (par exemple LdRAT, REH, RDH) impliquées dans ce métabolisme pour mieux comprendre par quel mécanisme le Cd perturbe le métabolisme des rétinoïdes chez les poissons sauvages. De plus, il serait aussi important de mesurer les concentrations d'acide rétinoïque dans le foie pour vérifier si l'incapacité de métaboliser les métabolites de rétinoïdes chez les poissons qui vivent dans les lacs contaminés est due à une inhibition de la synthèse de cette forme biologiquement active.

Cette étude soutient l'importance de considérer les variations saisonnières lors de l'évaluation des risques environnementaux des métaux sur la physiologie des organismes aquatiques. Nous l'avons fait sur une seule année et sur seulement deux saisons. Afin d'avoir une meilleure compréhension des variations saisonnières sur le

métabolisme des rétinoïdes et sur la réponse au stress oxydant, il serait intéressant d'explorer au moins durant trois saisons. Audet et Couture (2003) ont souligné l'importance de réaliser plus de deux échantillonnages dans les études de saison puisqu'avec seulement deux échantillonnages les pics (positifs ou négatifs) de l'indice d'embonpoint des perchaudes, des concentrations de métaux ou d'activités enzymatiques tissulaires n'auraient pas été identifiés. Aussi en échantillonnant sur deux ans, cela permettrait de mieux comprendre l'influence des variations interannuelles sur ces paramètres.

Au final, nos résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle 80 ans d'exposition aux métaux auraient entraîné un changement évolutif rapide en réponse à la contamination chez les populations de perchaudes du lac Dufault. Pour généraliser un tel postulat, il serait envisageable d'échantillonner dans d'autres lacs et même dans d'autres régions minières comme la région de Sudbury.

L'approche adoptée dans le choix des voies métaboliques étudiées dans cette thèse s'est faite sur la base des réponses transcriptomiques issues des analyses de séquençage (Pierron et al., 2011) et de micro-puces à ADN (Bougas et al., 2013) de la perchaude. Dans ces études préalables de dépistage des effets des métaux sur la santé des poissons, plusieurs biomarqueurs de contamination métallique appartenant à diverses voies métaboliques ont été observés. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et biochimiques de toxicité des métaux, il serait important d'examiner ces autres voies métaboliques qui se sont différenciellement exprimées, par exemple, d'étudier l'impact des métaux sur le métabolisme du fer, le transport du calcium ou la coagulation sanguine.

Chapitre VII : Références bibliographiques

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aalto, S.K., Newsome, G.E., 1990. Additional evidence supporting demic behaviour of a yellow perch (*Perca flavescens*) population. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 47, 1959-1962.

Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquatic Toxicology 76, 160-202.

Andrews, G.K., 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. Biochemical Pharmacology 59, 95-104.

Ankley, G.T., Bennet, R.S., Erickson, R.J., Hoff, D.J., Hornung, M.w., Johnson, R.D., Mount, D.R., Nichols, J.W., Russom, C.L., Schmieder, P.K., Serrano, J.A., Tietge, J.E., Villeneuve, L., 2010. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. Environmental Toxicology and Chemistry 29, 730-741.

Ankley, G.T., Daston, G.P., Degitz, S.J., Denslow, N.D., Hoke, R.A., Kennedy, S.W., Miracle, A.L., Perkins, E.J., Snape, J., Tillitt, D.E., Tyler, C.R., Versteeg, D., 2006. Toxicogenomics in regulatory ecotoxicology. Environmental Science and Technology 40, 4055-4065.

Annuaire Statistique Mondial des Minerais et Métaux, 2008. <http://infoterre.brgm.fr/rapports/RP-59646-FR.pdf>. Page 12.

Asagba, S.O., Eriyamremu, G.E., Igberaese, M.E., 2008. Bioaccumulation of cadmium and its biochemical effect on selected tissues of the catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 34, 61-69.

Atli, G., Canli, M., 2011. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology* 20, 1861-1869.

Audet, D., Couture, P., 2003. Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60, 269-278.

Auslander, M., Yudkovski, Y., Chalifa-Caspi, V., Herut, B., Ophir, R., Reinhardt, R., Neumann, P., Tom, M., 2008. Pollution-affected fish hepatic transcriptome and its expression patterns on exposure to cadmium. *Marine Biotechnology* 10, 250-261.

Bagnyukova, T.V., Chahrak, O.I., Lushchak, V.I., 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stressors. *Aquatic Toxicology* 78, 325-331.

Bélanger-Deschênes, S., Couture, P., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., 2013. Evolutionary change driven by metal exposure as revealed by coding SNP genome scan in wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Ecotoxicology* 22, 938-957.

Benedetti, M., Fattorini, D., Martuccio, G., Nigro, M., Regoli, F., 2009. Interactions between trace metals (Cu, Hg, Ni, Pb) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*: oxidative effects on biotransformation pathway. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 818-825.

Benedetti, M., Martuccio, G., Fattorini, D., Canapa, A., Barucca, M., Nigro, M., Regoli, F., 2007. Oxidative and modulatory effects of trace metals on metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Aquatic Toxicology* 85, 167-175.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002. Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase plays a key role in protection against reactive oxygen species. In: Freeman, W. H. (Eds.), *Biochemistry*. 5th edition. New York: Section 20.5.

Bernatchez, L., Giroux, M., 1991. Guide des poissons d'eau douce du Québec et leur distribution dans l'Est du Canada, Éditions Paquet inc. Québec. 304 p.

Bernatchez, L., Giroux, M., 2000. Les poissons d'eau douce du Québec et leur répartition dans l'Est du Canada, Éditions Broquet, Boucherville. 350 p.

Berry, D.C., Croniger, C.M., Ghyselinck, N.B., Noy, N., 2012. Transthyretin blocks retinol uptake and cell signaling by the holo-retinol-binding protein receptor STRA6. *Molecular and Cellular Biology* 32, 3851-3859.

Boily, M., Bisson, M., Spear, P., 2004. Rétinoïdes biomarqueurs et base moléculaire d'effets de substances toxiques, dans : Campbell, P.G.C., Pelletier, É., Denizeau, F. (Eds.), *Écotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement*. Presses de l'Université du Québec, Québec, pp. 197-256.

Boily, M., Thibodeau, J., Bisson, M., 2009. Retinoid metabolism (LRAT, REH) in the liver and plasma retinoids of bullfrog, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural contamination. *Aquatic Toxicology* 91, 118-125.

Boily, M.H., Bérubé, V.E., Spear, P.A., DeBlois, C., Dassylva, N., 2005. Hepatic retinoids of bullfrogs in relation to agricultural pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 1099-1106.

Bonham-Carter, G.F., Henderson, P.J., Kliza, D.A., Kettles, I.M., 2006. Comparison of metal distributions in snow, peat, lakes and humus around a Cu smelter in western Quebec, Canada. *Geochemistry Exploration Environment Analysis* 6, 215-228.

Borgmann, U., Nowierski, M., Grapentine, L.C., Dixon, D.G., 2004. Assessing the cause of impacts on benthic organisms near Rouyn-Noranda, Quebec. *Environmental Pollution* 129, 39-48.

Bougas, B., Normandeau, E., Pierron, F., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2013. How does exposure to nickel and cadmium affect the transcriptome of yellow perch (*Perca flavescens*) - Results from a 1000 candidate-gene microarray. *Aquatic Toxicology* 142-143, 355-364.

Bourret, V., Couture, P., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., 2008. Evolutionary ecotoxicology of wild yellow perch (*Perca flavescens*) populations chronically exposed to a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 86, 76-90.

Branchaud, A., Gendron, A., Fortin, R., Anderson, P.D., Spear, P.A., 1995. Vitamin A stores, teratogenesis, and EROD activity in white sucker, *Catostomus commersoni*, from Riviere des Prairies near Montreal and a reference site. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 1703-1713.

Bury, N.R., Walker, P.A., Glover, C.N., 2003. Nutritive metal uptake in teleost fish. *Journal of Experimental Biology* 206, 11-23.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments *Clinical Chemistry* 55, 611- 622.

Campbell, P.G.C., Couillard, Y., 2004. Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques, dans : Campbell, P.G.C., Pelletier, É., Denizeau, F. (Eds.), *Écotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement*. Presses de l'Université du Québec, Québec, pp. 9-62.

Campbell, P.G.C., Giguère, A., Bonneris, E., Hare, L., 2005. Cadmium-handling strategies in two chronically exposed indigenous freshwater organisms - The yellow perch (*Perca flavescens*) and the floater mollusc (*Pyganodon grandis*). *Aquatic Toxicology* 72, 83-97.

Campbell, P.G.C., Hontela, A., Rasmussen, J.B., Giguère, A., Gravel, A., Kraemer, L., Kovescs, J., Lacroix, A., Levesque, H., Sherwood, G., 2003. Differentiating between direct (physiological) and food-chain mediated (bioenergetic) effects on fish in metal-impacted lakes. *Human and Ecological Risk Assessment* 9, 847-866.

Campbell, P.G.C., Kraemer, L.D., Giguère, A., Hare, L., Hontela, A., 2008. Subcellular distribution of cadmium and nickel in chronically exposed wild fish: Inferences regarding metal detoxification strategies and implications for setting water quality guidelines for dissolved metals. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 290-316.

Cao, L., Huang, W., Shan, X., Ye, Z., Dou, S., 2012. Tissue-specific accumulation of cadmium and its effects on antioxidant responses in Japanese flounder juveniles. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 33, 16-25.

Cattaneo, A., Couillard, Y., Wunsam, S., Courcelles, M., 2004. Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in Lac Dufault (Québec, Canada). *Journal of Paleolimnology* 32, 163-175.

CCME, 1999a. Conseil canadien des ministres de l'environnement. Recommandations canadiennes pour la qualité des sédiments : protection de la vie aquatique — cadmium. Dans: *Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement*, 1999, Winnipeg, le Conseil.

CCME, 1999b. Conseil canadien des ministres de l'environnement. Recommandations canadiennes pour la qualité des sols : Environnement et santé humaine — cadmium. Dans: *Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement*, 1999, Winnipeg, le Conseil.

CCME, 1999c. Conseil canadien des ministres de l'environnement. Recommandations canadiennes pour la qualité des sols : Environnement et santé humaine — cuivre. Dans: *Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement*, 1999, Winnipeg, le Conseil.

CCME, 1999d. Conseil canadien des ministres de l'environnement. Recommandations canadiennes pour la qualité des sols : Environnement et santé humaine — nickel. Dans: *Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement*, 1999, Winnipeg, le Conseil.

CCME, 1999e. Conseil canadien des ministres de l'environnement. Recommandations canadiennes pour la qualité des sols : Environnement et santé humaine — zinc. Dans: Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement, 1999, Winnipeg, le Conseil.

Chandurvelan, R., Marsden, I.D., Gaw, S., Glover, C.N., 2013. Waterborne cadmium impacts immunocytotoxic and cytogenotoxic endpoints in green-lipped mussel, *Perna canaliculus*. *Aquatic Toxicology* 142-143, 283-293.

Chen, Q., Zhang, R., Li, W.M., Niu, Y.J., Guo, H.C., Liu, X.H., Hou, Y.C., Zhao, L.J., 2013. The protective effect of grape seed procyanidin extract against cadmium-induced renal oxidative damage in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36, 759-768.

Choi, C.Y., An, K.W., An, M.I., 2008. Molecular characterization and mRNA expression of glutathione peroxidase and glutathione S transferase during osmotic stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 149, 330-337.

Couillard, Y., Courcelles, M., Cattaneo, A., Wunsam, S., 2004. A test of the integrity of metal records in sediment cores based on the documented history of metal contamination in Lac Dufault (Québec, Canada) *Journal of Paleolimnology* 32, 149-162.

Couture, P., Busby, P., Gauthier, C., Rajotte, J.W., Pyle, G.G., 2008a. Seasonal and regional variations of metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. I. Factors influencing tissue metal concentrations. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 97-125.

Couture, P., Pyle, G., 2011. Field studies on metal accumulation and effects in fish. In: Wood CM, Farrell AP, Brauner C, J. (eds). Fish Physiology 31 (part 1), Academic Press, 417-473.

Couture, P., Pyle, G., Campbell, P.G.C., Hontela, A. (2015). Using Perca as Biomonitors in Ecotoxicological Studies. In: Biology of Perch, P. Couture and G. Pyle, Editors. CRC Press, Boca Raton, Fl. Chapter 10.

Couture, P., Rajotte, J.W., 2003. Morphometric and metabolic indicators of metal stress in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from Sudbury, Ontario: A review. Journal of Environmental Monitoring 5, 216-221.

Couture, P., Rajotte, J.W., Pyle, G.G., 2008b. Seasonal and regional variations in metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. III. Energetic and physiological indicators. Human and Ecological Risk Assessment 14, 146-165.

D'Ambrosio, D.N., Clugston, R.D., Blaner, W.S., 2011. Vitamin A metabolism: An update. Nutrients 3, 63-103.

Debier, C., Larondelle, Y., 2005. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. British Journal of Nutrition 93, 153-174.

Denslow, N.D., Garcia-Reyero, N., Barber, D.S., 2007. Fish 'n' chips: the use of microarrays for aquatic toxicology. Molecular BioSystems 3, 172-177.

Depledge, M.H., Aagaard, A., Györkös, P., 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. Marine Pollution Bulletin 31, 19-27.

Doyon, C., Boileau, S., Fortin, R., Spear, P.A., 1998. Rapid HPLC analysis of retinoids and dehydroretinoids stored in fish liver: Comparison of two lake sturgeon populations. *Journal of Fish Biology* 53, 973-986.

Doyon, P., Bigot, A., Vasseur, P., Rodius, F., 2008. Molecular cloning and expression study of pi-class glutathione S-transferase (pi-GST) and selenium dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) transcripts in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Comparative Biochemic and Physiology C* 147, 69-77.

Driessen, C.A.G.G., Winkens, H.J., Hoffmann, K., Kuhlmann, L.D., Janssen, B.P.M., Van Vugt, A.H.M., Van Hooser, J.P., Wieringa, B.E., Deutman, A.F., Palczewski, K., Ruether, K., Janssen, J.J.M., 2000. Disruption of the 11-cis-retinol dehydrogenase gene leads to accumulation of cis-retinols and cis-retinyl esters. *Molecular and Cellular Biology* 20, 4275-4287.

Eastwood, S., Couture, P., 2002. Seasonal variations in condition and liver metal concentrations of yellow perch (*Perca flavescens*) from a metal-contaminated environment. *Aquatic Toxicology* 58, 43-56.

Eaton, J.G., Swenson, W.A., McCormick, J.H., Simonson, T.D., 1992. A field and laboratory investigation of acid effects on largemouth bass, rock bass, black crappie, and yellow perch. *Transactions of the American Fisheries Society* 121, 644-658.

Efferth, T., Schwarzl, S.M., Smith, J., Osieka, R., 2006. Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase for oxidative stress and apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 13, 527-528.

Eisler, R., 2004. Mercury hazards from gold mining to humans, plants and animals. *Review of Environmental Contamination Toxicology* 181, 139-198.

Elia, A.C., Anastasi, V., Drr, A.J.M., 2006. Hepatic antioxidant enzymes and total glutathione of *Cyprinus carpio* exposed to three disinfectants, chlorine dioxide, sodium hypochlorite and peracetic acid for superficial water potabilization. *Chemosphere* 64, 1633-1641.

Environnement Canada, 1997. Environmental Assessments of Priority Substances. Under the Canadian Environmental Protection Act. Guidance Manual Version 1.0, EPS/2/CC/3E :1-1 à 8-10, xvii+86 p.

Farag, A.M., Boese, C.J., Woodward, D.F., Bergman, H.L., 1994. Physiological changes and tissue metal accumulation in rainbow trout exposed to foodborne and waterborne metals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 2021-2029.

Fedorenkova, A., Vonk, J.A., Lenders, H.J.R., Ouborg, N.J., Breure, A.M., Hendriks, A.J., 2010. Ecotoxicogenomics: Bridging the gap between genes and populations. *Environmental Science and Technology* 44, 4328-4333.

Ferencz, Á., Hermesz, E., 2014. Impact of acute Cd²⁺ exposure on the antioxidant defence systems in the skin and red blood cells of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Science and Pollution Research*.

Flammarion, P., Devaux, A., Nehls, S., Migeon, B., Noury, P., Garric, J., 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle river (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51, 145-153.

Fortin, C., Couillard Y., Vigneault, B., Campbell, P.G.C., 2010. Determination of free Cd, Cu and Zn concentrations in lake waters by in situ diffusion followed by column equilibration ion -exchange. *Aquatic Geochemistry* 16(1): 151-172.

Furlong, E., 2011. Molecular biology: a fly in the face of genomics. *Nature* 471.

Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004a. Ecosystem management bioindicators: the ECOMAN project - a multi-biomarkers approach to ecosystem management. *Marine Environmental Research* 58, 233-237.

Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004b. A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environmental Science and Technology* 38, 1723-1731.

Garner, S.R., Neff, B.D., Bernards, M.A., 2010. Dietary carotenoid levels affect carotenoid and retinoid allocation in female Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Journal of Fish Biology* 76, 1474-1490.

Garric, J., Morin, S., Vincent-Hubert, F., 2010. Les biomarqueurs en écotoxicologie: définition, intérêt, limite, usage. *Revue SET* 1, 12-19.

Gesto, M., Castro, L.F.C., Reis-Henriques, M.A., Santos, M.M., 2012a. Retinol metabolism in the mollusk *Osilinus lineatus* indicates an ancient origin for retinyl ester storage capacity. *PLoS ONE* 7 (4), art. no. e35138.

Gesto, M., Castro, L.F.C., Reis-Henriques, M.A., Santos, M.M., 2012b. Tissue-specific distribution patterns of retinoids and didehydroretinoids in rainbow trout *Oncorhynchus*

mykiss. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 162, 57-134.

Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., McDonald, D.G., Rasmussen, J.B., 2004. Influence of lake chemistry and fish age on cadmium, copper, and zinc concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 61, 1702-1716.

Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., Cossu-Leguille, C., 2005. Metal bioaccumulation and oxidative stress in yellow perch (*Perca flavescens*) collected from eight lakes along a metal contamination gradient (Cd, Cu, Zn, Ni). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 62, 563-577.

Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., Couture, P., 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. Aquatic Toxicology 77, 178-189.

Giuliani, M.E., Benedetti, M., Arukwe, A., Regoli, F., 2013. Transcriptional and catalytic responses of antioxidant and biotransformation pathways in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to chemical mixtures. Aquatic Toxicology 134-135, 120-127.

Gliszczyńska-Świgło, A., 2006. Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. Food Chemistry 96, 131-136.

Goswami, U.C., Barua, A.B., 1981. Distribution of retinol & dehydroretinol in freshwater fish. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 18, 383-385.

Guderley, H., Lapointe, D., Bédard, M., Dutil, J. D. 2003. Metabolic priorities during

starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *gadus morhua* L. Comparative biochemistry and physiology- a molecular and integrative physiology, 135, 347-356.

Gupta, S.C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R.K., Chowdhuri, D.K., 2010. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? Life Sciences 86, 377-384.

Hansen, M.M., Olivieri, I., Waller, D.M., Nielsen, E.E., The GeM Working Group, 2012. Monitoring adaptive genetic responses to environmental change. Molecular Ecology 21, 1311-1329.

Hare, L., Tessier, A., 1998. The aquatic insect *Chaoborus* as a biomonitor of trace metals in lakes. Limnology and Oceanography 43, 1850-1859.

Hare, L., Tessier, A., Croteau, M.N., 2008. A biomonitor for tracking changes in the availability of lakewater cadmium over space and time. Human and Ecological Risk Assessment 14, 229-242.

Harrison, S.E., 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). Environmental Toxicology and Chemistry 8, 87-97.

Heikkila, J.J., Schultz, G.A., Iatrou, K., Gedamu, L., 1982. Expression of a set of fish genes following heat or metal ion exposure. Journal of Biological Chemistry 257, 12000-12005.

Henrik Hansen, B., Rømme, S., Garmo, Ø.A., Pedersen, S.A., Olsvik, P.A., Andersen, R.A., 2007. Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*). *Chemosphere* 67, 2241-2249.

Ho, H.Y., Cheng, M.L., Chiu, D.T., 2007. Glucose-6-phosphate dehydrogenase--from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. *Redox Report* 12 (3), 109-118.

Hontela, A., Dumont, P., Duclos, D., Fortin, R., 1995. Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence River. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 725-731.

Hontela, A., Rasmussen, J.B., Audet, C., Chevalier, G., 1992. Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and mercury. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 22, 278-283.

Hsu, T., Huang, K.M., Tsai, H.T., Sung, S.T., Ho, T.N., 2013. Cadmium(Cd)-induced oxidative stress down-regulates the gene expression of DNA mismatch recognition proteins MutS homolog 2 (MSH2) and MSH6 in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology* 126, 9-16.

Iles, A.C., Rasmussen, J.B., 2005. Indirect effects of metal contamination on energetics of yellow perch (*Perca flavescens*) resulting from food web simplification. *Freshwater Biology* 50, 976-992.

Jayapal, M., Bhattacharjee, R.N., Melendez, A.J., Hande, M.P., 2010. Environmental toxicogenomics: A post-genomic approach to analysing biological responses to

environmental toxins. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 42, 230-240.

Klinck, J.S., Green, W.W., Mirza, R.S., Nadella, S.R., Chowdhury, M.J., Wood, C.M., Pyle, G.G., 2007. Branchial cadmium and copper binding and intestinal cadmium uptake in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated lakes. *Aquatic Toxicology* 84, 198-207.

Kövecses, J., Sherwood, G.D., Rasmussen, J.B., 2005. Impacts of altered benthic invertebrate communities on the feeding ecology of yellow perch (*Perca flavescens*) in metal-contaminated lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62, 153-162.

Kowara, R., Karaczyn, A., Cheng, R.Y.S., Salnikow, K., Kasprzak, K.S., 2005. Microarray analysis of altered gene expression in murine fibroblasts transformed by nickel(II) to nickel(II)-resistant malignant phenotype. *Toxicology and Applied Pharmacology* 205, 1-10.

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., 2005a. Dynamics of Cd, Cu and Zn accumulation in organs and sub-cellular fractions in field transplanted juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Environmental Pollution* 138, 324-337.

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., 2005b. A field study examining metal elimination kinetics in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology* 75, 108-126.

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., 2006a. Seasonal variations in hepatic Cd and Cu concentrations and in the sub-cellular distribution of these metals in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Environmental Pollution* 142, 313-325.

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., Auclair, J.C., 2006b. A field study examining the relative importance of food and water as sources of cadmium for juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63, 549-557.

Kubrak, O.I., Husak, V.V., Rovenko, B.M., Poigner, H., Kriews, M., Abele, D., Lushchak, V.I., 2013. Antioxidant system efficiently protects goldfish gills from Ni²⁺-induced oxidative stress. *Chemosphere* 90.

Kubrak, O.I., Husak, V.V., Rovenko, B.M., Poigner, H., Mazepa, M.A., Kriews, M., Abele, D., Lushchak, V.I., 2012. Tissue specificity in nickel uptake and induction of oxidative stress in kidney and spleen of goldfish *Carassius auratus*, exposed to waterborne nickel. *Aquatic Toxicology* 118-119, 88-96.

Laflamme, J.S., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Hontela, A., 2000. Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, and Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 1692-1700.

Lambert, Y., Dutil, J.D., 1997. Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 104-112.

Landry, P.L., Axelsen, F., Morin, R., 2000. Élevage de la perchaude. Les publications de la direction de l'innovation et des technologies. Document d'information. Agriculture, Pêche et Alimentation.

Lapointe, D., Couture, P., 2009. Influence of the route of exposure on the accumulation and subcellular distribution of nickel and thallium in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 57, 571-580.

Leonard, S.S., Harris, G.K., Shi, X., 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. Free Radical Biology and Medicine 37, 1921-1942.

Levesque, H.M., Moon, T.W., Campbell, P.G.C., Hontela, A., 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. Aquatic Toxicology 60, 257-267.

Lott, J.P., Willis, D.M., Lucchesi, D.O., 1996. Relationship of food habits to yellow perch growth and population structure in South Dakota Lakes. Freshwater Ecology 11, 27-37.

Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. Environmental Science and Technology 39, 1921-1931.

Mahler, B.J., Van Metre, P.C., Callender, E., 2006. Trends in metals in urban and reference lake sediments across the United States, 1970 to 2001. Environmental Toxicology and Chemistry 25, 1698-1709.

Malison, J.A., 2000. A White paper on the status and needs of yellow perch aquaculture in the north central region. For the North Central Regional Aquaculture Center. University of Wisconsin-Madison.

Marcogliese, D.J., Pulkkinen, K., Valtonen, E.T., 2012. Trichodinid (*Ciliophora: Trichodinidae*) infections in perch (*Perca fluviatilis*) experimentally exposed to pulp and paper mill effluents. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 62, 650–656.

Mason, A.Z., Jenkins, K.D., 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. . In: Tessier, A., Turner, D. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. J.Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 479–608.

McCall, K.A., Huang, C.C., Fierke, C., 2000. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *Journal of Nutrition* 130, 1437S-1446S.

Miller, L.L., Rasmussen, J.B., Palace, V.P., Hontela, A., 2009. The physiological stress response and oxidative stress biomarkers in rainbow trout and brook trout from selenium-impacted streams in a coal mining region. *Journal of Applied Toxicology* 29, 681-688.

Molotkov, A., Ghyselinck, N.B., Chambon, P., Duester, G., 2004. Opposing actions of cellular retinol-binding protein and alcohol dehydrogenase control the balance between retinol storage and degradation. *Biochemical Journal* 383, 295-302.

Ndayibagira, A., Spear, P.A., 1999. Esterification and hydrolysis of vitamin A in the liver of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the influence of a coplanar polychlorinated

biphenyl. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 122, 317-325.

Neumann, N.F., Galvez, F., 2002. DNA microarrays and toxicogenomics: Applications for ecotoxicology? *Biotechnology Advances*, 20, 391-419.

Nikinmaa, M., McCairns, R.J., Nikinmaa, M.W., Vuori, K.A., Kanerva, M., Leinonen, T., Primmer, C.R., Merilä, J., Leder, E.H., 2013. Transcription and redox enzyme activities: comparison of equilibrium and disequilibrium levels in the three-spined stickleback. *Dans: Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 280, 1755, 9 p. 20122974.

Nikinmaa, M., Rytönen, K.T., 2011. Functional genomics in aquatic toxicology-Do not forget the function. *Aquatic Toxicology* 105, 16-24.

Niyogi, S., Kent, R., Wood, C.M., 2008. Effects of water chemistry variables on gill binding and acute toxicity of cadmium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A biotic ligand model (BLM) approach. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 148, 305-314.

Niyogi, S., Pyle, G.G., Wood, C.M., 2007. Branchial versus intestinal zinc uptake in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from reference and metal-contaminated aquatic ecosystems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64, 1605-1613.

Novák, J., Beníšek, M., Hilscherová, K., 2008. Disruption of retinoid transport, metabolism and signaling by environmental pollutants. *Environment International* 34, 898-913.

Nuwaysir, E.F., Bittner, M., Trent, J., Barrett, J.C., Afshari, C.A. 1999. Microarrays and toxicology: The advent of toxicogenomics. *Molecular Carcinogenesis*, 24, 153-159.

Pellerin, J., Gauthier-Clerc, S., Siah, A., Assoi-Etchian, O., 2004. Stress physiologique et perturbation endocrinienne chez les bivalves marins,. Dans : Campbell, P.G.C., Pelletier, É., Denizeau, F. (Eds.), Écotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement. Presses de l'Université du Québec, Québec, pp. 349-400.

Peltier, M.R., Wilcox, C.J., Sharp, D.C., 1998. Technical note: application of the Box-Cox data transformation to animal science experiments. *Journal of Animal Sciences* 76, 847-849.

Pennie, W., Pettit, S.D., Lord, P.G., 2004. Toxicogenomics in risk assessment: An overview of an HESI collaborative research program. *Environmental Health Perspectives*, 112, 417-419.

Pereira, A.A., van Hattum, B., Brouwer, A., 2012. Hepatic retinoid levels in seven fish species (teleosts) from a tropical coastal lagoon receiving effluents from iron-ore mining and processing. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 408-416.

Pierron, F., Bourret, V., St-Cyr, J., Campbell, P.C.G., Bernatchez, L., Couture, P., 2009. Transcriptional responses to environmental metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*) collected in lakes with differing environmental metal concentrations (Cd, Cu, Ni). *Ecotoxicology* 18, 620–631.

Pierron, F., Normandeau, E., Defo, M.A., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2011. Effects of chronic metal exposure on wild fish populations revealed by high-throughput cDNA sequencing. *Ecotoxicology* 20, 1388-1399.

Poynton, H.C., Loguinov, A.V., Varshavsky, J.R., Chan, S., Perkins, E.J., Vulpe, C.D. 2008a. Gene expression profiling in *Daphnia magna* part I: Concentration-dependent

profiles provide support for the no observed transcriptional effect level. *Environmental Science and Technology*, 42, 6250-6256.

Poynton, H.C., Zuzow, R., Loguinov, A.V., Perkins, E.J., Vulpe, C.D. 2008b. Gene expression profiling in *Daphnia magna*, Part II: Validation of a copper specific gene expression signature with effluent from two copper mines in California. *Environmental Science and Technology*, 42, 6257-6263.

Price-Haughey, J., Bonham, K., Gedamu, L., 1986. Heavy metal-induced gene expression in fish and fish cell lines. *Environmental Health Perspectives* 65, 141-147.

Qu, R., Wang, X., Wang, Z., Wei, Z., Wang, L., 2014. Metal accumulation and antioxidant defenses in the freshwater fish *Carassius auratus* in response to single and combined exposure to cadmium and hydroxylated multi-walled carbon nanotubes. *Journal of Hazardous Materials* 275, 89-98.

Raimundo, J., Vale, C., Duarte, R., Moura, I., 2008. Sub-cellular partitioning of Zn, Cu, Cd and Pb in the digestive gland of native *Octopus vulgaris* exposed to different metal concentrations (Portugal). *Science of the Total Environment* 390, 410-416.

Rajotte, J.W., Couture, P., 2002. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 1296-1304.

Rasmussen, J.B., Gunn, J.M., Sherwood, G.D., Iles, A., Gagnon, A., Campbell, P.G.C., Hontela, A., 2008. Direct and indirect (foodweb mediated) effects of metal exposure on the growth of yellow perch (*Perca flavescens*): Implications for ecological risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 317-350.

Regoli, F., 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquatic Toxicology* 50, 351-361.

Regoli, F., Giuliani, M.E., Benedetti, M., Arukwe, A., 2011. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquatic Toxicology* 105, 56-66.

Robbens, J., van der Ven, K., Maras, M., Blust, R., De Coen, W., 2007. Ecotoxicological risk assessment using DNA chips and cellular reporters. *Trends in Biotechnology* 25, 460-466.

Rodríguez-Estival, J., Martínez-Haro, M., Monsalve-González, L., Mateo, R., 2011a. Interactions between endogenous and dietary antioxidants against Pb-induced oxidative stress in wild ungulates from a Pb polluted mining area. *Science of the Total Environment* 409, 2725-2733.

Rodríguez-Estival, J., Taggart, M.A., Mateo, R., 2011b. Alterations in vitamin A and E levels in liver and testis of wild ungulates from a lead mining area. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 361-371.

Salinas, A.E., Wong, M.G., 1999. Glutathione S-transferases—a review. *Current Medicinal Chemistry* 6, 279-309.

Sanderson, B.L., Hrabik, T.R., Magnuson, J.J., Post, D.M., 1999. Cyclic dynamics of a yellow perch (*Perca flavescens*) population in an oligotrophic lake: Evidence for the role of intraspecific interactions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 1543-1542.

Scandalios, J.G., 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38, 995-1014.

Serpil Mişe Yonar, 2013. Toxic effects of malathion in carp, *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of lycopene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 97, 223-229.

Sherwood G.D, Kovacs J, Hontela A, et al. 2002. Simplified food webs lead to energetic bottlenecks in polluted lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 1-5.

Sherwood, D.D., Rasmussen, J.B., Rowan, D.J., Brodeur, J., Hontela, A., 2000. Bioenergetic costs of heavy metal exposure in yellow perch (*Perca flavescens*): in situ estimates with a radiotracer (¹³⁷Cs) technique. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 441-450.

Snape, J.R., Maund, S.J., Pickford, D.B., Hutchinson, T.H., 2004. Ecotoxicogenomics: The challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 67, 143-154.

Soud, G., Souayed, N., Yaktiti, F., Maaroufi, K., 2013. Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 89, 1-7.

Thomas, R.S., Rank, D.R., Penn, S.G., Zastrow, G.M., Hayes, K.R., Pande, K., Glover, E., Silander, T., Craven, M.W., Reddy, J.K., Jovanovich, S.B., Bradfield, C.A., 2001. Identification of toxicologically predictive gene sets using cDNA microarrays. *Molecular Pharmacology* 60, 1189-1194.

Tsangaris, C., Kormas, K., Stroglyoudi, E., Hatzianestis, I., Neofitou, C., Andral, B., Galgani, F., 2010. Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 151, 369-378.

Tyler, C.R., Filby, A.L., van Aerle, R., Lange, A., Ball, J., Santos, E.M., 2008. Fish toxicogenomics, in: Hogstrand, C., Kille, P. (Eds.).

Uren Webster, T.M., Bury, N., van Aerle, R., Santos, E.M., 2013. Global transcriptome profiling reveals molecular mechanisms of metal tolerance in a chronically exposed wild population of brown trout. *Environmental Science and Technology* 43, 8869-8877.

Van Aggelen, G., Ankley, G.T., Baldwin, W.S., Bearden, D.W., Benson, W.H., Chipman, J.K., Collette, T.W., Craft, J.A., Denslow, N.D., Embry, M.R., Falciani, F., George, S.G., Helbing, C.C., Hoekstra, P.F., Iguchi, T., Kagami, Y., Katsiadaki, I., Kille, P., Liu, L., Lord, P.G., McIntyre, T., O'Neill, A., Osachoff, H., Perkins, E.J., Santos, E.M., Skirrow, R.C., Snape, J.R., Tyler, C.R., Versteeg, D., Viant, M.R., Volz, D.C., Williams, T.D., Yu, L., 2010. Integrating omic technologies into aquatic ecological risk assessment and environmental monitoring: Hurdles, achievements, and future outlook. *Environmental Health Perspectives* 118, 1-5.

Van Coillie, R., Parent, L., 2011. Mesures d'exposition et de risque. Dans : Van Coillie, R., Parent, L. (Eds), *Écotoxicologie générale et appliquée*. Télé-université. Université du Québec à Montréal. Québec, pp. 65-90.

Van der Oost, R., Beyerb, J., Vermeulen, N., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.

Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003. Biomarkers ad community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International* 28, 711-711.

Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 2006. *Principles of Ecotoxicology*. CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cellular and Molecular Biology* 46, 407-417.

Villeneuve, D.L., Larkin, P., Knoebl, I., Miracle, A.L., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Makynen, E.A., Durhan, E.J., Carter, B.J., Denslow, N.D., Ankley, G.T., 2007. A graphical systems model to facilitate hypothesis-driven ecotoxicogenomics research on the teleost brain-pituitary-gonadal axis. *Environmental Science and Technology* 41, 321-330.

World Statistics, 2014. World Commodity Markets. World Economy Review-April. <http://www.ereport.ru/en/stat.php?razdel=metal>.

Xu, Y., Morel, F.M.M., 2013. Cadmium in marine phytoplankton, in: Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O. (Eds.), *cadmium: from toxicity to essentiality*. Springer Science, Dordrecht, The Netherlands, pp. 509-528.

PARTIE II : PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

8. ARTICLE 1

Defo, M.A., Spear, P.A., Couture, P., 2014. Consequences of metal exposure on retinoid metabolism in vertebrates: A review. *Toxicology Letters* 225, 1-11.

Michel Amery Defo: Conception et réalisation du projet, rédaction et révision de l'article

Philip Spear: Révision de l'article

Patrice Couture: Révision de l'article

Consequences of metal exposure on retinoid metabolism in vertebrates: A review

Defo M A^a, Spear PA^b and Couture P^{a*}

^a Institut national de la recherche scientifique (INRS), Centre Eau Terre Environnement,
490 de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9

^b Centre de Recherche TOXEN and Département des Sciences biologiques, Université
du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Qc, Canada,
H3C 3P8

* Corresponding author: e-mail address: patrice.couture@ete.inrs.ca

Telephone 1-418 559 3825, Fax: 1-418 654-2600

Abstract

What we generally refer to as 'vitamin A' is a group of naturally-occurring molecules structurally similar to retinol that are capable of exerting biological activity. These retinoids are essential to diverse physiological functions including vision, immune response, bone mineralisation, reproduction, cell differentiation, and growth. As well, some retinoids have antioxidant properties. Independent studies published over the last few decades have revealed that many fish and wildlife populations living in highly polluted environments have altered retinoid status possibly associated with retinoid metabolic or homeostatic mechanisms. Substantial evidence links organic contaminant exposure with changes in retinoid status in animal populations, but only a few detailed studies have been published implicating inorganic contaminants such as metals. This mini-review selectively deals with field and laboratory studies reporting associations between environmental contaminants, especially trace metals, and alterations in retinoid status. Both essential and non-essential trace metals have been reported to affect retinoid status. This review focuses on metabolic imbalances of retinoids in relation to metal contamination and illustrates possible modes of action. The role of retinoids as antioxidants and their potential as biomarkers of metal contamination are discussed.

Key words: Chronic metal exposure; retinoid metabolism; antioxidants; vertebrates

1. INTRODUCTION

Technological development has improved the quality of human life in industrial countries, but has also engendered a number of ecological crises and stress in ecosystems. At the top of the list of anthropogenic activities that have considerably impacted the environment are agriculture, deforestation and metal mining and smelting. Traditionally, scientists distinguish two groups of environmental contaminants: man made contaminants (organic contaminants) and inorganic contaminants especially metals. Organic and inorganic contaminants have widely different ecotoxicological properties. For example unlike the organic pollutants, metals are naturally occurring elements, they are an integral part of Earth and are found in all ecosystems (Campbell and Couillard, 2004). Certain metals are essential for life and are required micronutrients for biological functions (Atli and Canli, 2011; Campbell and Couillard, 2004; Niyogi et al., 2007).

Anthropogenic activities are known to have a considerable influence on the local environment and ecology. Toxicological effects caused by environmental pollutants have been highlighted elsewhere. For instance, evidence of metabolic disturbances linked to metal contamination has been reported in fish chronically exposed in the field (Couture and Pyle, 2011). In their review, the authors proposed that the mechanisms of chronic metal toxicity in fish living in contaminated natural environments are subtle and involve energy costs for fighting oxidative stress, metal detoxification and protein repair. Presumably, the toxic mode of action of metals under conditions of chronic exposure is largely similar to oxidative stress induced by reactive oxygen species ; both share multiple mechanisms of cellular response aiming at fighting cellular oxidative damage

(Clarkson, 1995; Couture and Pyle, 2011).

Literature reporting impacts of environmental pollutants on retinoid metabolism is largely focused on organic contaminants, especially persistent organochlorine pollutants (Novák et al., 2008; Rolland, 2000; Simms and Ross, 2000), while literature on metal effects is much scarcer. In the two last decades, trace metals have been reported to induce alterations of retinoid status in wildlife, mostly in fish. In this brief review, we describe the current knowledge and present recent reports of relationships between inorganic contaminants and retinoid metabolism in fish and other vertebrates. The role of retinoids as antioxidants against metal exposure and the mechanisms of retinoid metabolism disruption by inorganic pollutants will be discussed.

2. MOLECULAR STRUCTURE OF RETINOIDS

The molecular structures of common retinoids are illustrated in Figure 1, while Table 1 illustrates the main physico-chemical characteristics of the principal forms of retinoids.

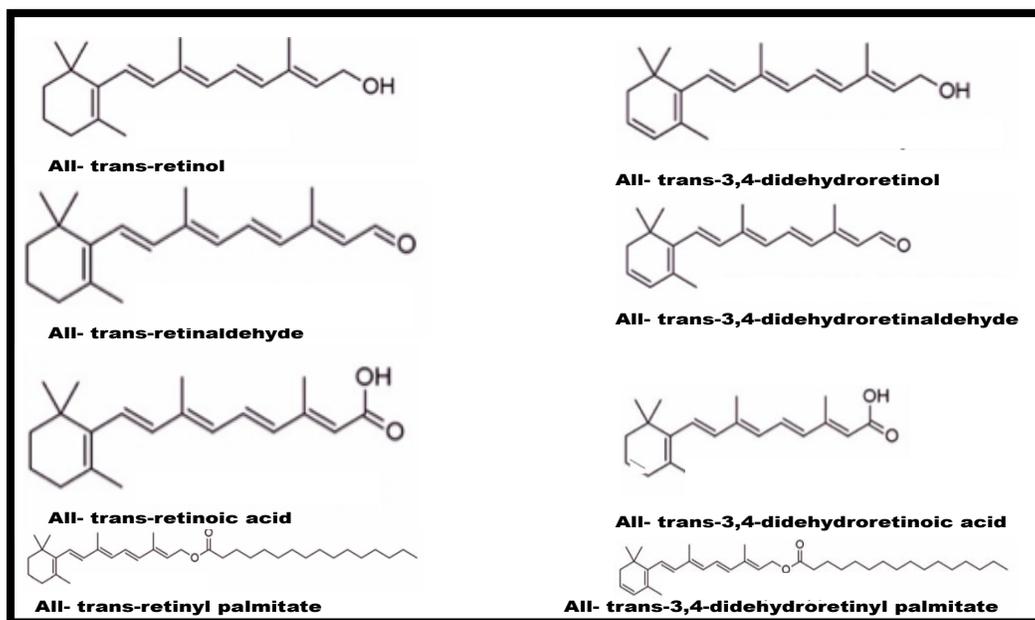


Figure 1: Molecular structures of the principal forms of retinoids listed in Table 1.

Table1: Some physico-chemical characteristics of the principal forms of vitamin A

Retinoids / vitamin A1					Didehydroretinoids / vitamin A2			
Form	Alcohol form	Aldehyde forms	Acid form	Ester form	Alcohol form	Aldehyde forms	Acid form	Ester form
Vitamin A	All trans retinol	All trans retinaldehyde	All trans retinoic acid	All trans retinyl palmitate	All trans 3,4-didehydro retinol	All trans 3,4-didehydro retinaldehyde	All trans 3,4-didehydro retinoic acid	All trans 3,4-didehydro retinyl palmitate
Molecular formula	$C_{20}H_{30}O$	$C_{20}H_{28}O$	$C_{20}H_{28}O_2$	$C_{36}H_{60}O_2$	$C_{20}H_{28}O$	$C_{20}H_{26}O$	$C_{20}H_{26}O_2$	$C_{36}H_{58}O_2$
Molar mass (g/mol)	286.44	284.44	300.44	524.86	284.44	282.44	298.44	522.86
Cell status	Transport	Semi active ^a Active (vision)	Active	Storage	b	b	b	b

a- Immediately precursor of the active form (retinoic acid)

b- Active cell status unknown however could be the same like their retinoid homologues

The predominant forms of retinoids are all-*trans*-retinol and its esters which are found in mammals, amphibians, birds and fish. Other forms of retinoids have also been reported in vertebrates, namely all-*trans*-dehydroretinol (3,4-didehydro-all-*trans*-retinol) and dehydroretinyl esters, which have been found in some fish species (Defo et al., 2012b; Goswami and Barua, 1981; Pereira et al., 2012) some bird species (Müller et al., 2012) and in frogs, although the amount was low in amphibians (Boily et al., 2005). The prevalence and the abundance of different forms of retinoids in fish are reported to be related to fish morphology and life traits (dietary habits, migratory potentiality and habitat) (Goswami and Barua, 1981). According to the classification of Goswami and Barua (1981), two categories in fish exist: Retinol-type (vitamin A₁) and dehydroretinol-type (vitamin A₂). However, the limited available data for the dehydroretinol type makes it difficult to really understand the tissue distribution, metabolism and roles of these substances (Gesto et al., 2012b). Photosynthetic organisms are the main source of pro-retinoids (beta-carotene) and retinoids for animals (Garner et al., 2010a).

3. PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS AND METABOLISM OF RETINOIDS

Retinoids are natural or synthetic compounds with structures similar to retinol and, among this sizable composite of molecules, those naturally-occurring forms capable of exerting biological activity have historically been referred to as vitamin A (Debier and Larondelle, 2005; Novák et al., 2008). The inability of animals to perform *de novo* synthesis of retinoids forces them to incorporate these essential molecules from their diet (Garner et al., 2010a; Novák et al., 2008), which is consistent with the definition of vitamins. The most active retinoids (e.g. retinoic acid) act as hormones by regulating gene transcription through high-affinity binding to nuclear receptors belonging to the

steroid-thyroid family of hormones (Rolland, 2000; Simms and Ross, 2000). Retinoids are essential to diverse vital biological functions such as growth, development, cell differentiation, immune system, reproduction and vision (reviewed in D'Ambrosio et al., (2011); Debier and Larondelle, (2005); Novák et al., (2008). Some retinoids are also known to mitigate oxidative stress (Alpsoy et al., 2009; Defo et al., 2012b; Dragsted, 2008; Rodríguez-Estival et al., 2011c). The alcohol form, retinol, acts as a precursor for the biosynthesis of two critical metabolites (retinal and retinoic acid). Retinol is essential in reproduction while the aldehyde form plays a crucial role in vision (Janošek et al., 2006), especially in the metabolism of the pigment rhodopsin, involved in photoreceptor cells of the retina (D'Ambrosio et al., 2011; Debier and Larondelle, 2005). Perhaps the most biologically active forms of retinoids are the different isoforms of its retinoic acid (Fernández and Gisbert, 2011; Wu and Ross, 2010). This molecule is a potent hormone that controls the expression of genes through binding to nuclear receptors acting on genomic targets (Ross and Zolfaghari, 2004). Through the activation of specific transcription factors (Amann et al., 2011a; Amann et al., 2011b; Sucov and Evans, 1995), the acid form of retinoids is known to participate in the immune system, reproduction, growth and development (Debier and Larondelle, 2005). Literature reports on the potential of retinoids to prevent or treat diseases. By regulating apoptosis and cell growth, retinoids are involved in the prevention of cancers. They are also essential for programmed cell death necessary in 'sculpting' embryonic structures (Hansen et al., 2000; Zile, 2001). Retinoids are also known to have anti-mutagenic and anti-inflammatory effects (Debier and Larondelle, 2005). Deficiencies of retinoids can be deleterious to animals and are able to induce deformities (Branchaud et al., 1995; Gesto et al., 2012b), growth delay, vision impairment, changes in hepatosomatic index or

disease such as exophthalmia in fish (Moren et al., 2004). Long-term avitaminosis A was reported to alter the spermatogenesis in adult mouse by decreasing the differentiated germ cell in vitamin A-deficient animals, which was also correlated with an increase of cellular apoptosis (Boucheron-Houston et al., 2013).

Similarities in retinoid metabolism are generally recognised among the five vertebrate classes (Duester, 2000). Figure 2 illustrates the major pathways in retinoid metabolism in vertebrates.

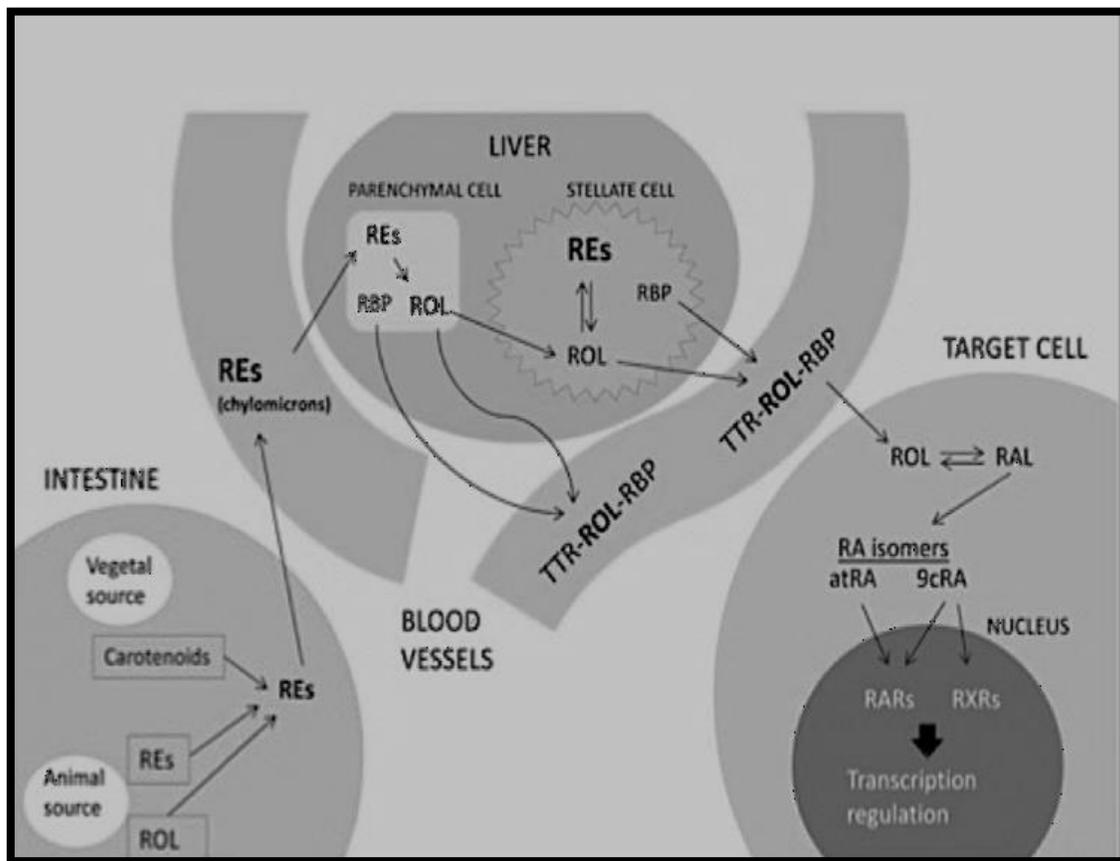


Figure 2: Major pathways in retinoid metabolism in vertebrates (from Gesto et al., (2012a)). Retinyl esters (REs) are hydrolysed in the intestinal lumen and absorbed in the alcohol form, retinol (ROL) by enterocytes. ROL is reesterified to REs before being incorporated into chylomicrons. Chylomicrons reach the general circulation through the intestinal lymph and arrive in the liver where they are taken up by parenchymal cells. The synthesized ROL are stored in stellate cells in the form of REs. Once in the liver the fatty acids are rehydrolysed to ROL where they bind to retinol binding protein (RBP) to be transported to the target cells by binding to the transthyretin (TTR) in blood vessels. In the target cells, ROL are irreversibly oxidized to retinoic acid (RA) via retinal (RAL) and enters the nucleus for transcription regulation by binding to retinoic acid receptors (RARs) or to retinoid X receptors (RXRs).

The first organ involved in retinoid metabolism is the small intestine, where dietary retinoids are taken up mainly as retinol (ROL) from prey or are derived from dietary carotenoids (D'Ambrosio et al., 2011; Fernández and Gisbert, 2011). In the intestinal cells, retinol can be esterified to retinyl esters (REs) with the aid of the lecithin:retinol acyltransferase (LRAT) enzyme (O'Byrne et al., 2005). The synthesized retinyl esters are packaged into chylomicrons and transported principally to the liver parenchymal cells (hepatocytes) through the lymphatic vessels where they are hydrolysed by neutral and acid retinyl ester hydrolases (REH), to produce retinol which binds to the retinol binding protein (RBP) (Albalat, 2009). Although high plasma retinyl esters (mainly retinyl palmitate) were detected in some bird species (Müller et al., 2012; Wallace et al., 1996), the retinols bound to RBP are mainly transferred to liver stellate cells where they are also converted into REs for storage through the action of the LRAT enzyme. The primary role of RBP is the protection of retinol against oxidation or degradation. However, RBP also participates in retinoid homeostasis, controlling the metabolism, storage and transport of retinoids (Albalat, 2009). The ROL-RBP complex may also be directly secreted into the general circulation, where it binds to transthyretin (TTR) for transportation to the target cells. TTR plays a key role as it assures the delivery of retinol to target cells by avoiding kidney filtration of retinol (Lans et al., 1993). The complex TTR-ROL-RBP delivers retinol to the target cells (Green and Green, 1994) where it is metabolized into retinyl esters for storage or irreversibly oxidized by aldehyde dehydrogenases to retinoic acid (RA) *via* its immediate metabolic precursor, the retinal (RAL) (Duester et al., 2003). Synthesized retinoic acid enters the nucleus and regulates gene transcription by binding to retinoic acid receptors (RARs) or to retinoid X receptors (RXRs) (Albalat, 2009; Gesto et al., 2012a; Levi et al., 2008). Once the biological action

of retinoic acid is exerted, enzymes such as Cyp26 convert RA into biologically inactive compounds like 4-hydroxy-RA and 4-oxo-RA (Albalat, 2009).

As mentioned above, the uptake of retinyl ester-containing chylomicrons occurs mainly in the hepatocytes. It has been well documented that about 75% of retinyl esters (REs) are taken up by the hepatic cells, while white adipocyte tissue account for about 15% of extra-hepatic retinoid storage. Other tissues such as skeletal muscle, heart, lung, and kidney take up the remaining 10 % (D'Ambrosio et al., 2011). The storage of retinyl esters in tissues other than liver implies that retinol, which is the main transport form of retinoids found in the general circulation, may also originate from these tissues.

4. EFFECTS OF EXCESS INTAKE OF RETINOIDS IN VERTEBRATES: HYPERVITAMINOSIS A

A thorough description of the consequences of excess retinoids on animal health can be found in recent reviews from Fernández and Gisbert (2011) and Inoue et al. (2010). Briefly, the impact of hypervitaminosis A will depend on several factors including the nature (ester, alcohol, aldehyde or acid form) and the concentration of vitamin A supplied, time of exposure and animal developmental stage (egg, embryo, larvae, juvenile or adult) (Fernández and Gisbert, 2011). Excess exogenous retinoids influence reproductive performance in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Specifically, hypervitaminosis of retinyl esters enhance spawning performance and augment egg retinoid content, but does not affect egg and larval quality (Furuita et al., 2001; Furuita et al., 2003).

Excess retinoids induce skeletal deformities in fish larvae (Negm et al., 2013; Yutaka et al., 2011). Chronic intake of retinol led to craniofacial and vertebral deformities, and

deleterious effects for bone health in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) (Ørnsrud et al., 2013). Œdema, tail reduction and brain deformities were observed in embryos of zebrafish (*Danio Brachydanio rerio*) exposed to 0.9 µg/L of all-trans-retinoic acid (Herrmann, 1995). In contrast to control fish, 60% of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed with higher amounts of retinyl acetate during 14 weeks presented scoliosis and compressed vertebrae in the anterior region of the vertebral column (Lewis-McCrea and Lall, 2010). In European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), the transcription level of genes involved in morphogenesis was positively correlated with hypervitaminosis A, which was also coupled to delays in development, reduction in the number of vertebral segments and bone formation anomalies in the cephalic region of fish (Villeneuve et al., 2006). During post-hatching development in sea bass, Villeneuve et al. (2005) highlighted the implication of retinoid metabolic pathways in the induction of skeletal malformations.

Hypervitaminosis was related to decreased growth in sea bass (Villeneuve et al., 2005), alteration of the specific growth rate in milkfish (*Chanos chanos*) fed with retinyl palmitate (Tutas et al., 2013) and deleterious effects on growth in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) (Ørnsrud et al., 2013).

Teratogenic effects have been reported in zebrafish for two isomers of retinoic acids, all-trans retinoic acid (RA) and 9-cis RA, with stronger effects for the latter (Zhang et al., 1996). Notably, higher exogenous 9-cis RA completely alters the development of embryos posterior midbrain and qualitatively affects the transcription of *hlx-1* (gene involved in cellular differentiation and in organ development) within the rostral central nervous system (CNS). However all-trans RA only induces the premature expression of

pax-2 (gene involved in urogenital, eyes, ears and CNS development) of the posterior midbrains and a weak expression signal of *hlx-1* gene in the CNS of zebrafish (Zhang et al., 1996).

Excess intake of retinoids may lead to deleterious effects not only in fish but also in other vertebrates (Inoue et al., 2010). A 3-day exposure to a high dose (0.6µg/L) of retinoids (retinoic acid) induced malformations in African clawed frog (*Xenopus laevis*) during embryogenesis. Observed biological effects included microphthalmia and a reduction in prosencephalon size (Degitz et al., 2003). This spectrum of effects coupled with hind-limb dysmorphogenesis was also observed with mink frog (*Rana septentrionalis*), green frog (*Rana clamitans*) and wood frog (*Rana sylvatica*) (Degitz et al., 2000).

Hypervitaminosis A causes cellular depletion of some essential elements like phosphorus in birds (Alarcón Corredor et al., 1996). Teratogenic effects of retinoic acids including dysplasia of caudal structures, limb malformations and scoliosis were reported in chick tail bud (Griffith and Wiley, 1991).

As reviewed in Ritchie et al. (2003), hypervitaminosis A also results in abnormalities in mammalian development. Possible consequences include malformations in all body systems including limbs, ears and face, and cardiovascular, urogenital, respiratory and gastrointestinal systems (Ritchie et al., 2003).

5. IMBALANCE OF RETINOID STORAGE IN RELATION TO METAL CONTAMINATION

Lipophilic and persistent contaminants such as dioxins, furans, PCBs and organochlorine pesticides tend to decrease the storage of retinoids in wildlife; however,

due to the limited literature related to inorganic contaminants, the trend is not so clear for this group of pollutants. Studies that have reported alterations in retinoid metabolism in biota associated with exposure to trace metals are summarized in tables 2, 3 and 4. From these studies, it is clear that metals can modify retinoid concentrations in animal tissues. The proposed mechanisms by which metals alter retinoid homeostasis may involve impairment of retinoid metabolising enzymes (Tsin and Malsbury, 1991), changes in gene expression (Pierron et al., 2011) or dysfunctions of hepatic storage capacity (Defo et al 2012). Data from literature reporting retinoid-disrupting effects of inorganic contaminants are increasing, but these effects depend on the nature of the metal (essential or non essential), the exposure mode (field or lab exposure), the tissues examined and the species (Table 2).

5.1. Metal effects on retinoid metabolism in fish

Fish are located at the top of the aquatic food web and can integrate metals either from food or directly from water. Adverse effects of bioaccumulated metals in fish include the disruption of retinoid metabolism.

We have recently shown that exposure to Cd results in higher tissue concentrations of dehydroretinoids (Defo et al., 2012b). Yellow perch (*Perca flavescens*) collected in late spring were sampled in six lakes representing a metal contamination gradient. Fish from Cd-contaminated lakes had significantly higher concentrations of liver 3,4-didehydroretinol and 3,4-didehydroretinyl esters including 3,4-didehydroretinyl palmitate, stearate and myristate than fish from reference lakes. However, the increase in 3,4-didehydroretinyl ester stores with increasing Cd concentrations was quantitatively much more important than the increase in free 3,4-didehydroretinol leading to a significant

decrease in the percentage of liver free 3,4-didehydroretinol with increasing Cd concentrations (Defo et al., 2012b). In the same study, plasma 3,4-didehydroretinol concentrations were also analysed to determine whether increasing liver 3,4-didehydroretinol concentrations was translated to its mobilization from liver to blood. The authors observed no significant correlation between plasma and liver 3,4-didehydroretinol concentrations (Defo et al., 2012b). This result suggests that 3,4-didehydroretinol is mobilized from tissues other than liver.

Another field study was undertaken in a coastal lagoon in Brazil that receives effluents from an iron-ore mining and processing plant. In this study, seven fish species were sampled in order to investigate the possible effects of trace metal exposure on retinoid levels in liver (Pereira et al., 2012). Comparing data from reference and contaminated sites, considerable qualitative and quantitative differences in hepatic retinoid concentrations among species were found. A positive correlation was reported between hepatic Fe, Cu and Zn and hepatic retinol levels. The same correlation was also obtained between hepatic Fe and liver retinyl palmitate. However, fish species from the same sites with higher concentrations of Al, As, and Cd indicated lower hepatic didehydroretinol and didehydroretinyl palmitate. In particular, liver didehydroretinoids and retinoids decreased with an increase of liver Pb (Pereira et al., 2012).

Table 2: Effects of trace metals on concentrations of retinoids in various fish tissues

Metal	Type of exposure	Species	Tissue	Retinoid changes	References
Cd	Field	Yellow perch (<i>Perca flavescens</i>)	Liver	↑Dehydroretinol ↑dehydroretinyl esters ↓% dehydroretinol	(Defo et al., 2012a)
Cd	Field	Yellow perch (<i>Perca flavescens</i>)	Plasma	↑Dehydroretinol	(Defo et al., 2012a)
Fe, Mn	Field	Lake trout (<i>Salvelinus namaycush</i>)	Liver	↓Retinyl palmitate ↓retinol	(Payne et al., 1998)
Cu	Labs (Dietary exposure)	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	Eggs	No Effect on retinal level	(Alsop et al., 2007)
Cu	Labs (Dietary exposure)	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	Whole body	↓Retinyl esters ↓retinal ↓Didehydrotinyl esters ↓retinol	(Alsop et al., 2007)
Se	Field	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Liver	↓Total retinyl ester	(Miller et al., 2009)
Se	Field	Brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	Liver	No effect	(Miller et al., 2009)
Pb	Field	Seven fish species (teleost)	Liver	↓Retinyl palmitate ↓retinol ↓Didehydrotinyl retinyl palmitate ↓Didehydroretinol	(Pereira et al., 2012)
Fe, Cu, Zn	Field	Seven fish species (teleost)	Liver	↑Retinol	(Pereira et al., 2012)
Fe	Field	Seven fish species (teleost)	Liver	↑ Retinyl palmitate	(Pereira et al., 2012)
Al, As, Cd	Field	Seven fish species (teleost)	Liver	↓Didehydrotinyl retinyl palmitate ↓Didehydroretinol	(Pereira et al., 2012)
Hg	Labs (Aqueous exposure)	Notopterus (<i>Notopterus notopterus</i>)	Liver	↑Vitamin A	(Verma and Tonk, 1983)
Hg	Labs (Aqueous exposure)	Notopterus (<i>Notopterus notopterus</i>)	Muscle	↓Vitamin A	(Verma and Tonk, 1983)
Hg	Labs (Aqueous exposure)	Notopterus (<i>Notopterus notopterus</i>)	Ovary	↓Vitamin A	(Verma and Tonk, 1983)
Hg	Labs (Aqueous exposure)	Catfish (<i>Heteropneustes fossilis</i>)	Muscle	↓Vitamin A	(Gupta and Sastry, 1981)

Table 3: Effects of trace metals on concentrations of retinoids in various bird tissues

Contaminant	Type of exposure	Species	Tissue	Metal mechanism	References
Cd, Se	Field	Common eiders (<i>Somateria mollissima borealis</i>)	Liver	No Effect	(Wayland et al., 2003)
Hg	Field	Common eiders (<i>Somateria mollissima borealis</i>)	Liver	↑ Retinyl palmitate ↑ Retinol ↑ Ratio of retinol/retinyl palmitate ↓ Ratio of plasma retinol/liver retinol	(Wayland et al., 2003)
Hg, Cd, Se	Field	Common eiders (<i>Somateria mollissima borealis</i>)	Plasma	No Effect	(Wayland et al., 2003)
Cd, Zn	Field	Surf scoters (<i>Melanitta perspicillata</i>)	Liver	↑ Retinyl palmitate	(Harris et al., 2007)
Cd	Field	Surf scoters (<i>Melanitta perspicillata</i>)	Liver	↑ Retinol	(Harris et al., 2007)
Pb	Field	Coots (<i>Fulica atra</i>) Pochard (<i>Aythya ferina</i>)	Plasma	↓ Retinol	(Martinez-Haro et al., 2011)

Table 4: Effects of trace metals on concentrations of retinoids in various mammalian tissues

Contaminant	Type of exposure	Species	Tissue	Metal mechanism	References
Cd	Labs (Injection)	Rat (<i>Rattus rattus</i>)	Plasma	↓Vitamin A	(Sugawara and Sugawara, 1978, 1979; Sugawara et al., 1981)
Cd	Labs (Injection)	Rat (<i>Rattus rattus</i>)	Liver	↑Vitamin A	(Sugawara and Sugawara, 1978)
Cu, Zn	Labs (Injection)	Rat (<i>Rattus rattus</i>)	Plasma	No Effect	(Sugawara and Sugawara, 1979)
Cu	Labs (Dietary exposure)	Mink (<i>Mustela vison</i>)	Liver Plasma	No Effect	(Käkelä et al., 1999)
Pb	Field	Red deer (<i>Cervus elaphus</i>)	Testis	↓Retinyl palmitate ↓retinol	(Rodríguez-Estival et al., 2011c)
Se	Field	Red deer (<i>Cervus elaphus</i>)	Liver	↓retinol	(Rodríguez-Estival et al., 2011c)
Pb	Field	Wild board (<i>Sus scrofa</i>)	Liver	↑Retinol ↓Retinyl stearate	(Rodríguez-Estival et al., 2011c)
Pb	Field	Red deer (<i>Cervus elaphus</i>)	Liver	↑retinol	(Rodríguez-Estival et al., 2011b)
Cu	Field	Wild board (<i>Sus scrofa</i>)	Liver	↑Retinol	(Rodríguez-Estival et al., 2011b)
Pb	Field	Wild board Red deer <i>Cervus</i>	Liver	↓Retinyl esters ↑ % Retinol	(Rodríguez-Estival et al., 2011b)

Similar-sized female lake trout (*Salvelinus namaycush*) were collected in late summer at a reference lake (Shabogomo Lake) and in a Fe and Mn contaminated lake (Wabush Lake) (Payne et al., 1998). The authors observed that retinol and retinyl palmitate were 60- and 150-times lower respectively in contaminated fish compared to fish from the reference lake. These results contrast with those of Pereira *et al.* (2012) who reported a positive correlation between Fe contamination and liver retinyl palmitate concentrations in fish living in Fe contaminated area, suggesting that changes in liver retinoid concentrations induced by Fe exposure are species-specific.

Iron is an essential element involved in the construction of structural components of key enzymes in the cell (Senadheera et al., 2012). Another study reported that iron deficiency negatively impacted the metabolism of some enzymes, presumably because of its presence in the enzyme structure (Okoyasu et al., 1981). Although both studies were carried out in the field, the fish species sampled were not the same. These studies combined suggest that interspecific differences in response to Fe contamination might be explained by their different sensitivities to Fe or by the interference of Mn in the action of Fe and therefore their different responses in the storage of retinyl palmitate. Mn was reported to profoundly influence the spectral change of retinyl phosphate in the liver of rat (Shidoji et al., 1983).

Miller *et al.* (2009) reported a negative association between muscle Se and liver total retinyl esters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). However, no effects of Se on retinol metabolism were reported with brook trout (*Salvelinus fontinalis*) (Miller et al., 2009).

Laboratory studies also revealed similar results with those obtained in the field. Verma and Tonk (1983) reported an increase in hepatic retinoid concentrations in the tissues of *Notopterus notopterus* exposed to sublethal concentrations of mercury. Liver retinoid concentrations have been proposed as the most consistent and sensitive indicators of pollutant-related retinoid effects (Simms and Ross, 2000). In contrast, a diminished retinoid storage capacity was reported in fish muscle and ovary associated with Hg contamination (Gupta and Sastry, 1981; Verma and Tonk, 1983). After 30 days of exposure, a sublethal concentration of Hg significantly decreased retinoid concentrations in the muscle of catfish (*Heteropneustes fossilis*) (Gupta and Sastry, 1981).

Investigating the link between toxicant exposure and retinoid levels in zebrafish (*Danio rerio*), Alsop et al. (2007) reported a depletion of retinoid stores in fish. Specifically, whole body retinol, retinal, retinyl ester and didehydroretinyl ester were reduced in fish exposed to copper. However, no effect was observed on egg retinal, which was the only form of retinoids found in this life stage (Alsop et al., 2007). This study indicated that although adult fish endogenous retinoids were depleted, daily retinoids intake was sufficient to maintain a normal concentration of egg retinal.

5.2. Metal effects on retinoid metabolism in birds

As observed in fish, metal-related changes in tissue retinoids have been reported in numerous studies of free-ranging birds (Table 3). Wayland et al. (2003) found an increase in liver retinol and retinyl palmitate of common eiders (*Somateria millissima borealis*) in relation to higher liver Hg. The same study reported an increase in liver retinol:retinyl palmitate ratios and a decrease in plasma retinol:liver retinol ratios in Hg-contaminated eiders, suggesting a perturbation in the mobilization of liver retinoids into

the circulation (Defo et al., 2012b). However, no significant correlation was established between liver Cd or Se and liver retinoid concentrations, or between liver Hg, Cd and Se and plasma retinol concentrations (Wayland et al., 2003). The mobilization of plasma retinol in coots (*Fulica atra*) and pochard (*Aythya ferina*) also appears to be affected by Pb exposure, decreasing with increasing blood Pb concentrations (Martinez-Haro et al., 2011). In their study carried out on the Pacific coast of British Columbia, Canada, with surf scoters (*Melanitta perspicillata*), Harris et al. (2007) highlighted the positive relationship between liver retinol and kidney Cd and between liver retinyl palmitate and kidney Cd and Zn.

5.3. Metal effects on retinoid metabolism in mammals

Studies have observed negative relationships between circulating retinoid levels and tissue metal concentrations in exposed mammals (Table 4). Circulating retinoid levels in rat (*Rattus ratus*) were negatively correlated with injected Cd concentrations (Sugawara and Sugawara, 1978, 1979; Sugawara et al., 1981) and positive relationships were found between Cd and liver retinoid concentrations in rat (Sugawara and Sugawara, 1978). However no significant effects on liver or plasma retinoids were observed when rats were injected with Cu or Zn (Sugawara and Sugawara, 1979). Also, chronic dietary exposure to low levels of Cu did not reduce or increase liver retinoid and circulatory retinol concentrations in mink (*Neovison vison*) (Käkelä et al., 1999).

Different trends of change in retinoid levels in relation with trace metals were reported in ungulates from Pb mining areas (Rodríguez-Estival et al., 2011b; Rodríguez-Estival et al., 2011c). These studies were conducted within and outside a Pb mining area and were aiming to assess the effects of trace metals on retinoid levels in red deer (*Cervus*

elaphus) and wild boar (*Sus scrofa*). Retinyl palmitate and retinol concentrations in testis of red deer were diminished in mining impacted compared to reference sites. Red deer also exhibited negative correlations between bone Se levels and hepatic retinol (Rodríguez-Estival et al., 2011c). However an increase in liver retinol associated with a decrease in liver retinyl stearate was observed in wild boar from the same contaminated area. In another field study, Rodríguez-Estival et al. (2011a) emphasized the alteration of retinoid concentrations in tissues of red deer and wild boar exposed to Pb. They identified a positive correlation between liver retinol and liver Pb in red deer and between liver retinol and liver Cu in wild boar. In both species, decreases in liver retinyl esters and increases in liver retinol percentage were reported in the Pb mining area, suggesting a possible mobilisation of liver retinoid stores (Simms and Ross, 2000).

6. MODES OF ACTION OF TRACE METALS IN THE DISRUPTION OF RETINOID METABOLISM

In the previous sections we have reviewed data regarding retinoid metabolite imbalance in vertebrates exposed to metal contamination. However, the mechanisms underlying the disruption of retinoid metabolism by trace metals remains to be elucidated. Table 5 lists some key studies proposing mechanisms of retinoid metabolism impairment by trace metals. Driessen et al. (2000) suggested that the disruption of the expression of genes involved in retinoid homeostasis leads to the accumulation of retinol and retinyl esters.

Table 5: Mechanisms of retinoid metabolism impairment by trace metals

Wildlife type	Contaminant	Type of exposure	Species	Tissue	Metal mechanism	References
Fish	Cd, Cu	Field	Yellow perch (<i>Perca flavescens</i>)	Liver	↓Transcription level of Epidermal retinol dehydrogenase 2	(Pierron et al., 2011)
Fish	Cd	Field	Yellow perch (<i>Perca flavescens</i>)	Liver	↑Transcription level of TTR	(Pierron et al., 2011)
Fish	Cd, Ni	Labs	Yellow perch (<i>Perca flavescens</i>)	Liver	↑Transcription level of photoreceptor associated retinol dehydrogenase 2	(Defo et al unpublished data)
Fish	Cd, Ni	Labs (Aqueous exposure)	Yellow perch (<i>Perca flavescens</i>)	Muscle	↓Transcription level of Photoreceptor associated retinol dehydrogenase 2	(Defo et al unpublished data)
Fish	Cu	Labs (Dietary exposure)	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	Whole body	No effect on raldh2	(Alsop et al., 2007)
Mammal	Zn, Cd	Labs (Add to the incubation preparation)	Bovine	Eyes	↓REH activity	(Tsin and Malsbury, 1991)

Pierron *et al.* (2011) conducted a study on indigenous yellow perch chronically exposed to metals, and reported that the transcription level of the epidermal retinol dehydrogenase 2, a gene thought to be involved in the biosynthesis of an enzyme that converts retinol to retinoic acid *via* retinaldehyde (Lee *et al.*, 2009), was down-regulated in response to long term Cd exposure (Pierron *et al.*, 2011). However, the transcription level of transthyretin, a gene encoding for TTR, a protein which prevents the loss of RBP by filtration in the kidney (Berry *et al.*, 2012), increased with increasing liver Cd concentration in yellow perch (Pierron *et al.*, 2011). In contrast, no effect of Cu on whole body *raldh-2*, a gene involved in retinal biosynthesis, was reported (Alsop *et al.*, 2007). These results combined suggest that the transcriptional response of genes involved in retinoid metabolism is metal-specific.

The effects of metal contamination on the transcription level of one thousand genes was investigated using a cDNA microarray on adult yellow perch (*Perca flavescens*) exposed in the laboratory to cadmium (0 µg/L, 0.8 µg/L and 3.65 µg/L) for 6 weeks. The result indicates that the *photoreceptor associated retinol dehydrogenase type 2*, gene involved in retinoid metabolism, was up-regulated at the highest Cd exposure. Furthermore, a global analysis of gene expression patterns revealed that a gene involved in vitamin binding was overexpressed in the liver of Cd-exposed fish (Bougas *et al.*, 2013). The up-regulation of other genes playing a role in vitamin process, such as *serine hydroxymethyltransferase* and *formimidoyltransferase-cyclodeaminase* (folic acid metabolism) and *cysteine sulfinic acid decarboxylase* (taurine metabolism) are in accordance with the role of some vitamin to provide protection against metal induced oxidative stress in animal tissues.

Changes in the transcription level of genes involved in retinoid metabolism may lead to the modifications of the activity of enzymes involved in this metabolic pathway. Tsing and Malsbury (1991) reported that divalent cations such as Cd and Zn inhibited the activities of retinyl ester hydrolases in bovine ocular tissues. Few studies reported directly the impact of metals on the activities of enzymes involved in retinoid metabolism (REH, LRAT, ARAT; Figure 3).

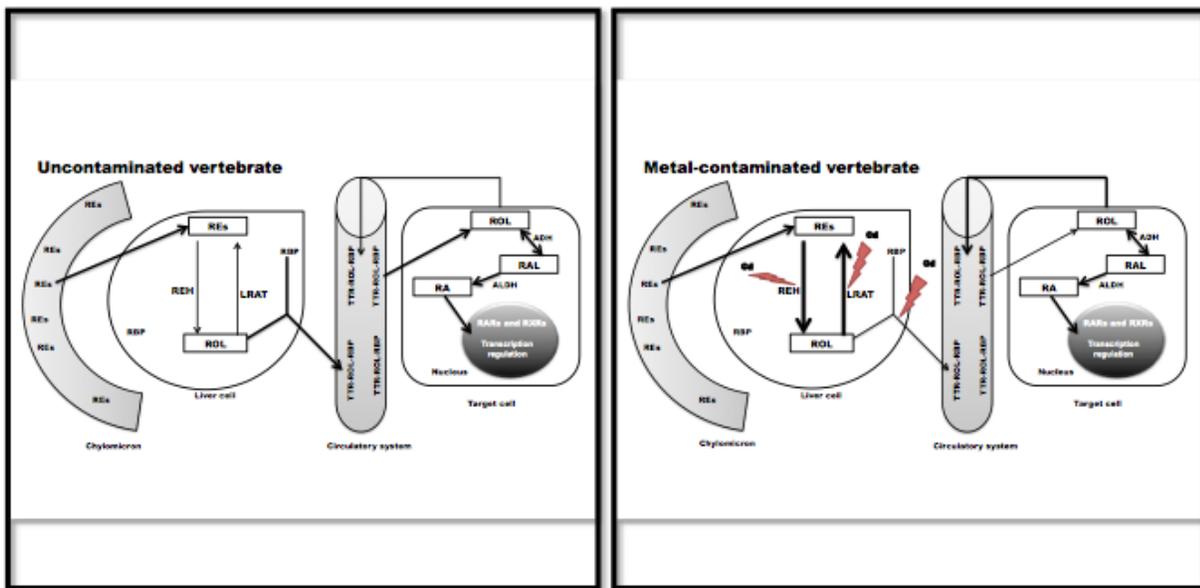


Figure 3: Proposed basic mechanisms of metal toxicity on retinoid metabolism pathways in vertebrates. Nevertheless, the observation that metals impair retinoid storage and mobilization supports the hypothesis that metals, like organic contaminants, have the potential to affect the activities of these enzymes (Boily et al., 2004; Boily et al., 2009). Boily et al., (2009) have associated the imbalance of retinoid esters in frog liver living in organic contaminant impacted areas to the alteration of the activities of two key enzymes (LRAT and REH) involved in the retinoid metabolism.

The ratio of free over ester forms of retinoids is considered to be an index of the metabolism of stored retinoids in the liver. A lower ratio of liver retinol/retinyl palmitate in bullfrogs was observed in polluted sites (Boily et al., 2005). In another study, the percentage of liver 3,4-didehydroretinol was lower in fish living in Cd impacted lakes suggesting that Cd alters the activities of enzymes involved in ester hydrolysis (REH) or in esterification of dROH (LRAT or ARAT) (Defo et al., 2012b). However the percentage of liver retinol was reported to increase in red deer and wild boar living in a Pb impacted area, suggesting that the metal inhibited the activities of enzymes involved in the esterification of retinol (LRAT) (Rodríguez-Estival et al., 2011b). The ratio of plasma retinol over liver retinol is used as an index of the mobilisation of retinol in the general circulation. This ratio was reported to be lower in yellow perch living in Cd impacted lakes (Defo et al., 2012b) and in common eiders inhabiting Hg-contaminated areas (Wayland et al., 2003). This low ratio could be attributed to the inhibition of the synthesis of RBP and/or TTR proteins or to the inhibition of retinol binding to RBP (Defo et al., 2012b). To better understand the mechanisms of metal toxicity on retinoid metabolism, it will be essential to compare transcriptomic data with direct measurements of the activities of enzymes involved in this metabolic pathway, in addition to quantification of retinoid concentrations.

7. THE ROLE OF RETINOIDS AS ANTIOXIDANTS AND THEIR POTENTIAL AS BIOMARKERS OF METAL CONTAMINATION

In vertebrates, trace metals are well known to generate oxidative stress. The mechanisms involved in the production of stress related molecules, such as reactive oxygen species (ROS) by metals include the interference of trace metal-related

processe and/or the generation of free radicals by reacting with changeable valence ions (Lushchak, 2011). The consequence of ROS production in relation to metal exposure included increase in lipid peroxidation (Chen et al., 2013), with possibly oxidative damage of DNA and proteins (Leonard et al., 2004). Most studies involving antioxidants and their role in combatting cellular oxidative stress in vertebrates have focused on the activities of enzymes such as SOD, GST, GPx, G6PDH and CAT (Choi et al., 2008; Lushchak, 2011). In contrast, only a few studies have examined exogenous antioxidants such as retinoids (Defo et al., 2012; Miller et al., 2009; Rodríguez-Estival et al., 2011b; Rodríguez-Estival et al., 2011c). Retinoids and other exogenous antioxidants such as vitamin E (α -tocopherol) and vitamin C (ascorbic acid) generally modulate the effects of ROS by scavenging cellular free radical molecules (Lushchak, 2011).

The interactions of both types of antioxidants (endogenous and exogenous) appear essential to counteract metal mediated oxidative damage (Cairns et al., 2011; Flora et al., 2008). Figure 4 illustrates the actions of endogenous and nutritional antioxidants in the reduction of free radicals within the cell. Both groups of antioxidants react in the organism as an integrated defence system against free radical molecules. Under normal conditions, a cellular free radical steady state is maintained between ROS generation and depuration. However, under certain conditions like metal exposure, oxidative stress occur leading to the augmentation of ROS in the cell. Increases in intracellular ROS may be counterbalanced by the action of cellular antioxidant defence mechanisms. Retinoids protect against oxidative stress by directly scavenging free radicals and by interfering with the production of reactive oxygen species (Alpsoy et al., 2009; Keys and Zimmerman, 1999; Vertuani et al., 2004). Hence, the highly significantly positive

correlation observed between kidney Cd and liver retinoid concentrations in fish living in impacted sites may be interpreted as a mechanism to provide protection against oxidative damage induced by Cd exposure (Defo et al., 2012b). This finding is in accordance with other studies, reviewed above, reporting an increase in retinoid levels in wildlife in relation to Fe, Zn, Cu pollution (Pereira et al., 2012); Hg (Verma and Tonk, 1983; Wayland et al., 2003); Pb (Rodríguez-Estival et al., 2011b; Rodríguez-Estival et al., 2011c), indicating that increase in retinoid concentrations might protect animal against ROS.

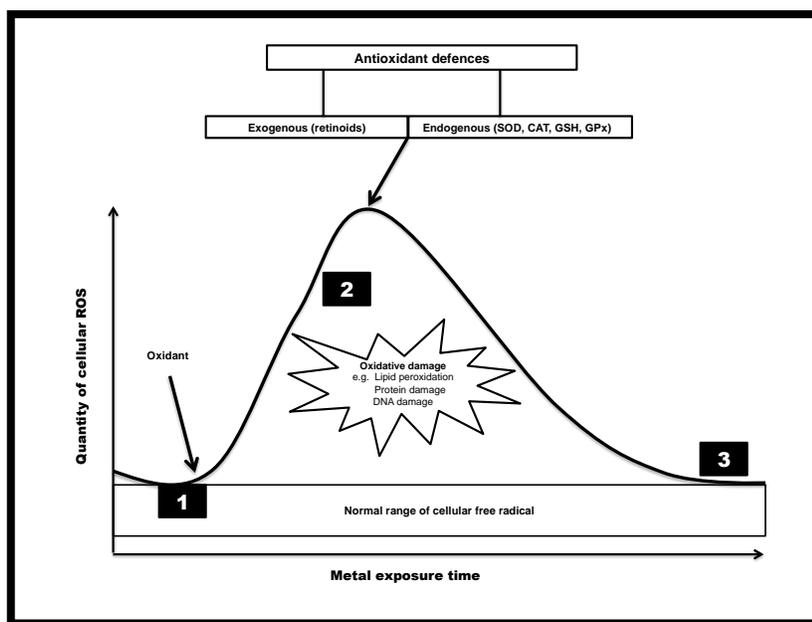


Figure 4: Schematic diagram illustrating the relationship between free radicals quantity and time of metal exposure in the intracellular environment, (modified from (Cairns et al., 2011; Lushchak, 2011)). (1): amount of free radicals in normal conditions; (2): cell overproduction of free radicals leading to oxidative stress, returning to the normal state trough the action of antioxidant defence systems (3).

8. POSSIBLE TOXICOLOGICAL CONSEQUENCES OF ALTERED RETINOID STATUS IN VERTEBRATES

In addition to their endogenous formation by various enzymatic processes, retinoids are

ubiquitous chemicals found in plants in the form of carotenoids and in animals mainly in the form of retinyl esters (Fernández and Gisbert, 2011). Understanding the complex metabolic processes and functions of retinoids and their metabolites, reviewed in Section 3, is essential to investigate the consequences of contaminant-induced impairment of retinoid metabolism. This includes dietary uptake, blood transport, cell storage and mobilization mechanisms of retinoids in responses to tissue requirements (O'Byrne and Blaner, 2013). Disturbing of one of these processes may affect the functions of retinoids, reviewed in Section 3. Disruption in retinoid status can lead to broad spectrum of negative health impacts ranging from vision pathology to death (Von Lintig, 2012). For example, retinoid signalling pathways were reported to be disturbed when zebrafish larvae were acutely exposed to polybrominated diphenyl ethers (PBDE), possibly leading to an alteration of eye development (Xu et al., 2013). Another study, focused on the same contaminant but this time at environmentally relevant concentrations, also highlighted the potential implication of long-term exposure to PBDE on vision and reproduction in zebrafish, the transcription level of various genes involved in the transport, storage and metabolism of retinoids in tissues being disrupted (Chen et al., 2012).

9. CONCLUSIONS

Retinoid levels are known to vary widely among individuals, which poses a major problem when attempting to quantify and compare retinoid levels in wild populations. This can be overcome by identifying, characterising, and minimizing the various parameters affecting retinoid metabolism (e.g. sex, age, condition index, nutritional status, quality and quantity of diet, sampling season...). Thus, if these confounding

factors are minimized, changes in the levels of retinoids might be used as a biomarker of metal exposure, in the context of environmental risk assessment. In this mini review, we have presented evidence that metal exposure can affect retinoid status in vertebrates. Changes in tissue concentrations of retinol or its metabolites are the ultimate consequences of metal toxicity on the retinoid metabolic pathways, including modifications of both gene transcription levels and enzyme activities. This hypothesis is supported by studies reporting interactions between metal contamination and retinoid metabolism in wild and laboratory organisms. Studies have also reported that organisms living in metal contaminated areas displayed higher tissue retinoid levels, potentially providing protection against oxidative damage induced by metal exposure. In addition, a disruption in retinoid status might prevent retinoids from fulfilling their cellular functions. Clearly, further investigations are needed to identify the mechanisms linking metal exposure with retinoid metabolism and the direct toxicological consequences of altered retinoid status in vertebrates remain to be elucidated.

10. ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and by Vale Limited (Rio de Janeiro, Brazil).

11. REFERENCES

- Alarcón Corredor, O.M., Larralte, T.S., Patiño, A.C., Pachano Primera, Y.J., Alarcón, A.O., Reinoso, J., 1996. Alterations in the liver and kidney phosphorus in guinea pigs exposed to high doses of vitamin a (retinol). *Acta Científica Venezolana* 47, 127-131.
- Albalat, R., 2009. The retinoic acid machinery in invertebrates: Ancestral elements and vertebrate innovations. *Molecular and Cellular Endocrinology* 313, 23-35.
- Alpsoy, L., Yildirim, A., Agar, G., 2009. The antioxidant effects of vitamin A, C, and e on aflatoxin B 1-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Toxicology and Industrial Health* 25, 121-127.
- Alsop, D., Brown, S., Van Der Kraak, G., 2007. The effects of copper and benzo[a]pyrene on retinoids and reproduction in zebrafish. *Aquatic Toxicology* 82, 281-295.
- Amann, P.M., Eichmüller, S.B., Schmidt, J., Bazhin, A.V., 2011a. Regulation of gene expression by retinoids. *Current Medicinal Chemistry* 18, 1405-1412.
- Amann, P.M., Schadendorf, D., Owen, R.W., Korn, B., Eichmüller, S.B., Bazhin, A.V., 2011b. Retinal and retinol are potential regulators of gene expression in the keratinocyte cell line HaCaT. *Experimental Dermatology* 20, 373-375.
- Atli, G., Canli, M., 2011. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology* 20, 1861-1869.

Berry, D.C., Croniger, C.M., Ghyselinck, N.B., Noy, N., 2012. Transthyretin blocks retinol uptake and cell signaling by the holo-retinol-binding protein receptor STRA6. *Molecular and Cellular Biology* 32, 3851-3859.

Boily, M., Bisson, M., Spear, P., 2004. Rétinoïdes biomarqueurs et base moléculaire d'effets de substances toxiques, in: Campbell, P.G.C., Pelletier, É., Denizeau, F. (Eds.), *Écotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement*. Presses de l'Université du Québec, Québec, pp. 197-256.

Boily, M., Thibodeau, J., Bisson, M., 2009. Retinoid metabolism (LRAT, REH) in the liver and plasma retinoids of bullfrog, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural contamination. *Aquatic Toxicology* 91, 118-125.

Boily, M.H., Bérubé, V.E., Spear, P.A., DeBlois, C., Dassylva, N., 2005. Hepatic retinoids of bullfrogs in relation to agricultural pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 1099-1106.

Boucheron-Houston, C., Canterel-Thouennon, L., Lee, T.L., Baxendale, V., Nagrani, S., Chan, W.Y., Rennert, O.M., 2013. Long-term vitamin A deficiency induces alteration of adult mouse spermatogenesis and spermatogonial differentiation: Direct effect on spermatogonial gene expression and indirect effects via somatic cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 24, 1123-1135.

Bougas, B., Normandeau, E., Pierron, F., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2013. How does exposure to nickel and cadmium affect the transcriptome of yellow perch (*Perca flavescens*) - Results from a 1000 candidate-gene microarray. *Aquatic Toxicology* 142-143, 355-364.

Branchaud, A., Gendron, A., Fortin, R., Anderson, P.D., Spear, P.A., 1995. Vitamin A stores, teratogenesis, and EROD activity in white sucker, *Catostomus commersoni*, from Riviere des Prairies near Montreal and a reference site. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 1703-1713.

Cairns, R.A., Harris, I.S., Mak, T.W., 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer* 11, 85-95.

Campbell, P.G.C., Couillard, Y., 2004. Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques, in: Campbell, P.G.C., Pelletier, É., Denizeau, F. (Eds.), *Écotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement*. Presses de l'Université du Québec, Québec, pp. 9-62.

Chen, L., Hu, C., Huang, C., Wang, Q., Wang, X., Yang, L., Zhou, B., 2012. Alterations in retinoid status after long-term exposure to PBDEs in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 120-121, 11-18.

Chen, Q., Zhang, R., Li, W.M., Niu, Y.J., Guo, H.C., Liu, X.H., Hou, Y.C., Zhao, L.J., 2013. The protective effect of grape seed procyanidin extract against cadmium-induced renal oxidative damage in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36, 759-768.

Choi, C.Y., An, K.W., An, M.I., 2008. Molecular characterization and mRNA expression of glutathione peroxidase and glutathione S transferase during osmotic stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 149, 330-337.

Clarkson, T., 1995. Health effects of metals: A role for evolution? *Environmental Health Perspectives* 103, 9-12.

Couture, P., Pyle, G., 2011. Field studies on metal accumulation and effects in fish. In: Wood CM, Farrell AP, Brauner C, J. (eds). *Fish Physiology* 31 (part 1), Academic Press, 417-473.

D'Ambrosio, D.N., Clugston, R.D., Blaner, W.S., 2011. Vitamin A metabolism: An update. *Nutrients* 3, 63-103.

Debier, C., Larondelle, Y., 2005. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *British Journal of Nutrition* 93, 153-174.

Defo, M.A., Pierron, F., Spear, P.A., Bernatchez, L., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2012. Evidence for metabolic imbalance of vitamin A₂ in wild fish chronically exposed to metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 85, 88-95.

Degitz, S.J., Holcombe, G.W., Kosian, P.A., Tietge, J.E., Durham, E.J., Ankley, G.T., 2003. Comparing the effects of stage and duration of retinoic acid exposure on amphibian limb development: Chronic exposure results in mortality, not limb malformations. *Toxicological Sciences* 74, 139-146.

Degitz, S.J., Kosian, P.A., Makynen, E.A., Jensen, K.M., Ankley, G.T., 2000. Stage- and species-specific developmental toxicity of all-trans retinoic acid in four native North American ranids and *Xenopus laevis*. *Toxicological Sciences* 57, 264-274.

Dragsted, L.O., 2008. Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and E and their relation to lipid and protein oxidation markers. *European Journal of Nutrition* 47, 3-18.

Duester, G., 2000. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function. Production of visual pigment and retinoic acid. *European Journal of Biochemistry* 267, 4315-4324.

Duester, G., Mic, F.A., Molotkov, A., 2003. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chemico-Biological Interactions* 143-144, 201-210.

Fernández, I., Gisbert, E., 2011. The effect of vitamin A on flatfish development and skeletogenesis: A review. *Aquaculture* 315, 34-48.

Flora, S.J.S., Mittal, M., Mehta, A., 2008. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research* 128, 501-523.

Furuita, H., Tanaka, H., Yamamoto, T., Shiraishi, M., Takeuchi, T., 2001. Effects of high dose of vitamin A on reproduction and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science* 67, 606-613.

Furuita, H., Yamamoto, T., Shima, T., Suzuki, N., Takeuchi, T., 2003. Effect of arachidonic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 220, 725-735.

Garner, S.R., Neff, B.D., Bernards, M.A., 2010. Dietary carotenoid levels affect carotenoid and retinoid allocation in female Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Journal of Fish Biology* 76, 1474-1490.

Gesto, M., Castro, L.F.C., Reis-Henriques, M.A., Santos, M.M., 2012a. Retinol metabolism in the mollusk *Osilinus lineatus* indicates an ancient origin for retinyl ester storage capacity. PLoS ONE 7 (4), art. no. e35138.

Gesto, M., Castro, L.F.C., Reis-Henriques, M.A., Santos, M.M., 2012b. Tissue-specific distribution patterns of retinoids and didehydroretinoids in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 162, 57-134.

Goswami, U.C., Barua, A.B., 1981. Distribution of retinol & dehydroretinol in freshwater fish. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 18, 383-385.

Green, M.H., Green, J.B., 1994. Dynamics and control of plasma retinol. In: Blomhoff R. (Ed.), Vitamin A in Health and Disease. New York: Marcel Dekker, 119-133.

Griffith, C.M., Wiley, M.J., 1991. Effects of retinoic acid on chick tail bud development. Teratology 43, 217-224.

Gupta, P.K., Sastry, K.V., 1981. Effect of mercury chloride on enzyme activities in the digestive system and chemical composition of liver and muscles of the catfish, *Heteropneustes fossilis*. Ecotoxicology and Environmental Safety 5, 389-400.

Hansen, L.A., Sigman, C.C., Andreola, F., Ross, S.A., Kelloff, G.J., DeLuca, L.M., 2000. Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. Carcinogenesis 21, 1271-1279.

Herrmann, K., 1995. Teratogenic effects of retinoic acid and related substances on the early development of the zebrafish (*Brachydanio rerio*) as assessed by a novel scoring system. Toxicology in Vitro 9, 267-283.

Inoue, D., Sei, K., Ike, M., 2010. Disruption of retinoic acid receptor signaling by environmental pollutants. *Journal of Health Science* 56, 221-230.

Janošek, J., Hilscherová, K., Bláha, L., Holoubek, I., 2006. Environmental xenobiotics and nuclear receptors - Interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicology in Vitro* 20, 18-37.

Käkelä, R., Käkelä, A., Hyvärinen, H., Asikainen, J., Dahl, S.K., 1999. Vitamins A1, A2, and E in minks exposed to polychlorinated biphenyls (aroclor 1242®) and copper, via diet based on freshwater or marine fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2595-2599.

Keys, S.A., Zimmerman, W.F., 1999. Antioxidant activity of retinol, glutathione, and taurine in bovine photoreceptor cell membranes. *Experimental Eye Research* 68, 693-702.

Lans, M.C., Klasson Wehler, E., Willemsen, M., Meussen, E., Safe, S.H., Brouwer, A., 1993. Structure - dependent, competitive interaction of hydroxypolychlorobiphenyls, hydroxy- dibenzo - p-dioxins and hydroxy- dibenzofurans with human transthyretin. *Chem Biol Interact* 88, 7-21.

Lee, S.A., Belyaeva, O.V., Kedishvili, N.Y., 2009. Biochemical characterization of human epidermal retinol dehydrogenase 2. *Chemico-Biological Interactions* 178, 182-187.

Leonard, S.S., Harris, G.K., Shi, X., 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine* 37, 1921-1942.

- Levi, L., Levavi-Sivan, B., Lubzens, E., 2008. Expression of genes associated with retinoid metabolism in the trout ovarian follicle. *Biology of Reproduction* 79, 570-577.
- Lewis-McCrea, L.M., Lall, S.P., 2010. Effects of phosphorus and vitamin C deficiency, vitamin A toxicity, and lipid peroxidation on skeletal abnormalities in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Journal of Applied Ichthyology* 26, 334-343.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101, 13-30.
- Martinez-Haro, M., Green, A.J., Mateo, R., 2011. Effects of lead exposure on oxidative stress biomarkers and plasma biochemistry in water birds in the field. *Environmental Research* 111, 530-538.
- Miller, L.L., Rasmussen, J.B., Palace, V.P., Hontela, A., 2009. The physiological stress response and oxidative stress biomarkers in rainbow trout and brook trout from selenium-impacted streams in a coal mining region. *Journal of Applied Toxicology* 29, 681-688.
- Moren, M., Opstad, I., Berntssen, M.H.G., Zambonino Infante, J.L., Hamre, K., 2004. An optimum level of vitamin a supplements for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) juveniles. *Aquaculture* 235, 587-599.
- Müller, K., Raila, J., Altenkamp, R., Schmidt, D., Dietrich, R., Hurtienne, A., Wink, M., Krone, O., Brunnberg, L., Schweigert, F.J., 2012. Concentrations of retinol, 3,4-didehydroretinol, and retinyl esters in plasma of free-ranging birds of prey. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96, 1044-1053.

Negm, R.K., Cobcroft, J.M., Brown, M.R., Nowak, B.F., Battaglione, S.C., 2013. The effects of dietary vitamin A in rotifers on the performance and skeletal abnormality of striped trumpeter *Latris lineata* larvae and post larvae. *Aquaculture* 404-405, 105-115.

Niyogi, S., Pyle, G.G., Wood, C.M., 2007. Branchial versus intestinal zinc uptake in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from reference and metal-contaminated aquatic ecosystems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64, 1605-1613.

Novák, J., Beníšek, M., Hilscherová, K., 2008. Disruption of retinoid transport, metabolism and signaling by environmental pollutants. *Environment International* 34, 898-913.

O'Byrne, S.M., Blaner, W.S., 2013. Retinol and retinyl esters: Biochemistry and physiology. *Journal of Lipid Research* 54, 1731-1743.

O'Byrne, S.M., Wongsiriroj, N., Libien, J., Vogel, S., Goldberg, I.J., Baehr, W., Palczewski, K., Blaner, W.S., 2005. Retinoid absorption and storage is impaired in mice lacking lecithin:retinol acyltransferase (LRAT). *Journal of Biological Chemistry* 280, 35647-35657.

Okoyasu, T., Nagano, M., Ishibashi, T., Imai, Y., 1981. Purification and partial characterization of linoleoyl CoA desaturase from rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 206, 21-42.

Ørnsrud, R., Lock, E.J., Waagbø, R., Krossøy, C., Fjelldal, P.G., 2013. Establishing an upper level of intake for vitamin A in Atlantic salmon (*Salmo Salar L.*) postsmolts. *Aquaculture Nutrition* 19, 651-664.

Payne, J.F., Malins, D.C., Gunselman, S., Rahimtula, A., 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. *Marine Environmental Research* 46, 289-294.

Pereira, A.A., van Hattum, B., Brouwer, A., 2012. Hepatic retinoid levels in seven fish species (teleosts) from a tropical coastal lagoon receiving effluents from iron-ore mining and processing. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 408-416.

Pierron, F., Normandeau, E., Defo, M.A., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2011. Effects of chronic metal exposure on wild fish populations revealed by high-throughput cDNA sequencing. *Ecotoxicology* 20, 1388-1399.

Ritchie, H.E., Brown-Woodman, P.D., Korabelnikoff, A., 2003. Effect of co-administration of retinoids on rat embryo development in vitro. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology* 67, 444-451.

Rodríguez-Estival, J., Martínez-Haro, M., Monsalve-González, L., Mateo, R., 2011a. Interactions between endogenous and dietary antioxidants against Pb-induced oxidative stress in wild ungulates from a Pb polluted mining area. *Science of the Total Environment* 409, 2725-2733.

Rodríguez-Estival, J., Taggart, M.A., Mateo, R., 2011b. Alterations in vitamin A and e levels in liver and testis of wild ungulates from a lead mining area. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 361-371.

Rolland, R.M., 2000. A review of chemically-induced alterations in thyroid and vitamin A status from field studies of wildlife and fish. *Journal of Wildlife Diseases* 36, 615-635.

Ross, A.C., Zolfaghari, R., 2004. Regulation of hepatic retinol metabolism: Perspectives from studies on vitamin A status. *Journal of Nutrition* 134, 1 269S-275S.

Senadheera, S.D., Turchini, G.M., Thanuthong, T., Francis, D.S., 2012. Effects of dietary iron supplementation on growth performance, fatty acid composition and fatty acid metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed vegetable oil based diets. *Aquaculture* 342-343, 80-88.

Shidoji, Y., Silverman-Jones, C., Noji, S., De Luca, L.M., 1983. Interactions between retinyl phosphate and bivalent cations. *Biochemical Journal* 214, 719-724.

Simms, W., Ross, P., 2000. Vitamin A physiology and its application as a biomarker of contaminant-related toxicity in marine mammals: a review. *Toxicology and Industrial Health* 16, 291-302.

Sucov, H.M., Evans, R.M., 1995. Retinoic acid and retinoic acid receptors in development. *Molecular Neurobiology* 10, 169-184.

Sugawara, C., Sugawara, N., 1978. The effect of cadmium on vitamin A metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology* 46, 19-27.

Sugawara, C., Sugawara, N., 1979. The effect of heavy metals on vitamin A metabolism. *Toxicology Letters* 3, 215-218.

Sugawara, C., Sugawara, N., Miyake, H., 1981. Decrease of plasma vitamin A, albumin and zinc in cadmium-treated rats. *Toxicology Letters* 8, 323-329.

Tsin, A.T.C., Malsbury, D.W., 1991. Bile salt independent retinyl ester hydrolases in the bovine eye. *Brain Research Bulletin* 28, 121-125.

Tutas, L.B., Serrano Jr, A.E., Traifalgar, R.F.M., Corre, V.L., 2013. Optimum dietary levels of Vitamin A (retinyl palmitate) for growth and reduction of incidence of operculum deformity in milkfish (*Chanos chanos*) fry. *AAFL Bioflux* 6, 464-469.

Verma, S.R., Tonk, I.P., 1983. Effect of sublethal concentrations of mercury on the composition of liver, muscles and ovary of *Notopterus notopterus*. *Water, Air, and Soil Pollution* 20, 287-292.

Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S., 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: An overview. *Current Pharmaceutical Design* 10, 1677-1694.

Villeneuve, L., Gisbert, E., Le Delliou, H., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 2005. Dietary levels of all-trans retinol affect retinoid nuclear receptor expression and skeletal development in European sea bass larvae. *British Journal of Nutrition* 93, 791-801.

Villeneuve, L.A.N., Gisbert, E., Moriceau, J., Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 2006. Intake of high levels of vitamin A and polyunsaturated fatty acids during different developmental periods modifies the expression of morphogenesis genes in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *British Journal of Nutrition* 95, 677-687.

Von Lintig, J., 2012. Metabolism of carotenoids and retinoids related to vision. *Journal of Biological Chemistry* 287, 1627-1634.

Wallace, R.S., Teare, J.A., Diebold, E., Michaels, M., Willis, M.J., 1996. Plasma tocopherol, retinol, and carotenoid concentrations in free-ranging humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) in Chile. *Zoo Biology* 15, 127-134.

Wayland, M., Smits, J.E.G., Gilchrist, H.G., Marchant, T., Keating, J., 2003. Biomarker responses in nesting, common eiders in the Canadian arctic in relation to tissue cadmium, mercury and selenium concentrations. *Ecotoxicology* 12, 225-237.

Wu, L., Ross, C., 2010. Acidic retinoids synergize with vitamin A to enhance retinol uptake and STRA6, LRAT, and CYP26B expression in neonatal lung. *Journal of Lipid Research* 51, 378-387.

Xu, T., Chen, L., Hu, C., Zhou, B., 2013. Effects of acute exposure to polybrominated diphenyl ethers on retinoid signaling in zebrafish larvae. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 35, 13-20.

Yutaka, H., Shao-Jun, D., Shuichi, S., Tomonari, K., Hiroshi, F., Toshio, T., 2011. Analysis of the mechanism of skeletal deformity in fish larvae using vitamin A- induced bone deformity model. *Aquaculture* 315, 26-33.

Zhang, Z., Balmer, J.E., Løvlie, A., Fromm, S.H., Blomhoff, R., 1996. Specific teratogenic effects of different retinoic acid isomers and analogs in the developing anterior central nervous system of zebrafish. *Developmental Dynamics* 206, 73-86.

Zile, M.H., 2001. Function of vitamin A in vertebrate embryonic development. *Journal of Nutrition* 131, 705-708.

Chapitre IX : Evidence for metabolic imbalance of vitamin A₂ in wild fish chronically exposed to metals

9. ARTICLE 2

Defo, M.A., Pierron, F., Spear, P.A., Bernatchez, L., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2012. Evidence for metabolic imbalance of vitamin A₂ in wild fish chronically exposed to metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 85, 88-95.

Michel Amery Defo: Conception et réalisation (échantillonnage de terrain, analyse de laboratoire, traitement et interprétation des données) du projet, rédaction et révision de l'article.

Fabien Pierron: Conception et réalisation (contribution à l'analyse des données) du projet et révision de l'article

Philip Spear: Réalisation du projet et révision de l'article.

Louis Bernatchez: Conception du projet et révision de l'article.

Peter C.G. Campbell: Conception du projet et révision de l'article.

Patrice Couture: Conception du projet et rédaction de l'article.

Evidence for metabolic imbalance of vitamin A₂ in wild fish chronically exposed to metals

Defo Michel A.^a, Pierron Fabien^{b,c}, Spear Philip A.^d, Bernatchez Louis^e, Campbell Peter G.C.^a and Couture Patrice^{a*}.

^a Institut national de la Recherche scientifique (INRS), Centre Eau Terre et Environnement, 490 de la Couronne, Québec, QC, Canada G1K 9A9

^b Université de Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

^c CNRS, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

^d Centre de Recherche TOXEN and Département des Sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada H3C 3P8

^e Institut de Biologie intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Québec, QC, Canada G1V 0A6

* Corresponding author: e-mail address: patrice.couture@ete.inrs.ca; telephone 1-418-654-3825, Fax: 1-418 654-2600.

Abstract

In a recent study on indigenous yellow perch chronically exposed to metals, we reported a negative correlation between liver metal concentration and liver transcription levels of genes encoding for enzymes involved in the metabolism of retinoids. We therefore speculated that metals, and especially the non-essential metal Cd, could alter the metabolism of retinoids in wild fish. Thus the present field study investigates the impact of *in situ* metal exposure on retinoid storage. A total of 55 yellow perch (*Perca flavescens*) were sampled in six lakes representing a metal contamination gradient ($8 \leq N \leq 10$ per lake). Our results show that yellow perch from Cd-contaminated lakes had significantly higher concentrations of liver dehydroretinol and dehydroretinyl esters than did fish from reference lakes. However, the increase in retinyl ester stores with increasing Cd concentrations was quantitatively much more important than the increase in free dehydroretinol. As a result, a significant decrease in the percentage of hepatic free dehydroretinol with increasing renal Cd concentrations was observed. These results suggest that the enzymes and the binding proteins involved in vitamin A homeostasis are inhibited by the presence of Cd. Alternatively, the increase in tissue vitamin A (antioxidant) levels could serve to better counteract the oxidative stress engendered by Cd exposure. Overall our findings illustrate that vitamin A₂ homeostasis can be altered as a consequence of chronic exposure to low Cd concentrations. Thus, in the context of environmental risk assessment, the percentage of liver free dehydroretinol can be considered as a biomarker of *in situ* Cd exposure.

Key words: Chronic metal exposure, cadmium, dehydroretinoids, fish condition, and yellow perch.

1. INTRODUCTION

Metals released by anthropogenic activities such as mining and smelting have affected many aquatic ecosystems in the world. During the last century, concentrations of trace metals such as cadmium (Cd), copper (Cu) and zinc (Zn) have greatly increased in water, sediment and biota (Klee and Graedel, 2004; Luoma and Rainbow, 2008). The past two decades have seen a major tightening of governmental regulations on smelter emissions. As a result, a decrease in metal releases to the environment has been observed and signs of chemical recovery have been detected both in local ecosystems and regionally (Belzile et al., 2004; Mahler et al., 2006). However, recent research clearly indicates that the physiology, condition and overall health of fish living in metal-contaminated environments are still affected (Couture et al., 2008b; Giguère et al., 2006; Rajotte and Couture, 2002a), suggesting that metal contamination continues to exceed levels that are safe for the environment. The essentiality of Cd is still unknown; however, although the biological functions of Cu and Zn are largely accepted, these metals can be toxic at concentrations slightly greater than those required for homeostasis (Atli and Canli, 2011; Niyogi et al., 2007).

Yellow perch (*Perca flavescens*) is abundant and widely distributed in North America. In the context of metal ecotoxicology, it is a particularly relevant species because it can tolerate the presence of metals at quite high concentrations; this tolerance explains its wide distribution and abundance in surface waters affected by mining and smelting activities in Canada (Hontela et al., 1995; Hontela et al., 1992). In addition, because of its sedentary behaviour (Aalto and Newsome, 1990), bioaccumulated metals in yellow

perch tend to reflect local contamination of ecosystems (Aalto and Newsome, 1990; Campbell et al., 2003).

The use of tissue retinoid concentrations as biomarkers of pollutant exposure has already been discussed in the literature (Marcogliese et al., 2009; Mos et al., 2007; Rodríguez-Estival et al., 2011c) and extensively studied in vertebrates including mammals, birds, frogs and fish. The term 'retinoid' refers to a group of compounds having vitamin A biological activity and includes retinol, retinal and retinoic acids. Given their many physiological functions and the inability of fish to synthesize retinoids *de novo* (Garner et al., 2010a), these substances and their metabolic precursors are an important resource that can be limited by dietary availability. Dietary retinoids are taken up mainly as retinyl esters from animal prey and are derived from dietary carotenoids, natural plant pigments (D'Ambrosio et al., 2011; Fernández and Gisbert, 2011). In addition to their role as antioxidants (i.e. all-transretinols) (Alpsoy et al., 2009; Dragsted, 2008; Rodríguez-Estival et al., 2011c), various retinoids are involved in many essential functions including cell differentiation (Amann et al., 2011b), growth (Rolland, 2000; Tanumihardjo, 2011), vision (D'Ambrosio et al., 2011), immunity (Mora et al., 2008), bone mineralization (Fernández and Gisbert, 2011) and reproduction (Li et al., 2011) *via* the activation of specific transcription factors (Amann et al., 2011a; Amann et al., 2011b; Sucov and Evans, 1995). Unlike other vertebrates such as mammals, amphibians and birds, in which all-*trans*-retinol and its esters are typically the predominant forms of vitamin A, some freshwater fish species possess all-*trans*-dehydroretinol and dehydroretinyl esters as the major form of vitamin A (Gesto et al., 2012b; Goswami and Barua, 1981). However the tissue distribution, metabolism and roles of these

substances are mostly unknown or still poorly known (Gesto et al., 2012b). According to the classification of Goswami and Barua (1981), yellow perch can be categorized as a dehydroretinol-type (vitamin A₂) species.

A toxic effect of environmental contaminants is thought to be mediated by the disruption of vitamin A transport, metabolism and signalling (Novák et al., 2008). Studies have shown that exposure to organic pollutants (in particular organohalogenes and pesticides) can disturb vitamin A homeostasis in animals (Bérubé et al., 2005; Spear et al., 1992; Spear et al., 1990). In comparison to such organic pollutants, little is known about the adverse effect of metals on the change in levels of retinoids in populations of animals living in contaminated areas (Novák et al., 2008; Rolland, 2000). Although liver retinoid concentrations of two trout species from selenium-impacted streams in a coal-mining region were species- and gender- dependent, the concentration of total retinyl esters of rainbow trout (RT) decreased with increasing selenium level (Miller et al., 2009). However, selenium did not affect the storage of liver total retinyl esters in brook trout (BT). In the same studies, Miller *et al.* (2009) showed that liver dehydroretinol levels were higher in RT than in BT, but that immature RT and male BT displayed the highest level of vitamin A₂. After a three-year exposure of European flounder (*Platichthys flesus*) to heavily polluted sludge from Rotterdam harbour, the levels of plasma and liver retinol as well as liver retinyl esters were significantly decreased (Besselink et al., 1998). The authors suggest that PHAHs (Polyhalogenated Aromatic Hydrocarbons) and PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons), rather than trace metals, are responsible for the dramatic reductions in plasma and liver retinoid concentrations. By comparing the hepatic retinoid concentrations in seven fish species from a tropical coastal lagoon that

receives effluents from iron-ore mining, Pereira *et al.* (2012) observed a negative correlation between Al, Pb, As, and Cd and hepatic didehydroretinoid concentrations. However, significant and positive correlations were obtained with fish displaying higher levels of hepatic Fe, Cu, and Zn.

A recent study on indigenous yellow perch chronically exposed to metals in lakes of the Rouyn-Noranda region (Québec, Canada) reported a negative correlation between liver Cd concentration and liver transcription levels of genes encoding for enzymes involved in the metabolism of retinoids (Pierron *et al.*, 2011). We therefore speculated that metals, and especially the non-essential metal Cd, alter the metabolism of retinoids in wild fish. Thus the present field study investigates the impacts of *in situ* metal exposure on retinoid storage in yellow perch sampled in late spring from six lakes representing a metal contamination gradient. We tested the hypothesis that the retinoid transcriptomic response observed in our previous study (Pierron *et al.*, 2011) is translated at the biochemical/physiological level.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Study area and fish sampling

This investigation was carried out in an area of the Canadian Precambrian Shield that have been subjected to metal emissions from smelters for over 80 years, the Rouyn-Noranda region (Québec). This region presents a broad contamination gradient in Cd, Cu and Zn concentrations in water, sediment and prey (Campbell *et al.*, 2008; Croteau *et al.*, 2003; Perceval *et al.*, 2002) and therefore offers a unique research opportunity to

study relationships between metal bioaccumulation and subsequent deleterious effects on indigenous perch populations living in this area (Couture et al., 2008b).

For our investigation, we selected six lakes from this gradient (Table 1) that differ substantially in their dissolved and sediment metal concentrations: two pristine lakes, Opasatica and Hélène, located approximately 30 km upwind from the Horne smelter located in the city of Rouyn-Noranda; two intermediate lakes, Vaudray and Bousquet, located approximately 30 km downwind from the smelter; and two highly metal-contaminated lakes, Marlon and Dufault, situated near the smelters.

Table 1: Geographical coordinates of the study lakes with their total dissolved (nM) concentrations of the trace metal analysed

Lake	Longitude	Latitude	[Cd] nM	[Cu] nM	[Zn] nM	References
Hélène	48°12'44"N	79°10'18"W	0.15	36.4	8	(Hare and Tessier, 1998)
Opasatica	48°04'58"N	79°17'35"W	0.3	33	19	(Giguère et al, 2006)
Bousquet	48°12'59"N	78°36'46"W	2.37	43.5	117	(Hare and Tessier, 1998)
Dufault	48°18'30"N	78°59'58"W	6.7	180	1100	(Giguère et al, 2006)
Vaudray	48°05'09"N	78°40'47"W	0.5	42	60	(Giguère et al, 2006)
Marlon	48°15'51"N	79°03'55"W	1.43	169	57	(Hare and Tessier, 1998)

A total of 55 fish were collected in late spring (mid-June 2011) using a seine net. In order to minimize potential allometric bias, yellow perch were selected within a narrow size range. A total of 8 to 10 adult fish were sampled per lake. Length (11.0 ± 0.3 cm) and weight (16 ± 2 g), (mean \pm SE), were recorded and sex determined. Following the method describe in Bérubé *et al.* (2005), but without anaesthesia, blood was collected from the dorsal artery of the caudal peduncle using a heparinised needle. After centrifugation, the plasma was immediately frozen on dry ice and stored at -80°C in heparinised tubes until analysis. Fish were dissected and the liver (for retinoid analyses) as well as the kidney (for metal analyses) and pyloric caeca (for biometric analyses) were removed and immediately frozen and stored in liquid nitrogen in the field. Upon

return to the laboratory, tissues were stored at -80°C until used for analyses. The fish manipulation protocol was approved by the Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec and the Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) of INRS.

2.2 Calculation of fish condition and corrected pyloric caeca weights

Fulton condition factor (K) is the index commonly used when assessing fish condition. This index is based on the assumption of isometric growth, i.e. fish size increases according to a cubic relationship. However, in most species, growth is allometric. The relative index (Kn) removes biases related to size and allows the comparison of fish from the same population or different populations, irrespective of size (Baigún et al., 2009). The equation $Kn = (W_f / L^{SC}) \times 100$ (where “ W_f ” is fish weight, “L” is the fish length and “SC” is the scaling coefficient) was used to calculate “Kn”, a calculation used when fish size varies appreciably within a given dataset (Pyle et al., 2008a). SC is the slope of the logarithmic relation between the mass and the size of perch in the same region (Gauthier et al., 2009), which corresponds to 3.23 in our case.

Laboratory studies have demonstrated the existence of a positive correlation between pyloric caeca (PC) weights and feeding rate (Gauthier et al., 2008), and with food conversion efficiency in fish (Bergot et al., 1981). Due to the non-linearity of the relation between fish wet weight and wet weights of PC, we standardized the PC weights by applying an allometric correction described elsewhere for yellow perch (Gauthier et al., 2011). The pyloric caeca weights were corrected to a standard fish weight of 16 g with

an allometric exponent of 0.960, calculated as the slope of the logarithmic relationship between fish weight and pyloric caeca weights. The correction was done using the following equation: Corrected pyloric caeca weights = $((16/\text{fish wet wt})^{0.96})$ PC wet weights.

2.3 Kidney metal concentration analysis

Tissue metal concentrations (Cd, Cu and Zn) were determined in the kidney according to Pierron *et al.* (2009). Briefly, lyophilized samples were transferred to acid-washed (15% HNO₃) Eppendorf polypropylene tubes and digested in trace metal grade nitric acid at room temperature over 5 d. To monitor analytical accuracy and recovery, 5 replicates of certified reference material from the National Research Council of Canada (TORT2) were also analyzed. In parallel, for each batch of 10 samples, blanks (trace metal grade HNO₃) were subjected to the same treatment in order to control for potential contamination during the digestion and analysis procedures. After 5 d, hydrogen peroxide was added to the digests; after 24 h the digests were diluted with deionized Milli-Q water (10% of HNO₃) and stored at 4°C until analysis. Metal concentrations were measured by inductively coupled - plasma atomic emission spectrophotometry (ICP-AES), or by inductively coupled plasma - mass spectrometry (ICP-MS) when the concentrations were too low for detection by ICP-AES. Internal standards were within 10% of nominal values in all cases and recoveries averaged for metal analyses was 90 ± 3 % for Cd, 78 ± 3 % for Cu, 78 ± 6 % for Zn (mean \pm S.E.).

2.4 Retinoid analysis in plasma and liver

2.4.1 Retinoid extraction

To prevent isomerization, the analyses were conducted under yellow incandescent lights. The plasma retinoid extraction procedure was modified from that used by (Spear et al., 1988). Briefly, 50 μL of plasma was vortexed with an equal volume of ethanol in order to achieve protein precipitation, and with an equal volume of ultrapure water to dissociate retinoid-protein complexes. Extraction was achieved by adding 200 μL of hexane followed by phase separation by centrifugation (13,000 g X 2 min). A 160- μL aliquot of the organic phase was evaporated to dryness (5 min at 30°C) using a vacuum centrifuge (Vacufuge plus, Eppendorf, Hamburg, Germany). The extract was resuspended in 100 μL of ethanol and to prevent retinoid loss was stored at -20°C until analysis. Once prepared, the extracts were held for maximum 2h at -20°C prior to analysis. An 80- μL volume was injected into the high-performance liquid chromatography (HPLC) system.

The method for liver retinoid extraction was modified slightly from (Spear and Moon, 1986). Specifically, 0.05 g of partially thawed yellow perch liver was dehydrated by grinding with 0.5 g of anhydrous Na_2SO_4 and the resulting powder extracted with 1.25 mL hexane for 10 min using a rotary mixer. After centrifugation (2 min at 2000 g), an 800- μL aliquot was transferred to an Eppendorf tube, evaporated to dryness at 30°C during 10 min using a vacuum centrifuge and the residue dissolved in 100 μL of acetonitrile. A volume of 80 μL was injected into the HPLC.

2.4.2 High-performance liquid chromatography

All solvents used were HPLC grade. *All-trans*-retinol (ROH) and *all-trans*-retinyl palmitate (ROH-palmitate) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Other retinoids were synthesized by methods routinely used in our laboratory. The

standard all-*trans*-3,4-dehydroretinol (dROH) was synthesized as described previously (Bérubé et al., 2005). All-*trans*-3,4-dehydroretinyl esters of palmitate (dROH-palmitate), myristate (dROH-myristate) and stearate (dROH-stearate) were produced by condensing dROH with fatty acid anhydrides following the method of Doyon *et al.* (1998).

The HPLC system consisted of dual model 510 pumps, a model 150A injector, and a model 486-absorbance detector with data acquisition and instrument control by the Millennium 32 computer program (all Waters Associates, Milford, MA, USA). Retinoids were separated on a CSC-Inertsil C-18 analytical column (5 µm particle size, 150 Å pore, 4.6 x 250 mm; Chromatography Sciences, Montréal, QC, Canada). The detector was set at 354 nm, corresponding to the maximum light absorbance of all-*trans*-3,4-dehydroretinol (dROH) and dROH esters, the major retinoids. Extremely small peaks of other retinoids were apparent in yellow perch tissues, but were not quantified. Plasma dROH eluted at 10.6 min under isocratic conditions of 90% methanol and 10% water and a flow rate of 1 mL/min. The analyte dROH was separated from ROH, the latter having a retention time of 13.2 min. In the case of the hepatic retinoids, the method of Doyon et al. (1998) was adapted to improve peak resolution. At a constant flow rate of 1 mL/min, the initial mobile phase (tetrahydrofuran/methanol/water (18:75:7) changed linearly between 2 and 6 min to the second mobile phase composed of the same solvents in different proportions (36:57:7). Retention times under these conditions were dROH 5.4 min, ROH 5.7 min, dROH-myristate 17.1 min, dROH-palmitate 20.3 min, ROH-palmitate 22.3 min and dROH-stearate 24.5 min. Allowing for the elution of retinoid esters and column solvent re-equilibration, samples could be injected every 28

min. Peak identification was based on Doyon *et al.* (1998). No attempt was made to separate the palmitate and oleate esters, the peak being described here as dROH-palmitate. The major retinoids were quantified using a dROH external standard and adjusting for the mass differences of the different esters. The mass sum of individual retinoids was used to estimate 'total vitamin A', whereas the mass sum of esterified forms was taken to represent 'total retinyl esters'. The recovery of the different retinoids from spiked fish liver ranged from 86 – 103 %. The unesterified *all-trans*-3,4-dehydroretinol is referred to as 'free dehydroretinol' in this paper.

2.5 Data analysis

Due to the limited number of males (12/55), statistical analyses were performed without considering sex as an explanatory variable. Differences in vitamin A₂ levels, biometric parameters, and metal concentrations among sites were performed by analysis of variance (ANOVA), after checking assumptions of normality and homoscedasticity of the error terms (Levene test, $p > 0.05$). When the assumptions were not met, we used \log_{10} and Box-Cox (Peltier *et al.*, 1998) data transformations or the non-parametric Wilcoxon / Kruskal-Wallis tests. If significant effects were detected, the Least Square Deviation test (LSD or Tukey test) and the non-parametric U-Mann-Whitney test were used to determine whether means between pairs of samples were significantly different from one another. Computations were performed using JMP 8.0 program and STATISTICA version 6.1 software (StatSoft, USA). The relationships between individual metal concentrations in kidney and retinoid concentrations or biometric parameters were investigated using the non-parametric Spearman rank correlation test due to the non-linearity of the data.

3. RESULTS

3.1 Kidney metal concentrations in yellow perch

Ratios of renal metal concentrations between the most and the least contaminated fish, i.e. $[M]_{\max} / [M]_{\min}$, increased in the order Cu (1.44) < Zn (2.72) < Cd (36.7). Renal Cd concentrations presented a clear concentration gradient in the lakes sampled (Figure 1A) and varied from 1.35 to 49.5 $\mu\text{g/g}$ dry weight (12 to 440 nmol/g) from Lake H el ene to Lake Marlon, the latter lake being very close to the smelter. Renal Cu concentrations in yellow perch from all lakes sampled were similar except in the most pristine lake (H el ene) where values were significantly lower than in fish from lakes Dufault and Marlon (Figure 1B). Mean kidney Zn concentrations ranged from 345 to 939 $\mu\text{g/g}$ dry weight (5.3 to 14.4 $\mu\text{mol/g}$; Figure 1C). Fish from lakes Dufault and Marlon showed the highest Zn concentrations, significantly higher than those of the Bousquet and Vaudray fish.

3.2 Biometric parameters

Fish from Lake Opasatica displayed lower condition factors than fish from the other lakes, but this difference in condition was only significant when compared to fish from lakes Marlon and Bousquet (Table 2). Corrected pyloric caeca wet weights were not significantly different among most of the populations sampled (Table 2), except for fish from lake Bousquet, the pyloric caeca of which were significantly heavier than those of fish from Lake Marlon. Significant negative relationships were observed between corrected pyloric caeca wet weights and renal Cd and Zn concentrations (Table 3).

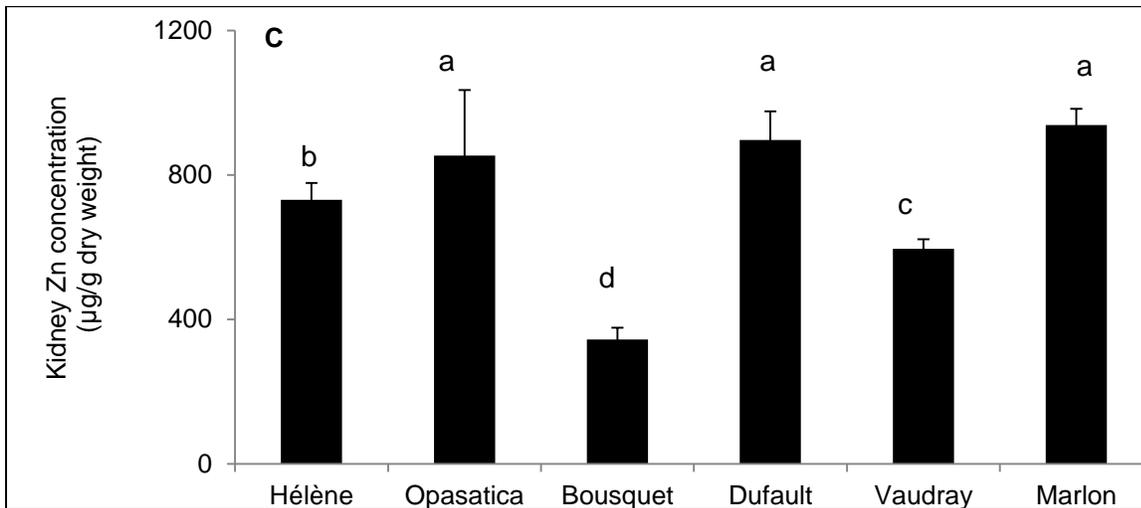
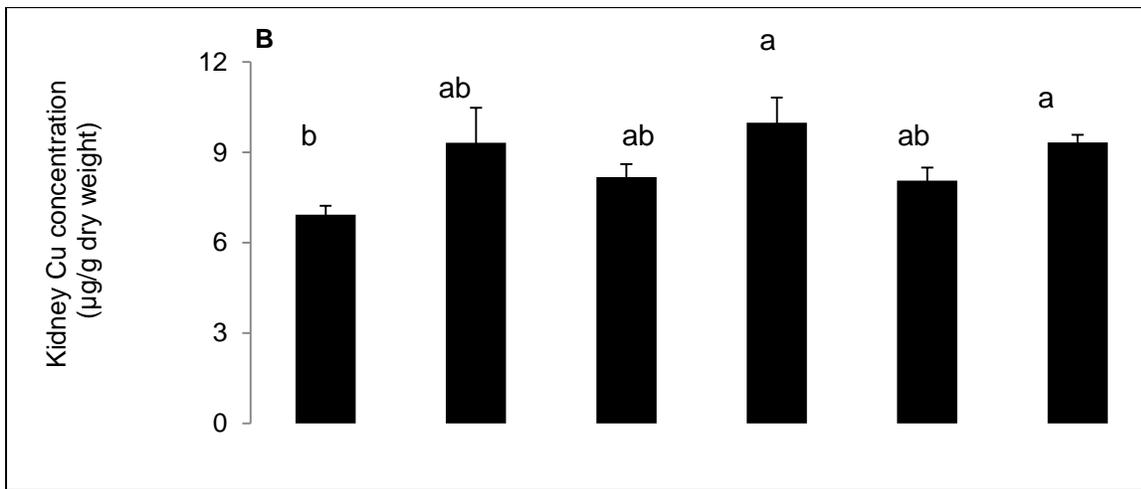
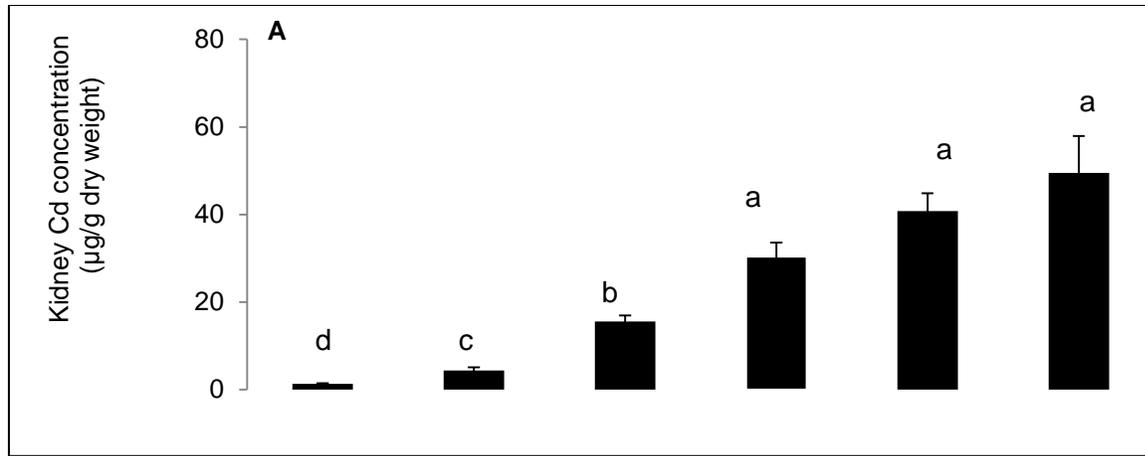


Figure 1: Total cadmium (A), copper (B) and zinc (C) concentrations in the kidney of yellow perch collected from six lakes along a metal concentration gradient. Values are means \pm SE ($8 \leq N \leq 10$ /lake). Means designated with different letters are significantly different (LSD test, $p < 0.05$).

Table 2: Number of fish in lake sampled (N), relative condition index (Kn) and corrected pyloric cæca weight of wild yellow perch used for vitamin A analysis. Values are mean \pm SE. ($8 \leq N \leq 10/\text{lake}$). Values within columns sharing at least one letter are not significantly different from each other (LSD test, $p < 0.05$)

	N	Relative index Condition (Kn)	Corrected pyloric Cæca wet weight
Hélène	9	0.55 \pm 0.02 ^{bc}	0.034 \pm 0.006 ^{ab}
Opasatica	8	0.50 \pm 0.01 ^c	0.024 \pm 0.001 ^{ab}
Bousquet	9	0.63 \pm 0.01 ^a	0.038 \pm 0.004 ^a
Dufault	9	0.550 \pm 0.005 ^{bc}	0.025 \pm 0.003 ^{ab}
Vaudray	10	0.55 \pm 0.01 ^{bc}	0.026 \pm 0.003 ^{ab}
Marlon	10	0.58 \pm 0.01 ^{ab}	0.022 \pm 0.002 ^b

3.3 Dehydroretinoid concentrations in liver and plasma

Analysis of liver samples by means of HPLC revealed that all-*trans*-3,4-didehydroretinoids (vitamin A₂) are the predominant form of the vitamin in liver and plasma of yellow perch. The major vitamin A₂ stored in yellow perch liver was dROH palmitate, with lesser amounts of dROH myristate, dROH stearate and other unidentified forms. Hepatic concentrations of free (i.e. unesterified) dROH, specific retinyl esters, total retinyl esters and total vitamin A differed significantly among the most Cd contaminated lakes (Dufault, Vaudray, Marlon) and the least Cd contaminated lakes (Hélène, Opasatica and Bousquet) (Table 4). A similar trend was observed for the storage of dehydroretinyl ester. Concentrations of dROH stearate, dROH myristate and dROH palmitate were 3-, 235- and 3.56 X 10⁵ times greater, respectively, in fish from lake Marlon in comparison to fish from Lake Hélène.

Table 3: Spearman correlations between kidney metal concentrations, biometric parameters and plasma and liver retinoids in yellow perch ($49 \leq N \leq 52$) sampled in the mining region of Rouyn-Noranda, Québec, Canada (Spring 2011).

	Kidney Cu		Kidney Cd		Kidney Zn	
	R Spearman	P	R Spearman	P	R Spearman	P
Relative index condition	0.141	0.319	0.046	0.748	-0.253	0.071
Corrected pyloric caeca	0.040	0.777	-0.280*	0.045	-0.373*	0.006
Plasma dehydroretinol	-0.041	0.777	0.259	0.072	-0.366*	0.010
Liver dehydroretinol	0.114	0.419	0.413*	0.002	0.414*	0.002
Liver dehydroretinyl myristate	0.212	0.132	0.696*	<.0001	0.374*	0.006
Liver dehydroretinyl palmitate	0.177	0.214	0.678*	<.0001	0.357*	0.010
Liver dehydroretinyl stearate	0.279*	0.045	0.668*	<.0001	0.399*	0.003
Liver total vitamin A esters	0.176	0.213	0.678*	<.0001	0.382*	0.005
Liver total vitamin A	0.175	0.216	0.665*	<.0001	0.399*	0.003
Liver percentage of free dehydroretinol	-0.207	0.141	-0.718*	<.0001	-0.283*	0.042
Ratio of plasma dehydroretinol / Liver dehydroretinol	-0.089	0.542	-0.318*	0.026	-0.506*	0.0002

P < 0.05

Table 4: Vitamin A levels (nmol/g liver wet weight) determined in livers of yellow perch sampled in Rouyn-Noranda region, Québec, Canada. Values are mean \pm SE. ($8 \leq N \leq 10/\text{lake}$). Values within lines sharing at least one letter are not significantly different from each other (LSD test, $p < 0.05$).

	Hélène	Opasatica	Bousquet	Dufault	Vaudray	Marlon
Retinoids						
Free dehydroretinol	308 \pm 175 ^{ab}	47 \pm 10 ^{ab}	22.2 \pm 6.5 ^b	419 \pm 228 ^a	4171 \pm 3693 ^a	9537 \pm 5187 ^c
Dehydroretinyl palmitate	5772 \pm 3211 ^a	918 \pm 622 ^a	298 \pm 134 ^a	(1.6 \pm 1.0)E+7 ^b	(4.3 \pm 2.1)E+9 ^b	(2.1 \pm 1.4)E+9 ^b
Dehydroretinyl myristate	17.0 \pm 5.7 ^a	10.2 \pm 3.2 ^a	11.2 \pm 3.6 ^a	1218 \pm 909 ^b	1806 \pm 1128 ^b	4003 \pm 1873 ^b
Dehydroretinyl stearate	3.4 \pm 0.3 ^a	3.0 \pm 0.1 ^a	3.0 \pm 0.1 ^a	7.0 \pm 0.9 ^{bc}	5.4 \pm 0.6 ^b	10.7 \pm 1.7 ^c
Total vitamin A esters	5793 \pm 3410 ^a	931 \pm 625 ^a	267 \pm 130 ^a	(1.4 \pm 1.1)E+7 ^b	(4.3 \pm 2.1)E+9 ^b	(2.1 \pm 1.4)E+9 ^b

Although hepatic dehydroretinoid levels increased in fish inhabiting the most contaminated lakes, the percentage of liver free dROH decreased significantly with increasing contamination (Figure 2). The percentage of free dROH was 9.3-fold, 24-fold

and 806-fold lower in fish from lakes Dufault, Vaudray, and Marlon respectively, in comparison to fish from Lake Opasatica.

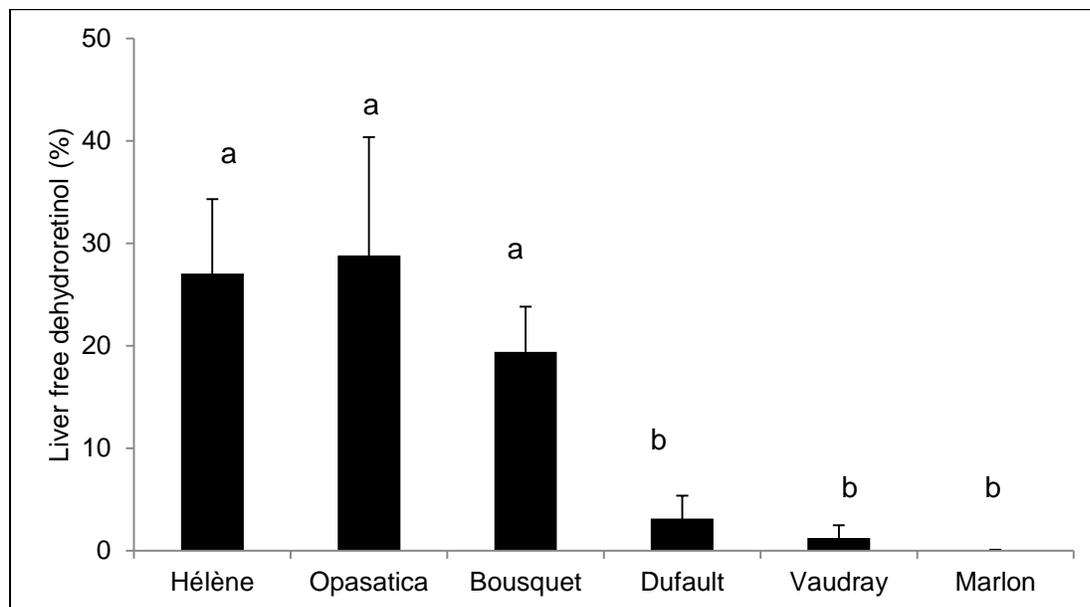


Figure 2: Percentage of hepatic free dehydroretinol. Bars represent means and standard error. Bars that do not share a common letter are significantly different (LSD test, $p < 0.05$).

The analyses of plasma extracts revealed significant differences in dROH concentrations among sites (Figure 3). The highest concentrations were detected in perch from lakes Marlon, Vaudray and Bousquet, while significantly lower levels were measured in fish from Lake Opasatica. Fish from Lake H  l  ne had similar plasma concentrations of dROH to those in fish from Lake Dufault.

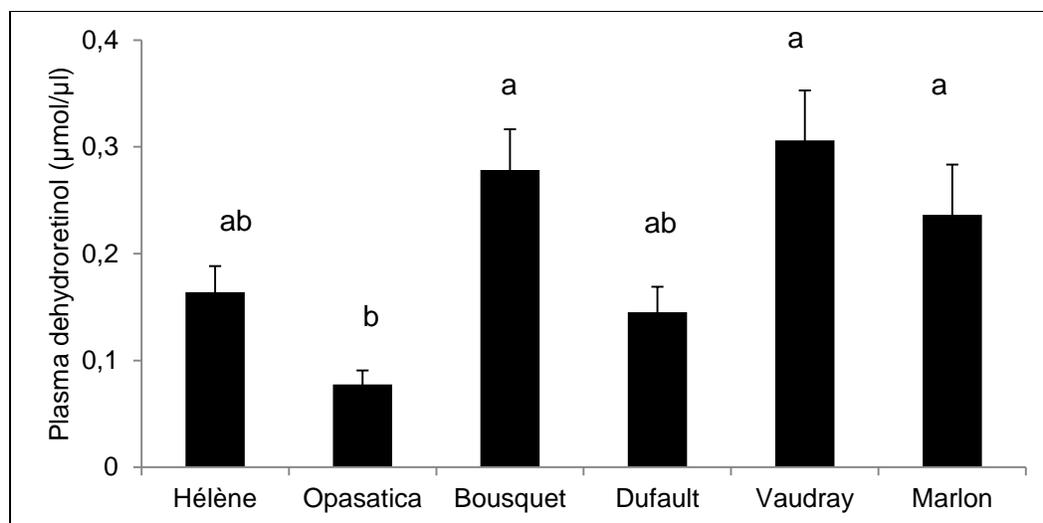


Figure 3: Plasma dehydroretinol concentrations in yellow perch sampled in the mining region of Rouyn-Noranda, Québec, Canada. Bars indicate means and standard errors ($7 \leq N \leq 10$). Bars that do not share a common letter are significantly different (LSD test, $p < 0.05$).

Figure 4 represents the plasma dROH:liver dROH ratio in fish from the lakes sampled.

The ratios were generally higher in fish from lakes less impacted by Cd, except in Lake Opasatica fish. However, the differences were generally non significant, except in the most Cd impacted lake (Marlon) (Figure 4). No significant correlation was observed between plasma and liver dROH concentration.

There was no significant correlation between renal Cu and hepatic retinoids except for liver dROH stearate ($R = 0.28$; $p = 0.045$). All forms of hepatic dehydroretinoids were significantly and positively correlated with kidney Cd and to a lesser extent with Zn concentration (Table 3). In contrast, plasma dROH was significantly and negatively correlated with kidney Zn ($R = -0.37$; $p = 0.0097$) whereas no significant correlations were observed between plasma dROH levels and renal Cu ($R = -0.41$; $p = 0.78$) or Cd ($R = 0.26$; $p = 0.072$) concentrations.

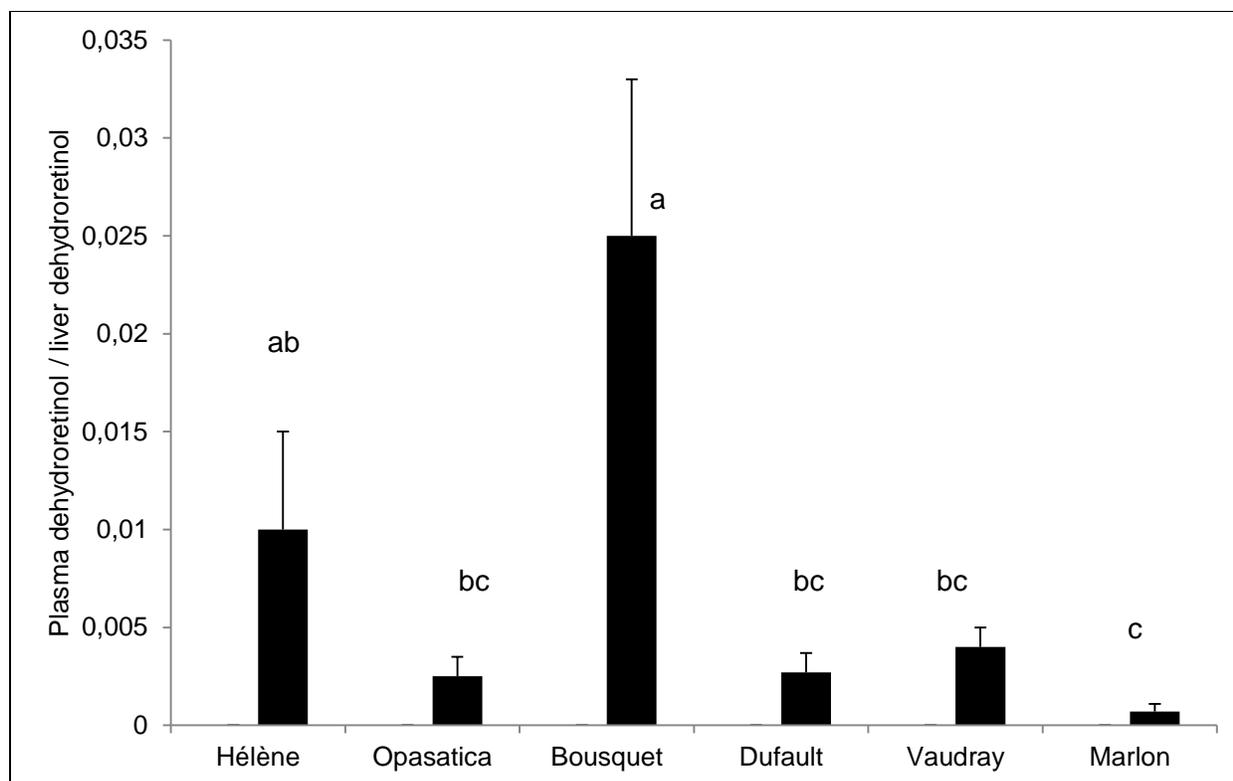


Figure 4: Ratios of $[\text{dehydroretinol}]_{\text{plasma}} / [\text{dehydroretinol}]_{\text{liver}}$. Bars represent means and standard errors. Bars that do not share a common letter are significantly different (LSD test, $p < 0.05$).

4. DISCUSSION

Previous studies have reported a good correlation between liver and kidney metal concentrations, notably Cd concentration, in yellow perch from this region (Kraemer et al., 2005a, b). Among the six lakes sampled, a gradient in kidney Cd was observed, with an 36-fold difference between fish from the cleanest and the most contaminated lake (Figure 1A). This result is in agreement with those reported by Couture *et al* (2008a), who also observed a kidney Cd gradient in yellow perch populations living in this mining region (Couture et al., 2008a). The same results were also obtained in liver (Bourret et al., 2008).

The relative index Kn was used to assess fish condition. Kn is associated with recent feeding activity; this metric is used as an estimate of somatic energy reserves accumulated in fish. Fish from Lake Opasatica displayed lower condition factors when compared to fish from lakes Marlon and Bousquet (Table 2). Studies reported that yellow perch living in metal impacted sites had lower indicators of physical condition than fish from cleaner lakes (Laflamme et al., 2000; Pyle et al., 2008a). Moreover these fish were smaller for a similar age, indicating slower growth rate. Furthermore the relative condition factor and scaling coefficients were lower (Pyle et al., 2008a).

Although tissue concentrations of dehydroretinoids of fish sampled were high, values obtained for fish living in pristine lakes were well within the range reported in other studies. For example, values of 0.24 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ and 0.17 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ of plasma retinol content were analysed in flounder exposed for 3 years to the reference sediment and contaminated sediment respectively (Besselink et al., 1998). Those concentrations are comparable to the plasma dROH obtained in this study (0.1 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ - 0.3 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$). In the same manner, values of liver dROH or ROH and ester forms reported by Miller *et al.* (2009), Besselink *et al.* (1998), Gesto *et al.* (2012), and Pereira *et al.* (2012) are similar to values reported in this study in the cleanest lake (Opasatica).

Yellow perch from Cd-contaminated lakes had significantly higher concentrations of liver dROH and dROH esters than fish from reference lakes. However, the increase in dROH ester stores with increasing Cd concentrations was quantitatively much more important than the increase in free dROH. Thus, a significant decrease in the percentage of liver free dROH with increasing Cd concentrations was observed (Figure 2). These findings differ from those of Branchaud *et al.* (1995), who reported that white suckers,

Catostomus commersoni, living in organohalogen- and PAH-contaminated sites had lower levels of both ROH and ROH palmitate in liver compared with those from their reference site. Similarly, hepatic concentrations of major retinoids including dROH and its esters, in lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, captured in a organohalogen contaminated river-lake system were 40 times lower than in lake sturgeon from a reference site (Doyon et al., 1998). These observations suggest that trace metals (Cd) and organic micropollutants (PAHs, PCBs, polychlorinated pesticides) have different modes of action on vitamin A homeostasis in fish living in polluted areas.

In a previous study we reported that the transcription level of the epidermal retinol dehydrogenase 2 gene, thought to be involved in the oxidation of retinol to retinaldehyde for retinoic acid biosynthesis (Lee et al., 2009), was down-regulated in response to chronic Cd exposure (Pierron et al., 2011). Retinol acts as an essential precursor for the biosynthesis of these two critical retinal metabolites. Retinaldehyde is involved in rhodopsin metabolism and vision (D'Ambrosio et al., 2011). Retinoic acid is an extremely active form of vitamin A, also known as a potent hormone that controls the expression of numerous genes (Ross and Zolfaghari, 2004) through its binding to nuclear receptors, RA receptors (RARs) and retinoid X receptors (RXRs), which act on the genomic targets. Our results suggest that cadmium may inhibit the synthesis of dehydroretinoic acid, leading to higher concentrations of dROH and its esterified forms. This hypothesis needs to be confirmed by measuring dehydroretinal and dehydroretinoic acid in liver and plasma of yellow perch.

Dehydroretinoids are normally esterified to inactive forms, such as dROH palmitate, that are stored in tissues, mainly the liver, and can be mobilized depending on dietary

vitamin intake level and physiological demands (Branchaud et al., 1995). Although all the lakes sampled are located in the same region with a similar natural macroenvironment, the availability and the quality of the prey available to yellow perch may vary among lakes depending, notably, on the contamination level of the lakes (Iles and Rasmussen, 2005a). Several authors have reported a food web simplification in the most metal-contaminated lakes of the Rouyn-Noranda region (Iles and Rasmussen, 2005a; Kövecses et al., 2005). Namely, Kövecses *et al.* (2005) found that the density of yellow perch prey, notably benthic macroinvertebrates, in Cd- and Cu-contaminated lakes was significantly lower than in uncontaminated lakes. Prey types were less diverse and fish inhabiting these contaminated lakes did not switch to larger prey size as they became older (Kövecses et al., 2005). Adult perch living in pristine lakes are predominantly piscivorous whereas chironomid and zooplankton are dominant prey items for yellow perch inhabiting metal-polluted lakes (Sherwood et al., 2000). As intake of vitamin A is dietary, the consumption of diets with different levels of vitamin A or its precursors likely influences liver vitamin A stores. One might speculate that the prey available in contaminated lakes could be richer in vitamin A or in β -carotene than in the available dietary items in clean lakes, thus explaining the increase in hepatic dehydroretinoids in metal-contaminated fish. However, if dietary availability was the principal factor explaining the higher levels of vitamin A in Cd contaminated fish, these fish would be expected to have a higher feeding rate or a higher food conversion efficiency than those inhabiting pristine lakes. In contrast, Sherwood *et al.* (2000) reported that yellow perch populations from polluted lakes had consumption rates that were similar to those for fish from reference lakes in the region of Rouyn-Noranda, and

that their food conversion efficiency was lower than that achieved by fish from the clean lakes. We conclude that dietary factors could unlikely be responsible for the higher levels of vitamin A in Cd-contaminated yellow perch.

Laboratory investigations have established links between pyloric caeca weights and feeding rate (Gauthier et al., 2008) and between pyloric caeca weight and food conversion efficiency (Bergot et al., 1981), with increases in pyloric caeca weight reflecting higher feeding rates and food conversion efficiencies. However, in our study, there were no significant differences in pyloric caeca weight among populations. Moreover, fish from the most contaminated lake (Lake Marlon) had lower pyloric caeca weights than fish from Lake Bousquet, which also had higher relative condition. Fish from Lake Bousquet also had lower hepatic concentrations of vitamin A than fish from Lake Marlon. Although there was a positive relationship between plasma dROH and fish condition factor, in our study, like in other (Audet and Couture, 2003; Couture and Pyle, 2008a; Eastwood and Couture, 2002a), fish living in more Cd-contaminated lakes did not show higher condition as would be expected if greater food availability was the main mechanism explaining their elevated liver dehydroretinoid concentrations. Thus these results also argue against a dietary explanation for the higher levels of vitamin A in Cd-contaminated yellow perch. However this conclusion needs to be confirmed by determining the vitamin A content in fish diet.

Highly significant and positive correlations were observed between kidney Cd concentrations and all forms of vitamin A examined in liver. Since they act as antioxidants, vitamins A are molecules capable of inhibiting the oxidation of other substances present in cells (Alpsoy et al., 2009; Dragsted, 2008). Subcellular

antioxidant systems are known to be sensitive to metal exposure and they have been proposed as indicators of metal toxicity (Atli and Canli, 2010). Laboratory experiments have shown that Cd exposure can induce the symptoms of oxidative stress (Shi et al., 2005), but yellow perch living in metal contaminated areas seem to have developed several protective mechanisms to scavenge reactive oxygen species (ROS) before detrimental effects occur in cells. For example, Giguère et al. (2005a) found little evidence of oxidative stress in the livers of yellow perch collected from lakes representing a metal contamination gradient (Cd, Cu, Ni, Zn); they speculated that the observed increase in metallothionein concentrations with increasing accumulated metals might protect fish against ROS. Our present results suggest an alternative explanation, namely that the increase in hepatic vitamin A concentrations in fish most impacted by Cd may provide protection against oxidative stress. However, it is noteworthy that strong and positive relationships between liver vitamin A and kidney burdens of cadmium were identified in birds (*Melanitta perspicillata*) (Harris et al., 2007). Similarly, Rodríguez- Estival et al. (2011) observed a relatively high proportion of free liver retinol in wild ungulates exposed to mine pollution. Vitamin A is also known to be involved in cell growth. The higher level of retinoids in the tissues of fish living in more cadmium-impacted lake could accelerate cell differentiation and growth. This finding is in accordance with the study of Couture and Pyle (2008), which proposed that yellow perch living in metal impacted lakes in the region of Sudbury (Canada) grow faster but die younger (Couture and Pyle, 2008a).

The six populations of yellow perch were selected to cover a range of metal exposure concentrations, especially for Cd. The ratio of free dROH over dROH palmitate, the

predominant ester, or over total esters, is considered to be an index of the metabolism of stored dehydroretinoids in the liver. A lower ratio of liver ROH/ROH palmitate in bullfrogs was related to polluted conditions (Boily et al., 2005). In our study, the percentage of free dROH was significantly and negatively correlated with kidney Cd concentrations. Likely, ester hydrolysis was affected by Cd contamination. We speculate that enzymes involved in the hydrolysis of liver dROH esters were inhibited by the presence of Cd. This finding is in agreement with the study of Tsin and Malsbury (1991), who reported that divalent cations such as Cd inhibited the activities of retinyl ester hydrolases in bovine ocular tissues.

Plasma dROH concentrations were analysed in the same fish, to verify whether the increase in liver dROH concentrations accelerated its mobilization from liver to blood. Interestingly, no significant correlation was observed between plasma and liver dROH concentrations. In the liver, carrier proteins such as retinol binding proteins (RBPs) and transthyretin (TTR) are activated to transfer this molecule from the liver to target organs. Liver secretion of these proteins is modulated by the vitamin A concentration and by the animal's stress status (D'Ambrosio et al., 2011). The decrease in the plasma dROH: liver dROH ratio in the most Cd impacted fish (Figure 4) could be attributed to the inhibition of the synthesis of RBP and/or TTR protein or to the inhibition of the binding of dROH to RBP by the presence of Cd. Interestingly, in a previous study we reported an increase in the transcription level of the gene encoding for TTR with increasing Cd concentrations in yellow perch. In this context, an increase at the transcription level could suggest a compensatory mechanism aiming at counteracting the direct effects of Cd at the protein level.

5. CONCLUSIONS

Our study showed (1) that yellow perch living in contaminated lakes in the Rouyn-Noranda region display high liver vitamin A₂ levels, potentially providing protection against oxidative stress induced by metal exposure; (2) that the proportion of liver free dROH decreases along a gradient of increasing Cd contamination, suggesting a negative effect of Cd on enzymes and binding proteins involved in vitamin A homeostasis. Clearly then, vitamin A₂ homeostasis can be altered as a consequence of exposure to environmentally relevant Cd concentrations. Our results also support the hypothesis that down-regulation of genes involved in retinol metabolism can be reflected at the biochemical level.

6. ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, Ottawa, ON, Canada) and by Vale Limited (Toronto, ON, Canada). The authors wish to acknowledge the contributions of the INRS-ETE support staff, without whom this study could not have been completed. In particular, Stéfane Prémont, René Rodrigue, Anissa Bensadoune and Julie Perreault are thanked for their help and technical assistance with metal analyses. Thanks to Bérénice Bougas for her help in the development of plasma collection protocols. We are grateful to the associate editors and two anonymous referees that constructively commented a previous version of this manuscript. P.G.C. Campbell and L. Bernatchez are supported by the Canada Research Chair Program.

7. REFERENCES

- Aalto, S.K., Newsome, G.E., 1990. Additional evidence supporting demic behaviour of a yellow perch (*Perca flavescens*) population. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 47, 1959-1962
- Alpsoy, L., Yildirim, A., Agar, G., 2009. The antioxidant effects of vitamin A, C, and E on aflatoxin B 1-induced oxidative stress in human lymphocytes. Toxicology and Industrial Health 25, 121-127.
- Amann, P.M., Eichmüller, S.B., Schmidt, J., Bazhin, A.V., 2011a. Regulation of gene expression by retinoids. Current Medicinal Chemistry 18, 1405-1412.
- Amann, P.M., Schadendorf, D., Owen, R.W., Korn, B., Eichmüller, S.B., Bazhin, A.V., 2011b. Retinal and retinol are potential regulators of gene expression in the keratinocyte cell line HaCaT. Experimental Dermatology 20, 373-375.
- Atli, G., Canli, M., 2010. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. Ecotoxicology and Environmental Safety 73, 1884-1889.
- Atli, G., Canli, M., 2011. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. Ecotoxicology 20, 1861-1869.
- Audet, D., Couture, P., 2003. Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 60, 269-278.

Baigún, C.R.M., Colautti, D.C., Grosman, F., 2009. Assessment of condition in pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes: Atherinopsidae) populations: Which index works best? *Neotropical Ichthyology* 7, 439-446.

Belzile, N., Chen, Y.W., Gunn, J.M., Dixit, S.S., 2004. Sediment trace metal profiles in lakes of Killarney Park, Canada: From regional to continental influence. *Environmental Pollution* 130, 239-248.

Bergot, P., Blanc, J.M., Escaffre, A.M., 1981. Relationship between number of pyloric caeca and growth in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture* 22, 81-96.

Bérubé, V.E., Boily, M.H., DeBlois, C., Dassylva, N., Spear, P.A., 2005. Plasma retinoid profile in bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural intensity of sub-watersheds in the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada. *Aquatic Toxicology* 71, 109-120.

Besselink, H.T., Flipsen, E.M.T.E., Eggens, M.L., Vethaak, A.D., Koeman, J.H., Brouwer, A., 1998. Alterations in plasma and hepatic retinoid levels in flounder (*Platichthys flesus*) after chronic exposure to contaminated harbour sludge in a mesocosm study. *Aquatic Toxicology* 42, 271-285.

Boily, M.H., Bérubé, V.E., Spear, P.A., DeBlois, C., Dassylva, N., 2005. Hepatic retinoids of bullfrogs in relation to agricultural pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 1099-1106.

Bourret, V., Couture, P., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., 2008. Evolutionary ecotoxicology of wild yellow perch (*Perca flavescens*) populations chronically exposed to a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 86, 76-90.

Branchaud, A., Gendron, A., Fortin, R., Anderson, P.D., Spear, P.A., 1995. Vitamin A stores, teratogenesis, and EROD activity in white sucker, *Catostomus commersoni*, from Riviere des Prairies near Montreal and a reference site. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 1703-1713.

Campbell, P.G.C., Hontela, A., Rasmussen, J.B., Giguère, A., Gravel, A., Kraemer, L., Kovescs, J., Lacroix, A., Levesque, H., Sherwood, G., 2003. Differentiating between direct (physiological) and food-chain mediated (bioenergetic) effects on fish in metal-impacted lakes. *Human and Ecological Risk Assessment* 9, 847-866.

Campbell, P.G.C., Kraemer, L.D., Giguère, A., Hare, L., Hontela, A., 2008. Subcellular distribution of cadmium and nickel in chronically exposed wild fish: Inferences regarding metal detoxification strategies and implications for setting water quality guidelines for dissolved metals. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 290-316.

Couture, P., Busby, P., Gauthier, C., Rajotte, J.W., Pyle, G.G., 2008a. Seasonal and regional variations of metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. I. Factors influencing tissue metal concentrations. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 97-125.

Couture, P., Pyle, G., 2008. Live fast and die young: Metal effects on condition and physiology of wild yellow perch from along two metal contamination gradients. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 73-96.

Couture, P., Rajotte, J.W., Pyle, G.G., 2008b. Seasonal and regional variations in metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two

polymetallic gradients. III. Energetic and physiological indicators. Human and Ecological Risk Assessment 14, 146-165.

Croteau, M.N., Hare, L., Tessier, A., 2003. Difficulties in relating Cd concentrations in the predatory insect Chaoborus to those of its prey in nature. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 60, 800-808.

D'Ambrosio, D.N., Clugston, R.D., Blaner, W.S., 2011. Vitamin A metabolism: An update. Nutrients 3, 63-103.

Doyon, C., Boileau, S., Fortin, R., Spear, P.A., 1998. Rapid HPLC analysis of retinoids and dehydroretinoids stored in fish liver: Comparison of two lake sturgeon populations. Journal of Fish Biology 53, 973-986.

Dragsted, L.O., 2008. Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and e and their relation to lipid and protein oxidation markers. European Journal of Nutrition 47, 3-18.

Eastwood, S., Couture, P., 2002. Seasonal variations in condition and liver metal concentrations of yellow perch (*Perca flavescens*) from a metal-contaminated environment. Aquatic Toxicology 58, 43-56.

Fernández, I., Gisbert, E., 2011. The effect of vitamin A on flatfish development and skeletogenesis: A review. Aquaculture 315, 34-48.

Garner, S.R., Neff, B.D., Bernards, M.A., 2010. Dietary carotenoid levels affect carotenoid and retinoid allocation in female Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. Journal of Fish Biology 76, 1474-1490.

Gauthier, C., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2008. Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 151A, 526-532.

Gauthier, C., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2009. Condition and pyloric caeca as indicators of food web effects in fish living in metal-contaminated lakes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 2066-2074.

Gauthier, C., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2011. Enzymatic correlates of energy status in wild yellow perch inhabiting clean and contaminated environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 2148-2156.

Gesto, M., Castro, L.F.C., Reis-Henriques, M.A., Santos, M.M., 2012. Tissue-specific distribution patterns of retinoids and didehydroretinoids in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 162, 57-134.

Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., Cossu-Leguille, C., 2005. Metal bioaccumulation and oxidative stress in yellow perch (*Perca flavescens*) collected from eight lakes along a metal contamination gradient (Cd, Cu, Zn, Ni). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62, 563-577.

Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., Couture, P., 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 77, 178-189.

Goswami, U.C., Barua, A.B., 1981. Distribution of retinol & dehydroretinol in freshwater fish. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 18, 383-385.

Hare, L., Tessier, A., 1998. The aquatic insect Chaoborus as a biomonitor of trace metals in lakes. *Limnology and Oceanography* 43, 1850-1859.

Harris, M.L., Wilson, L.K., Trudeau, S.F., Elliott, J.E., 2007. Vitamin A and contaminant concentrations in surf scoters (*Melanitta perspicillata*) wintering on the Pacific coast of British Columbia, Canada. *Science of the Total Environment* 378, 366-375.

Hontela, A., Dumont, P., Duclos, D., Fortin, R., 1995. Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence River. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 725-731.

Hontela, A., Rasmussen, J.B., Audet, C., Chevalier, G., 1992. Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and mercury. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 22, 278-283.

Iles, A., Rasmussen, J.B., 2005. Indirect effects of metal contamination on energetics of yellow perch (*Perca flavescens*) resulting from food web simplification. *Freshwater Biology*, 976-992.

Klee, R.J., Graedel, T.E., 2004. ELEMENTAL CYCLES: A Status Report on Human or Natural Dominance. *Annual Review of Environment and Resources* 29, 69-107.

Kövecses, J., Sherwood, G.D., Rasmussen, J.B., 2005. Impacts of altered benthic invertebrate communities on the feeding ecology of yellow perch (*Perca flavescens*) in metal-contaminated lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62, 153-162.

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., 2005a. Dynamics of Cd, Cu and Zn accumulation in organs and sub-cellular fractions in field transplanted juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Environmental Pollution* 138, 324-337.

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., 2005b. A field study examining metal elimination kinetics in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology* 75, 108-126.

Laflamme, J.S., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Hontela, A., 2000. Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, and Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 1692-1700.

Lee, S.A., Belyaeva, O.V., Kedishvili, N.Y., 2009. Biochemical characterization of human epidermal retinol dehydrogenase 2. *Chemico-Biological Interactions* 178, 182-187.

Li, H., Palczewski, K., Baehr, W., Clagett-Dame, M., 2011. Vitamin A deficiency results in meiotic failure and accumulation of undifferentiated spermatogonia in prepubertal mouse testis. *Biology of Reproduction* 84, 336-341.

Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2008. Trace metal bioaccumulation, metal contamination in aquatic environments: science and lateral management. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 126-168.

Mahler, B.J., Van Metre, P.C., Callender, E., 2006. Trends in metals in urban and reference lake sediments across the United States, 1970 to 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1698-1709.

Marcogliese, D.J., King, K.C., Salo, H.M., Fournier, M., Brousseau, P., Spear, P., Champoux, L., McLaughlin, J.D., Boily, M., 2009. Combined effects of agricultural activity and parasites on biomarkers in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Aquatic Toxicology* 91, 126-134.

Miller, L.L., Rasmussen, J.B., Palace, V.P., Hontela, A., 2009. The physiological stress response and oxidative stress biomarkers in rainbow trout and brook trout from selenium-impacted streams in a coal mining region. *Journal of Applied Toxicology* 29, 681-688.

Mora, J.R., Iwata, M., Von Andrian, U.H., 2008. Vitamin effects on the immune system: Vitamins A and D take centre stage. *Nature Reviews Immunology* 8, 685-698.

Mos, L., Tabuchi, M., Dangerfield, N., Jeffries, S.J., Koop, B.F., Ross, P.S., 2007. Contaminant-associated disruption of vitamin A and its receptor (retinoic acid receptor alpha) in free-ranging harbour seals (*Phoca vitulina*). *Aquatic Toxicology* 81, 319-328.

Niyogi, S., Pyle, G.G., Wood, C.M., 2007. Branchial versus intestinal zinc uptake in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from reference and metal-contaminated aquatic ecosystems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64, 1605-1613.

Novák, J., Beníšek, M., Hilscherová, K., 2008. Disruption of retinoid transport, metabolism and signaling by environmental pollutants. *Environment International* 34, 898-913.

Peltier, M.R., Wilcox, C.J., Sharp, D.C., 1998. Technical note: application of the Box-Cox data transformation to animal science experiments. *Journal of Animal Sciences* 76, 847-849.

Perceval, O., Pinel-Alloul, B., Méthot, 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.

Pierron, F., Bourret, V., St-Cyr, J., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2009. Transcriptional responses to environmental metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*) collected in lakes with differing environmental metal concentrations (Cd, Cu, Ni). *Ecotoxicology* 18, 620-631.

Pierron, F., Normandeau, E., Defo, M.A., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2011. Effects of chronic metal exposure on wild fish populations revealed by high-throughput cDNA sequencing. *Ecotoxicology* 20, 1388-1399.

Pyle, G., Busby, P., Gauthier, C., Rajotte, J., Couture, P., 2008. Seasonal and regional variations in metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. II. Growth patterns, longevity, and condition. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 126-145.

Rajotte, J.W., Couture, P., 2002. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 1296-1304.

Rodríguez-Estival, J., Taggart, M.A., Mateo, R., 2011. Alterations in vitamin A and e levels in liver and testis of wild ungulates from a lead mining area. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 361-371.

- Rolland, R.M., 2000. A review of chemically-induced alterations in thyroid and vitamin A status from field studies of wildlife and fish. *Journal of Wildlife Diseases* 36, 615-635.
- Ross, A.C., Zolfaghari, R., 2004. Regulation of hepatic retinol metabolism: perspectives from studies on vitamin A status. *Journal of Nutrition*. 134, 1 269S-275S.
- Sherwood, D.D., Rasmussen, J.B., Rowan, D.J., Brodeur, J., Hontela, A., 2000. Bioenergetic costs of heavy metal exposure in yellow perch (*Perca flavescens*): in situ estimates with a radiotracer (¹³⁷ Cs) technique. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 441-450.
- Shi, H., Sui, Y., Wang, X., Luo, Y., Ji, L., 2005. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 140, 115-121.
- Spear, P.A., Bilodeau, A.Y., Branchaud, A., 1992. Retinoids: From metabolism to environmental monitoring. *Chemosphere* 25, 1733-1738.
- Spear, P.A., Bourbonnais, D.H., Norstrom, R.J., Moon, T.W., 1990. Yolk retinoids (vitamin A) in eggs of the herring gull and correlations with polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9, 1053-1061.
- Spear, P.A., Garcin, H., Narbonne, J.F., 1988. Increased retinoic acid metabolism following 3,3',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl injection. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 66, 1181-1186.

Spear, P.A., Moon, T.W., 1986. Thyroid-vitamin A interactions in chicks exposed to 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl: Influence of low dietary vitamin A and iodine. *Environmental Research* 40, 188-198.

Sucov, H.M., Evans, R.M., 1995. Retinoic acid and retinoic acid receptors in development. *Molecular Neurobiology* 10, 169-184.

Tanumihardjo, S.A., 2011. Vitamin A: Biomarkers of nutrition for development. *American Journal of Clinical Nutrition* 94, 658S-665S.

Tsin, A.T.C., Malsbury, D.W., 1991. Bile salt independent retinyl ester hydrolases in the bovine eye. *Brain Research Bulletin* 28, 121-125.

Chapitre X : Variations saisonnières des concentrations métalliques rénales et leurs implications sur le métabolisme des rétinoïdes et la réponse au stress oxydant chez les perchaudes sauvages (*Perca flavescens*)

10. ARTICLE 3

Defo, M.A., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P. Variations saisonnières des concentrations métalliques rénales et leurs implications sur le métabolisme des rétinoïdes et la réponse au stress oxydant chez les perchaudes sauvages (*Perca flavescens*). En préparation.

Michel Amery Defo: Conception et réalisation (échantillonnage de terrain, analyse de laboratoire, traitement et interprétation des données) du projet et rédaction de l'article.

Louis Bernatchez: Conception du projet.

Peter G.C. Campbell: Conception du projet et révision de l'article.

Patrice Couture: Conception du projet et révision de l'article.

Defo, M.A., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P. Variations saisonnières des concentrations métalliques rénales et leurs implications sur le métabolisme des rétinoïdes et la réponse au stress oxydant chez les perchaudes sauvages (*Perca flavescens*).

Michel A. Defo^a, Louis Bernatchez^b, Peter G.C. Campbell^a et Patrice Couture^{a*}

a Institut national de la Recherche scientifique (INRS), Centre Eau Terre Environnement, 490 de la Couronne, Québec, QC, Canada G1K 9A9.

b Institut de Biologie intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Québec, QC, Canada G1V 0A6.

* Auteur de la correspondance: adresse courriel: patrice.couture@ete.inrs.ca

Téléphone 1-418 559 3825, Fax: 1-418 654-2600

RÉSUMÉ

Les fluctuations saisonnières des concentrations métalliques (Cd, Cu et Zn) ont été mesurées au printemps et à l'automne 2012 dans les reins de perchaudes juvéniles (*Perca flavescens*) échantillonnées dans quatre lacs situés le long d'un gradient de concentration en métaux dans la région de Rouyn-Noranda (Qc). Les lacs Opasatica et Hélène sont considérés comme les lacs de référence (faible concentration métallique) alors que les lacs Dufault et Marlon sont contaminés par les métaux. L'objectif de cette étude était d'évaluer si les variations saisonnières dans les concentrations tissulaires des métaux affectent les biomarqueurs de stress oxydant et le métabolisme des rétinoïdes. Nos résultats montrent que les concentrations de Cd, de Cu et de Zn mesurées dans les reins des poissons vivant dans les lacs contaminés varient fortement entre les deux saisons avec des valeurs plus faibles en automne, que nous avons attribuées d'une part à une variation dans les concentrations métalliques et/ou dans la chimie de l'eau entre les deux saisons, et d'autre part à la dilution par la croissance des perchaudes. Au cours d'une même saison, les concentrations du déhydrorétinol, déhydrorétinyl palmitate et d'esters totaux de vitamine A ont augmenté chez les poissons issus des lacs contaminés traduisant un besoin de mieux lutter contre le stress oxydant engendré par l'exposition aux métaux. Une forte variation saisonnière des concentrations de ces métabolites, du pourcentage de déhydrorétinol libre et du niveau de transcription de la rétinol deshydrogénase-2 a été observée avec des valeurs plus élevées au printemps qu'en automne. Pour le muscle, une variation saisonnière dans les concentrations du déhydrorétinol, du déhydrorétinyl stéarate et du pourcentage de déhydrorétinol libre a été observée dans des poissons capturés dans les lacs

contaminés, avec des valeurs élevées au printemps sauf pour le dernier paramètre où la valeur était plus forte en automne. Parmi les bio-indicateurs traditionnels de la réponse au stress oxydant, bien qu'il existe des variations inter-lacs dans la même saison pour certains paramètres, une fluctuation saisonnière a été observée. Par exemple l'expression de la Cu/Zn-superoxyde dismutase-1 et les activités de la catalase et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase hépatique des perchaudes échantillonnées dans les lacs contaminés étaient plus élevées au printemps qu'en automne. Ce résultat traduit un état de stress causé par les métaux plus important au printemps qu'en automne chez les perchaudes vivant dans les lacs contaminés aux métaux. Notre étude illustre les conséquences que peuvent avoir des variations dans les concentrations métalliques tissulaires dans le métabolisme des rétinoïdes et les réponses au stress oxydant chez les poissons indigènes.

Mots clés : Échantillonnage temporel, perchaude sauvage, exposition chronique, métaux, rétinoïdes, stress oxydant.

1. INTRODUCTION

Contrairement à d'autres biomoniteurs tels que les insectes (*Chaoborus* par exemple), les poissons dans les écosystèmes dulcicoles représentent le plus souvent le dernier maillon de la chaîne alimentaire et constituent de ce fait un modèle biologique important dans l'étude des impacts d'une contamination métallique sur les populations puisqu'ils intègrent à la fois les effets directs (exposition par l'eau) et les effets indirects (exposition par la diète) (Audet and Couture, 2003; Farag et al., 1994; Giguère et al., 2004a). Espèce sentinelle de pollution aquatique, la perchaude est capable non seulement de tolérer la présence des métaux (Eaton et al., 1992), mais aussi de les accumuler dans ses tissus (Kraemer et al., 2005a). Ubiquitaire en Amérique du Nord, c'est un poisson facile à capturer. Elle constitue l'espèce dominante (Couture et al., 2008a) dans certains lacs des zones minières et de fonderies du Canada (Hontela et al., 1995; Hontela et al., 1992) incluant la région de Rouyn-Noranda.

Les études des effets des métaux sur les poissons sont le plus souvent conduites dans les conditions contrôlées de laboratoire où ils sont typiquement exposés à un seul métal par voie aqueuse. De ce fait, l'influence des variations saisonnières sur les paramètres physico-chimiques (température, oxygène dissous...), sur la disponibilité de nourriture, sur le cycle biologique des poissons (maturation sexuelle...) et sur les concentrations métalliques tissulaires est ignorée. Par exemple, un changement dans le régime alimentaire de la perchaude au cours de sa croissance induit une variation des concentrations de métaux dans sa diète, ce qui pourrait entraîner une augmentation des concentrations des métaux dans ses tissus (Rasmussen et al., 2008). Des études conduites en milieu naturel ont montré que non seulement les concentrations tissulaires

en métaux chez les perchaudes vivant dans les lacs contaminés fluctuent au cours de l'année, mais que cette variation peut apporter des conséquences sur la répartition subcellulaire des métaux et donc potentiellement une plus grande susceptibilité à la toxicité si les métaux sont liés aux fractions sensibles (Kraemer et al., 2006a). De plus, une corrélation a été établie entre les variations saisonnières des concentrations métalliques mesurées dans les tissus des perchaudes et une variation de leurs conditions (Audet and Couture, 2003; Eastwood and Couture, 2002b), de leurs capacités biosynthétiques (Audet and Couture, 2003) ou de l'accumulation des réserves énergétiques (Levesque et al., 2002a).

Aussi appelés vitamine A, les rétinoïdes représentent un groupe de molécules organiques ayant une structure proche de celle du rétinol. Ils jouent un rôle essentiel dans l'organisme puisqu'ils interviennent dans diverses fonctions physiologiques telles que la reproduction, la vision ou la croissance. En outre, certains composés possèdent des propriétés anti-oxydantes (Defo et al., 2014b). Chez les organismes aérobies, bien qu'il existe une faible concentration permanente d'espèces réactives à l'oxygène (ERO) (Pellerin et al., 2004), la concentration cellulaire d'ERO peut rapidement augmenter pour faire face à un changement défavorable dans les conditions environnementales ou métaboliques de l'organisme (Gliszczyńska-Świgło 2006; Scandalios, 2005). La conséquence d'une surproduction d'ERO est le passage de la cellule d'un état normal à un état de stress oxydant pouvant entraîner des dommages parfois irréversibles incluant la peroxydation des lipides, la dénaturation des protéines ou d'acides nucléiques et d'autres effets délétères dans la cellule (Chen et al., 2013; Leonard et al., 2004; Regoli, 2000). Les métaux utilisent divers modes d'action pour générer ou

augmenter la production des radicaux libres dans la cellule (Defo et al., 2014b; Lushchak, 2011). Une formation excessive de radicaux libres peut stimuler une expression des gènes impliqués dans la défense du stress oxydant et augmenter les activités des enzymes impliqués dans cette voie métabolique (Uren Webster et al., 2013).

Bien que nous avons évalué les effets d'une exposition chronique à un cocktail de métaux sur le métabolisme des rétinoïdes chez les perchaudes indigènes (Defo et al., 2012b), à notre connaissance, les variations saisonnières de ces effets n'ont pas encore fait l'objet d'une étude. Une étude sur l'impact des métaux sur les populations de perchaudes indigènes de deux régions minières au Canada a montré que ces poissons avaient des capacités de défenses antioxydantes réduites (par exemple baisse de l'activité de la glutathion réductase et réduction de la concentration en glutathion hépatique) prouvant ainsi un état de stress oxydant (Giguère et al., 2005a). Cependant la diminution dans les paramètres du stress oxydant observés était liée à une augmentation des concentrations de la métallothionéine qui aurait joué un rôle dans la protection contre le stress oxydant engendré par les métaux (Giguère et al., 2005a). La seule étude qui fait mention d'une variation saisonnière des concentrations métalliques sur les paramètres de réponse au stress oxydant est celle de Levesque et al. (2002). En effet, l'activité de la G6PDH hépatique était faible chez les perchaudes vivant dans les lacs les plus contaminés en métaux, en été, mais cette activité restait élevée comparativement à celle de leurs homologues capturés en automne de la même année (Levesque et al., 2002a). Première enzyme dans la voie des pentoses phosphates, la G6PDH catalyse la conversion du glucose-6-phosphate en 6-

phosphogluconate avec production de la NADPH et est indispensable dans le maintien du niveau de NADPH cytosolique (Ho et al., 2007) nécessaire pour la formation du glutathion réduit, qui à son tour joue un rôle dans la protection contre les dommages oxydatifs (Efferth et al., 2006).

Les variations saisonnières dans les concentrations tissulaires de métaux chez la perchaude sont bien connues (Levesque et al., 2002a; Pyle and Couture, 2008). L'objectif principal de ce travail était de tester si le niveau de transcription d'un ensemble de gènes impliqués dans le métabolisme des rétinoïdes et dans la réponse au stress oxydant de même que les paramètres biochimiques correspondants (activités enzymatiques et stockage des rétinoïdes) suivent les fluctuations des concentrations tissulaires métalliques. Les données recueillies pourront servir à mieux évaluer les risques environnementaux d'une exposition aux métaux en tenant compte des variabilités saisonnières de la contamination métallique et de leur influence sur les réponses moléculaires et biochimiques des organismes.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Présentation du site et des lacs d'étude

Le site d'investigation de cette étude se situe dans la région de Rouyn-Noranda (Nord-Ouest de la province de Québec). Elle constitue un cadre de recherche exceptionnel pour examiner le lien entre la contamination métallique et les effets sur les populations de poissons sauvages. En effet, des activités minières et métallurgiques qui ont lieu dans cette région depuis 1927 ont eu pour conséquence majeure, sur le plan biogéochimique, une contamination régionale en métaux, notamment en Cd, en Cu et

en Zn (Campbell et al., 2008; Perceval et al., 2002) et subséquentement des effets néfastes sur la vie des organismes aquatiques (Couture et al., 2008b). L'échantillonnage des poissons s'est déroulé au printemps (fin mai) et à l'automne 2012 (début septembre). Selon le niveau de concentration métallique dans l'eau et dans les sédiments, quatre lacs ont été sélectionnés. Ces plans d'eau étaient constitués des lacs Opasatica et Hélène, considérés comme des lacs relativement "propres" et des lacs Dufault et Marlon, situés à une distance relativement proche de la fonderie Horne et considérés comme étant contaminés en métaux (Fig.1).

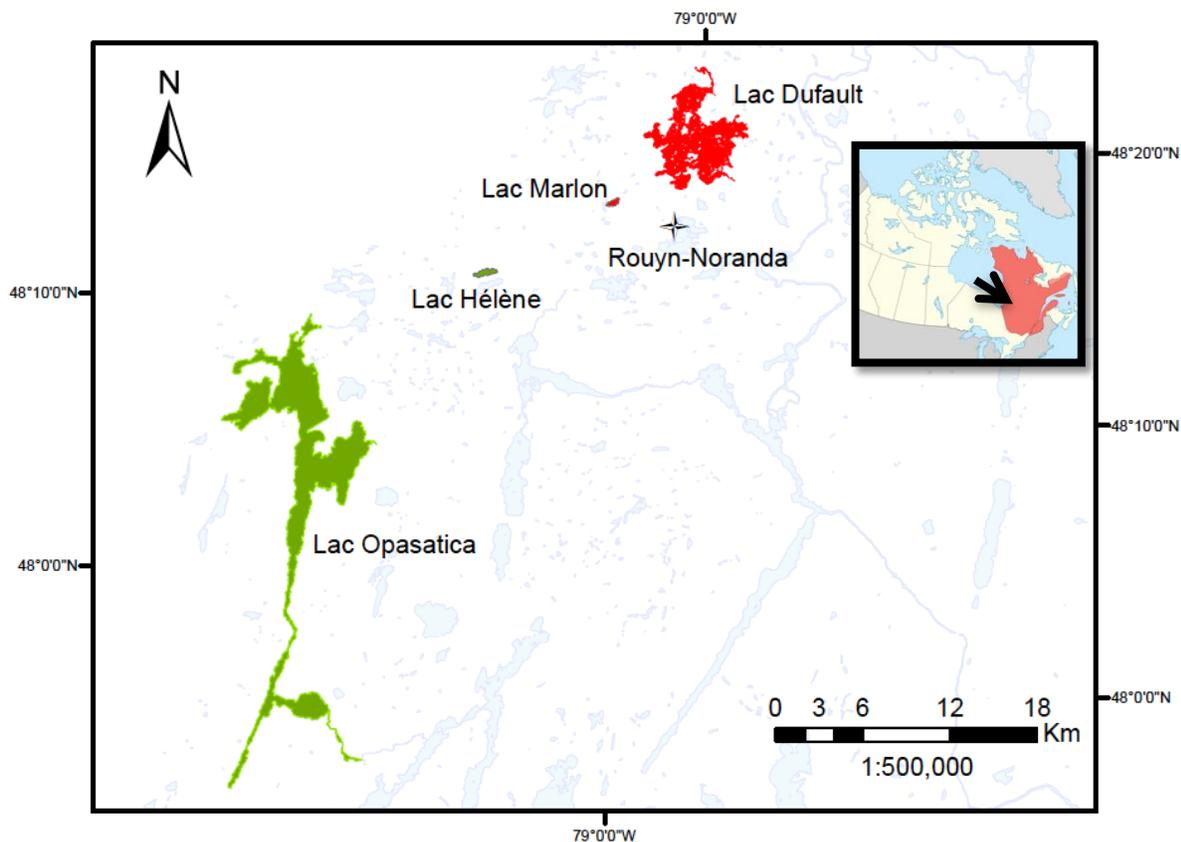


Figure 1 : Différents lacs échantillonnés au printemps et en automne 2012. Les couleurs verte et rouge indiquent respectivement les lacs "propres" et les lacs ayant une concentration métallique aqueuse relativement élevée. L'étoile représente la fonderie Horne dans la ville de Rouyn-Noranda.

2.2. Prélèvement et échantillonnage des poissons

Afin de vérifier si la nature de diète des perchaudes est le principal facteur pouvant expliquer les fortes concentrations en rétinoïdes mesurées dans le foie des perchaudes (Defo et al., 2012), les perchaudes juvéniles planctonophages ont été échantillonnées.

Pour chacune des saisons une senne de rivage a été utilisée pour capturer 20 perchaudes juvéniles (taille = $7,0 \pm 0,1$ cm ; masse = $3,5 \pm 0,2$ g ; moyenne \pm erreur type) dans chacun des lacs échantillonnés. Une fois capturées, les perchaudes étaient maintenues dans une glacière remplie d'eau du lac d'origine et aérée en permanence jusqu'à la dissection de tous les poissons. Afin de minimiser le stress dû à la captivité, quelques gouttes de Stress Coat® ont été ajoutées à l'eau. Les poissons ont été euthanasiés par un coup à la tête et ensuite disséqués après avoir mesuré leur masse et leur longueur à la fourche. Après détermination de leur sexe, divers organes tels que les reins (analyses des métaux), le muscle blanc (analyses biochimiques), le foie (analyses biochimiques et moléculaires) et les cæca pyloriques ont été extraits. Ces deux derniers tissus, ont en plus, été pesés pour des analyses biométriques. Le matériel biologique était ensuite placé dans des cryotubes libellés, puis conservés dans l'azote liquide jusqu'à la fin du séjour sur le terrain et entreposés dans un congélateur (-80°C) de l'INRS-ETE jusqu'au moment de leur analyse. Le protocole de manipulation des poissons a été approuvé par le Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec et par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) de l'INRS.

2.3. Analyse des métaux contenus dans les reins des perchaudes

Pour chaque individu le rein a été lyophilisé avant sa digestion dans l'acide nitrique concentré (grade métal trace ; 67-70%) Pour assurer un contrôle de qualité, des

échantillons de référence (TORT-2) ainsi que des blancs (acide pur, témoin d'une éventuelle contamination métallique) ont été analysés dans chaque séquence. Le Cd, le Cu et le Zn tissulaire ont été analysés avec un spectrophotomètre (ICP-AES) selon la méthode décrite dans Defo et al. (2012). Les valeurs nominales du standard interne étaient toutes $\leq 10\%$ et les pourcentages de récupération des métaux par rapport aux valeurs des échantillons certifiés (8 à 10 échantillons) étaient de $94,8 \pm 0,4\%$ pour le Cd ; $85,3 \pm 1,3\%$ pour le Cu et $89,0 \pm 0,9\%$ pour le Zn (moyenne \pm erreur type).

2.4. Analyse des PCR quantitatives en temps réel, des rétinoïdes, des activités enzymatiques et des protéines tissulaires

Les séquences nucléotidiques des paires d'amorces utilisées dans cette étude sont présentées dans le tableau 1. Les analyses d'expression des gènes de même que tous les paramètres biochimiques de cette étude ont été conduites en utilisant le protocole décrit dans Defo al. (2014a) sans modification aucune.

2.5. Calculs et analyses statistiques des données

L'indice d'embonpoint relatif (Kn) a été calculé en utilisant la formule $Kn = (Mp/L^{3,16}) \times 100$ (où 3,16 représente le coefficient d'embonpoint, "Mp" la masse du poisson et "L" sa longueur totale) (Gauthier et al., 2009). L'équation $(Mf/Mp) \times 100$ a été utilisée pour déterminer l'indice hépatosomatique (IHS) de chaque poisson, avec Mf = masse du foie (Miller et al., 2009)

Tableau 1: Séquences nucléotidiques des paires d'amorces et les produits PCR utilisés dans les analyses de la RT-qPCR.

abréviations	Nom et fonctions	Amorces spécifiques	Produits PCR
<i>β-actine</i>	Gène de référence	F: 5'- GCCTCTCTGTCCACCTTCCA-3' R: 5'- GGGCCGGACTCATCGTACT-3'	Tiré de Pierron et al. (2009)
<i>rdh-2</i>	Photorécepteur associé à la rétinol déshydrogénase sous unité-2 (rétinoïdes et stress oxydant)	F: 5'-AGTCAAGCAGTGCATCAACAAT-3' R: 5'- CATGCGAACACACCAAAGAAG-3'	151
<i>cat</i>	Catalase (stress oxydant)	F: 5'- GTCTTTCTTGTTTCAGCGATCGA-3' R: 5'- GTAGAAACGTTCCACATCAGCA-3'	106
<i>mgst-3</i>	Glutathionne S transférase microsomale sous unité-3 (stress oxydant)	F: 5'- CCTTCCTCTACAGCTGGATCAT-3' R: 5'- TGAATACCTGCTCCTTGTCACT-3'	114
<i>g6pdh</i>	Glucose 6 phosphate déshydrogénase (voies des pentoses phosphates et stress oxydant)	F: 5'- ACGAGAGGCTGATATTGGATGT-3' R: 5'- TCCATATGTGTAAGGGATGGGG-3'	146
<i>Cu/Zn-sod</i>	Cu/Zn superoxyde dismutase (stress oxydant)	F : 5'-TGAGCAGGAGGAGGGTTCATCCCC-3' R : 5'-CCTGCACTGATGCACCCGTTTGT-3'	123

F: Amorce F
R: Amorce R

La masse corrigée des cæca pyloriques a été calculée selon la description de Gauthier et al. (2011), avec les valeurs de 2,6 et 0,92 comme la masse standard moyenne du poisson et coefficient allométrique, respectivement (Gauthier et al., 2011). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le programme JMP version 9.0 (SAS Institute). Pour tester les différences dans les paramètres biométriques, la concentration totale des métaux contenus dans les reins, les activités enzymatiques tissulaires, le niveau de transcription des gènes et les concentrations des rétinoïdes tissulaires entre les lacs et les saisons, nous avons utilisé les analyses de variance (ANOVA) à 2 facteurs après un satisfecit de la normalité (test de Levene $p > 0,05$). Dans le cas contraire, afin de respecter la normalité de la distribution les données ont été transformées (log ou Box-Cox) (Peltier et al., 1998). Des tests d'ANOVA suivis de tests de Tukey ont été utilisés pour déceler les différences entre les moyennes multiples. Dans le cas de non-respect de la normalité ou de l'homogénéité des variances après transformation, des tests non paramétriques de Wilcoxon par paire ont été utilisés. À cause du nombre limité des poissons, l'analyse des rétinoïdes dans les tissus a été faite sans prendre en compte le sexe comme variable explicative. Le degré de liaison entre les concentrations métalliques rénales et les paramètres biométriques, biochimiques et moléculaires a été analysé à l'aide du test non paramétrique de corrélation de rang de Spearman. Un seuil de confiance de 0,05 a été utilisé dans chacun des tests.

3. RÉSULTATS

3.1. Accumulation rénale de métaux chez les perchaudes

Que ce soit au printemps ou en automne, les concentrations rénales en Cd reflétaient clairement le gradient inter-lac de contamination (Fig. 2A). Un facteur de 60 a été

observé entre les concentrations en Cd rénal des poissons provenant du lac le plus propre et celui du lac le plus contaminé à l'échantillonnage du printemps, alors qu'en automne ce facteur était de 32. Au printemps, les concentrations en Cd tissulaire étaient plus faibles dans les poissons des lacs « métalliquement propres » que dans ceux des lacs pollués. Par contre en automne, la différence était perceptible seulement entre le lac Hélène (le plus propre) et le lac Marlon (le plus pollué) (Fig. 2A). Aucune différence dans l'accumulation du Cd rénal n'a été observée entre les deux saisons chez les perchaudes capturées dans le lac Hélène.

Comparativement au lac Opasatica, les concentrations rénales en Cu étaient plus élevées dans les reins des poissons échantillonnés dans les autres lacs au printemps. (Fig. 2 B). Aucune différence dans l'accumulation du Cu n'a été observée dans le rein des poissons capturés en automne. Par contre les concentrations rénales en Cu varient fortement entre les deux saisons avec des valeurs plus fortes au printemps sauf dans le lac Opasatica.

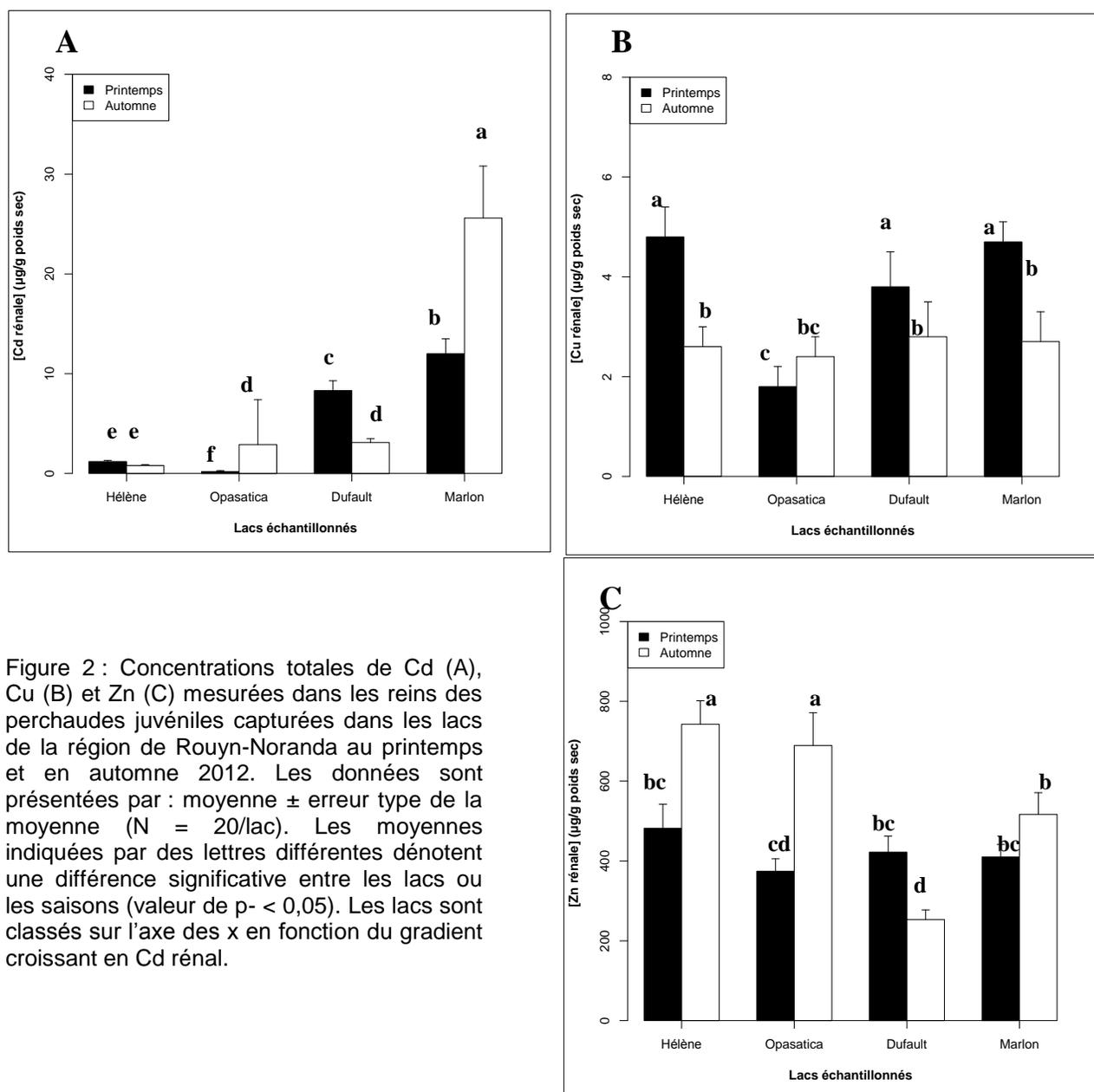


Figure 2 : Concentrations totales de Cd (A), Cu (B) et Zn (C) mesurées dans les reins des perchaudes juvéniles capturées dans les lacs de la région de Rouyn-Noranda au printemps et en automne 2012. Les données sont présentées par : moyenne \pm erreur type de la moyenne (N = 20/lac). Les moyennes indiquées par des lettres différentes dénotent une différence significative entre les lacs ou les saisons (valeur de $p < 0,05$). Les lacs sont classés sur l'axe des x en fonction du gradient croissant en Cd rénal.

Contrairement au Cd et au Cu, aucune différence dans l'accumulation du Zn rénal n'a été observée chez les poissons capturés au printemps, quel que soit le lac analysé.

Par contre en automne on assiste à une baisse de presque deux fois dans la concentration du Zn rénal entre les poissons des lacs propres et ceux des lacs contaminés (Fig. 2C). Un effet saison a été aussi observé dans l'accumulation du Zn

chez les perchaudes. En effet, les concentrations rénales de Zn varient fortement entre les deux saisons dans les lacs propres avec des valeurs plus fortes en automne. Par contre ces concentrations en Zn rénal étaient élevées chez les poissons échantillonnés dans le lac Dufault au printemps (Fig. 2C).

3.2. Impacts des métaux sur les paramètres biométriques analysés

L'indice d'embonpoint relatif (Kn) des poissons issus du lac Marlon était le plus élevé de tous les lacs aux deux saisons d'échantillonnages, sauf chez les poissons issus du lac Opasatica en automne (Tableau 2). Par contre les poissons du lac Dufault ont montré un Kn le plus faible aux deux saisons, beaucoup plus faible au printemps qu'en automne. Un effet saison a été aussi observé dans l'indice d'embonpoint des perchaudes échantillonnées dans les autres lacs sauf dans le lac Marlon. En effet les poissons échantillonnés au printemps présentaient un Kn faible comparativement à ceux pêchés en automne (Tableau 2). L'indice d'embonpoint présente un degré de liaison significatif avec les concentrations tissulaires de certains métaux selon que l'échantillonnage a eu lieu au printemps ou en automne. Ainsi, au printemps, le Kn présente une corrélation positive avec les concentrations du Cu rénal ($\rho = 0,2384$; $p = 0,0293$). Par contre, en automne une relation significative et positive avec le Cd rénal ($\rho = 0,2495$; $p = 0,0192$), le Zn rénal ($\rho = 0,4109$; $p = 0,0002$), mais pas le Cu rénal a été notée avec Kn. Lorsque les données provenant des deux saisons étaient assemblées, l'indice d'embonpoint relatif montrait une corrélation positive beaucoup plus faible entre le Kn et le Cd rénal ($\rho = 0,1890$; $p = 0,0018$) et le Zn rénal ($\rho = 0,2237$; $p = 0,0046$).

Tableau 2 : Paramètres biométriques mesurés (moy. \pm ET)[§] chez des perchaudes échantillonnées au printemps et en automne 2012 dans la région de Rouyn-Noranda (N = 20/lac). Les lettres différentes dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les lacs ou les saisons (valeur de $p < 0,05$).

Lacs	Kn [♣]	Masse cæca pyloriques (mg)	HSI [♠]
Printemps			
Hélène	0,66 \pm 0,01 ^{bc}	8,13 \pm 0,66 ^{ab}	1,41 \pm 0,10 ^{abc}
Opasatica	0,62 \pm 0,01 ^{cd}	8,10 \pm 0,64 ^{ab}	1,56 \pm 0,20 ^{ab}
Dufault	0,59 \pm 0,01 ^d	10,35 \pm 0,98 ^a	1,65 \pm 0,10 ^a
Marlon	0,73 \pm 0,01 ^a	9,65 \pm 0,96 ^a	1,44 \pm 0,11 ^{abc}
Automne			
Hélène	0,69 \pm 0,01 ^{ab}	4,88 \pm 0,30 ^c	1,18 \pm 0,06 ^{bc}
Opasatica	0,70 \pm 0,01 ^{ab}	5,01 \pm 0,31 ^c	1,00 \pm 0,05 ^c
Dufault	0,65 \pm 0,01 ^{bc}	6,60 \pm 0,76 ^{bc}	1,63 \pm 0,10 ^{ab}
Marlon	0,70 \pm 0,01 ^{ab}	4,64 \pm 0,26 ^c	1,18 \pm 0,07 ^{bc}

§ Moyenne \pm erreur type à la moyenne

♣ Indice d'embonpoint relatif

♠ Indice hépatosomatique

Aucune différence intra-saison dans la masse corrigée des cæca pyloriques n'a été notée entre les lacs, sauf dans le lac Dufault où les poissons provenant de ce milieu avaient la masse de cæca pylorique la plus lourde en automne (Tableau 2). Par contre, une différence inter-saison a été observée dans la masse des cæca pyloriques. En effet, la masse corrigée des cæca pyloriques des perchaudes était plus importante au printemps qu'en automne, sauf chez les poissons du lac Dufault, où l'inverse a été observé (Tableau 2). Une corrélation significative, mais négative entre la masse des cæca pyloriques et la concentration en Zn (et non en Cd et en Cu) rénal a été observée et le degré de liaison entre ces deux entités était fonction de la saison d'échantillonnage. Ainsi, au printemps une faible corrélation négative ($\rho = -0,2691$; $p =$

0,0165) a été enregistrée alors qu'en automne cette corrélation était beaucoup plus forte ($\rho = -0,8353$; $p < 0,0001$). Aussi, une forte relation négative ($\rho = -0,6512$; $p < 0,0001$) entre ces paramètres a été enregistrée lorsque les données provenant des deux saisons étaient assemblées.

L'indice hépatosomatique des poissons échantillonnés dans le lac Dufault était le plus élevé aux deux saisons, comparativement aux autres lacs (Tableau 2). Au printemps l'IHS était pareil dans tous les lacs. Par contre, en automne on a noté que les poissons du lac Opasatica avaient un IHS significativement inférieur à celui des poissons du lac Dufault (Tableau 2). Une variation saisonnière dans l'IHS a été observée seulement dans le lac Opasatica où les poissons capturés dans ce lac présentaient un IHS plus important au printemps qu'en automne (Tableau 2). En combinant les données de tous les lacs, par saison, l'IHS a montré une relation négative seulement avec le Zn rénal ($\rho = -0,3016$; $p = 0,0090$) et uniquement en automne. Par contre, en combinant les données des deux saisons, la liaison entre l'IHS et le Zn rénal restait significative, mais plus faible ($\rho = -0,2588$; $p = 0,0013$).

3.3. Impacts des métaux sur le métabolisme des rétinoïdes

Les formes all-trans-3,4- didéhydrorétinoïdes (vitamine A₂) ont constitué les molécules prédominantes de vitamine A analysées dans le foie et dans le muscle des perchaudes. Dans le foie les rétinoïdes étaient principalement stockés sous la forme de déhydrorétinyl palmitate et accessoirement sous les formes de déhydrorétinyl myristate, déhydrorétinyl stéarate et d'autres formes non identifiées.

Au cours d'une même saison, une tendance à l'augmentation des concentrations de déhydrorétinol (dROH), de déhydrorétinyl palmitate et d'esters totaux de vitamine A a

été notée dans le foie des poissons issus des lacs contaminés par comparaison à ceux issus des lacs propres (Tableau 3).

Tableau 3: Concentrations tissulaires (moy. \pm ET)[§] de déhydrotétinol, déhydrorétinyl palmitate d'esters totaux de vitamine A et de déhydrorétinyl stéarate exprimées en nmol g⁻¹ poids frais de tissu chez les perchaudes échantillonnées au printemps et automne 2012. Les lettres différentes dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les lacs ou les saisons (valeur de p < 0,05).

Lacs	Rétinoïdes hépatiques			Rétinoïdes musculaires	
	Déhydrorétinol	Déhydrorétinyl palmitate	Esters totaux de vitamine A	Déhydrorétinol	Déhydrorétinyl stéarate [▲]
Printemps					
Hélène	16,0 \pm 5,0 ^b	23,0 \pm 6,0 ^d	40,0 \pm 10,0 ^d	0,160 \pm 0,030 ^a	0,200 \pm 0,010 ^a
Opasatica	24,3 \pm 7,8 ^b	79,0 \pm 17,5 ^c	125,0 \pm 28,3 ^c	0,093 \pm 0,005 ^b	0,220 \pm 0,010 ^a
Dufault	45,3 \pm 13,2 ^a	103,4 \pm 31,4 ^b	175,8 \pm 55,6 ^b	0,150 \pm 0,010 ^a	0,170 \pm 0,010 ^b
Marlon	50,4 \pm 11,2 ^a	197,2 \pm 28,1 ^a	342,3 \pm 52,3 ^a	0,160 \pm 0,020 ^a	0,170 \pm 0,010 ^b
Automne					
Hélène	1,6 \pm 0,2 ^d	26,2 \pm 10,1 ^d	41,1 \pm 15,3 ^d	0,077 \pm 0,007 ^b	0,130 \pm 0,006 ^c
Opasatica	1,2 \pm 0,5 ^d	30,0 \pm 11,4 ^d	44,0 \pm 16,3 ^d	0,080 \pm 0,007 ^b	0,120 \pm 0,006 ^c
Dufault	6,2 \pm 1,6 ^c	69,5 \pm 24,4 ^c	110,0 \pm 41,1 ^c	0,160 \pm 0,020 ^a	0,150 \pm 0,010 ^b
Marlon	2,3 \pm 1,2 ^d	41,0 \pm 13,1 ^d	66,2 \pm 21,2 ^d	0,100 \pm 0,010 ^b	0,130 \pm 0,010 ^c

§ Moyenne \pm erreur type

▲ Seule forme de rétinoïdes estérifiés analysés dans le muscle des perchaudes

Au printemps, ces concentrations de métabolites étaient respectivement 3,2, 8,6 et 8,6 fois plus élevées dans le foie des poissons du lac Marlon (lac contaminé) que ceux du lac Hélène (lac de référence). En automne les différences étaient de 5,2, 2,6 et 2,7 respectivement. De plus, une très forte variation saisonnière dans les concentrations de ces métabolites a été observée entre les deux saisons, avec des valeurs plus élevées au printemps sauf dans le lac Hélène pour les formes estérifiées (Tableau 3). Au printemps, toutes les formes de rétinoïdes analysés étaient positivement corrélées avec

les concentrations en Cd rénal des perchaudes (Tableau 4). En combinant les données des deux saisons, les corrélations restaient significatives entre le Cd rénal et les formes estérifiées d'une part et entre le Cu rénal et la forme libre de rétinoïdes hépatiques d'autre part (Tableau 4).

Au printemps, les poissons capturés dans les lacs les plus pollués avaient des concentrations en dROH musculaire élevées., Par contre, en automne cette augmentation dans les concentrations de dROH musculaire était observé seulement chez les poissons issus du lac Dufault (Tableau 3). De plus, une certaine variation saisonnière dans les concentrations en dROH musculaire a été observée entre les deux saisons, avec des valeurs plus élevées au printemps sauf dans le lac Dufault (Tableau 3). Contrairement à l'extrait hépatique, l'extrait musculaire a révélé que le déhydrorétinyl stéarate était la seule forme d'esters majeure présente dans le muscle des perchaudes. Au printemps, une diminution des concentrations en déhydrorétinyl stéarate musculaire a été notée chez des perchaudes échantillonnées dans les lacs contaminés aux métaux comparativement à celles provenant des lacs de référence (Tableau 3). Par contre en automne on a observé une augmentation de cette concentration seulement chez les poissons provenant du lac Dufault. De même, une variation saisonnière dans les concentrations en déhydrorétinyl stéarate musculaire a été observée avec des valeurs plus élevées chez les poissons échantillonnés au printemps (Tableau 3).

Tableau 4: Corrélations de Spearman (ρ) et leurs probabilités (p) entre les concentrations rénales en métaux et certains paramètres du métabolisme des rétinoïdes tissulaires des perchaudes juvéniles analysés au printemps et automne 2012 dans la région minière de Rouyn-Noranda, Québec, Canada (N = 48).

Tissus	Paramètres	Printemps		Automne				Saisons combinées					
		Cd		Cu		Zn		Cd		Cu		Zn	
		ρ	p	ρ	p	ρ	p	ρ	p	ρ	p	ρ	p
	[Déhydrorétinol]	0,4659	0,0210	/	/	/	/	/	/	0,2495	0,0091	/	/
Foie	[Déhydrorétyl palmitate]	0,6417	0,0007	/	/	/	/	0,3697	0,0100	/	/	/	/
	[Esters totaux de vitamine A]	0,6374	0,0008	/	/	/	/	0,3778	0,0100	/	/	/	/
	Pourcentage de déhydrorétinol	-0,4112	0,0500	0,5758	0,0040	/	/	/	/	0,4084	0,0070	/	/
	[Déhydrorétinol]	/	/	/	/	-0,7461	<0,0001	/	/	/	/	-0,5259	0,0001
Muscle	[Déhydrorétyl stéarate]	-0,5449	0,0060	/	/	-0,5279	0,0080	-0,2699	0,0500	/	/	-0,4026	0,0046
	Pourcentage de déhydrorétinol	/	/	/	/	-0,5881	0,0025	0,3992	0,0060	/	/	/	/

/ : Corrélation non significative à $p < 0,05$

Les métabolites de rétinoïdes analysés dans le muscle des perchaudes présentent un degré de liaison significatif avec les concentrations tissulaires de certains métaux selon que l'échantillonnage a eu lieu au printemps ou en automne. Ainsi, au printemps une forte relation négative a été obtenue entre les concentrations de déhydrorétinyl stéarate et le Cd rénal ($\rho = -0,5449$; $p = 0,0060$), alors qu'en automne, les concentrations de Zn rénal étaient fortement corrélées avec les concentrations de dROH ($\rho = -0,7461$; $p < 0,0001$) et de déhydrorétinyl stéarate ($\rho = -0,5279$; $p = 0,0080$). Lorsque les données des deux saisons étaient mises ensemble les corrélations avec le Cd et le Zn restaient négatives, mais plus faibles (Tableau 4).

Au cours des deux saisons d'échantillonnage, bien que les concentrations de déhydrorétinoïdes hépatiques ont augmenté chez les poissons vivant dans les lacs contaminés, le pourcentage de dROH libre a relativement diminué dans le foie des poissons de ces lacs (Fig. 3A).

De même, une forte variation saisonnière dans les pourcentages de dROH hépatique a été observée entre les deux saisons, avec des pourcentages d'environ 4 fois plus élevés au printemps qu'en automne (Fig. 3A).

Une corrélation négative entre le pourcentage de dROH hépatique et les concentrations en Cd rénal des poissons a été enregistrée au printemps ($\rho = -0,4112$; $p = 0,0500$). Par contre en automne, non seulement cette relation était positive, mais elle l'était également avec les concentrations en Cu rénal ($\rho = 0,5758$; $p = 0,0040$). En combinant les données des deux saisons, la corrélation entre le pourcentage de dROH libre et la Cu rénal était positive, mais faible (Tableau 4).

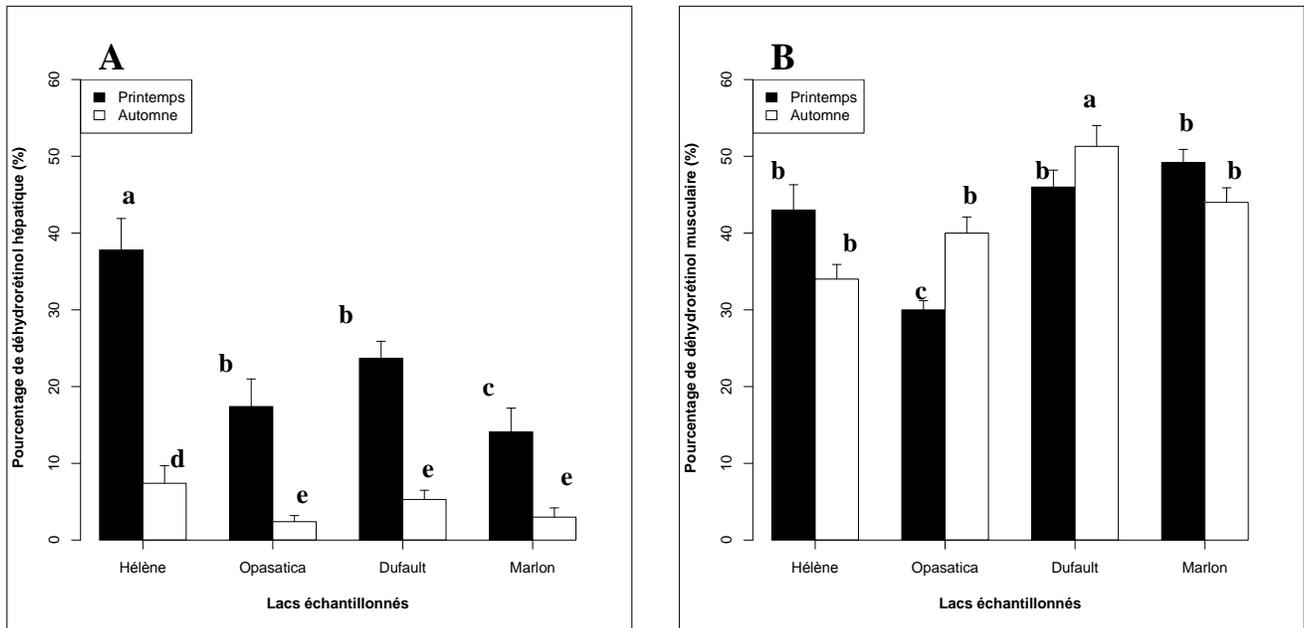


Figure 3 : Pourcentage de déhydrorétinol hépatique (A) et musculaire (B) des perchaudes juvéniles capturées dans les lacs de la région de Rouyn-Noranda au printemps et en automne 2012. Les données sont présentées par : moyenne \pm erreur type de la moyenne ($6 \leq N \leq 8$ /lac). Les moyennes indiquées par des lettres différentes dénotent une différence significative entre les lacs ou les saisons (valeur de $p < 0,05$).

Contrairement au foie, le pourcentage de dROH libre tendait à augmenter dans le muscle des poissons issus des lacs contaminés par rapport à ceux provenant des lacs de référence (Fig. 3B). Une variation saisonnière dans les pourcentages de dROH musculaire a été notée, avec des valeurs plus élevées en automne dans les lacs Dufault et Opasatica (Fig. 3B). Une corrélation forte et négative entre le pourcentage de dROH musculaire et les concentrations en Zn rénal des poissons a été enregistrée en automne ($\rho = -0,5881$; $p = 0,0025$). Par contre en combinant les données des deux saisons, une corrélation positive entre le pourcentage de dROH libre dans le muscle et le Cd rénal a été observée (Tableau 4).

Au printemps le niveau de transcription de la *rdh-2* hépatique était plus élevé chez les poissons provenant des lacs contaminés que chez ceux capturés dans les lacs de

référence (Fig. 4).

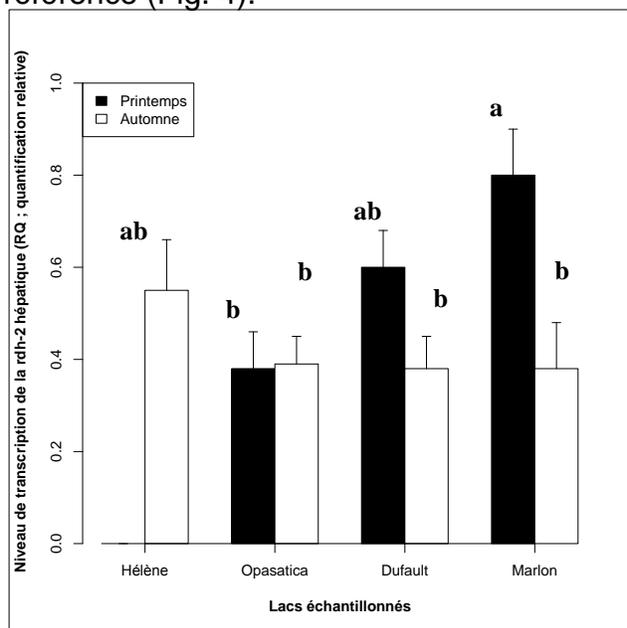


Figure 4 : Niveau de transcription de la *rdh-2* mesuré dans le foie des perchaudes juvéniles capturées dans les lacs de la région de Rouyn-Noranda au printemps et en automne 2012. Les données sont présentées par : moyenne \pm erreur type de la moyenne (N = 9 /lac). Les moyennes indiquées par des lettres différentes dénotent une différence significative entre les lacs ou les saisons (valeur de $p < 0,05$).

Par contre en automne aucune différence significative dans le niveau de transcription de la *rdh-2* hépatique des poissons entre les lacs n'a été relevée. Une variation saisonnière dans le niveau de transcription de ce gène a été observée seulement dans les lacs contaminés, avec des valeurs plus élevées au printemps surtout dans le lac Marlon (environ 2 fois ; Fig. 4).

3.4. Impacts des métaux sur la réponse au stress oxydant

3.4.1. Foie

Les analyses de l'impact des métaux sur les réponses au stress oxydant dans le foie ont été déterminées à la fois en évaluant leurs effets sur le niveau de transcription des gènes et sur les activités des enzymes correspondantes.

3.4.1.1. Catalase

Il n'y a pas eu de variation saisonnière dans le niveau de transcription de la *cat* hépatique (Tableau 5). Bien qu'il existe une légère hausse du niveau de transcription de

ce gène dans le foie des perchaudes capturées dans les lacs contaminés, les poissons provenant des lacs "propres" et des lacs contaminés en métaux montrent un niveau de transcription de la *cat* statistiquement similaire variant de 0,43 à 0,68 au printemps contre 0,38 à 0,52 en automne (Tableau 5). Au printemps, l'activité de la CAT hépatique était plus de 2 fois supérieures dans les poissons issus du lac Du comparativement à ceux provenant d'autres lacs. Par contre en automne cette activité était identique chez les poissons échantillonnés dans les lacs, sauf dans le lac Hélène où les poissons présentaient une activité de la catalase faible (Tableau 5). Une variation temporelle dans l'activité de la CAT a été notée seulement dans le lac Dufault. En effet cette activité était quasiment 2 fois supérieure au printemps qu'en automne (Tableau 5). Uniquement en automne, une forte corrélation négative ($\rho = -0,5548$; $p = 0,0049$) entre l'activité de la CAT hépatique et les concentrations en Zn rénal a été observée. Lorsque les données des deux saisons étaient combinées, on a enregistré une relation plus faible entre les deux paramètres (Tableau 6).

3.4.1.2. Superoxyde dismutase

Les poissons sélectionnés dans les lacs durant les 2 saisons ont montré un niveau de transcription de la *Cu/Zn sod-1* hépatique similaire sauf chez les individus échantillonnés dans le lac Ma, où le niveau de transcription de ce gène était plus élevé au printemps qu'en automne (Tableau 5). Aucune variation temporelle n'a été observée dans l'activité de la SOD hépatique des perchaudes. Cependant une variation inter-lac au cours de la même saison a été observée.

Tableau 5: Niveau de transcription des gènes et activités enzymatiques (moy. ± ET)[§] dans le foie des perchaudes échantillonnées au printemps et automne 2012. Les lettres différentes dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les lacs ou les saisons (valeur de p < 0,05).

Lacs	Niveau de transcription des gènes [‡]				Activités enzymatiques			
	<i>cat</i>	<i>Cu/Zn sod-1</i>	<i>g6pdh</i>	<i>mgst-3</i>	CAT [★]	SOD [★]	G6PDH [✳]	GST [✳]
Printemps								
Opasatica	0,43 ± 0,08 ^a	0,64 ± 0,15 ^b	0,19 ± 0,04 ^c	0,67 ± 0,14 ^a	0,24 ± 0,05 ^b	51,4 ± 9,4 ^a	0,016 ± 0,004 ^c	0,035 ± 0,001 ^b
Dufault	0,44 ± 0,10 ^a	0,54 ± 0,10 ^b	0,55 ± 0,08 ^b	0,52 ± 0,12 ^a	0,60 ± 0,11 ^a	33,5 ± 3,7 ^c	0,054 ± 0,005 ^a	0,030 ± 0,001 ^b
Marlon	0,68 ± 0,15 ^a	0,88 ± 0,14 ^a	1,26 ± 0,21 ^{ab}	0,99 ± 0,14 ^a	0,26 ± 0,02 ^b	35,7 ± 4,2 ^{bc}	0,047 ± 0,007 ^{ab}	0,037 ± 0,003 ^{ab}
Automne								
Hélène	0,38 ± 0,07 ^a	0,55 ± 0,08 ^b	1,50 ± 0,30 ^a	0,60 ± 0,12 ^a	0,12 ± 0,03 ^c	45,3 ± 4,6 ^{abc}	0,056 ± 0,007 ^a	0,049 ± 0,008 ^a
Opasatica	0,44 ± 0,08 ^a	0,57 ± 0,07 ^b	1,21 ± 0,16 ^{ab}	0,63 ± 0,11 ^a	0,21 ± 0,02 ^b	49,3 ± 2,9 ^{ab}	0,039 ± 0,005 ^b	0,058 ± 0,005 ^a
Dufault	0,52 ± 0,12 ^a	0,49 ± 0,08 ^b	0,59 ± 0,11 ^b	0,85 ± 0,20 ^a	0,28 ± 0,02 ^b	34,1 ± 2,9 ^c	0,037 ± 0,003 ^b	0,045 ± 0,003 ^a
Marlon	0,51 ± 0,13 ^a	0,54 ± 0,10 ^b	0,93 ± 0,14 ^b	0,83 ± 0,16 ^a	0,21 ± 0,02 ^b	43,8 ± 4,1 ^{abc}	0,035 ± 0,003 ^b	0,045 ± 0,005 ^a

§ Moyenne ± erreur type

★ Exprimée en U mg/protéine

✳ Exprimée en U g/protéine

‡ Exprimée en quantification relative (RQ)

Tableau 6: Corrélations de Spearman (ρ) et leurs probabilités (p) entre les concentrations rénales en métaux et la réponse de certains paramètres du stress oxydant dans le foie et le muscle des perchaudes juvéniles analysées au printemps et automne 2012 dans la région minière de Rouyn-Noranda, Québec, Canada ($42 \leq N \leq 72$).

Tissus	Paramètres	Printemps				Automne				Saisons combinées					
		Cd		Cu		Cd		Cu		Zn		Cu		Zn	
		ρ	p	ρ	p	ρ	p	ρ	p	ρ	p	ρ	p	ρ	p
	<i>g6pdh</i> ‡	0,6502	0,0002	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Foie	G6PDH¶	/	/	/	/	/	/	0,4204	0,0166	/	/	0,3169	0,0184	/	/
	GST¶	/	/	0,5253	0,0252	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	CAT¶	/	/	/	/	/	/	/	/	-0,5548	0,0049	/	/	-0,4671	0,0021
Muscle	SOD¶	/	/	/	/	-0,5687	0,0037	/	/	0,4374	0,0326	/	/	/	/

/ : Corrélation non significative à $p < 0,05$

‡ : Niveau de transcription du gène

¶ : Activité de l'enzyme

Au printemps, une baisse dans l'activité de la SOD hépatique chez les poissons issus des lacs contaminés en métaux comparativement à ceux provenant du lac de référence a été notée (Tableau 5). De même en automne, cette baisse dans l'activité de la SOD fut aussi observée chez les poissons capturés seulement dans le lac Dufault (Tableau 5).

3.4.1.3. Glucose-6-phosphate déshydrogénase

Dépendamment de la saison, le niveau de transcription de la *g6pdh* hépatique augmente dans les poissons capturés dans les lacs contaminés au printemps et diminue en automne. Cependant il n'existe pas de variation inter saisonnière dans le niveau de transcription de ce gène sauf dans le lac Opasatica, où l'expression de ce gène était plus de 6 fois élevée en automne qu'au printemps (Tableau 5). L'activité de la G6PDH hépatique augmente dans les poissons issus des lacs contaminés par rapport à ceux des lacs propres au printemps. Par contre, l'activité de cette enzyme diminue dans les poissons capturés dans les lacs contaminés comparativement à ceux des lacs propres en automne. Une variation inter saison dans l'activité de la G6PDH a été notée dans le foie des poissons capturés dans les lacs contaminés avec une relative forte activité au printemps (Tableau 5). Une forte corrélation positive entre le niveau de transcription de la *g6pdh* hépatique et les concentrations en Cd rénal a été notée seulement au printemps ($\rho = 0,6502$; $p = 0,0002$). Par contre l'activité de l'enzyme correspondante (G6PDH) corrélait positivement avec les concentrations de Cu rénal en automne et lorsque les données des deux saisons étaient combinées (Tableau 6).

3.4.1.4. Glutathione-S-transférase

Bien qu'il existe une légère hausse non significative du niveau de transcription de la *mgst-3* dans le foie des perchaudes capturées dans les lacs contaminés comparativement à celles obtenues dans les lacs de référence, il n'y a pas eu de variation saisonnière dans le niveau de transcription de ce gène (Tableau 5). De plus, d'un lac à l'autre, il n'y a pas eu de variation dans l'activité de la GST hépatique au cours de la même saison d'échantillonnage. Cependant une augmentation dans l'activité de cette enzyme était observée chez les poissons capturés en automne comparé au printemps (Tableau 5). L'activité de la GST hépatique printanière a montré une liaison forte et positive avec les concentrations de Cu accumulées dans les reins ($\rho = 0,5253$; $p = 0,0252$). Aucune corrélation significative n'a été enregistrée en automne ou lorsque les données des deux saisons étaient mises ensemble (Tableau 6).

3.4.2. Muscle

Contrairement au foie, les analyses de l'impact des métaux sur les réponses au stress oxydant dans le muscle ont été déterminées uniquement en se basant sur les activités enzymatiques.

Par comparaison au lac Op l'activité de la CAT a augmenté chez les poissons des lacs contaminés au printemps, alors qu'en automne il n'y pas eu de variation significative dans l'activité de la CAT musculaire (Tableau 7). Une variation inter saison de cette activité a été notée dans le lac Ma avec des valeurs plus élevées au printemps qu'en automne. Cependant, chez les perchaudes capturées dans le lac Opasatica, l'activité de la CAT musculaire était 4 fois moins élevée au printemps qu'en automne (Tableau 7).

Les poissons sélectionnés au printemps n'ont montré aucune différence dans l'activité de la SOD musculaire entre les lacs. Par contre en automne, on a noté une diminution dans l'activité de cette enzyme chez les poissons provenant des lacs contaminés par rapport à ceux issus des lacs propres. Une variation temporelle dans l'activité de cet enzyme a été observée seulement dans les individus échantillonnés dans le lac Hélène. Cette activité était presque 2 fois plus élevée en automne qu'au printemps (Tableau 7). L'activité de la GST musculaire des poissons échantillonnés en automne présente une corrélation négative avec les concentrations de Cu rénal ($\rho = -0,5687$; $p = 0,0037$), alors que les concentrations de Zn rénal lui sont positivement corrélées ($\rho = 0,4374$; $p = 0,0326$). Aucune corrélation significative n'a été enregistrée au printemps ou lorsque les données des deux saisons étaient mises ensemble (Tableau 6).

Tableau 7: Activités enzymatiques (moy. \pm ET)[§] dans le muscle des perchaudes échantillonnées au printemps et en automne 2012. Les lettres différentes dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les lacs ou les saisons (valeur de $p < 0,05$).

Lacs	Activités enzymatiques		
	CAT★	SOD★	GST✱
Printemps			
Hélène	0,0033 \pm 0,0004 ^{ab}	4,15 \pm 0,17 ^b	0,013 \pm 0,001 ^c
Opasatica	0,0007 \pm 0,0001 ^c	3,58 \pm 0,64 ^b	0,028 \pm 0,005 ^a
Dufault	0,0023 \pm 0,0002 ^{bc}	5,80 \pm 1,02 ^{ab}	0,020 \pm 0,004 ^b
Marlon	0,0039 \pm 0,0005 ^a	6,57 \pm 1,36 ^{ab}	0,010 \pm 0,002 ^c
Automne			
Hélène	0,0021 \pm 0,0004 ^{bc}	7,86 \pm 0,78 ^a	0,012 \pm 0,001 ^c
Opasatica	0,0030 \pm 0,0006 ^{ab}	5,59 \pm 0,89 ^{ab}	0,013 \pm 0,001 ^c
Dufault	0,0033 \pm 0,0004 ^{ab}	3,94 \pm 0,32 ^b	0,015 \pm 0,001 ^{bc}
Marlon	0,0020 \pm 0,0003 ^{bc}	3,76 \pm 0,65 ^b	0,015 \pm 0,001 ^{bc}

§ Moyenne \pm erreur type

★ Exprimée en U mg/protéine

✱ Exprimée en U g/protéine

Au printemps il semble avoir une baisse dans l'activité de la GST musculaire chez les poissons issus des lacs contaminés en métaux comparativement à ceux capturés dans le lac Opasatica, bien que cette activité soit aussi faible dans le lac Hélène. Par contre il n'y a pas eu de variation inter lac dans l'activité de cette enzyme dans le muscle des perchaudes échantillonnées en automne. Une variation saisonnière dans l'activité de cet enzyme a été observée uniquement chez les poissons capturés dans le lac Opasatica avec une activité 2 fois plus élevée au printemps qu'en automne (Tableau 7).

4. DISCUSSION

Avec le stress oxydant comme paramètre toxicologique, nous voulions comprendre si un changement temporel dans l'accumulation tissulaire des métaux affecte aux niveaux moléculaires et biochimiques le métabolisme des rétinoïdes et la réponse adaptative au stress oxydant.

4.1. Différences temporelles dans l'accumulation rénale des métaux chez les perchaudes

Nous avons utilisé la concentration rénale métallique comme étant une indication de l'exposition des perchaudes aux métaux. Plutôt que dans le foie, les concentrations des métaux dans les tissus ont été mesurées dans les reins parce que ce tissu a été réservé pour d'autres analyses. Par ailleurs certaines études ont montré qu'il existe une corrélation entre les concentrations des métaux dans le rein et dans le foie chez les perchaudes sauvages (Couture et al., 2008a; Kraemer et al., 2005a, b). Des valeurs seuils des concentrations rénales des métaux mesurées en µg/g de poids sec (19,9 pour le Cd et 20,2 pour le Cu) permettant de discriminer des poissons ayant des

concentrations en métaux tissulaires « anormalement élevées » de ceux possédant les concentrations « normales », ont été proposées (Couture and Pyle, 2008b). La grande majorité des concentrations métalliques mesurées dans nos poissons se situe en deçà de ces seuils, sauf pour les concentrations de Cd chez les poissons échantillonnés en automne dans le lac Ma (50% de dépassement de ce seuil ; N = 20). Ce résultat quoique surprenant particulièrement pour les lacs contaminés peut s'expliquer par une différence dans l'âge et/ou la taille des poissons, puisque la corrélation entre ces deux paramètres (surtout la taille) et la bioaccumulation des métaux (notamment le Cd) n'est pas clairement établie chez la perchaude (Couture and Pyle, 2008b). Tout compte fait il faut interpréter ces valeurs seuils avec beaucoup de précaution en déterminant par exemple si les poissons à comparer sont du même âge ou bien sont d'une classe de taille identique. S'il est attesté que deux voies d'internalisation des métaux chez les perchaudes coexistent en milieu naturel (Kraemer et al., 2008), il est aussi avéré que leur régime alimentaire dépend beaucoup de leur stade de développement et donc de leur croissance (Rasmussen et al., 2008; Sherwood et al., 2000). Au stade juvénile, les perchaudes vont s'alimenter aux zooplanctons alors qu'au stade adulte elles vont préférer les invertébrés benthiques (Lott et al., 1996; Rasmussen et al., 2008).

Un gradient de concentration en métaux rénaux a été observé chez les poissons des lacs échantillonnés. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans certains lacs de la même région, chez la même espèce pour les concentrations en Cd rénal avec un facteur 9 de différence entre le lac le plus propre et le plus contaminé (Couture et al., 2008a; Levesque et al., 2002a) et en Cd hépatique avec un facteur 18 (Bourret et al., 2008). L'observation selon laquelle un gradient moins évident a été observé pour le Cu

et le Zn serait liée au fait que ces éléments étant des métaux essentiels, ils seraient mieux régulés.

Une variation saisonnière dans la concentration des métaux contenus dans les reins des perchaudes a été observée. Lorsqu'on s'intéresse seulement aux lacs contaminés on constate que les poissons échantillonnés au printemps (fin mai) avaient une concentration en métaux (Cd, Cu et Zn) tissulaires supérieure à ceux capturés en automne (début septembre), sauf dans le lac Marlon où la concentration en Cd rénal était inférieure au printemps qu'en automne. Par contre dans les lacs propres on observe en général à une exception près (Cu dans le lac Hélène) une augmentation de la concentration des métaux en automne comparativement au printemps. Malgré l'absence des mesures des concentrations d'espèces ioniques (métaux) présentes dans l'eau des lacs, nos résultats suggèrent qu'il y aurait une variabilité inter-saison dans les concentrations métalliques et/ou dans la chimie de l'eau (Couture et al., 2008a). Cette hypothèse est en accord avec les résultats de Kraemer et al. (2006a), qui ont noté 2 à 3,5 fois plus de concentrations en Cd dissoute dans les lacs contaminés au printemps qu'en automne. Cependant aucune différence temporelle dans la concentration en carbone organique dissoute n'a été observée.

Étant donné que deux voies de prise en charge des métaux par les poissons coexistent en milieu naturel (Kraemer et al., 2008), un autre paramètre qui pourrait expliquer cette variation temporelle dans les concentrations rénales des métaux serait le taux d'ingestion alimentaire qui serait plus élevé au printemps qu'en automne et donc expliquerait une probable contamination *via* la diète. De plus, l'indice d'embonpoint relatif (Kn) qui donne une indication sur les activités alimentaires récentes des poissons

et sur l'accumulation des réserves énergétiques (Lambert and Dutil, 1997) n'était pas plus élevé au printemps qu'en automne dans ces lacs (Tableau 2). De plus le poids des cæca pyloriques, un autre indicateur de la consommation, était moins lourd chez les poissons capturés au printemps que chez ceux échantillonnés en automne dans le lac Dufault. Ce résultat laisse présager une prédominance de la contamination par l'eau que par la diète au printemps. La faible corrélation obtenue entre le Cu rénal et l'indice d'embonpoint relatif renforce cette hypothèse. Exceptionnellement on a noté une concentration en Cd rénal plus importante en automne qu'au printemps chez les perchaudes du lac Marlon; cependant le poids des cæca pyloriques des perchaudes de ce lac était aussi plus faibles en automne qu'au printemps ce qui tend à soutenir la prédominance d'une prise en charge du Cd *via* la voie directe par les poissons en automne. Une fois de plus la faible corrélation obtenue durant cette saison entre le Cd rénal et l'indice d'embonpoint relatif tend à appuyer cet argument. Ce résultat est en accord avec les travaux de Kraemer et al., (2006b) qui ont montré que, dans un lac ayant une concentration en Cd dissoute élevée, la prise en charge du Cd par l'eau chez les perchaudes juvéniles est plus importante que la prise en charge *via* l'alimentation (Kraemer et al., 2006b). Une étude menée dans deux régions minières au Canada incluant celle à l'étude a fait état d'une forte variation saisonnière des concentrations tissulaires en Cd et en Cu reflétant probablement un lien avec l'indice d'embonpoint et la croissance (Pyle et al., 2008b).

Une autre hypothèse qui expliquerait cette variation saisonnière est que la baisse de la concentration rénale des métaux dans les lacs contaminés en automne coïncide avec une corrélation négative entre l'IHS et les concentrations rénales de Zn des poissons.

Ce résultat suggère que la variation saisonnière dans les concentrations tissulaires en métaux chez les poissons provenant des lacs contaminés serait due à une dilution induite par la croissance.

4.2. Impact d'une fluctuation des concentrations métalliques sur le métabolisme des rétinoïdes tissulaires.

Les lacs de référence sont des bons témoins des observations obtenues dans les lacs contaminés. En effet, plusieurs études conduites dans cette région (Hontela et al., 1992 ; Hontela et al., 1995 ; Levesque et al., 2002 ; Pierron et al., 2011) ont rapporté des effets délétères des métaux sur les populations des perchaudes, en utilisant ces lacs comme des lacs témoins. Durant la même saison d'échantillonnage les concentrations hépatiques de dROH, du déhydrorétinyl palmitate et d'esters totaux de vitamine A étaient plus élevées chez les poissons issus des lacs contaminés par comparaison à ceux issus des lacs propres. Ce résultat n'est pas surprenant, puisque dans nos travaux récents sur l'exposition chronique en milieu naturel, nous avons observé que des perchaudes vivant dans les lacs contaminés au Cd avaient des concentrations hépatiques de dROH et de déhydroretinyl esters plus élevées que les poissons des lacs de référence, indiquant que l'augmentation de niveaux de vitamine A (antioxydant) pourrait servir à mieux lutter contre le stress oxydant engendré par la présence des métaux (Defo et al., 2012b). Par la même occasion nos résultats montrent une très forte variabilité saisonnière dans les concentrations de ces métabolites avec en général des valeurs plus élevées au printemps. La première raison de cette variabilité temporelle dans les concentrations des métabolites des rétinoïdes est que le stockage des esters de rétinoïdes et la libération du dROH hépatique chez

les poissons vivant dans les lacs contaminés seraient proportionnels à la concentration tissulaire en métaux (Defo et al., 2012b). La deuxième raison serait que, soit le type de proies ingérées par les perchaudes en automne serait pauvre en vitamine A ou en caroténoïdes (précurseurs de vitamine A), soit les proies seraient moins disponibles durant cette saison. La troisième hypothèse serait que, après la période de frai, les perchaudes vont activement consommer des aliments qui contiennent la vitamine A nécessaire pour leur croissance. Par contre, elles utiliseraient les rétinoïdes stockés dans leurs tissus pour la maturation des gonades en automne. Notre étude constitue la première investigation qui fait directement un lien entre les fluctuations temporelles en métaux tissulaires et le stockage des rétinoïdes dans le foie des poissons sauvages. De toute évidence une simplification de la chaîne alimentaire (Iles and Rasmussen, 2005b) couplée à un appauvrissement dans la diversité des proies des perchaudes (Kövecses et al., 2005) a été rapportée dans les lacs contaminés de la région de Rouyn-Noranda. En effet la qualité de proie disponible influencerait les concentrations de rétinoïdes ingérées et même les teneurs en rétinoïdes tissulaires puisque certains aliments sont plus riches en rétinoïdes ou β carotènes que d'autres (Garner et al., 2010b).

Bien que nous ayons établi dans la présente étude la preuve d'une augmentation de la concentration des métabolites rétinoïdiens dans le foie des poissons des lacs contaminés, une baisse du pourcentage de dROH hépatique beaucoup plus importante au printemps a été observée dans ces lacs. Ce résultat suggère une activité accrue au printemps qu'en automne dans le métabolisme des rétinoïdes et correspond très bien avec nos travaux précédents où nous avons aussi observé une diminution significative du pourcentage de dROH hépatique avec une augmentation des concentrations en Cd

rénal chez les perchaudes adultes capturées dans les mêmes lacs (Defo et al., 2012b). Les deux études mises ensemble suggèrent que les enzymes et/ou les protéines de liaison impliquées dans l'homéostasie des rétinoïdes sont inhibées par la présence des métaux. Ces résultats contrastent avec nos travaux de laboratoire où nous avons observé que le pourcentage de rétinol libre et les activités des enzymes impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes avaient augmenté dans le foie des perchaudes exposées au Cd pendant six semaines (Defo et al., 2014a). Non seulement la concentration d'exposition utilisée au laboratoire était dix fois supérieure à celle mesurée dans l'eau des lacs les plus contaminés de la région de Rouyn-Noranda, mais également d'autres facteurs confondants dans l'environnement naturel auraient contribué à diminuer les activités de ces enzymes chez les perchaudes sauvages. En réponse à la baisse dans les activités des enzymes impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes, nous avons observé une augmentation du niveau de transcription de la rétinol deshydrogénase-2 (*rdh-2*) dans le foie des perchaudes capturées au printemps, mais pas en automne, probablement dans le but de maintenir les concentrations en vitamine A à des niveaux proches des conditions normales (milieux propres). À la suite d'une investigation menée sur l'impact d'une contamination métallique sur le niveau de transcription des gènes chez les perchaudes, Pierron et al. (2011) ont observé une corrélation négative entre le niveau de transcription des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes et les concentrations en Cd hépatique chez les poissons chroniquement exposés aux métaux en milieu naturel. Bien que les perchaudes dans ces deux études ont été échantillonnées à une exception près dans les mêmes lacs et durant les mêmes saisons (printemps), les concentrations

hépatiques de métaux accumulés étaient au minimum deux fois supérieures dans l'étude de Pierron et al. (2011) que dans la présente étude. Ces résultats suggèrent que dans une exposition chronique à un mélange complexe de métaux en milieu naturel, le niveau de transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des rétinoïdes serait fonction des concentrations métalliques accumulées dans les tissus.

Selon les besoins physiologiques de la cellule, la vitamine A stockée dans le foie principalement sous sa forme estérifiée peut s'hydrolyser (Branchaud et al., 1995) et être transportée dans les tissus cibles sous forme libre (rétinol) en s'associant aux protéines de liaison spécifique du rétinol (Retinol Binding Proteins, RBP) et à la transthyrétine (TTR). Tout comme dans nos études récentes (Defo et al., 2014a), le déhydrorétinyl stéarate était la seule forme d'ester de rétinoïdes détectée dans le muscle. Comparativement au foie les concentrations de rétinoïdes étaient beaucoup plus faibles dans le muscle. La présence de concentrations élevées de dROH musculaire couplée à une baisse des concentrations du déhydrorétinyl stéarate chez les poissons issus des lacs contaminés par rapport à ceux des lacs propres traduirait une hydrolyse des formes estérifiées de rétinoïdes en forme libre (dROH) probablement en vue de mieux combattre le stress oxydant. Ce postulat se vérifie davantage avec le pourcentage de dROH musculaire élevé chez ces poissons. Une hausse du pourcentage de dROH musculaire a été obtenu chez les perchaudes exposées pendant six semaines au Cd à une concentration semblable à celle mesurée (0,8 µg/L) dans les eaux des lacs contaminés de la région de Rouyn-Noranda (Defo et al., 2014a).

4.3. Réponses des biomarqueurs du stress oxydant

4.3.1. Foie

Le foie est l'organe jouant un rôle de premier plan dans la lutte contre le stress oxydant induit par des polluants chimiques chez les poissons (Benedetti et al., 2007). Dans notre étude la réponse hépatique au stress oxydant est variable. Elle dépend de la saison d'échantillonnage et du biomarqueur analysé. L'augmentation de l'activité de la CAT hépatique, mais non précédée d'un changement dans le niveau de transcription de la *cat* durant les deux saisons chez les poissons vivant dans les lacs contaminés principalement dans le lac Dufault suggère qu'au moins au niveau catalytique, des dispositions sont prises pour protéger la cellule contre le stress oxydant. Une augmentation dans l'activité de la CAT hépatique a été obtenue chez des perchaudes exposées au Cd pendant six semaines au laboratoire, par contre ce résultat était précédé d'une hausse du niveau de transcription de ce gène (Defo et al., 2014a). Dans le système de défense antioxydante, la catalase apparaît comme étant l'une des premières enzymes à répondre à la présence d'un agent stressant (Serpil Mişe Yonar, 2013); une augmentation dans l'activité de cette enzyme participe à la neutralisation des ERO produites suite à une exposition aux métaux (Uren Webster et al., 2013).

Au printemps, le niveau de transcription de la *g6pdh* et de la *Cu/Zn sod* hépatique était élevé chez les poissons capturés dans les lacs contaminés par rapport à ceux des lacs propres. Si cette réponse a été suivie d'une forte activité de la G6PDH, un effet inverse a été observé dans l'activité de la SOD. Typiquement les réponses transcriptomiques devraient se traduire en des réponses biochimiques (Nikinmaa and Rytönen, 2011). Les réactions synchrones obtenues dans les réponses moléculaires et biochimiques de la G6PDH traduisent un besoin de mieux lutter contre le stress oxydant causé par la présence des métaux. Ce résultat suggère que dans un environnement contaminé par

un cocktail de métaux, la régulation de la voie métabolique de la G6PDH se ferait à deux niveaux d'organisation biologique. L'augmentation dans le niveau de transcription de la SOD viserait à maintenir le pool d'enzymes qui seraient impliquées activement dans la réduction des ERO dans la cellule hépatique. Contrairement au printemps, les niveaux de transcription de la *Cu/Zn sod* et de la *g6pdh* hépatique ont diminué chez les poissons échantillonnés en automne dans les lacs contaminés par comparaison à ceux des lacs propres. Bien que non significative pour la SOD, ces réponses étaient suivies d'une baisse dans l'activité des enzymes correspondantes. Ici encore nous obtenons une réaction synchrone au niveau moléculaire et biochimique, traduisant une régulation à deux niveaux d'organisation biologique pour mieux juguler le stress oxydant induit par les métaux. Une faible activité de la G6PDH a été rapportée chez des perchaudes échantillonnées en été dans certains lacs contaminés en métaux de la région de Rouyn-Noranda. Par contre aucune différence dans ce paramètre n'avait été signalée lorsque l'échantillonnage avait lieu en automne. Cependant, comparativement à l'été, l'activité de la G6PDH avait diminué en automne (Levesque et al., 2002a). Cette baisse serait due à un état de stress oxydant limité qui s'expliquerait par une surproduction des métallothionéines qui auraient capté les métaux et, de ce fait, protégé la cellule contre le stress oxydant (Giguère et al., 2005a).

Que ce soit au niveau transcriptomique ou au niveau biochimique, aucune différence inter-lac ou intra-saison n'a pas été observée dans la réponse de la GST. Ce paramètre ne serait donc pas un bon biomarqueur dans l'étude des effets d'une contamination chronique aux métaux en milieu naturel sur la réponse au stress oxydant chez les poissons. Par contre, au laboratoire, on a observé une augmentation du niveau de

transcription de ce gène, mais qui n'était pas suivie d'une réponse au niveau catalytique, lorsque les perchaudes étaient exposées pendant six semaines au Cd (Defo et al., 2014a). De même une augmentation de l'activité de la GST hépatique précédée d'une surexpression de la *mgst-3* a été observée chez les perchaudes transplantées pendant quatre semaines dans un lac ayant une concentration aqueuse en Cd élevée (Defo et al., 2015).

4.3.2. Muscle

Dans cette étude les activités de la CAT, SOD et la GST ont été mesurées dans le muscle. Dans les poissons échantillonnés en automne dans les lacs contaminés, une faible activité de la SOD a été mesurée comparativement aux poissons issus des lacs de référence. De plus une relation négative entre l'activité de cette enzyme et le Cd rénal a été observée, alors que l'activité de cette enzyme corrélait positivement avec le Zn rénal. Ce résultat, non surprenant, suggère que le muscle serait aussi susceptible à un stress oxydant induit par les métaux et que le Zn, étant un microélément essentiel, joue un rôle important dans le métabolisme de cette enzyme. En dehors de la SOD, aucune différence dans l'activité des autres enzymes n'a été relevée. Ce résultat, en lien avec la faible activité de la SOD musculaire, suggère que ce tissu aurait moins accumulé les métaux, comparativement au foie par exemple, et aurait donc un besoin réduit d'une réponse anti-oxydante (Defo et al., 2014a).

5. CONCLUSION

L'étude présentée ici a permis d'évaluer l'impact d'un changement temporel des concentrations tissulaires en métaux sur les réponses des biomarqueurs du stress oxydant chez les perchaudes sauvages. Nous avons mis en évidence, pour la première fois, qu'une fluctuation saisonnière dans les concentrations tissulaires en métaux peut avoir des implications sur les réponses des biomarqueurs du métabolisme des rétinoïdes et du stress oxydant chez les perchaudes juvéniles chroniquement exposées à des concentrations sublétales de métaux. Nos résultats indiquent qu'au cours d'une même saison, les concentrations du dROH et du déhydrorétinyl ester hépatiques et musculaires augmentent proportionnellement avec la concentration métallique tissulaire. Ce résultat suggère un besoin de mieux lutter contre le stress oxydant engendré par les métaux. De plus, une forte variation saisonnière dans les concentrations des métabolites, du pourcentage de dROH libre et du niveau de transcription de la rétinol deshydrogénase-2 a été observée dans le foie avec des valeurs plus importantes au printemps qu'en automne témoignant une activité accrue dans le métabolisme des rétinoïdes durant cette saison.

Cette étude indique aussi des différences dans les niveaux de transcription des gènes et des activités enzymatiques des bio-indicateurs traditionnels de la réponse au stress oxydant entre les lacs contaminés et les lacs de référence durant la même saison. De même une fluctuation temporelle a été notée dans l'expression de la Cu/Zn-superoxyde dismutase-1 et dans les activités de la catalase et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase hépatique des perchaudes échantillonnées dans les lacs contaminés, avec un niveau de transcription du gène et des activités enzymatiques plus élevés au

printemps qu'en automne, reflétant probablement la présence d'une concentration d'ERO plus importante au printemps qu'en automne chez les perchaudes vivant dans les lacs contaminés. Au demeurant cette étude met en évidence l'importance de considérer les variations saisonnières lors de l'évaluation des risques environnementaux des métaux sur la physiologie des organismes aquatiques.

6. REMERCIEMENTS

Cette recherche a été financée par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG, Ottawa, On, Canada), RDCPJ 379611 et par Vale Limited (Rio de Janeiro, Brésil). Les auteurs remercient Guillaume Côté pour son aide dans la mise au point des différents paramètres de la RT-PCR, de même que Stéphane Moise pour son appui technique dans l'analyse des rétinoïdes. Nous avons bénéficié de l'assistance d'Antoine Caron, Bérénice Bougas, Julie Grasset, Mariem Fadhlaoui et Ophélie Drevet pour les échantillonnages des poissons. L. Bernatchez et P.G.C. Campbell sont financés par le programme des Chaires de Recherche du Canada.

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Audet, D., Couture, P., 2003. Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 60, 269-278.

Benedetti, M., Martuccio, G., Fattorini, D., Canapa, A., Barucca, M., Nigro, M., Regoli, F., 2007. Oxidative and modulatory effects of trace metals on metabolism of polycyclic

aromatic hydrocarbons in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Aquatic Toxicology* 85, 167-175.

Bourret, V., Couture, P., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., 2008. Evolutionary ecotoxicology of wild yellow perch (*Perca flavescens*) populations chronically exposed to a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 86, 76-90.

Branchaud, A., Gendron, A., Fortin, R., Anderson, P.D., Spear, P.A., 1995. Vitamin A stores, teratogenesis, and EROD activity in white sucker, *Catostomus commersoni*, from Riviere des Prairies near Montreal and a reference site. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 1703-1713.

Campbell, P.G.C., Kraemer, L.D., Giguère, A., Hare, L., Hontela, A., 2008. Subcellular distribution of cadmium and nickel in chronically exposed wild fish: Inferences regarding metal detoxification strategies and implications for setting water quality guidelines for dissolved metals. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 290-316.

Chen, Q., Zhang, R., Li, W.M., Niu, Y.J., Guo, H.C., Liu, X.H., Hou, Y.C., Zhao, L.J., 2013. The protective effect of grape seed procyanidin extract against cadmium-induced renal oxidative damage in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36, 759-768.

Couture, P., Busby, P., Gauthier, C., Rajotte, J.W., Pyle, G.G., 2008a. Seasonal and regional variations of metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. I. Factors influencing tissue metal concentrations. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 97-125.

Couture, P., Pyle, G.G., 2008. Live fast and die young: metal effects on the condition and physiology of wild yellow perch from along two metal contamination gradients. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 73-96.

Couture, P., Rajotte, J.W., Pyle, G.G., 2008b. Seasonal and regional variations in metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. III. Energetic and physiological indicators. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 146-165.

Defo, M.A., Bernatchez, L., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2014a. Waterborne cadmium and nickel impact oxidative stress responses and retinoid metabolism in yellow perch. *Aquatic Toxicology* 154, 207-220.

Defo, M.A., Bernatchez, L., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2015. Transcriptional and biochemical markers in transplanted *Perca flavescens* to characterize cadmium- and copper-induced oxidative stress in the field. *Aquatic Toxicology* 162, 39-53.

Defo, M.A., Pierron, F., Spear, P.A., Bernatchez, L., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2012. Evidence for metabolic imbalance of vitamin A2 in wild fish chronically exposed to metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 85, 88-95.

Defo, M.A., Spear, P.A., Couture, P., 2014b. Consequences of metal exposure on retinoid metabolism in vertebrates: A review. *Toxicology Letters* 225, 1-11.

Eastwood, S., Couture, P., 2002. Seasonal variations in condition and liver metal concentrations of yellow perch (*Perca flavescens*) from a metal-contaminated environment. *Aquatic Toxicology* 58, 43-56.

Eaton, J.G., Swenson, W.A., McCormick, J.H., Simonson, T.D., 1992. A field and laboratory investigation of acid effects on largemouth bass, rock bass, black crappie, and yellow perch. *Transactions of the American Fisheries Society* 121, 644-658.

Efferth, T., Schwarzl, S.M., Smith, J., Osieka, R., 2006. Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase for oxidative stress and apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 13, 527-528.

Farag, A.M., Boese, C.J., Woodward, D.F., Bergman, H.L., 1994. Physiological changes and tissue metal accumulation in rainbow trout exposed to foodborne and waterborne metals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 2021-2029.

Garner, S.R., Neff, B.D., Bernards, M.A., 2010. Dietary carotenoid levels affect carotenoid and retinoid allocation in female Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Journal of Fish Biology* 76, 1474-1490.

Gauthier, C., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2009. Condition and pyloric caeca as indicators of food web effects in fish living in metal-contaminated lakes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 2066-2074.

Gauthier, C., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2011. Enzymatic correlates of energy status in wild yellow perch inhabiting clean and contaminated environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 2148-2156.

Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., 2004. Influence of lake chemistry and fish age on cadmium, copper, and zinc concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 61, 1702-1716.

Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., Cossu-Leguille, C., 2005. Metal bioaccumulation and oxidative stress in yellow perch (*Perca flavescens*) collected from eight lakes along a metal contamination gradient (Cd, Cu, Zn, Ni). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62, 563-577.

Gliszczyńska-Świgło, A., 2006. Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. *Food Chemistry* 96, 131-136.

Ho, H.Y., Cheng, M.L., Chiu, D.T., 2007. Glucose-6-phosphate dehydrogenase--from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. *Redox Report* 12 (3), 109-118.

Hontela, A., Dumont, P., Duclos, D., Fortin, R., 1995. Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence River. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 725-731.

Hontela, A., Rasmussen, J.B., Audet, C., Chevalier, G., 1992. Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and mercury. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 22, 278-283.

Iles, A.C., Rasmussen, J.B., 2005. Indirect effects of metal contamination on energetics of yellow perch (*Perca flavescens*) resulting from food web simplification. *Freshwater Biology* 50, 976-992.

Kövecses, J., Sherwood, G.D., Rasmussen, J.B., 2005. Impacts of altered benthic invertebrate communities on the feeding ecology of yellow perch (*Perca flavescens*) in

metal-contaminated lakes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 62, 153-162.

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., 2005a. Dynamics of Cd, Cu and Zn accumulation in organs and sub-cellular fractions in field transplanted juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). Environmental Pollution 138, 324-337.

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., 2005b. A field study examining metal elimination kinetics in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). Aquatic Toxicology 75, 108-126.

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., 2006. Seasonal variations in hepatic Cd and Cu concentrations and in the sub-cellular distribution of these metals in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). Environmental Pollution 142, 313-325.

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., 2008. Modeling cadmium accumulation in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 65, 1623-1634.

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., Auclair, J.C., 2006b. A field study examining the relative importance of food and water as sources of cadmium for juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 63, 549-557.

Lambert, Y., Dutil, J.D., 1997. Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of atlantic cod (*Gadus morhua*)? Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 54, 104-112.

Leonard, S.S., Harris, G.K., Shi, X., 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine* 37, 1921-1942.

Levesque, H.M., Moon, T.W., Campbell, P.G.C., Hontela, A., 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquatic Toxicology* 60, 257-267.

Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101, 13-30.

Miller, L.L., Rasmussen, J.B., Palace, V.P., Hontela, A., 2009. The physiological stress response and oxidative stress biomarkers in rainbow trout and brook trout from selenium-impacted streams in a coal mining region. *Journal of Applied Toxicology* 29, 681-688.

Nikinmaa, M., Rytönen, K.T., 2011. Functional genomics in aquatic toxicology-Do not forget the function. *Aquatic Toxicology* 105, 16-24.

Pellerin, J., Gauthier-Clerc, S., Siah, A., Assoi-Etchian, O., 2004. Stress physiologique et perturbation endocrinienne chez les bivalves marins,. In: Campbell, P.G.C., Pelletier, É., Denizeau, F. (Eds.), *Écotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement*. Presses de l'Université du Québec, Québec, pp. 349-400.

Peltier, M.R., Wilcox, C.J., Sharp, D.C., 1998. Technical note: application of the Box-Cox data transformation to animal science experiments. *Journal of Animal Sciences* 76, 847-849.

Perceval, O., Pinel-Alloul, B., Méthot, 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.

Pierron, F., Normandeau, E., Defo, M.A., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2011. Effects of chronic metal exposure on wild fish populations revealed by high-throughput cDNA sequencing. *Ecotoxicology* 20, 1388-1399.

Pyle, G., Busby, P., Gauthier, C., Rajotte, J., Couture, P., 2008. Seasonal and regional variations in metal contamination and condition Indicators in Yellow Perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. II. Growth patterns, longevity, and condition. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 126-145.

Pyle, G., Couture, P., 2008. Live fast and die young: metal effects on condition and physiology of wild yellow perch from along two metal contamination gradients. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 73-96.

Rasmussen, J.B., Gunn, J.M., Sherwood, G.D., Iles, A., Gagnon, A., Campbell, P.G.C., Hontela, A., 2008. Direct and indirect (foodweb mediated) effects of metal exposure on the growth of yellow perch (*Perca flavescens*): Implications for ecological risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 317-350.

Regoli, F., 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquatic Toxicology* 50, 351-361.

Scandalios, J.G., 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38, 995-1014.

Serpil Mişe Yonar, 2013. Toxic effects of malathion in carp, *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of lycopene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 97, 223-229.

Uren Webster, T.M., Bury, N., van Aerle, R., Santos, E.M., 2013. Global transcriptome profiling reveals molecular mechanisms of metal tolerance in a chronically exposed wild population of brown trout. *Environmental Science and Technology* 43, 8869-8877.

Chapitre XI : Transcriptional and biochemical markers in transplanted *Perca flavescens* to characterize metal-induced oxidative stress in the field

11. ARTICLE 4

Defo, M.A., Bernatchez, L., Campbell, P.G.C., Couture, P. Transcriptional and biochemical markers in transplanted *Perca flavescens* to characterize metal-induced oxidative stress in the field. *En préparation*

Michel Amery Defo: Conception et réalisation (échantillonnage de terrain, analyse de laboratoire, traitement et interprétation des données) du projet et rédaction de l'article.

Louis Bernatchez: Conception du projet et révision de l'article.

Peter C.G. Campbell: Conception du projet et révision de l'article.

Patrice Couture: Conception du projet et révision de l'article.

Transcriptional and biochemical markers in transplanted *Perca flavescens* to characterize metal-induced oxidative stress in the field

Michel A. Defo^a, Louis Bernatchez^b, Peter G.C. Campbell^a and Patrice Couture^{a*}

a Institut national de la Recherche scientifique (INRS), Centre Eau Terre Environnement, 490 de la Couronne, Québec, QC, Canada G1K 9A9.

b Institut de Biologie intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Québec, QC, Canada G1V 0A6.

* Corresponding author: e-mail address: patrice.couture@ete.inrs.ca

Telephone 1-418 559 3825, Fax: 1-418 654-2600

ABSTRACT

Despite recent progress achieved in elucidating the mechanisms underlying local adaptation to pollution, little is known about the evolutionary change that may be occurring at the molecular level. The goal of this study was to examine patterns of gene transcription and biochemical responses induced by metal accumulation in clean yellow perch (*Perca flavescens*) and metal depuration in contaminated fish in a mining and smelting region of Canada. Fish were collected from a reference lake (Lake Opasatica) and a Cd, Cu and Zn contaminated lake (Lake Dufault) located in the Rouyn-Noranda region (Qc, Canada) and caged for one or four weeks in their own lake or transplanted in the other lake. Free-ranging fish from the same lakes were also collected. Kidney Cd and Cu concentrations in clean fish caged in the contaminated lake increased with the time of exposure, but metal depuration did not occur in contaminated fish caged in the clean lake. After 4 weeks, the major retinoid metabolites analysed, the percentage of free dehydroretinol (dROH) and the retinol dehydrogenase-2 (*rdh-2*) transcription level in liver decreased in clean fish transplanted into the metal-contaminated lake, suggesting that metal exposure negatively impacted retinoid metabolism. However, we observed an increase in almost all of the retinoid parameters analysed in fish from the metal-impacted lake caged in the same lake, which we interpret as an adaptation response to higher ambient metal concentration. In support of this hypothesis, liver transcription levels of microsomal glutathione-S-transferase-3 (*mgst-3*) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (*g6pdh*) were enhanced in clean fish transplanted into the metal-contaminated lake and this up-regulation was accompanied by an increase in the activities of corresponding enzymes, involved in antioxidant response. However,

although in the same fish the transcription level of Cu/Zn superoxide dismutase (*Cu/Zn sod*) was also increased, this did not lead to a change in the activity of the SOD enzyme, suggesting that this upregulation was aimed at maintaining SOD-related antioxidant capacities. In contrast, the transcription level of the *cat* gene, which did not change in contaminated fish, did not compensate for the decrease of CAT activity. After 4 weeks of exposure, some plastic responses of the clean fish were observed when they were transplanted in the metal contaminated lake. However, probably as a consequence of the prior 80 years of exposure to metals, the contaminated population showed a limited plastic response in the expression of the majority of the candidate genes tested, when they were transplanted in the reference lake.

The overall findings of this field investigation highlight how yellow perch molecularly and biochemically responded to a sudden or relatively long-term exposure (4 weeks) to a cocktail of metals.

Keywords: Wild fish; Metal pollution; Reciprocal transplantation; Biomarkers; Plasticity traits; Genomic reaction norm.

1. INTRODUCTION

It is broadly accepted that anthropogenic activities are affecting all ecosystems. Among these activities, pollution sources including metal mining and smelting have contributed to drastic changes in environmental conditions that could potentially lead to changes in biodiversity (Eisler, 2004). Animals usually use three routes to better respond to these stressors or shifts in environmental conditions (Hansen et al., 2012). In favourable ecological and physical conditions such as an absence of physical barriers, they will disperse to new locations. However, in most cases the dispersal of fish to suitable nearby habitats is hard to achieve, and therefore they react *via* phenotypic plasticity to express particular traits (Merilä and Hendry, 2014) or *via* evolutionary adaptation if changes in environmental conditions occur over the long term (Hansen et al., 2012). In some cases, populations fail to adapt to anthropogenic stress. For instance, sulphur dioxide emissions from base metal smelters have led to the rapid acidification of lakes and consequent species extinctions (Gonzalez et al., 2013).

Generally, studies dealing with the development of plastic traits have been carried out for only one point in time, thereby ignoring the time dependency of changes in gene expression, the intensity of expression and the nature of genes (same or not) that were involved in the plastic development between two time points (Aubin-Horth and Renn, 2009). When assessing the mechanisms of action of pollutants, it is critical to evaluate the time point when the differences in gene expression occurred, because it can offer a valuable tool to identify genes that trigger plastic development (Aubin-Horth and Renn, 2009). Whereas adaptive stress response genes may be involved in short exposure periods, additional sets of genes may become involved as the exposure time increases,

in order to maintain animal homeostasis (Denslow et al., 2007). In support of this hypothesis, using a cDNA microarray on flounders (*Platichthys flesus*) exposed to different salinities in both short-term (1 day) and long-term (50 days) reciprocal-transplantation experiments between the North Sea and the Baltic Sea, Larsen et al. (2007) demonstrated that the number of genes significantly and differentially expressed increased with exposure time, indicating a plastic response to a local change in environmental conditions (Larsen et al., 2007).

Compared to most other fish species, the yellow perch (*Perca flavescens*) is considered as a biomonitor because it fulfils several criteria (Giguère et al., 2004b). It is abundant and widely distributed across North American freshwater ecosystems and is particularly relevant in metal toxicology studies because it tolerates metals such as cadmium (Cd) and copper (Cu) at high concentrations (Hontela et al., 1995; Hontela et al., 1992; Rajotte and Couture, 2003). This species possesses efficient biochemical defence mechanisms (e.g. increasing metallothionein concentrations with increasing metal levels in its tissues (Giguère et al., 2005a), which allow it to live in metal impacted areas. Nevertheless, metal concentrations in yellow perch tissues have been correlated with biological impacts such as the metabolic imbalance of vitamin A₂ (Defo et al., 2012b), impairment of metabolic capacities (Couture and Kumar, 2003), poor condition and overall health (Couture et al., 2008b; Rajotte and Couture, 2002b) and elevated metallothionein concentration (Giguère et al., 2005a). In a recent investigation on the mechanisms of Cd and Ni toxicity in yellow perch, we identified transcriptional and functional signatures specific to Cd and Ni exposure. The results indicate that metals, particularly Cd, affect the transcription level of genes and the activity of enzymes

involved in oxidative stress response and vitamin A metabolism (Defo et al., 2014a). In an earlier study in evolutionary ecotoxicology, negative correlations between hepatic concentrations of cadmium, but not copper, and genetic diversity have been reported in wild yellow perch living in metal impacted areas (Bourret et al. 2008). Results from another study carried out in the copper and gold mining region of Rouyn-Noranda have shown that metals, especially Cd, induce changes in the yellow perch genome by selecting alleles that increase the fitness of perch inhabiting metal-impacted lakes (Bélanger-Deschênes *et al.* 2013). Both studies support the hypothesis that pollution can trigger natural selection.

Gene expression can also be directly informative about population adaptive genetic divergence (Larsen et al., 2007). When attempting to test hypotheses aimed at identifying possible ecological drivers, traits and genes involved in the adaptation to changing environmental conditions, one approach involves the comparison of the transcription levels of genes among different exposure conditions (Côté et al., 2014; Hoffmann and Daborn, 2007; Meier et al., 2014). Among natural populations, variation in gene expression has been shown to play a prominent role in ecological adaptation (Derome and Bernatchez, 2006; Pavey et al., 2011; St-Cyr et al., 2008). The expression of mRNA was reported to explain *ca.* 40% of the variance in protein expression (Abreu et al., 2009) meaning that changes in gene transcription levels do not necessarily involve modifications in the concentrations of the corresponding enzymes (Giuliani et al., 2013; Regoli et al., 2011). It is therefore important to take into account functional and genomic information when designing genomic studies (Furlong, 2011) instead of simply discussing functional outcomes (e.g. change in enzymes activities) on the basis

of transcriptomic data (Nikinmaa et al., 2013). Change in response to the interactions between an organism and its environment can be observed at different levels including morphological, behavioural or physiological. The generic term of “genomic reaction norm” is generally used to describe the relationship between trait and environment for a given genotype, or to define the extent of plasticity of that trait (Aubin-Horth and Renn, 2009).

In aerobic organisms, oxygen, in its normal configuration (O_2) is somewhat unreactive, however it can be transformed into reactive oxygen species (ROS) in response to changing environmental or metabolic conditions (Gliszczyńska-Świgło 2006; Scandalios, 2005). ROS production can lead to cellular oxidative stress, itself inducing lipid peroxidation, DNA and protein damage and other adverse effects (Chen et al., 2013; Leonard et al., 2004). Metals have different modes of generating or increasing cellular ROS (Defo et al., 2014b; Lushchak, 2011). In order to counterbalance oxidative damage, gene transcription levels of cellular antioxidant response and the activities of enzymes involved in these metabolic pathways increase in response to higher cellular ROS (Uren Webster et al., 2013).

In the present reciprocal transplantation field experiment using caged fish, transcriptional analysis coupled with biochemical analyses were employed to investigate the effects of metal exposure on retinoid metabolism and oxidative stress response biomarkers in yellow perch. Our specific objectives were: (i) to examine temporal changes in liver transcription levels of a set of toxicologically-relevant genes involved in the oxidative stress response in yellow perch exposed up to four weeks to metals; (ii) to compare gene expression levels with corresponding biochemical endpoints (enzyme

activities and retinoid storage) in order to determine if metal-induced changes in gene transcription levels lead to significant physiological effects; (iii) to compare responses of a population from a clean site to a site where the population has been exposed to contaminants for 80 years and could have therefore developed adaptation to cope with the contaminated environment; and (iv) to determine at what time scale changes in the metabolic response appear as a result of metal accumulation or depuration.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study area, fish sampling and reciprocal transplantations

Two lakes were selected along the polymetallic concentration gradient in the Rouyn-Noranda region (Québec-Canada) (Fig. 1).

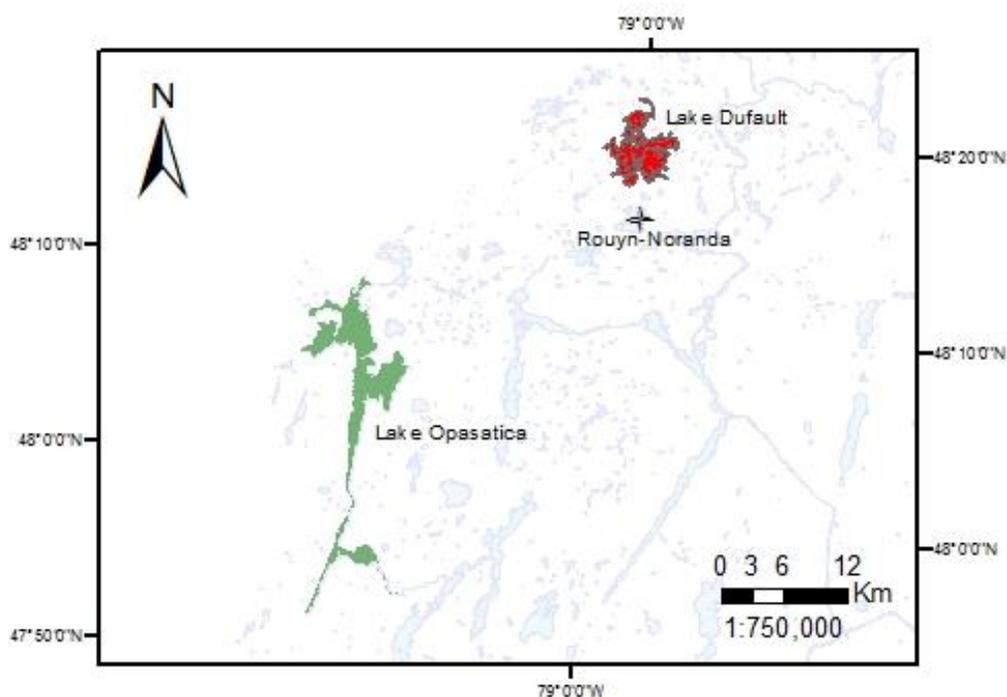


Figure 1. Study area and lakes sampled. The reference lake is indicated in green and the metal-contaminated lake in red. The cross refers to the point source of metal contamination in the Rouyn-Noranda region of Québec.

Table 1. Total aqueous and sediment concentrations of trace metals Cd, Cu and Zn in the study lakes

Compartment	Water			Sediments			References
Metal	[Cd] (nM)	[Cu] (nM)	[Zn] (nM)	[Cd] ($\mu\text{mol/g dw}$)	[Cu] ($\mu\text{mol/g dw}$)	[Zn] ($\mu\text{mol/g dw}$)	
Opasatica	0.11	44	31				(Giguère et al., 2004)
	0.30	33	19				(Giguère et al., 2006)
	< 0.90	72	27	12	0.88	2.33	(Borgmann et al., 2004)
	< 0.03	45.7	55				(Croisetière et al., 2006)
	0.07	64	7				(Fortin et al., 2010)
	0.11	47	5				(Kraemer et al., 2008)
Dufault	7.7	254	2425				(Giguère et al., 2004)
	6.7	180	1100				(Giguère et al., 2006)
	3.0	232	577	341	45.9	68.7	(Borgmann et al., 2004)
	3.2	194	510				(Croisetière et al., 2006)
	2.7	127	430				(Fortin et al., 2010)
	5.5	225	1015				(Kraemer et al., 2008)

Since 1927 a copper smelter has been in operation in this region and metal concentrations (Cd, Cu and Zn) in lakes situated downwind from the smelter are markedly higher than in lakes located upwind (Bonham-Carter et al., 2006). Lake Dufault is closely situated, ca. 2 km, downwind from the smelter and was chosen as the metal-contaminated lake (Con) due to historical atmospheric deposition of relatively high levels of metals such as Cd, Cu and Zn (Table 1). This has resulted in increased levels of metals in the water column, sediments and in prey. Lake Opasatica, located ca. 30 km upwind of the metal emission site, was selected as the reference lake (Ref) because of the relatively low metal concentrations in the water column, sediments and prey.

The cage experiments were carried out according to the approach developed in Kraemer *et al.* (2005a,b), with slight modification. In brief, planktivorous juvenile yellow perch (2.47 ± 0.07 g; 6.57 ± 0.07 cm; mean \pm SE) were collected between May 22-24, 2012 either in Lake Opasatica, hereafter Op or in Lake Dufault, hereafter Du, and reciprocally transplanted into cages located in both lakes. In order to account for the captivity effect itself, fish from each lake were maintained in captivity in their own lake of origin (unpublished study). The cage walls were made of 5 mm mesh netting, allowing free movement of water and food into the cages. A total of 8 cages were used (Fig. 2), creating 4 condition regimes for each exposure period (1 and 4 weeks).

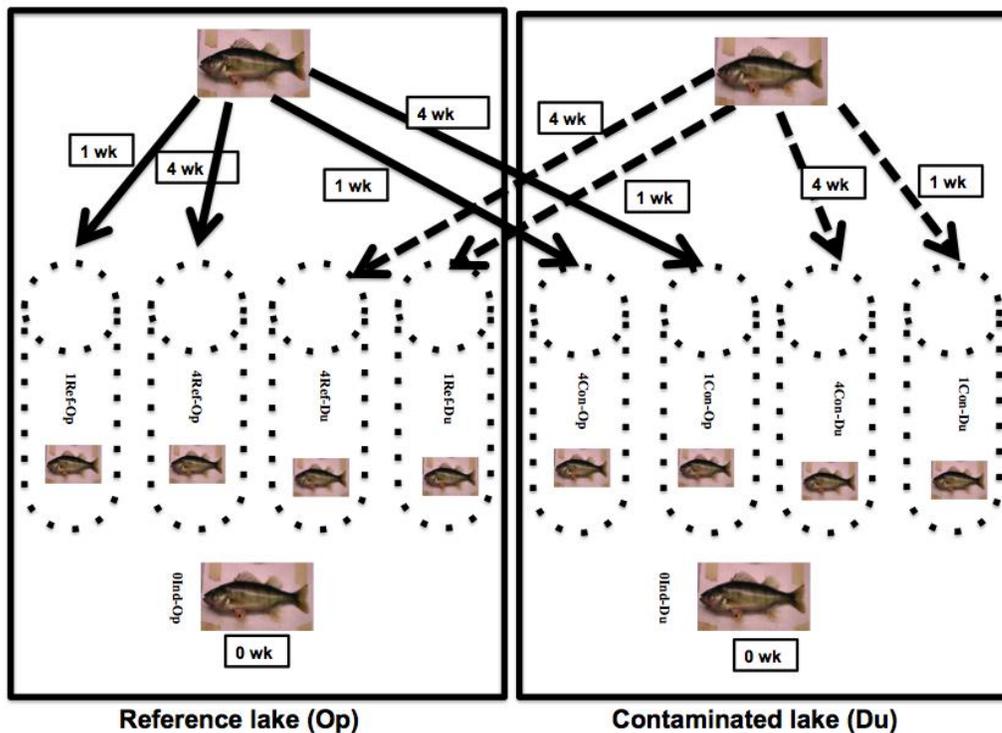


Figure 2. Experimental design of all exposure conditions: 1Ref-Op, 1Ref-Du, 1Con-Op, 1Con-Du, 4Ref-Op, 4Ref-Du, 4Con-Op, 4Con-Du, 0Ind-Op and 0Ind-Du (see Table 2 for details of the experimental design).

Also, at the beginning of the transplantation phase and at 1 and 4 weeks, free-ranging fish were collected from each lake. However unlike others conditions, only metal analyses were performed on free- ranging fish sampled at 1 and 4 weeks. Each cage initially contained 30-40 fish, and at the end of each exposure period the remaining fish (up to a maximum of 20) were sampled from each cage. The percentage of fish mortality in each cage is reported in Table 2. Lengths and weights were recorded and sex determined. Livers were dissected for molecular and biochemical analyses, kidneys for metal analyses and pyloric cæca for biometric analyses. Tissues were immediately frozen and stored in liquid nitrogen in the field. Upon arrival in the laboratory, samples were placed in a freezer at -80°C where they were kept until used for analyses. The fish

manipulation protocol was approved by the Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec and by the Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) of INRS.

The reciprocal-transplantation experiment conditions are explained in Table 2.

Table 2. Exposure condition, percentage of males and yellow perch mortality in the reciprocal-transplantation experiment. Opasatica is the reference lake and Dufault is the contaminated lake.

Condition*	Percentage of male	Percentage of mortality	Explanation
0Ind-Op	10	-	Free-ranging indigenous lake Opasatica fish sampled at the beginning of experiment
0Ind-Du	10	-	Free-ranging indigenous lake Dufault fish sampled at the beginning of experiment
1Ind-Op	10	-	Free-ranging indigenous lake Opasatica fish sampled at 1 week
1Ind-Du	5	-	Free-ranging indigenous lake Dufault fish sampled at 1 week
1Ref-Op	10	27.5	Fish from the reference lake caged in the reference lake for one week
1Ref-Du	15	12.2	Fish from the metal-contaminated lake caged in the reference lake for one week
1Con-Op	5	24.4	Fish from the reference lake caged in the metal-contaminated lake for one week
1Con-Du	0	80.0	Fish from metal-contaminated lake caged in metal-contaminated lake for one week
4Ind-Op	31	-	Free-ranging indigenous lake Opasatica fish sampled at 4 week
4Ind-Du		-	Free-ranging indigenous lake Dufault fish sampled at 4 week
4Ref-Op	47	57.5	Fish from the reference lake caged in the reference lake for four weeks
4Ref-Du	28	68.9	Fish from the metal-contaminated lake caged in the reference lake for four weeks
4Con-Op	27	76.1	Fish from the reference lake caged in metal-contaminated lake for four weeks
4Con-Du	15	50.0	Fish from metal-contaminated lake caged in the metal-contaminated lake for four weeks

*The number prefix in the condition column indicates the time of exposure (weeks)

2.2. Calculation of fish condition index (Kn) and corrected pyloric cæca weights

The relative condition factor (Kn) was calculated using the equation $Kn = (Wf / L^{3.16}) \times 100$ (where “Wf” is fish weight, “L” is the total fish length) (Gauthier et al., 2009). The corrected pyloric cæca weights were calculated according to the method described elsewhere (Gauthier et al., 2011) with 2.6 g as the standard fish weight and 0.92 as the allometric exponent.

2.3. Analyses of kidney metal concentrations, liver quantitative RT-PCR, determination of retinoid and protein concentrations and enzyme activities

Cadmium, Cu and Zn were analyzed in kidney tissues after digestion in trace metal grade nitric acid according to Pierron et al. (2009), using an inductively coupled-plasma atomic emission spectrophotometer (ICP-AES). Internal standards were within 10% of nominal values in all cases and mean metal recoveries from the reference material analyzed (TORT-2, lobster hepatopancreas, National Research Council of Canada, Ottawa, ON) were 94.8 ± 0.4 % for Cd, 85.3 ± 1.3 % for Cu and 89.0 ± 0.9 % for Zn (mean \pm S.E.).

RNA isolation, cDNA synthesis and analysis of liver gene transcription levels were performed in accordance with methods and technical standardization procedures cited in Defo et al. (2014a). The partial coding sequences (primers) used in this study are listed in Table 3. All the biochemical parameters, including liver retinoid concentrations and enzyme activities (CAT, SOD, G6PDH and GST) analyzed in this study were conducted using the protocol described by Defo et al. (2014a), without modification.

Table 3. Nucleotide sequences of specific partial coding sequence (primer) pairs and PCR products used in RT-qPCR analysis.

Gene abbreviations	Name and functions	Specific primers	PCR products
<i>β-actin</i>	Reference gene	F: 5'- GCCTCTCTGTCCACCTTCCA-3' R: 5'- GGGCCGGACTCATCGTACT-3'	From Pierron et al. (2009)
<i>rdh-2</i>	Photoreceptor associated retinol dehydrogenase 2 (retinoid and oxidative stress metabolism)	F: 5'-AGTCAAGCAGTGCATCAACAAT-3' R: 5'- CATGCGAACAACACCAAAGAAG-3'	151
<i>cat</i>	Catalase (Oxidative stress metabolism)	F: 5'- GTCTTTCTTGTTTCAGCGATCGA-3' R: 5'- GTAGAAACGTTCCACCATCAGCA-3'	106
<i>mgst-3</i>	Microsomal glutathione S transferase-3 (Oxidative stress metabolism)	F: 5'- CCTTCCTCTACAGCTGGATCAT-3' R: 5'- TGAATACCTGCTCCTTGTCACT-3'	114
<i>g6pdh</i>	Glucose 6 phosphate dehydrogenase (Pentose phosphate and oxidative stress metabolism)	F: 5'- ACGAGAGGCTGATATTGGATGT-3' R: 5'- TCCATATGTGTAAGGGATGGGG-3'	146
<i>sod</i>	Cu/Zn superoxide dismutase (Oxidative stress metabolism)	F : 5'-TGAGCAGGAGGAGGGTTCATCCCC-3' R : 5'-CCTGCACTGATGCACCCGTTTGT-3'	123

F: Forward primer ; R: Reverse primer

2.4. Data analysis

To test for differences in biometric parameters, metal concentrations, enzyme activities and retinoid concentrations among experimental conditions, we used one-way analysis of variance (ANOVA), after checking the assumption of normality (Levene test, $p > 0.05$). We also used ANOVA to evaluate the differences in gene transcription levels among conditions and to determine the degree of plasticity (genomic reaction norm) among experimental conditions. When the probability was significant ($p < 0.05$), multiple comparison tests were used to identify differences between two conditions. When the assumption of normality was not met, and when \log_{10} or Box-Cox (Peltier et al., 1998) transformation of the data was unable to normalize the distribution, non-parametric paired Wilcoxon tests were applied. For vitamin A determination, statistical analyses were performed without considering sex as an explanatory variable. A probability of $p < 0.05$ indicates a statistically significant difference from the control experiment condition. Results were expressed as means \pm standard error (SE). The relationships between individual kidney metal concentrations and liver gene transcription level, biochemical analysis or biometric parameters were investigated using the non-parametric Spearman rank correlation test. Analyses were performed using JMP 9.0 software.

3. RESULTS

3.1. Kidney metal accumulation dynamics

Kidney metal concentrations reflected the metal contamination status of the two studied lakes. At the beginning of the experimentation ($t = 0$), metals accumulated in kidneys of

free ranging-fish from the in reference Lake Opasatica (0Ind-Op) (Fig. 3A) were 4.6 and 1.3 times lower for Cd and Cu respectively than those for fish in the metal-impacted Lake Dufault (0Ind-Du) (Fig. 3B). This trend was confirmed in indigenous free-ranging fish sampled at $t = 1$ week. Kidney metal concentrations in free-ranging fish collected at $t = 4$ weeks in the metal-impacted lake (Fig. 3B) were also significantly higher ($p < 0.05$) for Cd, Cu and Zn (4.5, 1.9 and 1.5 times respectively) than those in fish from the reference lake (Fig. 3A).

Metal accumulation patterns in yellow perch kidneys varied over the transplantation period. Kidney Cd concentration of fish from reference Lake Opasatica caged in metal-impacted Lake Dufault increased over time in comparison to reference fish caged in Lake Opasatica. The increase was not significant after 1 week of exposure, but a significant ($p < 0.05$) increase was observed at the end of the experiment, although the Cd concentration was lower than that of fish living naturally in Lake Dufault (Fig. 3A). A similar but more pronounced trend was also seen for Cu (Fig. 3A). No trend in kidney Zn accumulation was observed in caged fish (Fig. 3A). Surprisingly, unlike the results obtained in the contamination experiment, kidney Cd, Cu and Zn concentrations of fish from the metal-impacted lake transplanted into the reference lake were not different from those in fish that remained caged in Lake Dufault (Fig. 3B).

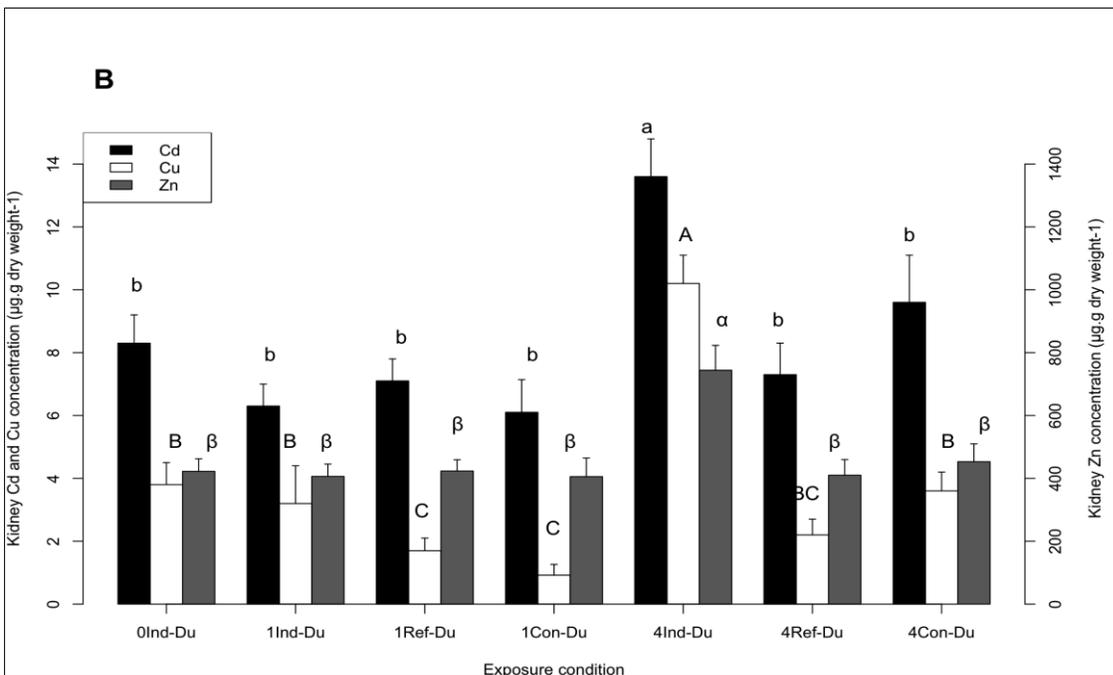
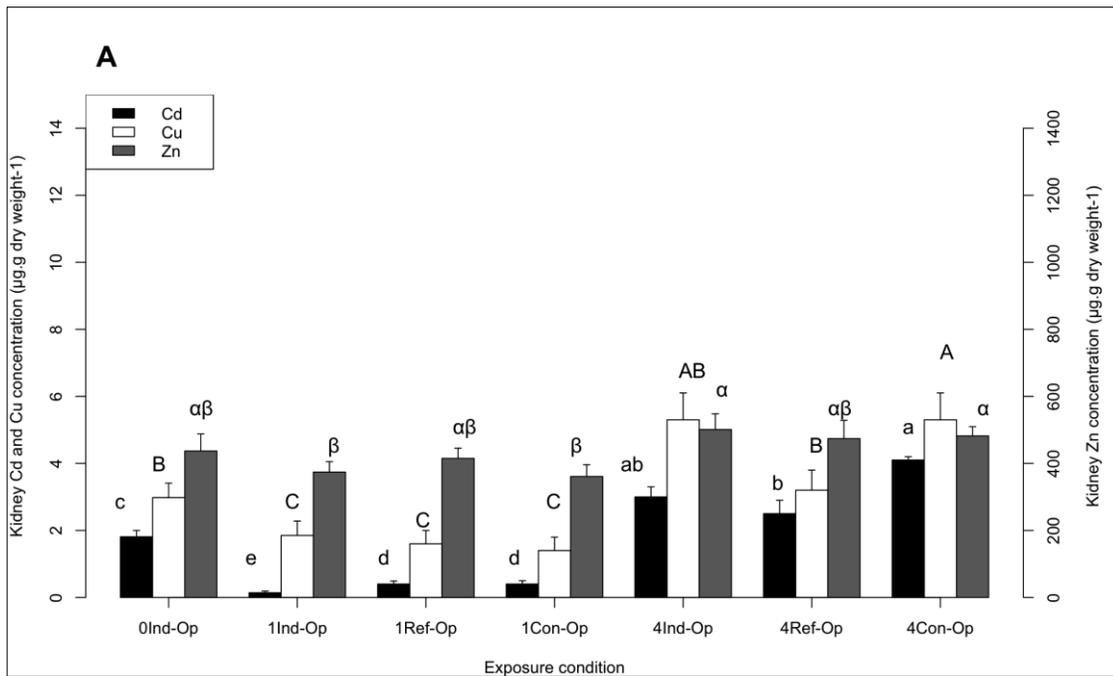


Figure 3. Total cadmium, copper and zinc concentrations in the kidney of indigenous yellow perch sampled after 1 and 4 weeks for the contamination experiment (Figure 3A; Lake Opasatica specimens) or for the depuration experiment (Figure 3B; Lake Dufault specimens). Free-ranging perch from Lake Opasatica (Ind-Op) and Lake Dufault (Ind-Du) respectively represent control fish for contamination and depuration experiments. Con-Op and Con-Du denote fish caged in Lake Dufault, while Ref-Op and Ref-Du represent fish caged in Lake Opasatica. The number prefix in the exposure conditions indicates the time of exposure (weeks). Bars are means \pm standard error (SE) ($11 \leq N \leq 20$ /condition). Means designated with different letters for a given metal are significantly different (p -value < 0.05). Different letters (capital letters for Cd, lower case letters for Cu and Greek letters for Zn) represent comparisons of kidney metal concentrations among exposure conditions.

Table 4. Number of fish in each sampling group (N), relative condition index (Kn), corrected pyloric cæca weight and major vitamin A concentrations in liver of indigenous free-ranging yellow perch from Lake Opasatica (0Ind-Op) and Lake Dufault (0Ind-Du) and in yellow perch caged in Lake Dufault (Con-Op and Con-Du) or in Lake Opasatica (Ref-Op and Ref-Du) sampled after 1 and 4 weeks (see Section 2.1). Values are mean \pm SE and means within columns designated with different letters are significantly different (p-value < 0.05).

Condition	N	Biometric parameters		Retinoid metabolism ^Y		
		Relative index condition (Kn)	Corrected pyloric cæca wet weight (g)	[dROH] [✓]	[dROH-palmitate] [✓]	[Total vitamin A esters] [✓]
0Ind-Op	20	0.62 \pm 0.01 ^b	0.66 \pm 0.02 ^b	0.024 \pm 0.008 ^b	0.078 \pm 0.017 ^c	0.124 \pm 0.028 ^c
0Ind-Du	20	0.59 \pm 0.01 ^b	0.73 \pm 0.05 ^b	0.050 \pm 0.013 ^a	0.103 \pm 0.031 ^c	0.174 \pm 0.055 ^{bc}
1Ref-Op	20	0.61 \pm 0.01 ^b	0.65 \pm 0.02 ^b	0.016 \pm 0.007 ^b	0.072 \pm 0.031 ^c	0.120 \pm 0.052 ^c
1Ref-Du	20	0.63 \pm 0.01 ^b	0.93 \pm 0.04 ^a	0.026 \pm 0.010 ^b	0.112 \pm 0.020 ^c	0.197 \pm 0.034 ^{bc}
1Con-Op	20	0.70 \pm 0.03 ^a	0.81 \pm 0.05 ^a	0.015 \pm 0.006 ^b	0.084 \pm 0.030 ^c	0.145 \pm 0.053 ^c
1Con-Du	8	0.62 \pm 0.03 ^b	0.98 \pm 0.06 ^a	0.025 \pm 0.007 ^b	0.125 \pm 0.020 ^c	0.237 \pm 0.040 ^{bc}
4Ref-Op	17	0.65 \pm 0.02 ^b	0.60 \pm 0.04 ^b	0.012 \pm 0.002 ^{bc}	0.250 \pm 0.035 ^b	0.319 \pm 0.070 ^b
4Ref-Du	14	0.72 \pm 0.03 ^a	1.05 \pm 0.11 ^a	0.020 \pm 0.004 ^b	0.432 \pm 0.063 ^a	0.632 \pm 0.092 ^a
4Con-Op	11	0.77 \pm 0.02 ^a	0.68 \pm 0.05 ^b	0.008 \pm 0.003 ^c	0.144 \pm 0.027 ^c	0.224 \pm 0.037 ^{bc}
4Con-Du	20	0.65 \pm 0.02 ^b	0.85 \pm 0.04 ^a	0.032 \pm 0.008 ^a	0.385 \pm 0.036 ^a	0.645 \pm 0.071 ^a

^Y N=6

*The number prefix in the condition column indicates the time of exposure (weeks)

✓ Expressed in μ mol/g liver wet weight

3.2. Fish condition index (Kn) and corrected pyloric cæca weights

In the metal contamination experiment (Lake Opasatica to Lake Dufault), analysis of biometric parameters revealed little difference among the experimental conditions.

Indeed transplanted fish (1Con-Op and 4Con-Op) displayed higher condition factors and heavier pyloric cæca weights than their corresponding control fish (1Ref-Op) and (4Ref-Op) respectively (Table 4).

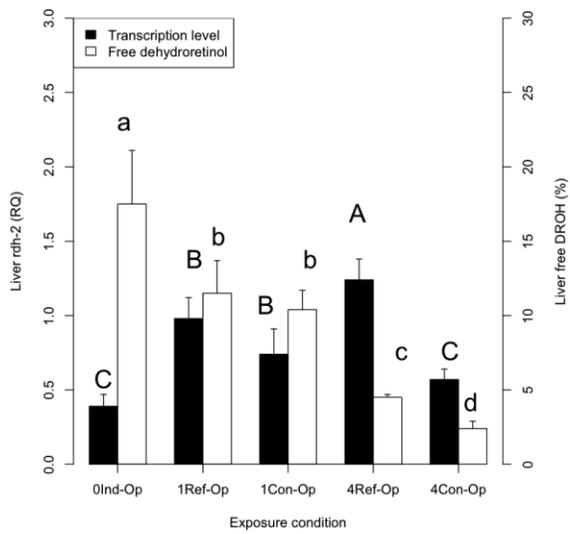
Depuration (Lake Dufault to Lake Opasatica) did not significantly affect the biometric parameters analysed, except for the fish transplanted for 4 weeks (4Ref-Du), which displayed higher condition factors than control fish (4Con-Du) (Table 4). A significant relationship was observed between Kn and kidney Cu concentrations ($\rho = 0.23$; $p = 0.0002$) and between pyloric cæca weights and kidney Cd concentrations ($\rho = -0.14$; $p = 0.0282$), for all fish pooled.

3.3. Changes in liver retinoid levels during metal accumulation and depuration

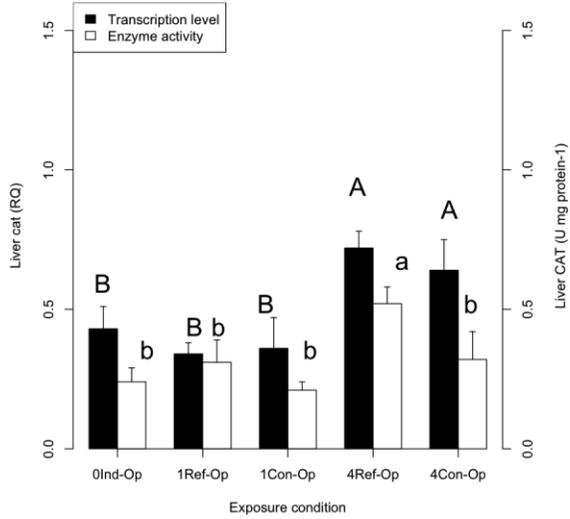
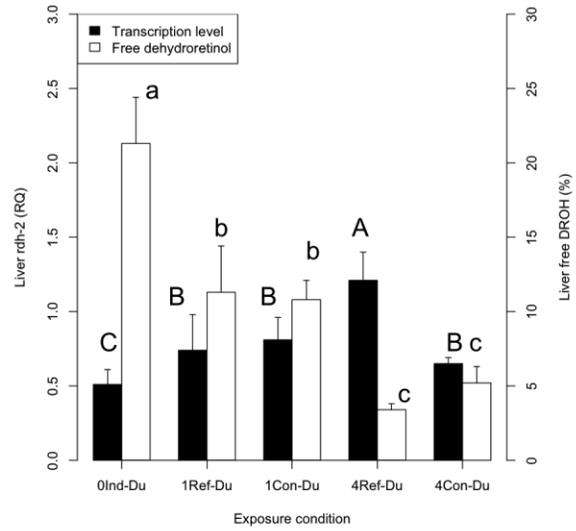
As expected, all-trans-3,4-didehydroretinoids were the predominant form of vitamin A found in yellow perch liver. After 4 weeks of metal exposure, the concentration of dehydroretinyl palmitate and the main form of vitamin A storage significantly decreased in fish from Lake Opasatica caged in Lake Dufault (4Con-Op) in comparison to control fish (4Ref-Op) (Table 4).

The percentage of free dROH also significantly decreased in fish from Lake Opasatica transplanted in Lake Dufault (4Con-Op) in comparison to control fish (4Ref-Op) (Fig. 4A; left panel).

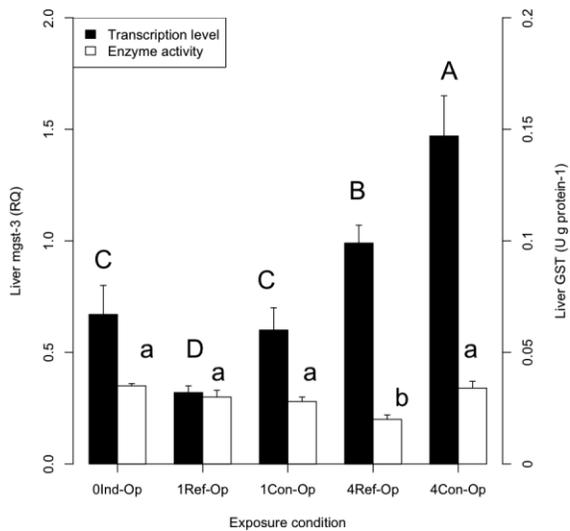
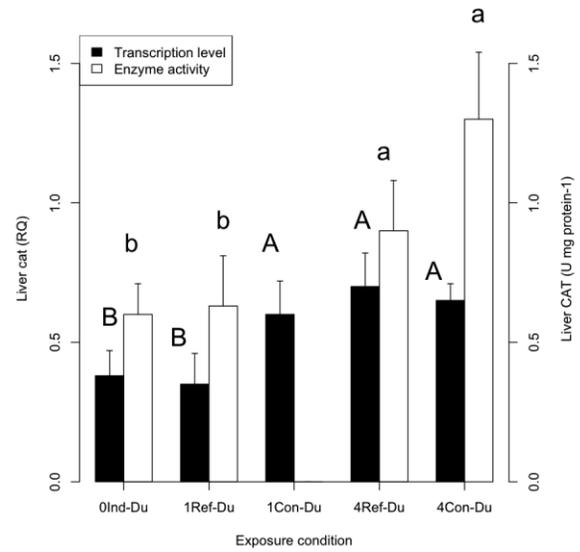
FIGURE 4.



A



B



C

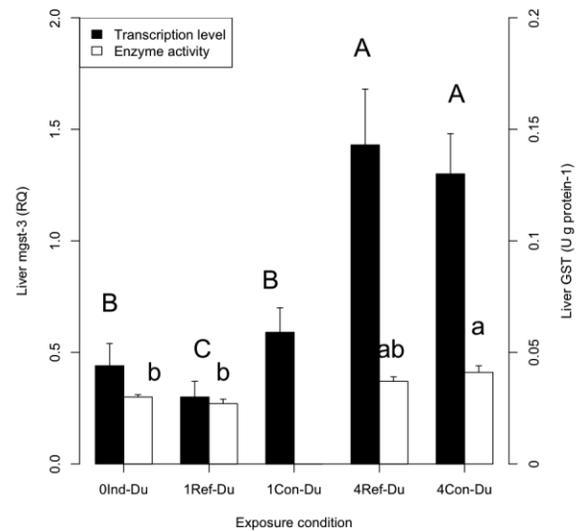


FIGURE 4. SUITE

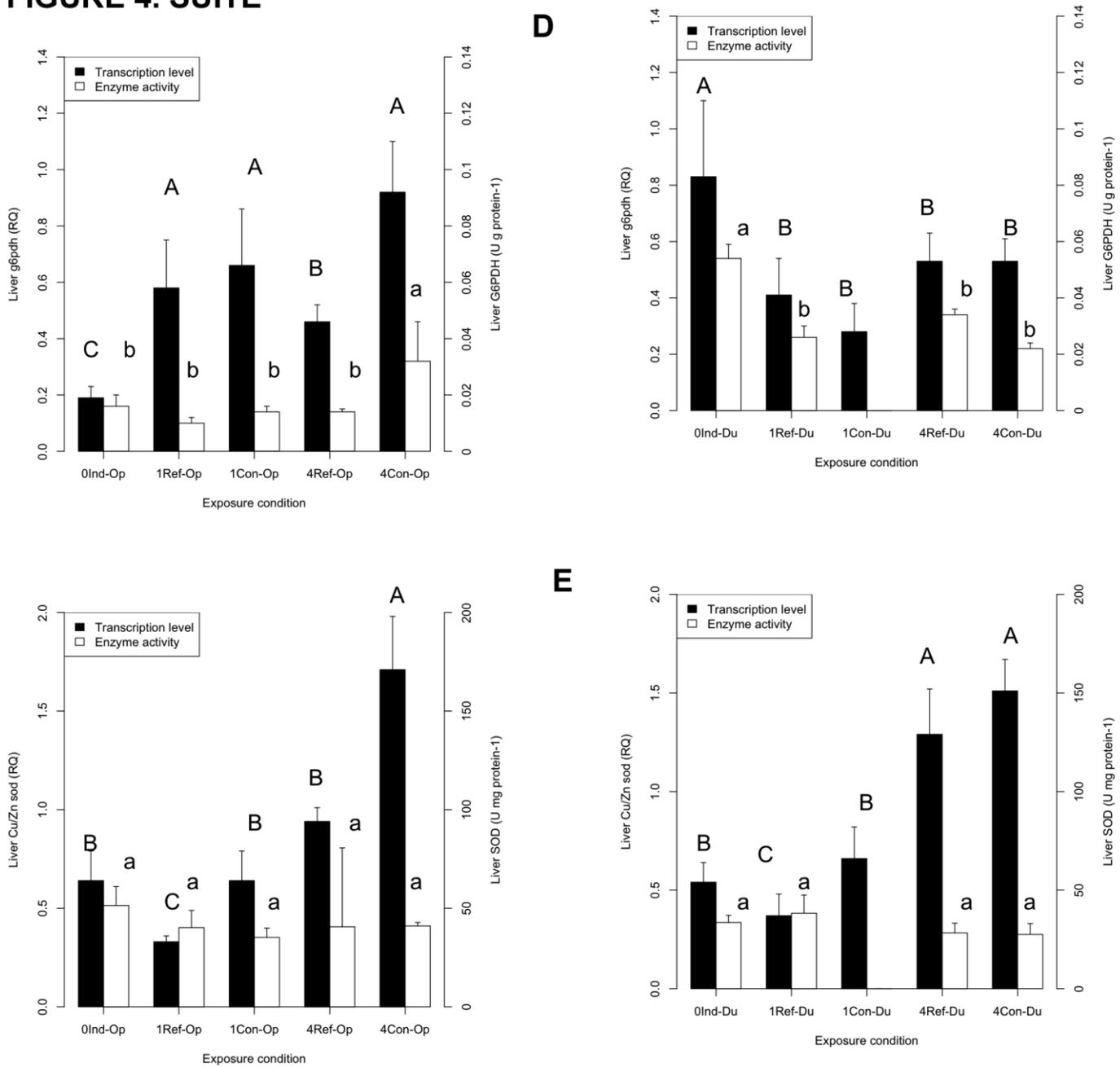


Figure 4. Liver gene transcription level (mean \pm SE) of *rdh-2* (A), *cat* (B), *mgst-3* (C), *g6pdh* (D) and *Cu/Zn sod* (E) and corresponding biochemical analysis of indigenous yellow perch sampled after 1 and 4 weeks for the contamination experiment (Lake Opasatica specimens; left panel) or for the depuration experiment (Lake Dufault specimens; right panel). Free-ranging perch from Lake Opasatica (Ind-Op) and Lake Dufault (Ind-Du) respectively represent control fish for contamination and depuration experiments. Con-Op and Con-Du denote fish caged in Lake Dufault, while Ref-Op and Ref-Du represent fish caged in Lake Opasatica (see Section 2.1). The number prefix in the exposure condition indicates the time of exposure (weeks). Means designated with different letters for a given parameter are significantly different (p -value < 0.05; $6 \leq N \leq 8$ /condition). Different letters (capital letters for gene transcription level and lower case letters for biochemical analysis) represent comparisons of each parameter among exposure conditions.

3.4. Response of molecular biomarkers of oxidative stress during metal accumulation and depuration

In the metal accumulation experiment, liver *rdh-2* transcription levels were significantly lower in fish exposed to metals compared to controls, and the decrease was more pronounced after 4 weeks of exposure (Fig. 4A; left panel). Liver *cat* transcription levels were not significantly different in fish exposed to metals compared to controls (Fig. 4B; left panel). However, liver *mgst-3* (Fig. 4C; left panel), *g6pdh* (Fig. 4D; left panel) and *Cu/Zn sod* (Fig. 4E; left panel) transcription levels were significantly higher in fish exposed to metals compared to controls, and the increases were more pronounced after 4 weeks of exposure.

In the metal depuration experiment, liver *cat* (Fig. 4B; right panel), *mgst-3* (Fig. 4C; right panel) and *Cu/Zn sod* (Fig. 4E; right panel) transcription levels had decreased after 1 week. However no change in liver *rdh-2* (Fig. 4A; right panel) and *g6pdh* (Fig. 4D; right panel) transcription levels was observed compared to controls. After 4 weeks, the transcription levels of the measured genes were no longer different, except for liver *rdh-2*, which had a transcription level 1.9 times higher in fish exposed to low metals (4Ref-Du) than in control fish (4Con-Du) (Fig. 4A; right panel).

Positive correlations were observed between kidney Cu concentrations and *Cu/Zn sod*, *mgst-3* and *g6pdh* transcription levels; correlations were not significant with kidney Cd concentrations (Fig. 5).

FIGURE 5.

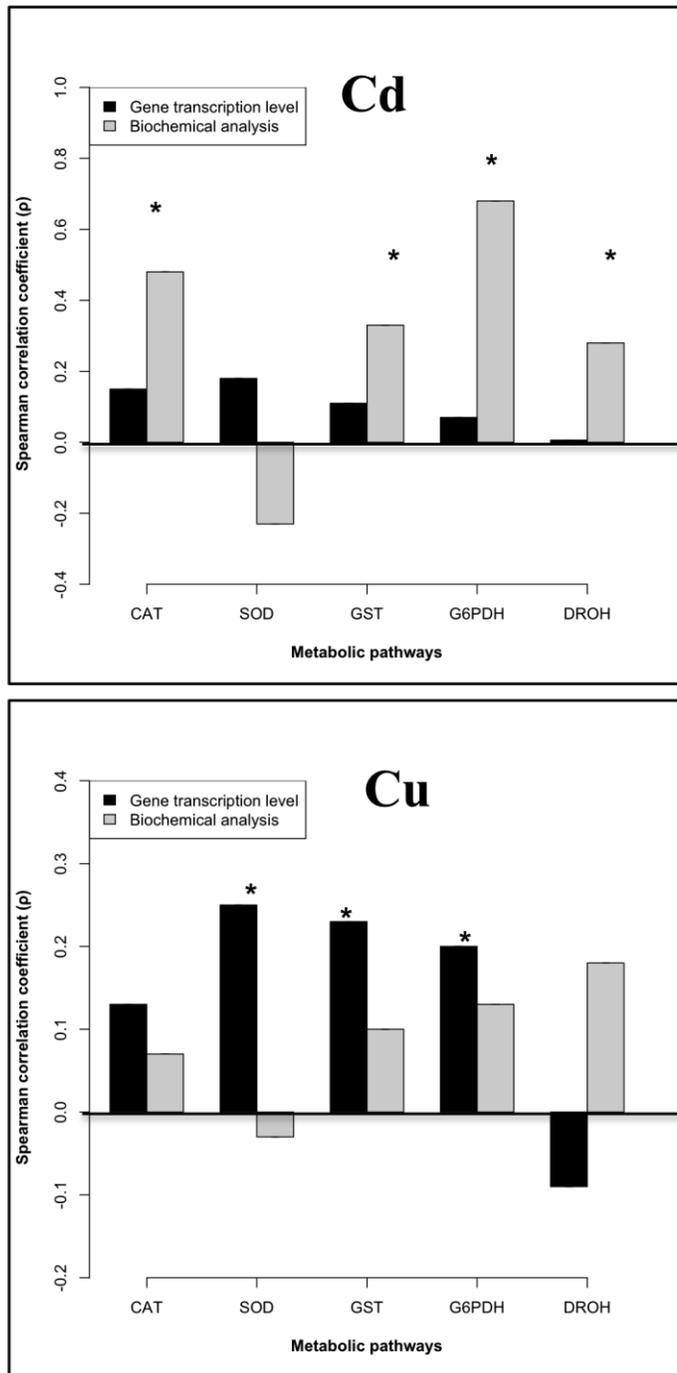


Figure 5. Spearman correlation coefficients (ρ) between kidney Cd and Cu concentrations and (i) gene transcription level of liver *cat*, *Cu/Zn sod*, *mgst-3*, *g6pdh* and *rdh-2*, (ii) corresponding biochemical analysis of indigenous free-ranging yellow perch from Lake Opasatica (0Ind-Op) and Lake Dufault (0Ind-Du) (both respectively control lakes for contamination and depuration experiments at the start of the experiment or 0 week) and in yellow perch caged in Lake Dufault (Con-Op and Con-Du) or in Lake Opasatica (Ref-Op and Ref-Du) sampled after 1 and 4 weeks. ($60 \leq N \leq 80$), * $p < 0.05$.

3.5. Changes in oxidative stress related enzyme activities during metal accumulation and depuration

After 4 weeks, the activity of liver CAT had decreased in fish transplanted from Lake Opasatica to Lake Dufault (Fig. 4B; left panel). In contrast, the activities of liver GST (Fig. 4C; left panel) and G6PDH (Fig. 4D; left panel) were significantly higher in fish that had been exposed to high metal concentrations, relative to the control. Liver SOD activity had not increased significantly as a consequence of metal exposure after 4 weeks (Fig. 4E; left panel). No effect of metal depuration was detected on the activity of the analysed enzymes when fish were transplanted from Lake Dufault to Lake Opasatica (t = 4 weeks; Figs. 4B, 4C, 4D, 4E; right panel).

Although gene transcription levels were not correlated with kidney Cd concentrations, the corresponding biochemical parameters analysed were positively correlated except for liver SOD activity, for which a negative but significant correlation was observed (Fig. 5).

3.6. Metal genomic reaction norm: response to a changing environment

Differentials in gene transcription levels showing the representation of trait values in relation to changes in environmental conditions (clean fish caged in the contaminated lake, contaminated fish caged in the clean lake, or free ranging fish caged in their own lake) were estimated after 1 week (Fig. 6 left panel) and 4 weeks (Fig. 6 right panel). Among the five genes analysed, the results clearly indicate that patterns of genomic reaction norms vary depending on fish origins and sampling time. After 1 week none of the genes analysed were transcriptionally induced or inhibited in either the metal contamination or the metal depuration experiments (Fig. 6 left panel).

FIGURE 6.

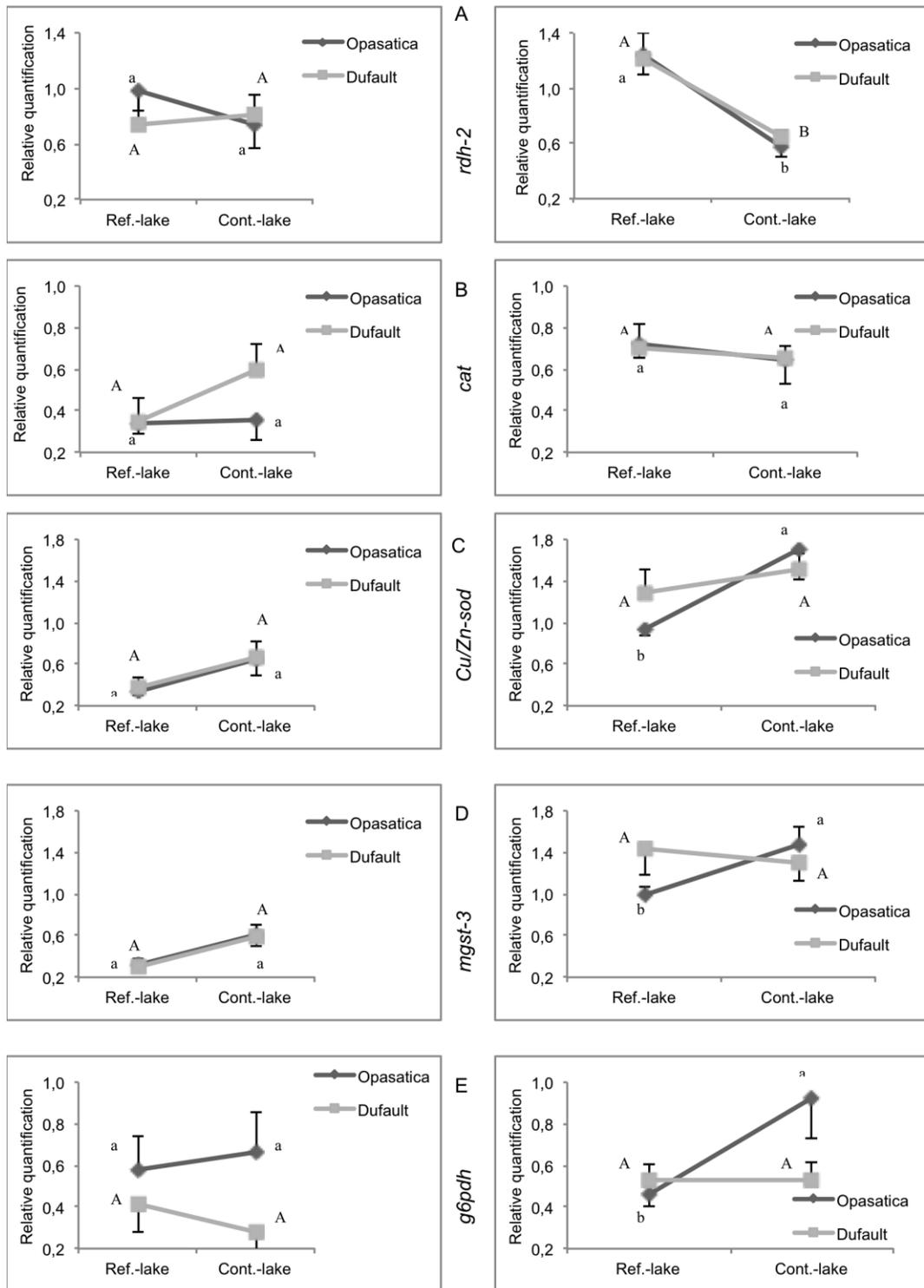


Figure 6. Genomic reaction norm of *rdh-2* (A), *cat* (B), *Cu/Zn sod* (C), *mgst-3* (D) and *g6pdh* (E) of indigenous yellow perch from Lake Opasatica and Lake Dufault caged in Lake Dufault (Cont.-lake) or in Lake Opasatica (Ref.-lake) and sampled after 1 week (left panel) and 4 weeks (right panel) of exposure. Means designated with different letters are significantly different (p -value < 0.05). Capital letters represent comparison between fish from Lake Dufault caged in contaminated and references lakes, and lowercase letters indicate comparison between fish from Lake Opasatica caged in reference and contaminated lakes. Values are mean and standard errors (SE).

With regard to three of the analysed genes (*Cu/Zn sod*, *mgst-3* and *g6pdh*), it appears that fish from Lake Dufault showed reduced response relative to fish from Lake Opasatica whereby no difference in expression were observed between the rearing environments whereas this was the case for Lake Dufault perch.

After 4 weeks the analysis of the depuration effect revealed a clear response only with *rdh-2* gene, where the gene increased in expression (Fig. 6A, right panel). However, in the metal contamination experiment this gene was under-expressed in comparison with their homologs that remained caged in clean lake (Fig. 6A, right panel). Catalase gene expression was not transcriptionally induced or inhibited in fish from Lake Opasatica caged in Lake Dufault (Fig. 6B, right panel). In contrast, a more pronounced and progressive response was noticed at the end of the experiment for *Cu/Zn sod*, *mgst-3* and *g6pdh* in fish from Lake Opasatica caged in Lake Dufault (Figs. 6C, 6D and 6E respectively, right panel).

4. DISCUSSION

We have inevitably collected and analysed only specimens found alive at the end of each experiment. Caging induced a high rate of mortality, especially after four weeks (Table 2). Nevertheless, survivors appeared healthy and their condition index and feeding activity illustrated by the corrected pyloric cæca weights were comparable to values in free-ranging fish. Mortality in cages was likely due to factors other than contamination, since there was no evidence that it was higher in fish caged in the contaminated lake. In the absence of predators, dominance and competition for food

resources in restricted environments like cages or aquaria lead to differential growth rates among individuals increasing over time, which can induce a selection for healthier, faster-growing individuals. Regardless of the causes of mortality, our data suggest that although survivors may differ from their population of origin in terms of variability of the biomarkers examined, fish sampled in cages remain comparable among themselves.

4.1. Effects of metal contamination and depuration on kidney metal concentration

Although we did not measure the concentrations of dissolved metals in water or sediment in this study, Campbell et al., (2008) reported a large difference in aqueous Cd (the main metal responsible for deleterious effects on aquatic organisms) concentration (about a factor of 22) in the lakes selected for the transplantation experiment. Furthermore, others authors (Table 1) have reported an ambient (water) metal gradient concentration with a factor of 70, 5.7 and 78 (Giguère et al., 2004); 22, 5.4, 58 (Giguère et al., 2006); 39, 2, 61 (Fortin et al., 2010) between the reference lake Opasatica and the contaminated lake Dufault for Cd, Cu and Zn respectively. A metal gradient was also observed in sediment of both lakes with a factor of 28, 52, 29.4 between both lakes for Cd, Cu and Zn respectively (Borgmann et al., 2004).

In this study, liver tissue was prioritized for biochemical and molecular analysis and kidney for metal analysis. Previous studies have reported a good correlation between liver and kidney metal concentrations in indigenous yellow perch and demonstrate that kidney metal contamination is a suitable surrogate for estimating metal accumulation (Couture et al., 2008a; Kraemer et al., 2005a, b).

In response to the differences in ambient metal concentrations, kidney metal (especially Cd) accumulation was much lower in fish living in the reference lake (Lake Opasatica)

than in fish from the metal-impacted lake (Lake Dufault) (Fig. 3A and 3B), thus confirming the contamination status of both study lakes. Unsurprisingly, metal-naïve fish caged in the contaminated lake had increased their renal Cd and Cu concentrations after 4 weeks of exposure. Unlike the case for Cu, kidney Cd concentrations in transplanted fish had not reached levels similar to those of indigenous caged fish from Lake Dufault, indicating that a steady-state was not reached during the experimental period. Cadmium, a non-essential metal, may have accumulated more slowly in comparison to Cu or Zn, which are both essential metals. Our study agrees with the findings of Kraemer et al. (2005a), who observed an increase in kidney Cd concentrations after yellow perch were transplanted from Lake Opasatica to Lake Dufault for 30 days. However, in their study, no clear temporal trend in kidney Cu concentrations was observed.

No significant loss of metals from the kidney for either sampling period was observed in fish caught in the metal-impacted lake and held within the reference lake (Fig. 3B). Although not surprising, this result indicates that the biological depuration times of kidney Cd, Cu and Zn are longer than 30 days. To our knowledge, the only other study reporting metal depuration in indigenous fish is that of Kraemer et al. (2005b). Juvenile yellow perch living in a metal-impacted lake (high Cd, Cu and Zn) were held for up to 75 days in cages within a reference lake (low Cd, Cu and Zn). Gill and gut Cd concentrations decreased rapidly, but the biological half lives of Cd in the kidney and liver were 52 and 75 days respectively. The depuration of excess Cu also occurred more rapidly in the liver and gut compared to the kidney and gills (Kraemer et al.,

2005b). Our study combined with theirs suggests that metal depuration rates are time, metal and tissue dependent.

Although our experiment took place within a single season (spring), it is important to note the increase in kidney metal concentrations in free-ranging fish that occurred over the experimental period, particularly in the fish collected at $t = 4$ weeks. Food availability likely played a role in metal uptake during our sampling period. Indeed, fish from the reference lake caged in the metal-impacted lake displayed higher values of K_n , a metric associated with recent feeding activity, and higher pyloric cæca weights, reflecting higher feeding rate and food conversion efficiency (Bergot et al., 1981; Gauthier et al., 2008), compared to their homologs caged in the reference lake. The positive relationship observed between K_n and kidney Cu concentrations in our study further supports the idea that tissue metal accumulation during the caging experiment was likely enhanced due to increased feeding activity ($p = 0.23$; $p = 0.0002$). However, we cannot rule out that the increase in metal accumulation is due to higher aqueous metal exposure or to an increase in the proportion of trophically available metal in prey (Luoma and Rainbow, 2005).

4.2. Effect of metal contamination on liver retinoid metabolism

In the present field study, the hepatic retinoid concentrations, the percentage of free dROH and the level of *rdh-2* transcription in fish originating from Lake Opasatica decreased after 4 weeks of exposure to metals, suggesting that exposure to high Cd levels negatively impacted yellow perch liver retinoid metabolism. Although this result contrasts with a previous study where we reported positive correlations between kidney Cd concentrations and liver dehydroretinoids (free and esterified form) in wild fish

collected in metal impacted lakes (Defo et al., 2012b), it is supported by our recent laboratory study where hepatic retinoid concentrations had decreased after a 6-week exposure to waterborne Cd and Ni (Defo et al., 2014a). However, the current investigation also demonstrated that when perch living naturally in a metal-impacted lake were caged in the same lake, their liver retinoid concentrations (free dROH, dROH-palmitate and total vitamin A esters) and the percentage of free liver dROH were all significantly higher than those of metal-naïve perch caged in the same metal-impacted lake for 4 weeks. This observation of higher retinoid parameters in the metal-contaminated fish caged in their own lake—suggests a compensatory mechanism in order to counteract the direct effects of metal induced oxidative stress (Defo et al., 2012b).

It is likely that more than 80 years of metal pollution have led to the selection of traits that enhanced the retinoid metabolic capacity of wild perch. Our present finding is in agreement with our previous report where we demonstrated that adult perch from Cd-impacted lakes displayed significantly higher concentrations of liver dROH and dROH-esters than fish from reference lakes (Defo et al., 2012b). Lake Dufault perch may have acquired some tolerance to metals through physiological acclimatization or adaptation. For example, a recent study showed that metal contamination has driven rapid adaptive evolution by favouring allelic selection of genes that could increase yellow perch fitness in metal-impacted areas (Bélanger-Deschênes et al., 2013). Also, higher nucleoside diphosphate kinase (NDPK) activity, an indicator of biosynthetic capacities, was reported in yellow perch inhabiting a metal-impacted lake in the region of Sudbury (Rajotte and Couture, 2002a). In support of these higher physiological capacities, fish

from Lake Dufault caged in the same lake exhibited higher liver aerobic capacities (higher cytochrome-c-oxidase activity) than did fish from Lake Opasatica held captive in Lake Dufault for 4 weeks (data not shown).

4.3. Relationships between gene transcription levels and functional responses

This is the first study to simultaneously examine the effects of metal exposure and its duration on transcriptional and functional regulation in wild perch. We have identified sets of genes that were differently expressed and consistently associated with biochemical responses to metal (especially Cd) stress, suggesting that the transcriptome and biological function of fishes can be significantly altered in response to Cd exposure. Although all genes analysed shared similar functions, variability in the responses of individual genes was observed and such response varied depending on metal exposure duration and type of gene analysed. Consistent with the hypothesis that Cd induced oxidative stress (Wang et al., 2013) and therefore might increase the level of cellular ROS, an increase in the transcription level of the most genes studied was observed.

Combining molecular analysis and biochemical responses, our study has demonstrated that genes involved in the response to metal-induced oxidative stress were differentially expressed in fish from Lake Opasatica following 4 weeks of acclimatization to a cocktail of metals in Lake Dufault, compared to their homologs caged in Lake Opasatica. Moreover we observed differences in the activities of the corresponding enzymes. Specifically, after 4 weeks, yellow perch transplanted into the metal-impacted lake displayed high transcription levels of liver *g6pdh*, *mgst-3*, *Cu/Zn sod*, presumably in order to reduce the level of ROS generated in the metal-exposed fish down to levels

noted in the reference fish. Furthermore, the up-regulation of some of the studied genes resulted in an increase in enzyme activities (e.g. GST and G6PDH), indicating a synchronous reaction at the molecular and biochemical levels to counteract the oxidative stress engendered by metal exposure. Typically, translational responses are expected to follow the transcriptional responses (Nikinmaa and Rytönen, 2011). Our results suggest that in metal-contaminated environments regulation of the relevant metabolic pathways might be achieved at both levels of biological organization. Our results are in agreement with our previous laboratory study where we reported consistent relationships between liver *mgst-3* and *g6pdh* transcription levels (up-regulation) and corresponding enzyme activities (increasing) in yellow perch exposed to Cd (Defo et al., 2014a).

Although we reported a high transcription level of liver *Cu/Zn sod* in fish originating from Lake Opasatica and transplanted into Lake Dufault, there was no measurable effect of metals on SOD activity, suggesting that regulation of liver transcription is only sufficient to maintain SOD activity. It is not surprising that gene transcription levels of some antioxidants increase whereas no change is reported at the functional level (Giuliani et al., 2013). As mentioned above, there is a delay between transcription and translation in eukaryotic cells and multiple regulation steps are involved in transcription and translation (Regoli et al., 2011).

Unlike the responses of liver GST and G6PDH activities, liver CAT activity had decreased with metal exposure after 4 weeks. A decrease in CAT activity is often compensated for by an increase in other antioxidant enzyme activities, as an alternative mechanism for ROS removal (Regoli et al., 2011); antioxidant defence enzymes act

cooperatively or synergistically in order to afford an optimal protection against oxidative stress (Bagnyukova et al., 2006). The present results contrast with our previous laboratory observations of a good agreement between liver *cat* transcription level (up-regulation) and CAT activity (increase) when perch were exposed to Cd for 6 weeks (Defo et al., 2014a). The difference between the two studies could be due to the multiple stress factors that operate in the natural environment. Indeed some oxidative stress biomarkers may be more sensitive to metal pollution due to synergistic or combined effects of factors, such as higher temperature, that may exert their influence in natural environment (Lapointe et al., 2011).

4.4. Time scale of changes in metabolic responses and metal genomic reaction norm

This field experiment has added a temporal dimension to our previous study in which we reported the impact of increasing metal concentrations on retinoid metabolism in wild perch (Defo et al., 2012b). Although multiple stressors co-exist in natural environments, we hypothesized that the results of our present field manipulation experiment would probably be comparable to those of our recent laboratory study, in which we exposed perch to an environmentally relevant concentration of Cd for six weeks. Indeed, as in our previous laboratory experiment, we found that liver transcription levels of some antioxidant defence genes (*mgst-3*, *g6pdh*) were enhanced and that this up-regulation was accompanied by an increase in the activities of the corresponding enzymes (Defo et al., 2014a).

In addition to the intensity of contamination, it is important to determine the time point at which adverse effects of pollutants may occur in order to better understand the impacts

of metal contamination in natural populations. In this reciprocal-transplantation experiment, plastic responses were observed after 4 weeks of exposure for all of the genes analysed, except for *cat* for which the response might take more than 4 weeks. This result suggests that the number of genes involved in oxidative stress responses may be time of exposure dependent (Denslow et al., 2007).

Studies have reported specific genomic reaction norms in responses to changes to environmental conditions such as temperature in brown trout (Meier et al., 2014) or salinity in eels (Côté et al., 2014). To our knowledge, ours is the first study reporting a genomic reaction norm to metals using reciprocal transplant experiments directly in the natural environment. Although a loss of plasticity was observed in the contaminated population, our results support an important role for phenotypic plasticity in explaining yellow perch adaptation to metal-induced oxidative stress when clean fish from Lake Opasatica were transferred into Lake Dufault. Analysis of a metal contamination effect showed a clear plastic effect for almost all genes analysed at the end of the experiment. Similar patterns of plasticity (progressive) were observed in the expression of *Cu/Zn sod*, *mgst-3* and *g6pdh*. This degree of plasticity could be linked to the extent to which fish are combatting oxidative stress. However, *rdh-2* expression showed different patterns of plasticity, suggesting that yellow perch used different strategies to cope with metal-induced oxidative stress. Finally *cat* expression did not show any variation between the two groups of caged fish, indicating that *cat* is the gene with the least plastic expression among those studied. The different genomic reactions observed between Lake Opasatica yellow perch transplanted into Lake Dufault and those caged in their own lake of origin, after 4 weeks, possibly reflects an adaptive plastic response

to the change in the environment. This is likely the case since they were causally linked with plastic responses observed at the biochemical level, except for the catalase pathway. Since all of the genes analysed are involved in the cellular response to oxidative stress, our study supports the idea that the genomic response of naïve perch to metal exposure is strongly oriented towards combatting oxidative stress.

In contrast to the yellow perch from Lake Opasatica, fish from Lake Dufault did not show a pronounced plastic response after 4 weeks. This difference in genomic reaction norms for at least three genes supports the hypothesis of genetic differences between the two populations. Also, the two previous studies indicated that increased metal exposure led to an important reduction in diversity (Bélanger-Deschênes et al., 2013; Bourret et al., 2008). Such a loss of diversity could perhaps impact on the potential for maintaining a plastic response. Overall then, our results support the hypothesis that more than 80 years of metal exposure may have driven rapid evolutionary change in the Lake Dufault population genome (Bélanger-Deschênes et al., 2013; Bourret et al., 2008). To demonstrate the generality of this hypothesis would require the analysis of more lakes.

Other factors, such as epigenetic effects (induction of phenotypic variation without DNA sequence alteration) (Pierron et al., 2014; Richards, 2006), may also explain the observed differences in gene expression between the two fish groups (Pierron et al., 2014). Indeed, although the yellow perch populations used in this study were similar in body weight and length and originated from the same region with similar natural macro-environments, epigenetic mechanisms could exert a crucial influence on phenotypic plasticity and on the interactions between the fish and their environment, thereby

modifying gene expression and contributing to environmentally-induced phenotypic changes (Angers et al., 2010).

5. CONCLUSION

This study indicates that a 4-weeks exposure period in a contaminated environment is sufficient for metal-naïve juvenile perch to significantly increase their kidney Cd and Cu concentrations. However, more time is necessary to depurate metals that have accumulated over the course of their lives. Our results clearly show that chronic metal exposure negatively affected indicators of retinoid metabolism and increased oxidative stress related parameters, at both the molecular and biochemical levels. Also, this study reveals that perch from clean populations may partly adjust to contamination by plastic responses and that such responses occur within the first 4 weeks of exposure; the contaminated population tended to express a higher, albeit non-plastic response, possibly as a consequence of more than 80 years of directional selective pressures associated with exposure to contaminants. Globally, our results indicate that in metal-impacted lakes, yellow perch manage to ensure their continued presence by increasing their capacity to synthesize retinoid metabolites. The overall findings from this field investigation highlight how yellow perch molecularly and biochemically deal with sudden or long-term exposures to a cocktail of metals. This study will contribute to a better understanding of how perch manage to live and adapt in natural environments impacted by metals.

6. ACKNOWLEDGMENTS

This study is part of a Collaborative Research and Development project (P. Couture, Principal Investigator) funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, Ottawa, ON, Canada; grant number RDCPJ 379611) and by Vale Limited (Rio de Janeiro, Brazil). The Canada Research Chair program supports P.G.C. Campbell and L. Bernatchez. The assistance of Bérénice Bougas, Julie Grasset, Mariem Fadhlou, Antoine Caron and Ophélie Drevet was invaluable throughout the field experimentation. We wish to acknowledge the contribution of Guillaume Côté during the optimization of RT-PCR parameters. The authors are also grateful to the INRS-ETE support staff without whom this study could not have been completed, in particular Stéphane Prémont, Stéphane Moise and Anissa Bensadoune for their technical assistance in retinoid and metal analyses.

7. REFERENCES

Abreu, R.D., Penalva, L.O., Marcotte, E.M., Vogel, C., 2009. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Molecular BioSystems* 5.

Angers, B., Castonguay, E., Massicotte, R., 2010. Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: How to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Molecular Ecology* 19, 1283-1295.

Aubin-Horth, N., Renn, S.C.P., 2009. Genomic reaction norms: using integrative biology to understand molecular mechanisms of phenotypic plasticity. *Molecular Ecology* 18, 3763-3780.

Bagnyukova, T.V., Chahrak, O.I., Lushchak, V.I., 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stressors. *Aquatic Toxicology* 78, 325-331.

Bélanger-Deschênes, S., Couture, P., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., 2013. Evolutionary change driven by metal exposure as revealed by coding SNP genome scan in wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Ecotoxicology* 22, 938-957.

Bergot, P., Blanc, J.M., Escaffre, A.M., 1981. Relationship between number of pyloric caeca and growth in rainbow trout (*Salmo gairdneri Richardson*). *Aquaculture* 22, 81-96.

Bonham-Carter, G.F., Henderson, P.J., Kliza, D.A., Kettles, I.M., 2006. Comparison of metal distributions in snow, peat, lakes and humus around a Cu smelter in western Quebec, Canada. *Geochemistry Exploration Environment Analysis* 6, 215-228.

Borgmann, U., Nowierski, M., Grapentine, L.C., Dixon, D.G., 2004. Assessing the cause of impacts on benthic organisms near Rouyn-Noranda, Quebec. *Environmental Pollution* 129, 39-48.

Bourret, V., Couture, P., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., 2008. Evolutionary ecotoxicology of wild yellow perch (*Perca flavescens*) populations chronically exposed to a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 86, 76-90.

Campbell, P.G.C., Kraemer, L.D., Giguère, A., Hare, L., Hontela, A., 2008. Subcellular distribution of cadmium and nickel in chronically exposed wild fish: Inferences regarding metal detoxification strategies and implications for setting water quality guidelines for dissolved metals. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 290-316.

Chen, Q., Zhang, R., Li, W.M., Niu, Y.J., Guo, H.C., Liu, X.H., Hou, Y.C., Zhao, L.J., 2013. The protective effect of grape seed procyanidin extract against cadmium-induced renal oxidative damage in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36, 759-768.

Côté, C.L., Castonguay, M., Kalujnaia, M.S., Cramb, G., Bernatchez, L., 2014. In absence of local adaptation, plasticity and spatially varying selection rule: A view from genomic reaction norms in a panmictic species (*Anguilla rostrata*). *BMC Genomics* 15.

Couture, P., Busby, P., Gauthier, C., Rajotte, J.W., Pyle, G.G., 2008a. Seasonal and regional variations of metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. I. Factors influencing tissue metal concentrations. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 97-125.

Couture, P., Rajotte, J.W., Pyle, G.G., 2008b. Seasonal and regional variations in metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. III. Energetic and physiological indicators. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 146-165.

Croisetière, L., Hare, L., Tessier, A., 2006. A field experiment to determine the relative importance of prey and water as sources of As, Cd, Co, Cu, Pb, and Zn for the aquatic invertebrate *Sialis velata*. *Environmental Science and Technology* 40, 873-879.

Defo, M.A., Bernatchez, L., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2014a. Waterborne cadmium and nickel impact oxidative stress responses and retinoid metabolism in yellow perch. *Aquatic Toxicology* 154, 207-220.

Defo, M.A., Pierron, F., Spear, P.A., Bernatchez, L., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2012. Evidence for metabolic imbalance of vitamin A2 in wild fish chronically exposed to metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 85, 88-95.

Defo, M.A., Spear, P.A., Couture, P., 2014b. Consequences of metal exposure on retinoid metabolism in vertebrates: A review. *Toxicology Letters* 225, 1-11.

Denslow, N.D., Garcia-Reyero, N., Barber, D.S., 2007. Fish 'n' chips: the use of microarrays for aquatic toxicology. *Molecular BioSystems* 3, 172-177.

Derome, N., Bernatchez, L., 2006. The transcriptomics of ecological convergence between 2 limnetic coregonine fishes (Salmonidae). *Molecular Biology and Evolution* 23, 2370-2378.

Eisler, R., 2004. Mercury hazards from gold mining to humans, plants and animals. *Review of Environmental Contamination Toxicology* 181, 139-198.

Fortin, C., Couillard Y., Vigneault, B., Campbell, P.G.C., 2010. Determination of free Cd, Cu and Zn concentrations in lake waters by in situ diffusion followed by column equilibration ion-exchange. *Aquatic Geochemistry* 16, 151-172.

Furlong, E., 2011. Molecular biology: a fly in the face of genomics. *Nature* 471.

Gauthier, C., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2008. Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 151A, 526-532.

Gauthier, C., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2009. Condition and pyloric caeca as indicators of food web effects in fish living in metal-contaminated lakes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 2066-2074.

Gauthier, C., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2011. Enzymatic correlates of energy status in wild yellow perch inhabiting clean and contaminated environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 2148-2156.

Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., Cossu-Leguille, C., 2005. Metal bioaccumulation and oxidative stress in yellow perch (*Perca flavescens*) collected from eight lakes along a metal contamination gradient (Cd, Cu, Zn, Ni). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62, 563-577.

Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., Couture, P., 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 77, 178-189.

Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., McDonald, D.G., Rasmussen, J.B., 2004. Influence of lake chemistry and fish age on cadmium, copper, and zinc concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 61, 1702-1716.

Giuliani, M.E., Benedetti, M., Arukwe, A., Regoli, F., 2013. Transcriptional and catalytic responses of antioxidant and biotransformation pathways in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to chemical mixtures. *Aquatic Toxicology* 134-135, 120-127.

Gliszczyńska-Świgło, A., 2006. Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. *Food Chemistry* 96, 131-136.

Gonzalez, A., Ronce, O., Ferriere, R., Hochberg, M.E., 2013. Evolutionary rescue: an emerging focus at the intersection between ecology and evolution. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 368, 1610, 20120404.

Hansen, M.M., Olivieri, I., Waller, D.M., Nielsen, E.E., The GeM Working Group, 2012. Monitoring adaptive genetic responses to environmental change. *Molecular Ecology* 21, 1311-1329.

Hoffmann, A.A., Daborn, P.J., 2007. Towards genetic markers in animal populations as biomonitors for human-induced environmental change. *Ecology Letters* 10, 63-76.

Hontela, A., Dumont, P., Duclos, D., Fortin, R., 1995. Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence River. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 725-731.

Hontela, A., Rasmussen, J.B., Audet, C., Chevalier, G., 1992. Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and mercury. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 22, 278-283.

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., 2008. Modeling cadmium accumulation in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 65, 1623-1634.

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., 2005a. Dynamics of Cd, Cu and Zn accumulation in organs and sub-cellular fractions in field transplanted juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Environmental Pollution* 138, 324-337.

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., 2005b. A field study examining metal elimination kinetics in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology* 75, 108-126.

Lapointe, D., Pierron, F., Couture, P., 2011. Individual and combined effects of heat stress and aqueous or dietary copper exposure in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology* 104(1-2), 80-85.

Larsen, P.F., Nielsen, E.E., Williams, T.D., Hemmer-Hansen, J., Chipman, J.K., Kruhøffer, M., Grønkjær, P., George, S.G., Dyrskjøt, L., Loeschcke, V., 2007. Adaptive differences in gene expression in European flounder (*Platichthys flesus*). *Molecular Ecology* 16, 4674-4683.

Leonard, S.S., Harris, G.K., Shi, X., 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine* 37, 1921-1942.

Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environmental Science and Technology* 39, 1921-1931.

Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101, 13-30.

Meier, K., Hansen, M.M., Normandeau, E., Mensberg, K.L.D., Frydenberg, J., Larsen, P.F., Bekkevold, D., Bernatchez, L., 2014. Local adaptation at the transcriptome level in brown trout: Evidence from early life history temperature genomic reaction norms. *PLoS ONE* 9, e85171.

Merilä, J., Hendry, A.P., 2014. Climate change, adaptation, and phenotypic plasticity: the problem and the evidence. *Evolutionary Applications* 7, 1-14.

Nikinmaa, M., McCairns, R.J., Nikinmaa, M.W., Vuori, K.A., Kanerva, M., Leinonen, T., Primmer, C.R., Merilä, J., Leder, E.H., 2013. Transcription and redox enzyme activities: comparison of equilibrium and disequilibrium levels in the three-spined stickleback. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 280, 20122974.

Nikinmaa, M., Rytönen, K.T., 2011. Functional genomics in aquatic toxicology-Do not forget the function. *Aquatic Toxicology* 105, 16-24.

Pavey, S.A., Sutherland, B.J., Leong, J., Robb, A., Schalburg, K., Hamon, T.R., Koop, B.F., Nielsen, J.L., 2011. Ecological transcriptomics of lake-type and riverine sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *BMC Ecology* 2011, 11-18.

Peltier, M.R., Wilcox, C.J., Sharp, D.C., 1998. Technical note: application of the Box-Cox data transformation to animal science experiments. *Journal of Animal Sciences* 76, 847-849.

Pierron, F., Baillon, L., Sow, M., Gotreau, S., Gonzalez, P., 2014. Effect of low-dose cadmium exposure on DNA methylation in the endangered European eel. *Environmental Science and Technology* 48, 797-803.

Pierron, F., Bourret, V., St-Cyr, J., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2009. Transcriptional responses to environmental metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*) collected in lakes with differing environmental metal concentrations (Cd, Cu, Ni). *Ecotoxicology* 18, 620-631.

Rajotte, J.W., Couture, P., 2002. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 1296-1304.

Rajotte, J.W., Couture, P., 2003. Morphometric and metabolic indicators of metal stress in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from Sudbury, Ontario: a review. *Journal of environmental monitoring* 5, 216-221.

Regoli, F., Giuliani, M.E., Benedetti, M., Arukwe, A., 2011. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquatic Toxicology* 105, 56-66.

Richards, E.J., 2006. Inherited epigenetic variation - Revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics* 7, 395-401.

Scandalios, J.G., 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38, 995-1014.

St-Cyr, J., Derome, N., Bernatchez, L., 2008. The transcriptomics of life-history trade-offs in whitefish species pairs (*Coregonus sp.*). *Molecular Ecology* 17, 1850-1870.

Uren Webster, T.M., Bury, N., van Aerle, R., Santos, E.M., 2013. Global transcriptome profiling reveals molecular mechanisms of metal tolerance in a chronically exposed wild population of brown trout. *Environmental Science and Technology* 43, 8869-8877.

Wang, J., Zhang, P., Shen, Q., Wang, Q., Liu, D., 2013. The Effects of Cadmium Exposure on the Oxidative State and Cell Death in the Gill of Freshwater Crab *Sinopotamon henanense*. *PLoS ONE* 8, e64020. Doi: 10.1371/journal.pone.0064020.

CHAPITRE XII : Waterborne cadmium and nickel impact molecular and physiological oxidative stress responses and retinoid metabolism in yellow perch

12. ARTICLE 5

Defo, M.A., Bernatchez, L., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2014. Waterborne cadmium and nickel impact oxidative stress responses and retinoid metabolism in yellow perch. *Aquatic Toxicology* 154, 207-220.

Michel Amery Defo: Conception et réalisation (Pêche et exposition des poissons, analyse de laboratoire, traitement et interprétation des données) du projet et rédaction de l'article.

Louis Bernatchez: Conception du projet et révision de l'article.

Peter C.G. Campbell: Conception du projet et révision de l'article.

Patrice Couture: Conception du projet, pêche des poissons et révision de l'article.

Waterborne cadmium and nickel impact molecular and physiological oxidative stress responses and retinoid metabolism in yellow perch

Michel A. Defo^a, Louis Bernatchez^b, Peter G.C. Campbell^a and Patrice Couture^{a*}

a Institut national de la Recherche scientifique (INRS), Centre Eau Terre Environnement, 490 de la Couronne, Québec, QC, Canada G1K 9A9.

b Institut de Biologie intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Québec, QC, Canada G1V 0A6.

* Corresponding author: e-mail address: patrice.couture@ete.inrs.ca

Telephone 1-418 559 3825, Fax: 1-418 654-2600

LIST OF ABBREVIATIONS USED

ANOVA: Analysis of variance

BHT: Butylated hydroxytoluene

BSA: Bovine serum albumin

CAT: Catalase

CCO: Cytochrome c oxidase

cDNA: Complementary DNA

CDNB: Chloro-2,4-dinitrobenzene

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DPPC: Dipalmitoylphosphatidylcholine

dREH: Dehydroretinyl ester hydrolase

DROH: Dehydroretinol

G6PDH: Glucose-6-phosphate dehydrogenase

GPx: Glutathione peroxidase

GST: Glutathione-S-transferase

HCd: High Cd concentration corresponding to waterborne exposure of fish to 8 µg/L (71 nmol/L) of Cd

HNi: High Ni concentration corresponding to waterborne exposure of fish to 600 µg/L (10200 nmol/L) of Ni

HPLC: High-performance liquid chromatography

Kn: Relative condition index

LARSA: Laboratoire Régional des Sciences Aquatiques

LCd: Low Cd concentration corresponding to waterborne exposure of fish to 0.8 µg/L
(7.0 nmol/L) of Cd

LdRAT: Lecithin dehydroretinyl acyl transferase

LNi: Low Ni concentration corresponding to waterborne exposure of fish to 60 µg/L
(1020 nmol/L) of Ni

LRAT: Lecithin retinyl acyl transferase

LSI: Liver somatic index

MGST: Microsomal glutathione-S-transferase

mgst-3: Microsomal glutathione-S-transferase-3

MTs: Metallothioneins

NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide

PBS: Phosphate saline buffer

RBP: Retinol binding protein

REH: Retinyl ester hydrolase

Rhd-2: Epidermal retinol dehydrogenase 2

ROH: Retinol

ROS: Reactive oxygen species

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction

RQ: Relative quantification

SE: Standard error

SOD: Superoxide dismutase

TCEP: Tris 2- carboxyethyl phosphine

TTR: Transthyretin

ABSTRACT

In this experiment, we studied the transcriptional and functional (enzymatic) responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to metal stress, with a focus on oxidative stress and vitamin A metabolism. Juvenile yellow perch were exposed to two environmentally relevant concentrations of waterborne cadmium (Cd) and nickel (Ni) for a period of six weeks. Kidney Cd and Ni bioaccumulation significantly increased with increasing metal exposure. The major retinoid metabolites analysed in liver and muscle decreased with metal exposure except at high Cd exposure where no variation was reported in liver. A decrease in free plasma dehydroretinol was also observed with metal exposure. In the liver of Cd-exposed fish, both *rhd-2* transcription level and corresponding enzyme activities retinyl ester hydrolase (REH) and lecithin dehydroretinyl acyl transferase (LdRAT) increased. In contrast, muscle *rhd-2* transcription level decreased with Cd exposure. Among antioxidant defences, liver transcription levels of catalase (*cat*), microsomal glutathione-S-transferase-3 (*mgst-3*) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (*g6pdh*) were generally enhanced in Cd-exposed fish and this up-regulation was accompanied by an increase in the activities of corresponding enzymes, except for microsomal glutathione-S-transferase (mGST). No consistent pattern in antioxidant defence responses was observed between molecular and biochemical response when fish were exposed to Ni, suggesting a non-synchronous response of antioxidant defence in fish exposed to waterborne Ni. There was a general lack of consistency between muscle transcription level and enzyme activities analysed. The overall findings from this investigation highlight the usefulness of transcriptional and biochemical endpoints in the identification of oxidative stress and vitamin A metabolism

impairment biomarkers and the potential use of multi-level biological approaches when assessing environmental risk in fish.

Key words: Waterborne Cd and Ni, yellow perch, retinoid metabolism, oxidative stress responses, linking gene transcription to functional responses.

1. INTRODUCTION

Metal pollution is a major environmental hazard affecting the health of freshwater biota. The yellow perch (*Perca flavescens*) is a good candidate as a biomonitor of aquatic metal pollution for several reasons (Giguère et al., 2004b). It is widely distributed across North American freshwater ecosystems and is particularly relevant in metal toxicology studies because it tolerates the presence of metals such as cadmium (Cd) and nickel (Ni) at high concentrations tolerated by few other fish (Hontela et al., 1995; Hontela et al., 1992; Rajotte and Couture, 2003). The bioaccumulation of metals in its tissues reflects local contamination and corroborates its sedentary behaviour (Campbell et al., 2003). Additionally, metal concentrations in yellow perch tissues have been correlated with biological impacts such as metabolic imbalance of vitamin A₂ (Defo et al., 2012b), impairment of metabolic capacities (Couture and Kumar, 2003), poor condition and overall health (Couture et al., 2008b; Rajotte and Couture, 2002a), elevated metallothionein concentration (Giguère et al., 2005a), and reduction in genetic diversity at both neutral and coding regions of the genome (Bourret et al. 2008; Bélanger-Deschênes 2013).

An emerging priority in biomonitoring is to identify relevant biological impacts in sentinel species providing informative elements about the adverse outcomes induced by environmental stressors (Chandurvelan et al., 2013). Effects of contaminants can be assessed at different levels of biological organization, from molecular to community levels (Ankley et al., 2010). To this end, biomarkers describe biochemical, cellular, physiological or behavioural changes that can be measured in cells, tissues or whole organisms as a result of bioaccumulation or effects of toxicant exposure (Depledge et

al., 1995; Tsangaris et al., 2010). Biomarkers can be used as premonitory warning signals of environmental disturbance, by providing the causal link between the presence of toxicants and an ecological effect (Walker et al., 2006).

Fishes are considered to be sensitive to metal-induced oxidative stress (Kubrak et al., 2012; Souid et al., 2013), resulting from an imbalance between the amount of cellular antioxidants and that of reactive oxygen species (ROS) (Defo et al., 2014b; Vertuani et al., 2004). Yet, studies have reported that yellow perch living in metal impacted areas possess efficient biochemical defence mechanisms (Giguère et al., 2005a). Depletion of cellular antioxidants, or an overproduction of ROS, can disturb this equilibrium leading to oxidative stress (Scandalios, 2005), which can lead to an impairment of cellular repair mechanisms (Dorval and Hontela, 2003). Both non-enzymatic antioxidant biomarkers such as vitamin A metabolites and enzymatic antioxidant biomarkers including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) interact together to minimize the damaging effects of ROS in fish (Scandalios, 2005).

As argued by Ankley et al. (2010), linking the responses to chemical interactions at different biological organization levels provides a critical basis for predictive approaches in environmental risk assessment. Cadmium and Ni are both non-essential metals for fish. These metals are known to be toxic at low levels and can cause oxidative stress in aquatic organisms (Kubrak et al., 2013; Vertuani et al., 2004). They can be found in sediments, the water column, and biota at elevated levels as a consequence of anthropogenic activities (Luoma and Rainbow, 2008), such as mining and smelting. In a previous study on yellow perch chronically exposed to metals in the field, we reported a

negative correlation between hepatic Cd concentrations and liver transcription levels of genes encoding for enzymes involved in the metabolism of retinoids (Pierron et al., 2011). Subsequent research showed that the percentage of hepatic free dehydroretinol decreased, suggesting that Cd inhibits the enzymes and the binding proteins involved in retinoid homeostasis (Defo et al., 2012b). Yellow perch from Cd-contaminated lakes had significantly higher concentrations of liver dehydroretinol and dehydroretinyl esters than did fish from reference lakes. To our knowledge, the only other study reporting simultaneous molecular and biochemical responses to metal exposure on antioxidant enzymes in fish is that of Henrik Hansen et al. (2007). Trout (*Salmo trutta*) from an environment with low metal levels were transferred to a polluted river with higher Cd and Zn concentrations for 15 days. Although a significant correlation between Cd accumulation and the transcription level of some antioxidant genes was reported, the changes of enzymes activities and gene transcription levels were inconsistent (Henrik Hansen et al., 2007), suggesting that changes in gene transcription levels do not necessarily lead to modifications in the activity of corresponding enzymes (Giuliani et al., 2013; Regoli et al., 2011).

In our investigation of the mechanisms of toxicity of Cd and Ni in yellow perch, we have identified transcriptional signatures specific to Cd and Ni exposure. The results indicate that Cd and Ni affect the transcription level of genes involved in several metabolic pathways including oxidative stress and vitamin metabolism (Bougas et al., 2013). The general objective of the present study was to investigate at two biological organization levels (molecular and biochemical) the effects of waterborne Cd and Ni exposure on oxidative stress response biomarkers in yellow perch. Our specific objectives were: (i) to

examine changes in liver and muscle transcription levels of a set of toxicologically-relevant genes involved in oxidative stress response in yellow perch exposed to Cd and Ni; and (ii) to compare gene expression levels to corresponding biochemical endpoints (enzyme activities and retinoid storage) in order to determine if metal-induced changes in gene transcription levels lead to significant physiological effects. This study will contribute to a better understanding of the role of perturbations in retinoid metabolism and oxidative stress in chronic metal toxicity.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Fish and maintenance conditions

Juvenile yellow perch were obtained from a private fish supplier (Trois-Rivières, Québec, Canada) between September and October 2011, and transferred to the laboratories at the LARSA (Laboratoire Régional des Sciences Aquatiques) at the Université Laval (Québec). Fish were acclimated in a flow-through holding tank (1 m³) for four weeks with aerated, dechlorinated water kept at 18°C and photoperiod set at 12L/12D. One week prior to the beginning of exposures, fish were randomly selected and transferred to aquaria (40 L), where acclimation continued. Temperature was adjusted to 20°C and oxygen maintained at 100% saturation.

2.2. Experimental treatments

Each exposure group (aquarium) consisted of 15 fish with an average total biomass of 250 g per aquarium. Perch were exposed to low and high Cd and Ni nominal water concentrations as follows: control (0 µg/L), low Cd concentration (LCd, 0.8 µg/L), high Cd concentration (HCd 8 µg/L), low Ni concentration (LNi, 60 µg/L), and high Ni

concentration (HNi, 600 µg/L). Each condition was replicated twice. Low Cd and Ni concentrations represent environmental concentrations respectively found in some lakes in the mining regions of Rouyn-Noranda (Québec, Canada) and Sudbury (Ontario, Canada) (Couture et al., 2008a). The higher concentrations of Cd and Ni were chosen in order to obtain tissue metal concentrations commonly measured in tissues of yellow perch living in contaminated areas. At the beginning of exposures, fish were fed frozen *Artemia salina* daily with a ration of 2% of their body weight, increasing to 3% at the end of exposure. Every week, water metal concentrations were monitored and adjusted as necessary and the exposures were conducted with continuous renewal mode.

2.3. Sampling

After six weeks of exposure, fish in each experimental aquarium were sacrificed and dissected. A total of 30 adult fish were sampled per condition. Length (12.4 ± 1.3 cm) and weight (14.3 ± 4.2 g) were recorded (mean \pm SE) and sex determined. Following the method described in Defo et al. (2012), blood was collected from the dorsal artery of the caudal peduncle using a heparinized needle. After centrifugation, the plasma was immediately frozen on dry ice and stored at -80°C in heparinized tubes until analysis. Livers were dissected and weighed (0.07 ± 0.02 g) for molecular and biochemical analyses. Muscle (molecular and biochemical analyses) as well as kidney (metal analyses) and pyloric cæca (biometric analyses) were also dissected. Tissues were immediately frozen and stored in liquid nitrogen. Tissues were then stored at -80°C until used for analyses. The fish manipulation protocol was approved by Université Laval's Animal Care Committee.

2.4. Calculation of fish condition index (Kn), liver somatic index (LSI) and corrected pyloric cæca weights

The relative condition factor (Kn) was calculated according to the method cited in Defo et al. (2012) using the equation $Kn = (Wf / L^{3.13}) \times 100$ (where “Wf” is fish weight, “L” is the total fish length). Liver somatic index (LSI) was calculated as $(\text{Liver weight}/Wf) \times 100$ (Miller et al., 2009). The corrected pyloric cæca weights were calculated according to the method described in Defo et al. (2012) with 14.3 g as the standard fish weight and 3.0 as the allometric exponent.

2.5. Measurement of metal concentrations in aquarium water and yellow perch kidney

After acidification of unfiltered aquarium water samples (5% ultrapure HNO₃), Cd and Ni analyses were performed on water samples and kidney tissues according to (Defo et al., 2012b), using an inductively coupled-plasma atomic emission spectrophotometry (ICP-AES). Internal standards were within 10% of nominal values in all cases and mean metal recoveries for the reference material analysed (TORT-2, lobster hepatopancreas, National Research Council of Canada, Ottawa, ON) were $88 \pm 2 \%$ for Cd and $75 \pm 5\%$ for Ni (mean \pm S.E.).

2.6. RNA isolation and cDNA synthesis

The analysis of gene transcription levels was performed in accordance with methods and technical standardization procedures listed in (Bustin et al., 2009). According to the manufacturer’s instructions, total RNA from a single perch was extracted from portions of liver and muscle tissue using PureLink™ Micro-to-Midi™ Total RNA Purification

System Mini Kits. Excess collagen fibres and lipids, particularly in muscle tissue, were removed with Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) prior to RNA extraction. To determine the RNA concentration and to ensure the integrity and the quality of RNA, samples were analysed by electrophoresis on a 1% agarose gel and with a NanoDrop spectrophotometer 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE); the ratio (260 nm/280 nm and 260 nm/230 nm) of all homogenates yielded values above 1.8. In order to remove residual genomic DNA, purified RNA was subjected to DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA) treatment according to the manufacturer's instructions. Briefly, a sample of 1 µg RNA was treated with DNase I (1 U/µL) at room temperature. After 30 min, the reaction was stopped by adding 1 µL of EDTA solution (25 mM) and the samples were then heated for 10 min at 65°C and stored at -80°C until reverse transcription analysis. First-strand cDNA was then synthesized from treated total RNA using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, reverse transcription reactions were performed in a total reaction volume of 50 µL containing equal volumes of RT master mix and treated RNA sample. The master mix included 5 µL random primers, 2 µL dNTP, 5 µL RT buffer, 2.5 µL reverse transcriptase and 10.5 µL of nuclease free water. Depending on the RNA concentration, a specific volume of treated RNA (0.5 µg/µL) was diluted with nuclease free water up to final volume of 25 µL. After a brief centrifugation of the plate to spin down the contents and to eliminate air bubbles, amplification reactions were carried out using the following temperature and time profiles: 10 min at 25°C, 120 min at 37°C, 5 min at 85°C, and at 4°C for undefined time. Synthesized cDNA was then stored at -20°C until RT-qPCR analysis.

2.7. Quantitative RT-PCR

Based on published yellow perch cDNA sequences (Bougas et al., 2013), partial coding sequences (primers) used in this study were designed with Primer blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Table 1).

Table 1. Nucleotide sequences of specific partial coding sequence (primer) pairs and PCR products used in RT-qPCR analysis.

Gene abbreviations	Name and functions	Specific primers	PCR products
<i>β-actin</i>	Reference gene	F: 5'- GCCTCTCTGTCCACCTTCCA-3' R: 5'- GGGCCGGACTCATCGTACT-3'	From Pierron et al. (2009)
<i>rhd-2</i>	Photoreceptor associated retinol dehydrogenase 2 (retinoid and antioxidant system)	F: 5'-AGTCAAGCAGTGCATCAACAAT-3' R: 5'- CATGCGAACAACACCAAAGAAG-3'	151
<i>cat</i>	Catalase (antioxidant system)	F: 5'- GTCTTTCTTGTTTCAGCGATCGA-3' R: 5'- GTAGAAACGTTCCACCATCAGCA-3'	106
<i>mgst-3</i>	Microsomal glutathione S transferase-3 (antioxidant system)	F: 5'- CCTTCCTCTACAGCTGGATCAT-3' R: 5'- TGAATACCTGCTCCTTGTCACT-3'	114
<i>g6pdh</i>	Glucose 6 phosphate dehydrogenase (Pentose phosphate pathway and antioxidant system)	F: 5'- ACGAGAGGCTGATATTGGATGT-3' R: 5'- TCCATATGTGTAAGGGATGGGG-3'	146

F: Forward primer ; R: Reverse primer

Real-time qPCR reactions were performed after parameter optimization (cDNA concentration and primer specificity). cDNA from muscle and liver were 2 and 3 fold diluted with nuclease free water respectively. Reactions were performed in triplicate and each well contained a total reaction volume of 12.5 μ L composed of 6.25 μ L of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.25 μ L of specific primer pairs (forward and reverse) at a final concentration of 300 nM, 3.25 μ L of nuclease free water and 2.5 μ L of cDNA. After a quick centrifugation of the plate, the reactions were performed in a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems,

Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions (95°C for 20 sec, followed by 40 cycles of 95°C for 3 sec and 60°C for 30 sec).

The relative quantification (RQ) of the transcription level of each gene of interest was normalized against the transcription level of β -actin, a RT-qPCR relevant reference gene for yellow perch (Pierron et al., 2009; Pierron et al., 2011). To diminish the variability during the analysis, sufficient numbers of biological replicates were used (Bustin et al., 2009).

2.8. Biochemical analysis

2.8.1. Plasma, liver and muscle retinoid analysis

Retinoids were analyzed using a slightly modified version of the protocol used by Defo et al. (2012). Analyses were conducted with minimal light in order to prevent molecule isomerisation. Briefly, 100 μ L of thawed yellow perch plasma were vortexed with an equal volume of ethanol and ultrapure water to achieve protein precipitation and dissociate retinoid–protein complexes. Extraction was achieved by adding 200 μ L of hexane followed by phase separation by centrifugation (13,000g, 10 min). A 160 μ L aliquot of the organic phase was evaporated to dryness under nitrogen (at 50°C). The extract was re-dissolved in 50 μ L of ethanol and a 40- μ L volume was injected for high-performance liquid chromatography (HPLC). Once prepared and prior to analysis, the extracts were held for maximum 24 h at -20°C to minimize retinoid loss.

Partially thawed yellow perch liver (0.01 g) and muscle (0.05 g) were dehydrated by grinding with anhydrous Na_2SO_4 and the resulting powder was extracted with 1000 μ L hexane for 10 min using a rotary mixer. After centrifugation (2000g for 2 min), an 800- μ L

aliquot of the organic phase was transferred to a Pyrex glass tube (15 mL) and evaporated to dryness under nitrogen (at 50°C). The residue was dissolved in 50 µL of acetonitrile and 40 µL samples were collected for HPLC analysis.

2.8.2. High-performance liquid chromatography

All solvents used were HPLC grade. The HPLC system consisted of a Spectra SYSTEM P4000 model pump, a model of Spectra SYSTEM AS3000 injector and a model Spectra SYSTEM UV 2000 detector. Data acquisition and instrument control were achieved with the ChromQuest 5.0 computer program (Thermo Scientific Wilmington, DE). Retinoids were separated on a Bio Basic C-18 analytical column (5 mm particle size, 300 Å pore, 4.6 mm × 250 mm, Thermo Scientific Wilmington, DE). The detector was set at 354 nm, corresponding to the maximum light absorbance of all-trans-3,4-dehydroretinoids, the major retinoids in yellow perch tissues (Defo et al., 2012b). Under isocratic conditions of 90% methanol and 10% water and a flow rate of 1 mL/min plasma dehydroretinol (dROH) and retinol (ROH) eluted at 7.3 min and 8.6 min respectively. Plasma samples were injected every 12 min.

For hepatic retinoids, peak separation occurred under a gradient condition with a flow rate maintained constant at 1 mL/min. The initial mobile phase (acetonitrile/water (90:10)) changed linearly between 9.5 and 12 min to the second mobile phase composed of tetrahydrofuran/methanol/water solvents in the proportions of 36:57:7 respectively. Under these conditions, retention times were dROH 5.7 min, ROH 7.0 min, dROH-myristate 14.7 min, ROH-myristate 15.4 min, dROH-palmitate 16.1 min, ROH-palmitate 16.8 min, dROH-stearate 17.7 and ROH-stearate 18.1 min. Samples could be injected every 25 min after the elution of retinoids and column solvent re-equilibration.

Peak identification was determined by comparing their elution time and their absorption spectra with those of certified standards (ROH and ROH-palmitate) and based on other studies (Defo et al., 2012b; Doyon et al., 1998). For muscle retinoids, HPLC conditions were the same as for the liver, but only dROH and dROH-stearate were eluted. The major retinoids were quantified using a ROH and ROH-palmitate standard curve. Quantification of dROH was reported on the ROH standard curve multiplied by 1.26, a correction factor corresponding to the ratio of extinction coefficients for ROH and dROH (1832/1450). Also, dROH-ester concentrations were calculated with the standard curve of ROH-palmitate multiplied by 1.26 (Doyon et al., 1998). To take into account the overall tissue retinoid storage, the concentrations of individual ROH-esters and DROH-esters were summed. The mean recovery of retinoids was $75.0 \pm 6.5\%$.

2.8.3. Preparation of microsomes

Liver microsomes from single individuals were prepared as described elsewhere with minor modifications (Boily et al., 2005; Ndayibagira and Spear, 1999). Briefly, 0.3 g of tissue was homogenized in 1.2 mL Tris-KCl buffer (0.15 M KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4). The resulting homogenates were centrifuged at 10,000 g for 20 minutes at 4°C followed by an ultracentrifugation of the supernatant at 100,000 g for 60 minutes at 4°C. The pellets were resuspended in 108 µL of sucrose buffer (0.25 M sucrose, 0.15 M KCl, 50 mM Tris, pH 7.0) and stored at -80°C until used for REH and LRAT assays. A 10-µL aliquot of the microsome preparation was immediately used for mGST (microsomal glutathione-S-transferase) activity analysis.

2.8.4. Liver LdRAT (lecithin dehydroretinol acyl transferase) and REH (retinyl ester hydrolase) assays

Prior to analysis, preliminary tests were conducted to optimize pH, incubation time, substrate concentration (dROH and ROH-palmitate) and protein concentration (quantity of microsomes) (data not shown). Liver REH activity was higher in acid conditions (pH=4.2) and optimal after a 45 min incubation. Five μL of ROH palmitate stock solution and 5 μL of microsomes were used to measure REH activity. Liver LdRAT activity was higher in alkaline condition (pH=11) with an incubation time of 60 min. An aliquot of 2.5 μL of dROH combined with 5 μL of microsomes were used to measure LdRAT activity.

For LdRAT analysis, a 250- μM stock solution of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) containing 2.5% of bovine serum albumin (BSA) was prepared in Tris buffer (0.1M, pH 9.0). After sonication on ice for 45 min, the mixture was divided into aliquots and stored at -80°C . Meanwhile a 0.1 mL of a stock solution of dROH (0.1 mg/mL) prepared in hexane was evaporated under nitrogen and re-suspended in 150 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO). A 2.5 μL of aliquot of dROH in DMSO was added to 50 μL of thawed DPPC stock solution and vortexed for 1 minute. The mixture was once more vortexed at room temperature for 1 minute with 137.5 μL of Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 11.0) and pre-incubated at 9°C for 10 minutes. To start the reaction, 5 μL of microsomes (previously thawed and pre-incubated with 2 mM of tris 2- carboxyethyl phosphine (TCEP) for 10 min at room temperature) were added to the mixture, vortexed for 1 min and kept for 60 min in a shaking stirrer placed in an incubator set at 9°C . To stop the reaction, 250 μL of ice-cold ethanol were added to the mixture followed by 1 minute of vortexing. Then 100 μL of distilled water were added and the tube was once more vortexed for 30 s. DROH –palmitate was extracted twice using 800 μL of hexane-butylated hydroxytoluene (BHT) (0.01%) then 1400 μL of the organic phase was

evaporated and resuspended in 50 μ L of acetonitrile containing BHT for HPLC analysis. To correct for endogenous dROH-palmitate, blank incubations without dROH were also analysed.

For REH analysis, 5 μ L of stock solution of ROH-palmitate were prepared in hexane and evaporated under nitrogen gas, then 75 μ L of buffer containing 0.2% Triton X-100, 50 mM Tris, 0.15 M KCl, pH 4.2 were added to the precipitated ROH-palmitate and vortexed for 5 s. The reaction was started by adding 5 μ L of thawed microsomes and the mixture was kept in a shaking stirrer placed in an incubator set at 9°C. After 45 min, the reaction was stopped by adding 250 μ L of ice-cold ethanol. ROH was extracted twice with hexane (1600 μ L) containing 0.01% of BHT, centrifuged and 1400 μ L of supernatant were evaporated under nitrogen. The extract was re-suspended in 50 μ L of ethanol-BHT for HPLC analysis. Parallel samples without microsomes and without ROH-palmitate were analyzed in order to correct for endogenous ROH and potential impurities respectively.

2.8.5. CAT, SOD, G6PDH, total GST, mGST and protein assays

The activities of CAT (EC 1.11.1.6), SOD (EC 1.15.1.1.), G6PDH (EC 1.1.1. 49), and GST (EC 2.5.1.18), as well as protein determinations, were measured in triplicate using a spectrophotometer (Varian 50 Bio) coupled to a microplate reader system. The optimal substrate concentrations as well as sample dilution used in all enzymes activity analyses were determined in preliminary experiments. Partially ice thawed liver and white muscle tissue samples were weighed after rinsing with phosphate saline buffer (PBS), pH 7.4, in order to remove blood and clots. Tissues were then diluted (1:10 tissue-buffer ratios) in a homogenization buffer (HEPES 20 mM, EDTA 1 mM, Triton X-

100 0.1%, pH 7.5) and mechanically mixed on ice with a homogenizer (Ultra Turrax[®] T25; Janke and Kunkel). Samples were then divided into three aliquots. For SOD activity, homogenates were centrifuged at 1,500 g for 5 min at 4°C and for CAT activity the homogenates were centrifuged at 10,000 g for 15 min also at 4°C. After homogenization, supernatants were collected, stored on ice until analysis or frozen at -80°C for a maximum of one month. The remaining homogenates were used for assaying total GST and G6PDH activities as well as total protein determination.

Liver G6PDH was measured at 340 nm under the following conditions: 0.5 mM β -NADH prepared in imidazole buffer (50 mM imidazole, 20 mM MgCl₂, 70 mM KCl, pH 7.5) and 100 mM glucose-6-phosphate (omitted for control). A 10 μ L portion of 100 fold-diluted homogenate was used in this analysis. Liver mGST was measured by adding 6 mM of reduced glutathione (omitted for control) to 2 mM 1-chloro-2, 4 dinitrobenzene (CDNB); for total muscle GST, 1 mM CDNB was used. The reaction was monitored in potassium phosphate buffer (50 mM KH₂PO₄, 50 mM K₂HPO₄, 1 mM EDTA, pH 6.5) for at least 3 min at 340 nm.

Yellow perch tissue CAT activity was determined using Cayman's catalase assay kit (item no. 707002; Ann Arbor, MI, USA). The kit measures at 540 nm the conversion of oxygen peroxide to oxygen and water. A 20 μ L portion of the homogenate was diluted 5000- or 50-fold for liver and muscle CAT analysis, respectively. One unit of CAT activity is the amount of enzyme needed to cause the formation of 1 nmol of formaldehyde/min.

Liver and muscle SOD activities were analysed using Cayman's Superoxide Dismutase assay kit (item no. 706002; Ann Arbor, MI, USA). The kit uses tetrazolium salt to detect

at 440-460 nm the superoxide radicals generated by the xanthine oxidase and hypoxanthine reaction; 10 μ L of 1000- and 50-fold diluted liver homogenate were used for liver and muscle SOD analysis, respectively. SOD activity is expressed as U/mg protein, where one unit represent the amount of enzyme needed to exhibit 50% dismutation of the superoxide radical.

The total protein content of each homogenate was determined using BSA as a standard.

2.9. Data analysis

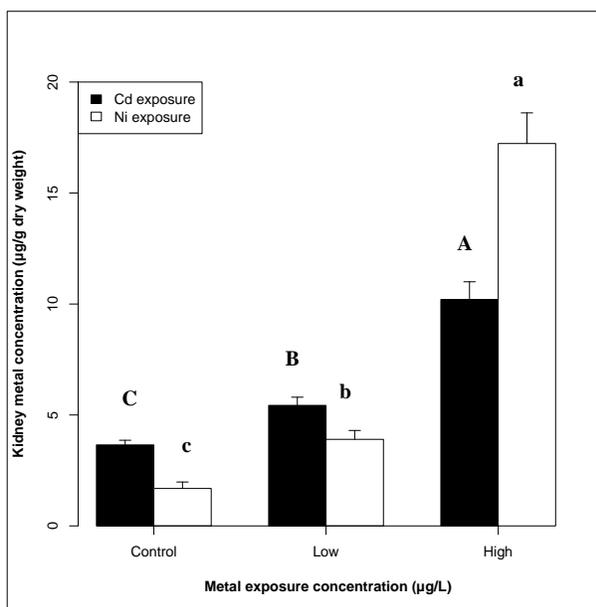
Results were expressed as means \pm standard error (SE). Differences in biometric parameters, metal concentrations, gene transcription levels, enzyme activities analysis and vitamin A levels among experimental conditions were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), after checking the assumption of normality (Levene test, $p > 0.05$). When the probability was significant ($p < 0.05$), multiple comparison tests were used to identify differences between two conditions. When the assumption of normality was not met, and no transformation of data using \log_{10} or Box-Cox (Peltier et al., 1998) was effective to normalize the distribution, non-parametric paired Wilcoxon tests were applied. For vitamin A determination, statistical analyses were performed without considering sex as an explanatory variable. A probability of $p < 0.05$ indicates a statistically significant difference from the control experiment condition. Computations were performed using JMP 9.0 program.

3. RESULTS

3.1. Metal concentrations in aquarium water and yellow perch kidney

Aqueous metal concentrations measured in aquarium water were very close to targeted nominal concentrations except for high Cd, where the measured concentration was half of the nominal concentration, likely due to adsorption on filters and aquarium glass. Measured aqueous metal concentrations (N=6; mean \pm SE) for each condition were: control (0 $\mu\text{g/L}$), low Cd concentration (LCd, $0.86 \pm 0.09 \mu\text{g/L}$), high Cd concentration (HCd $3.65 \pm 0.21 \mu\text{g/L}$), low Ni concentration (LNi, $68.5 \pm 6.8 \mu\text{g/L}$), and high Ni concentration (HNi, $542 \pm 16 \mu\text{g/L}$). After 6 weeks of metal exposure, kidney Cd concentration had significantly increased with increasing Cd exposure (Fig. 1).

Figure 1. Total metal concentrations in yellow perch kidney after 6 weeks Cd or Ni exposure. Low and High categories refer to exposure concentrations (see Section 3.1). Values are means \pm SE ($27 \leq N \leq 30/\text{condition}$). Means designated with different letters for a given metal exposure are significantly different ($p\text{-value} < 0.05$). Capital letters represent comparisons among Cd exposures and control, and lowercase letters indicate comparison among Ni exposures and control.



Renal Cd concentrations varied from 3.7 to 10.2 $\mu\text{g/g dry weight}$ (32 to 91 nmol/g) in controls and HCd, groups, respectively (Figure 1). Renal Ni concentrations also showed a clear concentration gradient among the conditions and varied from 1.69 to 17.2 $\mu\text{g/g dry weight}$ (29 to 294 nmol/g) in controls and HNi groups, respectively.

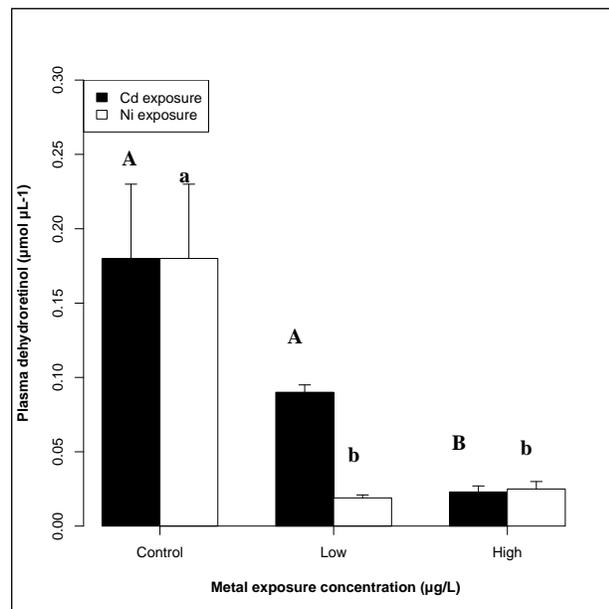
3.2. Biometric parameters

Exposure to low or high aqueous Ni or Cd concentrations did not affect Kn, LSI or corrected pyloric caeca weight (data not shown).

3.3. Plasma, liver and muscle retinoid levels

Unsurprisingly, HPLC analysis revealed that all-trans-3,4-didehydroretinoids (vitamin A₂) are the predominant form of vitamin A in yellow perch plasma, liver and muscle. Total dROH concentrations in plasma extracts of fish exposed to both Cd and Ni decreased at the end of exposure (Figure 2).

Figure 2. Plasma dehydroretinol concentrations in yellow perch sampled after 6 weeks waterborne exposure to Cd or Ni. Low and High categories refer to exposure concentrations (see Section 3.1). Bars indicate means and standard errors (SE). Bars that do not share a common letter in the same metal exposure test are significantly different (p -value < 0.05). Capital letters represent comparison among Cd exposure and control, and lowercase letters indicate comparison among Ni exposure and control. The same control fish was used to compare exposure to Cd and exposure to Ni.



Compared to control fish, the concentration of plasma dROH in fish exposed to low and high Ni was significantly lower ($p < 0.05$). However for Cd-exposed fish, such a decrease was only significant for fish exposed to the high concentration. Also as expected, the major vitamin A₂ stored in yellow perch liver was dROH palmitate, with lesser amounts of ROH palmitate, dROH myristate, ROH myristate, dROH stearate and ROH stearate (Table 2).

Table 2. Liver vitamin A concentrations ($\eta\text{mol/g}$ liver wet weight; mean \pm SE) determined in yellow perch ($6 \leq N \leq 8/\text{condition}$) sampled after 6 weeks waterborne exposure to Cd or Ni. Values within a row and designated with different letters are significantly different ($p\text{-value} < 0.05$). Capital letters represent comparisons among Cd exposures and control and lowercase letters indicate comparisons among Ni exposures and control. Abbreviations in column headings and exposure conditions are listed in the abbreviation list.

Exposure conditions	Free Retinol (ROH)	Free dehydroretinol (dROH)	ROH-palmitate	ROH-myristate	ROH-stearate	dROH-palmitate	dROH-myristate	dROH-stearate	Total vitamin A esters	Free ROH (%)	Free dROH (%)
Control	$0.91 \pm 0.23^{\text{Aa}}$	$479.7 \pm 2.5^{\text{Aa}}$	$24.7 \pm 8.3^{\text{Aa}}$	$163.8 \pm 2.5^{\text{Aa}}$	$12.5 \pm 3.6^{\text{Aa}}$	$1012.6 \pm 316.3^{\text{Aa}}$	$391.3 \pm 117.9^{\text{Aa}}$	$97.3 \pm 30.9^{\text{Aa}}$	$1702.2 \pm 511.3^{\text{Aa}}$	$0.7 \pm 0.2^{\text{Cc}}$	$35.0 \pm 9.5^{\text{Aa}}$
LCd	$0.36 \pm 0.11^{\text{B}}$	$27.3 \pm 14.7^{\text{B}}$	$2.2 \pm 1.0^{\text{B}}$	$23.4 \pm 12.0^{\text{B}}$	$1.65 \pm 0.9^{\text{B}}$	$65.6 \pm 40.9^{\text{B}}$	$46.2 \pm 22.1^{\text{B}}$	$10.2 \pm 4.5^{\text{B}}$	$138.3 \pm 65.7^{\text{B}}$	$5.3 \pm 2.5^{\text{A}}$	$21.0 \pm 5.2^{\text{A}}$
HCd	$0.70 \pm 0.08^{\text{AB}}$	$337.5 \pm 86.6^{\text{A}}$	$16.2 \pm 11.4^{\text{A}}$	$106.0 \pm 62.8^{\text{A}}$	$7.2 \pm 3.8^{\text{A}}$	$647.8 \pm 428.0^{\text{A}}$	$250.4 \pm 138.3^{\text{A}}$	$65.0 \pm 41.3^{\text{A}}$	$1092.6 \pm 685.2^{\text{A}}$	$1.7 \pm 0.5^{\text{B}}$	$40.2 \pm 7.5^{\text{A}}$
LNi	$0.30 \pm 0.10^{\text{b}}$	$65.7 \pm 22.4^{\text{b}}$	$5.9 \pm 2.6^{\text{b}}$	$47.9 \pm 22.4^{\text{b}}$	$5.0 \pm 2.5^{\text{b}}$	$377.0 \pm 215.5^{\text{b}}$	$162.2 \pm 89.6^{\text{a}}$	$37.8 \pm 21.8^{\text{a}}$	$635.8 \pm 352.8^{\text{a}}$	$1.4 \pm 0.5^{\text{b}}$	$20.7 \pm 6.4^{\text{a}}$
HNi	$0.60 \pm 0.10^{\text{ab}}$	$37.6 \pm 27.8^{\text{b}}$	$1.32 \pm 0.50^{\text{c}}$	$8.6 \pm 4.0^{\text{c}}$	$0.6 \pm 0.4^{\text{c}}$	$56.6 \pm 25.8^{\text{c}}$	$29.0 \pm 12.8^{\text{b}}$	$6.4 \pm 2.9^{\text{b}}$	$102.5 \pm 44.9^{\text{b}}$	$9.7 \pm 2.9^{\text{a}}$	$22.9 \pm 5.7^{\text{a}}$

Liver concentrations of specific free (i.e. unesterified) dROH, dehydroretinyl esters, and total vitamin A esters generally differed significantly between metal-exposed and control fish. Fish exposed to Ni and Cd exhibited a reduction in liver dehydroretinyl ester concentrations compared to control fish. However the reduction was not significant in fish exposed to high Cd (Table 2). For example, the concentrations of dROH palmitate were 15.4-, 2.7-, 1.5- and 17.9 times lower in fish from LCd, LNi, HCd and HNi, respectively, compared to control fish. The same trend was observed for retinyl esters stored in liver. For example, concentrations of ROH palmitate were 11-, 4-, 1.5- and 18.7 times lower, respectively, in fish from LCd, LNi, HCd and HNi, respectively, compared to control fish (Table 2).

Concentrations of the free form of vitamin A in liver for both ROH and dROH decreased in metal-exposed fish, although the decrease was only significant in fish exposed to the low Cd and Ni concentrations, except for free dROH in HNi fish which was higher compared to controls (Table 2). Interestingly, the percentage of free ROH increased in metal-exposed fish. The increase was 7.6-, 2-, 2.4- and 13.8 times greater than the control, for LCd, LNi, HCd and HNi exposures respectively (Table 2). However the percentage of free dROH remained unaffected by either Cd exposure or Ni exposures when compared to the control fish (Table 2).

Analysis of muscle extracts revealed that the major component of esterified retinoids was dROH stearate (Table 3). The dROH stearate tended to decrease with metal exposure, although the decrease was not significant in high Ni exposed fish. The concentration of dROH, the free form of retinoids found in muscle, was also lower in fish exposed to metals. However the reduction was only significant in fish exposed to the

higher metal concentrations (Table 3). The percentage of muscle free dROH decreased in HNi fish. In contrast, the percentage of muscle free dROH increased in Cd-exposed fish, although the increase was not significant in the HCd group (Table 3).

3.4. Effects of metals on liver REH and LdRAT enzyme activities

Figure 3 illustrates the effects of metal exposure on REH (Fig. 3A) and LdRAT activities (Fig. 3B). No measurable effect of Ni on liver REH and LdRAT activities was detected for either level of exposure. However a significant increase in liver REH and LdRAT activities was observed in fish exposed to high Cd at the end of exposure. The increase ($p < 0.005$) was 3- and 3.5-fold greater for the hydrolysing (REH) and the esterification (LdRAT) activities, respectively.

3.5. Effects of metals on the transcription level of the gene involved in retinoid metabolism (*rhd-2*)

The liver *rhd-2* transcription level was higher in fish exposed to Cd at both concentrations (Fig. 4A). In contrast to the observations for liver, the muscle *rhd-2* transcription level decreased with increasing Cd concentrations (Table 3). Indeed, liver and muscle *rhd-2* transcription levels were inversely correlated to kidney Cd concentrations after 6 weeks (data not show).

Table 3. Muscle mean \pm SE gene transcription level of *cat*, *mgst-3*, *g6pdh* and *rhd-2*; enzyme activities of CAT, SOD and GST; retinoid concentration of dROH, dROH-stearate and percentage of free dROH of yellow perch ($6 \leq N \leq 8$ /condition) sampled after 6 weeks exposure to Cd or Ni. Means designated with different letters within a row are significantly different (p-value < 0.05). Capital letters represent comparisons among Cd exposures and control and lowercase letters indicate comparisons among Ni exposures and control. Abbreviations in column headings and exposure conditions are listed in the abbreviation list.

Exposure Conditions	Transcription level [#]				Enzyme activities			Retinoid metabolism		
	<i>cat</i>	<i>mgst-3</i>	<i>g6pdh</i>	<i>rhd-2</i>	CAT [♯]	SOD [♯]	GST [♯]	dROH [*]	dROH-stearate [*]	Free dROH (%)
Control	2.1 \pm 0.2 ^{Aa}	2.2 \pm 0.2 ^{Aa}	0.8 \pm 0.3 ^{Ba}	5.9 \pm 0.5 ^A	0.0150 \pm 0.0070 ^{Ba}	16.9 \pm 4.8 ^{Ab}	0.0140 \pm 0.0050 ^{Aa}	0.032 \pm 0.008 ^{Aa}	0.077 \pm 0.009 ^{Aa}	28.1 \pm 2.9 ^{Ba}
LCd	2.4 \pm 0.2 ^A	1.7 \pm 0.1 ^A	1.6 \pm 0.3 ^A	3.2 \pm 0.3 ^B	0.0300 \pm 0.0200 ^A	13.4 \pm 3.3 ^A	0.0070 \pm 0.0010 ^{AB}	0.026 \pm 0.002 ^A	0.047 \pm 0.004 ^B	35.8 \pm 3.1 ^A
HCd	2.0 \pm 0.2 ^A	2.1 \pm 0.3 ^A	0.5 \pm 0.2 ^B	2.6 \pm 0.3 ^B	0.0020 \pm 0.0003 ^B	23.9 \pm 4.1 ^A	0.0057 \pm 0.0004 ^B	0.022 \pm 0.003 ^B	0.055 \pm 0.005 ^B	28.6 \pm 3.0 ^{AB}
LNi	1.7 \pm 0.3 ^a	1.8 \pm 0.1 ^a	0.4 \pm 0.1 ^a	-	0.0013 \pm 0.0004 ^b	51.6 \pm 11.9 ^a	0.0090 \pm 0.0010 ^a	0.025 \pm 0.003 ^a	0.055 \pm 0.005 ^b	31.5 \pm 2.0 ^a
HNi	1.9 \pm 0.3 ^a	2.1 \pm 0.4 ^a	0.7 \pm 0.2 ^a	-	0.0060 \pm 0.0003 ^b	183.3 \pm 104.9 ^a	0.0071 \pm 0.0007 ^a	0.021 \pm 0.003 ^b	0.070 \pm 0.009 ^a	23.6 \pm 1.7 ^b

[#]Expressed in relative quantification (RQ)

[♯] Expressed in U mg protein⁻¹

[♯] Expressed in U g protein⁻¹

^{*} Expressed in η mol/g muscle wet weight

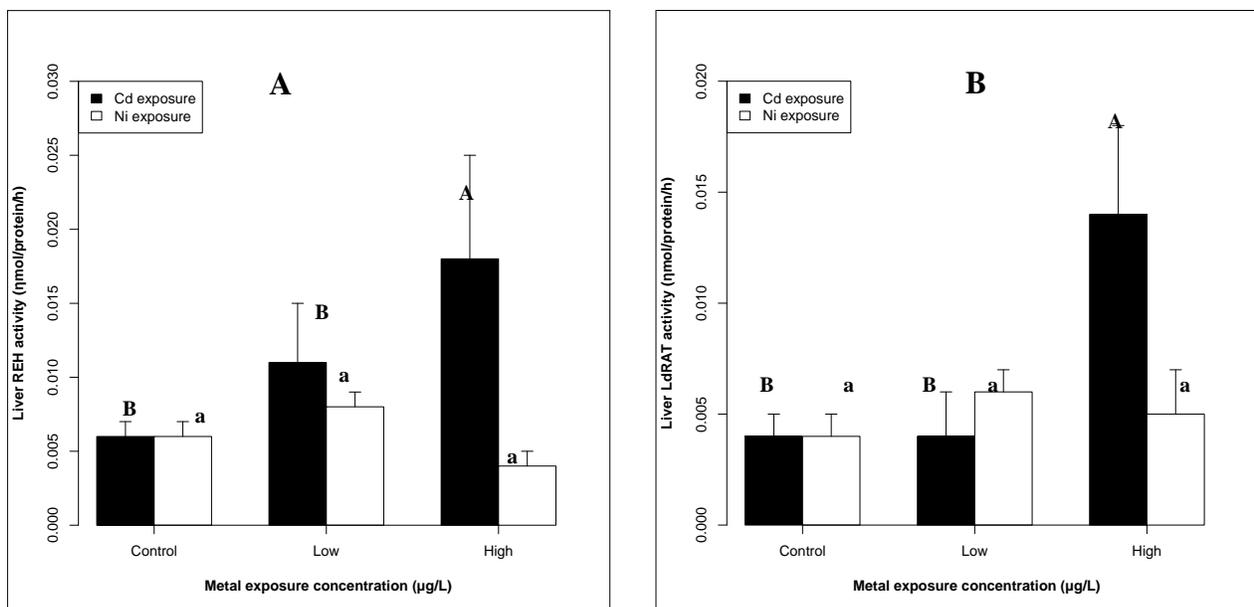


Figure 3. Liver enzyme activities of REH, retinyl ester hydrolase (A), LdRAT, lecithine dehydroretinol acyl transferase (B) after 6 weeks yellow perch exposure to metal. Low and High categories refer to exposure concentrations (see Section 3.1). Each bar represents the mean \pm SE of two separate experiments. Values indicated with different letters within same metal exposure are significantly different (p -value < 0.05). Capital letters represent comparison among Cd exposure and control, and lowercase letters indicate comparison among Ni exposure and control. The same control fish was used to compare exposure to Cd and exposure to Ni.

3.6. Effects of metals on molecular biomarkers of oxidative stress

Liver *g6pdh* transcription levels were significantly higher in fish exposed to both metals compared to controls, except for fish exposed to low Cd concentration (Fig. 4B). Muscle *g6pdh* transcription levels increased in fish exposed to low Cd but no change was observed in fish exposed to high Cd compared to controls (Table 3). In contrast, exposure to Ni did not affect the transcription level of muscle *g6pdh* (Table 3). The same increasing trend was observed in *mgst-3* transcription levels (Fig. 4C) and *cat* transcription levels (Fig. 4D) in livers of fish exposed to Cd and Ni compared to the control fish. In contrast to the observation for livers, there were no differences in mean muscle *mgst-3* and *cat* transcription levels among all conditions for both metals (Table 3).

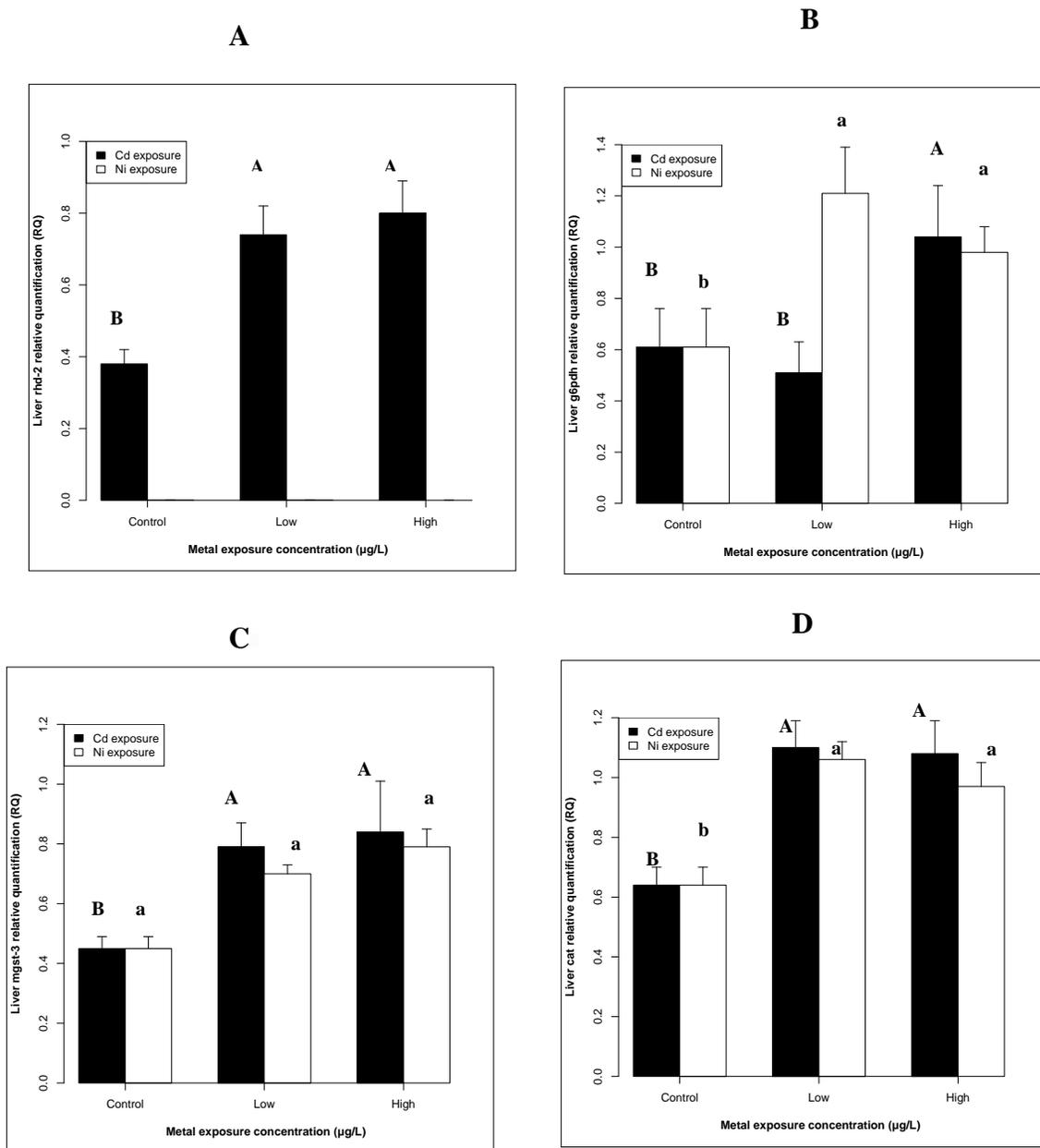


Figure 4. Liver relative transcription level of *rhd-2* (A), *g6pdh* (B), *mgst-3* (C) and *cat* (D) after 6 weeks yellow perch exposure to metal. Low and High categories refer to exposure concentrations (see Section 3.1). Each bar graph represents the mean \pm SE of two separate experiments. Values indicated with different letters within same metal exposure are significantly different (p -value < 0.05). Capital letters represent comparison among Cd exposure and control, and lowercase letters indicate comparison among Ni exposure and control. The same control fish was used to compare exposure to Cd and exposure to Ni.

3.7. Effects of metals on enzyme activities and oxidative stress biomarkers

Liver SOD activity did not increase significantly as a consequence of metal exposure (Fig. 5A).

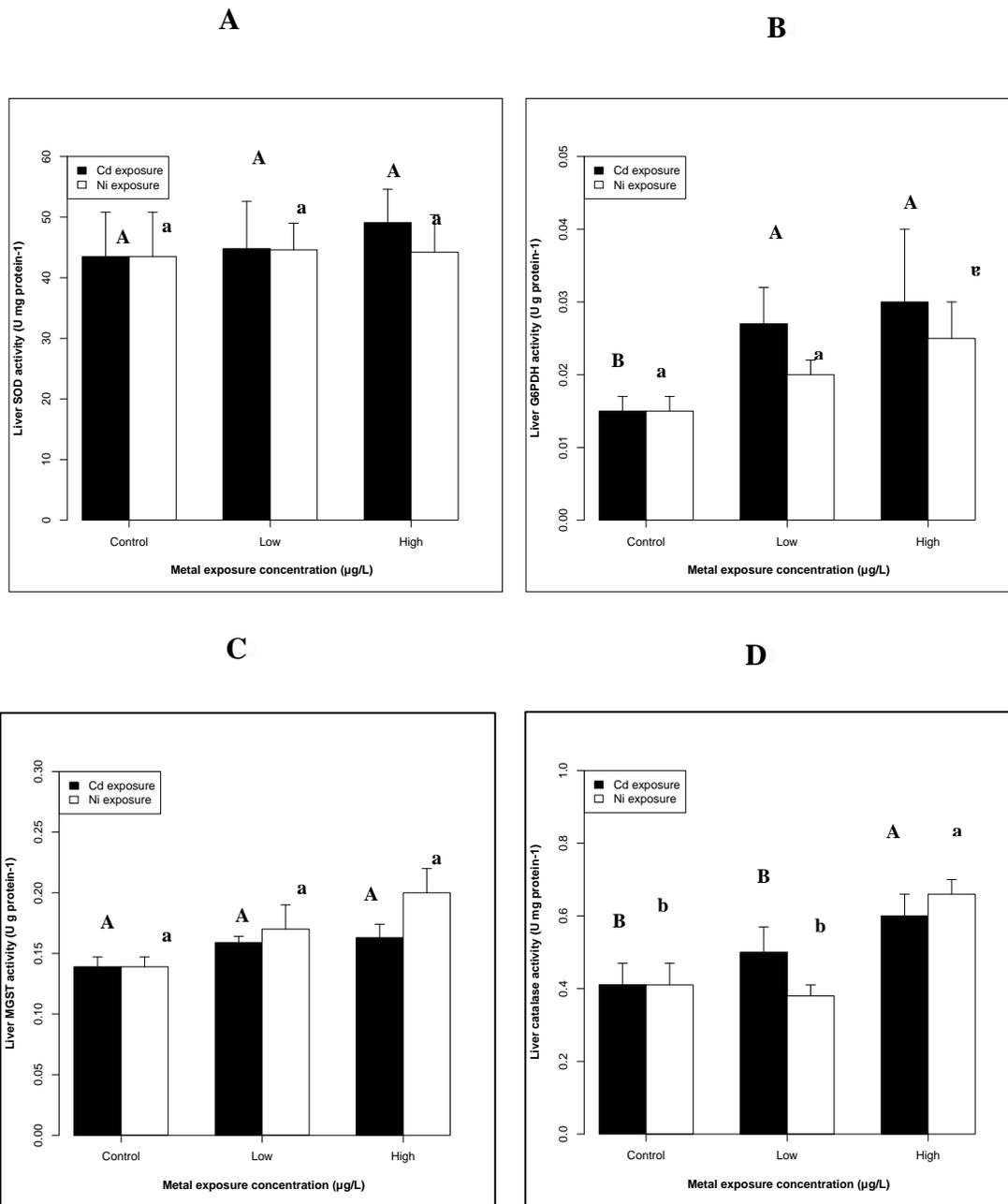


Figure 5. Liver enzyme activities of SOD (A), G6PDH (B), MGST (C) and CAT (D) after 6 weeks yellow perch exposure to metal. Low and High categories refer to exposure concentrations (see Section 3.1). Each bar represents the mean \pm SE of two separate experiments. Values indicated with different letters within same metal exposure are significantly different (p -value < 0.05). Capital letters represent comparison among Cd exposure and control, and lowercase letters indicate comparison among Ni exposure and control. The same control fish was used to compare exposure to Cd and exposure to Ni.

The activity of liver G6PDH was significantly higher in fish exposed to Cd either at low (2- fold) or high (1.66-fold) concentrations, relative to the control. In contrast, no effect of Ni exposure was detected in the activity of this enzyme when fish were exposed at

either Ni concentration (Fig. 5B).). Also liver MGST activity did not increase significantly as a consequence of metal exposure (Fig. 5C), but significant differences in liver CAT activity were found in yellow perch exposed at high concentrations of both Cd and Ni. The increase in CAT activity was 1.46- and 1.61-fold, for HCd and HNi groups, respectively, compared to controls (Fig. 5D).

Muscle CAT activity increased at the low Cd concentration but no changes were observed at the higher Cd concentration relative to the control. In contrast to Cd exposure, fish exposed to Ni at either low or high concentrations displayed lower muscle CAT activity compared to the control fish (Table 3). Muscle SOD activity of yellow perch exposed to Cd remained unaffected by Cd, but fish exposed to Ni had consistently higher muscle SOD activity compared to the control fish (Table 3). In contrast to muscle SOD activities, muscle total GST activity was lower in high Cd exposed fish, and there were no differences in muscle GST activity in fish exposed to Ni compared to the control fish (Table 3).

4. DISCUSSION

Our experimental conditions induced an accumulation of both cadmium and nickel in the kidney of our test fish. Although in this study we could not measure metal concentrations in the liver, since other analyses were prioritized for this tissue, kidney and liver metal concentrations have been shown in several studies to be well correlated in wild yellow perch (Couture et al., 2008a; Kraemer et al., 2005a, b). In our experiment, in fish exposed to the higher metal concentrations, the renal metal concentrations were

comparable to Cd values (Bourret et al., 2008; Kraemer et al., 2006a) and Ni values (Giguère et al., 2006; Iles and Rasmussen, 2005b) reported in the kidney tissues of wild yellow perch from metal-contaminated lakes.

4.1. Effects of metal contamination on tissue retinoid metabolites

Liver represents the major site of retinoid storage, with REs (esterified retinoids) representing the main stored form. In the present study, hepatic retinoid concentrations decreased after metal exposure, suggesting that waterborne Cd and Ni exposure negatively impacted yellow perch liver retinoid metabolism. This result contrasts with our previous studies where we reported positive correlations between kidney Cd concentrations and liver dehydroretinoids (free and esterified form) in fish inhabiting metal impacted lakes (Defo et al., 2012b). The discrepancy between these studies could be due to the interactions of multiple stressors found in the natural environment (for example diet quality and availability) or individual biometric parameters such as fish sex, size and age, that probably affected retinoid metabolism (Defo et al., 2014b). An alternative hypothesis is that, in contrast to the metal-naïve laboratory fish used here, wild yellow perch may have developed adaptive mechanisms enabling them to live in polluted areas, as recently shown at the genome level (Bélanger-Deschênes et al., 2013).

Low liver dROH concentrations observed in fish exposed to metals could reflect the general circulation levels. The low concentrations of plasma dROH in Cd- and Ni-exposed perch compared to controls suggest that these metals inhibit the synthesis of carrier proteins such as retinol binding p (RBP) and/or transthyretin (TTR), or interfere with the ability of dROH to bind to RBP. Metals may also inhibit the ability of the dROH-

RBP complex to bind to TTR, which protects this complex against degradation during its transfer to extra-hepatic cells (Berry et al., 2012). Interestingly, we have previously reported (Pierron et al., 2011) an increase in the transcription level of the gene encoding for TTR in wild yellow perch populations living in Cd-impacted areas, suggesting a compensatory mechanism aimed at counteracting the effect of Cd in the degradation of dROH-RBP complexes or accelerating the blood clearance rates of dROH. Alternately, the imbalance of yellow perch plasma dROH in metal-impacted environments could occur *via* competitive interactions between trace metals and those carrier proteins. Increasing blood Pb concentrations were also associated with the mobilization (decrease) of plasma retinol in coots (*Fulica atra*) and pochard (*Aythya ferina*) (Martinez-Haro et al., 2011). Taken together, these studies suggest that contaminants affect plasma dROH regulation, but the influences of confounding environmental stressors and adaptation to chronic exposure remain to be clearly identified. Nevertheless, in our experiment, none of the biometric endpoints analysed (Kn, HSI and corrected pyloric caeca weight) varied among the exposure conditions, implying that nutritional status did not influence the reported differences in tissue vitamin A concentrations. Finally, our study clearly demonstrates that Cd and Ni interfered with tissue retinoid metabolism in yellow perch.

Liver retinyl esters are hydrolysed to retinol, which is the form available to be transported to extra-hepatic tissues or target cells by binding to RBP and TTR (Defo et al., 2014b). Surprisingly, in our study only dROH-stearate was found as an esterified form of vitamin A in muscle. As was the case for the liver, muscle retinoid (dROH and dROH-stearate) concentrations decreased after high metal exposure. Our data suggest

that waterborne Cd and Ni negatively impact yellow perch muscle retinoid metabolism and that dROH-stearate is main storage form of dehydroretinyl esters in this tissue.

4.2. Effects of Cd and Ni on tissue retinoid metabolism and oxidative stress biomarkers

4.2.1. Liver

The role of retinoids in the protection against metal-induced oxidative stress was recently reviewed (Defo et al., 2014b). In the present study, exposure to elevated aqueous Cd concentrations caused an increase in liver REH activity, combined with a higher percentage of free liver ROH and an up-regulation of the transcription level of the epidermal retinol dehydrogenase 2 (*rhd-2*) gene, encoding for the synthesis of enzymes involved in the oxidation of retinol to retinaldehyde for retinoic acid biosynthesis (Lee et al., 2009). An up-regulation of this gene coupled with high REH activity indicates a synchronous reaction at the molecular and biochemical levels in order to accelerate retinol synthesis. This reaction suggests a compensatory mechanism aimed at counteracting the direct effects of Cd induced oxidative stress. In contrast, our microarray did not reveal any change in the transcription level of genes involved in retinoid metabolism when yellow perch were exposed to Ni at either low or high concentrations (Bougas et al., 2013). This finding agrees with the absence of effects of this metal on liver REH activity, although the percentage of liver free ROH was higher in fish exposed to the higher Ni concentration. Higher liver REH activity or the higher percentage of ROH suggests a high conversion or hydrolysis of retinyl palmitate to retinol, potentially in order to fight against oxidative stress induced by high metal concentrations (Defo et al., 2012b).

LdRAT transforms dehydroretinol into dehydroretinyl esters, and the activity of this enzyme serves as an indicator of the dehydroretinoid metabolic pathway. Studies using ROH as substrate reported negative effects of agricultural practices on LRAT activity in frogs (Boily et al., 2009) and of organic pollutants in fish (Ndayibagira and Spear, 1999). However, to our knowledge, this is the first study using dROH as substrate to examine the effects of metals on the enzymes involved in retinoid esterification in vertebrates. Our observation that HCd but not HNi exposure increased liver LdRAT activity suggests a higher conversion of dROH to dROH-palmitate, potentially to fight against oxidative stress induced by high metal concentrations, and that the stimulation of LdRAT activity is metal-specific.

Consistent with our hypothesis that higher enzyme (REH and LdRAT) activities and up-regulation of the *rhd-2* gene afforded an increased protection against metal-induced oxidative stress, we observed an increase in the activities of enzymes and in gene transcription levels of a set of toxicologically-relevant biomarkers traditionally involved in liver oxidative stress response. Probably, our Cd exposure conditions were beginning to exceed the capacities of antioxidants involving retinoid metabolites, since free and esterified forms of retinoids decreased along with an increase of other biomarkers of oxidative stress (G6PDH, GST, CAT, SOD). Specifically, yellow perch treated with Cd and Ni displayed high transcription levels of liver *g6pdh* and this up-regulation translated into an increase in liver G6PDH activity, presumably in order to bring the level of ROS generated by metal-exposed fish down to that of unexposed fish. G6PDH is an enzyme involved in lipid and pentose phosphate pathways, which has been used as an oxidative stress biomarker in studies examining the effects of numerous environmental stressors

including metals (Cartañá et al., 1992; Regoli et al., 2011). This enzyme regulates the response of glutathione to chemical exposure by influencing the biosynthesis of NADPH, which in turn serves as a reducing equivalent in glutathione reductase activity (Giguère et al., 2005a; Regoli et al., 2011). Our findings agree with those of Kubrak et al. (2013), who reported an increase in G6PDH activity in gills of goldfish (*Carassius auratus*), after laboratory exposure to different Ni concentrations. Previous reports in which the European eel (*Anguilla anguilla*) was chronically exposed to a cocktail of pollutants, including Cd and Ni at different concentrations, indicated an increase in liver and gill *g6pdh* transcription level when fish were exposed to moderately polluted sediment (Regoli et al., 2011). However, a down-regulation of this gene was observed in the liver of fish exposed to highly polluted sediment (Regoli et al., 2011).

Gene transcription for liver *mgst-3* was upregulated in Cd-exposed fish. However, the increase that we observed in mGST activity was not significant. It is known that GST contributes to cell detoxification by favouring excretion of ROS-containing reactive electrophilic centres (Elia et al., 2006). Our data suggest that at least at the transcription level, an increased protection is achieved at the metal concentrations used in this study. This protection also occurs *via* the glutathione metabolism (Kowara et al., 2005). A recent study reported an increase in gill GST activity after Ni exposure in goldfish (Kubrak et al., 2013). Regoli et al. (2011) also reported an increase in liver GST activity when eels were exposed to either moderately or highly polluted sediments compared to the control group. However, this increase in enzyme activity was preceded by an increase of liver *gst pi* transcription level, a gene encoding for one of the multiple *gst* isoforms (Espinoza et al., 2012), only in fish exposed to the moderately contaminated

sediment (Regoli et al., 2011). In a laboratory experiment, (Hoarau et al., 2006) showed that Cd concentration induced *gst pi* transcription level whereas it did not affect the GST activity in the digestive gland of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). We are not aware of a toxicological study other than ours where microsomal GST activity was measured.

In our study, we observed a high transcriptional level of liver *cat* in fish exposed to metals, and this up-regulation was translated into an increase in liver CAT activity in fish exposed to high Cd and Ni. These findings are not surprising since earlier studies have shown that catalase belongs to the first line of oxidative stress defence (Serpil Mişer Yonar, 2013). High levels of this antioxidant contribute to the neutralization of ROS generated by metal exposure (Hsu et al., 2013; Uren Webster et al., 2013). Our results are also in line with those of Kwong (2011) who reported an increase in the transcriptional level of antioxidant genes after fish were exposed to dietary Cd (Kwong et al., 2011), and with those of Regoli et al. (2011) who reported an increase in liver and gill *cat* transcription levels when European eels were exposed to highly polluted sediment. However, in contrast with our study, they respectively observed either a decrease or no change in liver and gill CAT activities (Regoli et al., 2011).

4.2.2. Muscle

A significant increase in the percentage of muscle dROH was observed in fish exposed to the lower Cd concentration, while a decrease was observed in fish exposed to the higher Ni concentration. These results suggest that the enzymes (LdRAT for Cd exposure and dREH for Ni exposure) involved in muscle vitamin A₂ homeostasis were inhibited by the presence of Cd and Ni respectively and indicate that these two metals might have different modes of action on muscle dehydroretinoid metabolism. Recently,

we proposed a mechanism of metal toxicity involving liver retinoid metabolic pathways in vertebrates, and resulting in alteration of retinoid homeostasis by metals occurring *via* the breakdown of hepatic enzymes involved in the hydrolysis of retinyl esters or in the esterification of retinol (Defo et al., 2012b; Defo et al., 2014b). The finding presented here also supports this hypothesis in yellow perch muscle.

In contrast to the responses of the liver, muscle CAT and GST activities decreased or remained unchanged with metal exposure, except at low cadmium concentrations, where the activities increased. This result is not counterintuitive as the literature suggests that a decrease in CAT activity is often compensated by enhancements in other antioxidant enzyme activities such as GPx, as an alternative mechanism for ROS removal (Regoli et al., 2011). A decrease in CAT activity was reported in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) kidney after Cd exposure (Romeo et al., 2000). Such a decrease in CAT and GST activities also corroborates the findings of Ahmad et al. (2006), who observed same response after exposure of European eel (*Anguilla. anguilla*) to a cocktail of environmental pollutants including metals. Although Cd and Ni promote oxidative stress (Hsu et al., 2013; Kubrak et al., 2013), these results suggest that different mechanisms predominate for the clean-up of ROS generated by metals in muscle compared to other tissues. Metallothioneins (MTs) are non-enzymatic and cysteine-rich proteins known to have high affinity for ROS and to contribute in the cellular detoxification of metals (Amiard et al., 2006; Viarengo et al., 2000). MTs could thus participate in the cellular antioxidant defence system (Uren Webster et al., 2013). Studies also suggest that the action of MTs depends on the tissue analysed (De Smet et al., 2001). In support of this hypothesis, we found a slight up-regulation in muscle

mts-1 of fish exposed to metals, although the differences were not statistically significant compared to the control (data not shown).

Another plausible explanation for the decrease or absence of changes in muscle biomarkers for metal-induced oxidative stress is that after their uptake, metals are largely directly transported to organs with high detoxification capacities, such as the liver and kidney. The low accumulation of metals in muscle compared to other tissues, reported previously for yellow perch (Rajotte and Couture, 2002a), suggests that muscle may be less susceptible to oxidative stress or may have a reduced need for antioxidant response systems. In agreement with this, we found no evidence of effects in the muscles of metal-contaminated fish, such as impairment of muscle aerobic capacity (*cco-1* transcription level, and CCO activity) or anaerobic capacity (LDH activity; data not shown). Again, our results differ from studies of wild yellow perch where metal contamination has repeatedly been reported to impair muscle metabolic capacities (Couture and Kumar, 2003).

In contrast to the liver, which is known to be the first organ to counteract oxidative challenge caused by chemical stressors in fish (Benedetti et al., 2007), responses of muscle to oxidative stressors are more variable. Here, muscle CAT activity decreased with both high and low Ni exposure and increased under conditions of low Cd exposure, while the *cat* gene transcription level remained unchanged. On the other hand, muscle GST activities decreased with Cd exposure but did not vary with Ni exposure, whereas gene transcription (*mgst-3*) levels remained unchanged when fish were exposed to either metal. Increases in antioxidant enzyme activity are the typical response in the presence of ROS in the cell. However a decrease in these activities with metal exposure

illustrates the fact that the activities of such enzymes are altered as a consequence of metal exposure (Benedetti et al., 2009). The responses obtained in yellow perch muscle are not unprecedented because in oxidative stress pathways a variety of different effects of pollutants on gene transcription levels and subsequent effects at the biochemical level have been observed, such as concomitant reduction or enhancement other variation trend in opposite direction. Each situation is time and concentration of exposure dependent (Canesi et al., 2008) and also depends on the protein pre-existing pool.

4.3. Implications of transcriptional changes on functional responses

4.3.1. Liver

For liver retinoid metabolism, there was good agreement between transcriptional and functional responses in fish exposed to the higher Cd concentration, e.g. increase *in rdh-2* transcription level was followed by higher REH activity. However, at the lower Cd concentration, REH and LdRAT activities did not increase although there was an up-regulation of the *rdh-2* gene. Translational responses typically follow transcriptional responses (Nikinmaa and Rytönen, 2011). However, since both processes are under the control of multiple regulation steps, this is not always the case (Regoli et al., 2011). Furthermore, the relationship between both responses depends on several parameters including tissue, mode of exposure, concentration of stress factor, transcription factor activation, gene specificity and substrate relationship (Nikinmaa and Rytönen, 2011; Regoli et al., 2011). We are not aware of any study that has reported simultaneous effects of metals on vitamin A metabolism at both the transcriptional and translational levels in fish. Although the genes analysed in this study are not directly involved in the

synthesis of the enzymes we examined, they belong to the same metabolic pathways. Thus our findings suggest that at high Cd concentrations, regulation is likely to occur at both levels, but at low Cd concentration regulation of transcription is sufficient to maintain enzyme activity. The results also suggest that the intensity of exposure is likely to influence the regulation of enzyme activity (Regoli et al., 2011), with slower regulation at low Cd and rapid regulation at high Cd. This result contrasts with our previous field studies where we observed a down-regulation of *rdh-2* gene in yellow perch chronically exposed to Cd (Pierron et al., 2011) and a decrease in the percentage of liver free dROH (Defo et al., 2012b). Furthermore, confounding effects of environmental stressors to which wild fish are subjected can influence the transcriptional and translational responses (Nikinmaa et al., 2013).

Inconsistent relationships between gene transcription level and biochemical endpoint responses for traditional oxidative stress biomarkers have frequently been observed in studies carried out with different fish species exposed to different class of pollutants (Bilbao et al., 2010; Craig et al., 2007; Jin et al., 2010) and these responses vary according to the tissue analysed (Regoli et al., 2011). In relation to other oxidative stress biomarkers, our results generally show good agreement between gene transcription levels and corresponding catalytic activity. For example, gene transcription for liver catalase was up-regulated and followed by an increase in enzyme activity after 6 weeks of exposure to both metals at least for high metal exposure. Optimal protection against oxidative stress is achieved by an appropriate balance among antioxidant defence enzymes, which work cooperatively or synergistically (Bagnyukova et al., 2006; Michiels et al., 1994). Also, in the present study, gene transcription for liver *mgst-3* and

g6pdh were up-regulated followed by an absence and increase in the activities of mGST and G6PDH respectively were reported in fish exposed to Cd. Unlike in prokaryotic cells where transcription is coupled to translation, there is different temporal relationship between transcription and translation in eukaryotic cells; therefore it is not surprising that gene transcription levels of some antioxidants increase while no change is observed at the biochemical level (Giuliani et al., 2013).

4.3.2. Muscle

Cadmium induced changes in the transcriptional level of muscle *rdh-2* gene. However at the biochemical level, variation trends in opposite direction in the percentage of dROH were noticed. For example, muscle *rdh-2* was markedly down-regulated after Cd exposure, whereas an increase in the percentage of dROH, at least for LCd, was observed. To our knowledge this is the first study that reports metal impacts on fish muscle dehydroretinoid metabolism. Our results suggest that *rdh-2* transcription level was down-regulated probably in order to activate the inhibition of dehydroretinoic acid synthesis, leading to muscle accumulation of dROH. This result also suggests a delay between muscle transcription and translation (Regoli et al., 2011).

5. CONCLUSIONS

Our results clearly indicate that Cd and Ni exposure affected indicators of retinoid metabolism and oxidative stress. Waterborne Cd or Ni exposure led to increased kidney metal concentrations and a decrease in plasma, liver and muscle vitamin A metabolites. Liver antioxidant defence biomarkers were elevated in Cd-impacted fish, indicating a

synchronous defence response against Cd-induced oxidative stress. However, no consistent pattern in antioxidant defence responses was observed between molecular and biochemical biomarkers when fish were exposed to Ni, suggesting a non-synchronous response of antioxidant defence in fish exposed to waterborne Ni. In contrast to what we observed in the liver, changes in gene transcription levels in muscle in response to metal exposure were not closely matched by the activities of corresponding enzymes, suggesting a lower susceptibility of this tissue to oxidative stress.

Data collected in this study provide insights into mechanisms used by yellow perch to fight against oxidative stress induced by metal accumulation. These mechanisms involve both well-established responses to oxidative stress and novel responses involving retinoid metabolism. Our approach combining examination of both transcriptomic and biochemical endpoints highlights the benefits of multi-level approaches in the identification of strategies used by fish to fight metal-induced oxidative stress in environmental risk assessment. While liver biochemical responses provide functional information, transcriptional change appears to be more sensitive to metal contamination, supporting their use as additional and complementary biomarkers of effects and exposure, respectively.

6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge the contributions of the LARSA and INRS-ETE support staff without whom this study could not have been completed, in particular

Marie Christine Dion, Serge Higgins and Jean-Christophe Therrien for their help during fish rearing, and Stéfane Prémont, Stéphane Moise and Anissa Bensadoune for their technical assistance in metal and retinoid analyses. We wish to thank Guillaume Côté for his kind assistance in optimizing RT-PCR parameters. We are grateful to all members of the yellow perch project in the Couture laboratory, in particular Bérénice Bougas for her help during fish sampling and primer sequence design. Finally we wish to acknowledge Philip Spear and Monique Boily for their advice during the optimization of the LdRAT and REH analyses. This study is part of a Collaborative Research and Development project to P. Couture funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, Ottawa, ON, Canada) and by Vale Limited (Rio de Janeiro, Brazil). The Canada Research Chair program supports P.G.C. Campbell and L. Bernatchez.

7. REFERENCES

Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2006. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosphere* 65, 952-962.

Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76, 160-202.

Ankley, G.T., Bennet, R.S., Erickson, R.J., Hoff, D.J., Hornung, M.w., Johnson, R.D., Mount, D.R., Nichols, J.W., Russom, C.L., Schmieder, P.K., Serrano, J.A., Tietge, J.E.,

Villeneuve, L., 2010. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 730-741.

Bagnyukova, T.V., Chahrak, O.I., Lushchak, V.I., 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stressors. *Aquatic Toxicology* 78, 325-331.

Bélanger-Deschênes, S., Couture, P., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., 2013. Evolutionary change driven by metal exposure as revealed by coding SNP genome scan in wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Ecotoxicology* 22, 938-957.

Benedetti, M., Fattorini, D., Martuccio, G., Nigro, M., Regoli, F., 2009. Interactions between trace metals (Cu, Hg, Ni, Pb) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*: oxidative effects on biotransformation pathway. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 818-825.

Benedetti, M., Martuccio, G., Fattorini, D., Canapa, A., Barucca, M., Nigro, M., Regoli, F., 2007. Oxidative and modulatory effects of trace metals on metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Aquatic Toxicology* 85, 167-175.

Berry, D.C., Croniger, C.M., Ghyselinck, N.B., Noy, N., 2012. Transthyretin blocks retinol uptake and cell signaling by the holo-retinol-binding protein receptor STRA6. *Molecular and Cellular Biology* 32, 3851-3859.

Bilbao, E., Raingeard, D., de Cerio, O.D., Ortiz-Zarragoitia, M., Ruiz, P., Izagirre, U., Orbea, A., Marigomez, I., Cajaraville, M.P., Cancio, I., 2010. Effects of exposure to prestige-like heavy fuel oil and to perfluorooctane sulfonate on conventional biomarkers and target gene transcription in the thicklip grey mullet *Chelon labrosus*. *Aquatic Toxicology* 98, 282–296.

Boily, M., Thibodeau, J., Bisson, M., 2009. Retinoid metabolism (LRAT, REH) in the liver and plasma retinoids of bullfrog, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural contamination. *Aquatic Toxicology* 91, 118-125.

Boily, M.H., Bérubé, V.E., Spear, P.A., DeBlois, C., Dassylva, N., 2005. Hepatic retinoids of bullfrogs in relation to agricultural pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 1099-1106.

Bougas, B., Normandeau, E., Pierron, F., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2013. How does exposure to nickel and cadmium affect the transcriptome of yellow perch (*Perca flavescens*) - Results from a 1000 candidate-gene microarray. *Aquatic Toxicology* 142-143, 355-364.

Bourret, V., Couture, P., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., 2008. Evolutionary ecotoxicology of wild yellow perch (*Perca flavescens*) populations chronically exposed to a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 86, 76-90.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The

MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments *Clinical Chemistry* 55, 611- 622.

Campbell, P.G.C., Hontela, A., Rasmussen, J.B., Giguère, A., Gravel, A., Kraemer, L., Kovescs, J., Lacroix, A., Levesque, H., Sherwood, G., 2003. Differentiating between direct (physiological) and food-chain mediated (bioenergetic) effects on fish in metal-impacted lakes. *Human and Ecological Risk Assessment*. 9, 847-866.

Canesi, L., Borghi, C., Ciacci, C., Fabbri, R., Lorusso, L.C., Vergani, L., Marcomini, A., Poiana, G., 2008. Short-term effects of environmentally relevant concentrations of EDC mixtures on *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. *Aquatic Toxicology* 87, 272-279.

Cartañá, J., Romeu, A., Arola, L.L., 1992. Effect of copper, cadmium and nickel on liver and kidney glutathione redox cycle of rats (*Rattus sp.*). *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C* 101, 209-213.

Chandurvelan, R., Marsden, I.D., Gaw, S., Glover, C.N., 2013. Waterborne cadmium impacts immunocytotoxic and cytogenotoxic endpoints in green-lipped mussel, *Perna canaliculus*. *Aquatic Toxicology* 142-143, 283-293.

Couture, P., Busby, P., Gauthier, C., Rajotte, J.W., Pyle, G.G., 2008a. Seasonal and regional variations of metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. I. Factors influencing tissue metal concentrations. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 97-125.

Couture, P., Kumar, P.R., 2003. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology* 64, 107-120.

Couture, P., Rajotte, J.W., Pyle, G.G., 2008b. Seasonal and regional variations in metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. III. Energetic and physiological indicators. *Human and Ecological Risk Assessment* 14, 146-165.

Craig, P.M., Wood, C.M., McClelland, G.B., 2007. Oxidative stress response and gene expression with acute zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 293, R1882-R1892.

De Smet, H., De Wachter, B., Lobinski, R., Blust, B., 2001. Dynamics of (Cd,Zn)-metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Aquatic Toxicology* 52, 269-281.

Defo, M.A., Pierron, F., Spear, P.A., Bernatchez, L., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2012. Evidence for metabolic imbalance of vitamin A₂ in wild fish chronically exposed to metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 85, 88-95.

Defo, M.A., Spear, P.A., Couture, P., 2014. Consequences of metal exposure on retinoid metabolism in vertebrates: A review. *Toxicology Letters* 225, 1-11.

Depledge, M.H., Aagaard, A., Györkös, P., 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin* 31, 19-27.

Dorval, J., Hontela, A., 2003. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 192, 191-200.

Doyon, C., Boileau, S., Fortin, R., Spear, P.A., 1998. Rapid HPLC analysis of retinoids and dehydroretinoids stored in fish liver: Comparison of two lake sturgeon populations. *Journal of Fish Biology* 53, 973-986.

Elia, A.C., Anastasi, V., Drr, A.J.M., 2006. Hepatic antioxidant enzymes and total glutathione of *Cyprinus carpio* exposed to three disinfectants, chlorine dioxide, sodium hypochlorite and peracetic acid for superficial water potabilization. *Chemosphere* 64, 1633-1641.

Espinoza, H.M., Williams, C.R., Gallagher, E.P., 2012. Effect of cadmium on glutathione-S-transferase and metallothionein gene expression in coho salmon liver, gill and olfactory tissues. *Aquatic Toxicology* 110-111, 37-44.

Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., Cossu-Leguille, C., 2005. Metal bioaccumulation and oxidative stress in yellow perch (*Perca flavescens*) collected from eight lakes along a metal contamination gradient (Cd, Cu, Zn, Ni). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62, 563-577.

Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., Couture, P., 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 77, 178-189.

Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., McDonald, D.G., Rasmussen, J.B., 2004. Influence of lake chemistry and fish age on cadmium, copper, and zinc concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 61, 1702-1716.

Giuliani, M.E., Benedetti, M., Arukwe, A., Regoli, F., 2013. Transcriptional and catalytic responses of antioxidant and biotransformation pathways in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to chemical mixtures. Aquatic Toxicology 134-135, 120-127.

Henrik Hansen, B., Rømme, S., Garmo, Ø.A., Pedersen, S.A., Olsvik, P.A., Andersen, R.A., 2007. Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*). Chemosphere 67, 2241-2249.

Hoarau, P., Damiens, G., Roméo, M., Gnassia-Barelli, M., Bebianno, M.J., 2006. Cloning and expression of a GST-pi gene in *Mytilus galloprovincialis*. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution. Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology 143, 196-203.

Hontela, A., Dumont, P., Duclos, D., Fortin, R., 1995. Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence River. Environmental Toxicology and Chemistry 14, 725-731.

Hontela, A., Rasmussen, J.B., Audet, C., Chevalier, G., 1992. Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and mercury. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 22, 278-283.

Hsu, T., Huang, K.M., Tsai, H.T., Sung, S.T., Ho, T.N., 2013. Cadmium(Cd)-induced oxidative stress down-regulates the gene expression of DNA mismatch recognition proteins MutS homolog 2 (MSH2) and MSH6 in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology* 126, 9-16.

Iles, A.C., Rasmussen, J.B., 2005. Indirect effects of metal contamination on energetics of yellow perch (*Perca flavescens*) resulting from food web simplification. *Freshwater Biology* 50, 976-992.

Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., Liu, W., Fu, Z., 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 78, 846-852.

Kowara, R., Karaczyn, A., Cheng, R.Y.S., Salnikow, K., Kasprzak, K.S., 2005. Microarray analysis of altered gene expression in murine fibroblasts transformed by nickel(II) to nickel(II)-resistant malignant phenotype. *Toxicology and Applied Pharmacology* 205, 1-10.

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., 2005a. Dynamics of Cd, Cu and Zn accumulation in organs and sub-cellular fractions in field transplanted juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Environmental Pollution* 138, 324-337.

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., 2005b. A field study examining metal elimination kinetics in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology* 75, 108-126.

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., 2006. Seasonal variations in hepatic Cd and Cu concentrations and in the sub-cellular distribution of these metals in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Environmental Pollution* 142, 313-325.

Kubrak, O.I., Husak, V.V., Rovenko, B.M., Poigner, H., Kriews, M., Abele, D., Lushchak, V.I., 2013. Antioxidant system efficiently protects goldfish gills from Ni²⁺-induced oxidative stress. *Chemosphere* 90.

Kubrak, O.I., Husak, V.V., Rovenko, B.M., Poigner, H., Mazepa, M.A., Kriews, M., Abele, D., Lushchak, V.I., 2012. Tissue specificity in nickel uptake and induction of oxidative stress in kidney and spleen of goldfish *Carassius auratus*, exposed to waterborne nickel. *Aquatic Toxicology* 118-119, 88-96.

Kwong, R.W.M., Andres, J.A., Niyogi, S., 2011. Effects of dietary cadmium exposure on tissue-specific cadmium accumulation, iron status and expression of iron-handling and stress-inducible genes in rainbow trout: Influence of elevated dietary iron. *Aquatic Toxicology* 102, 1-9.

Lee, S.A., Belyaeva, O.V., Kedishvili, N.Y., 2009. Biochemical characterization of human epidermal retinol dehydrogenase 2. *Chemico-Biological Interactions* 178, 182-187.

Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2008. Trace metal bioaccumulation, Metal contamination in aquatic environments: science and lateral management. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 126-168.

Martinez-Haro, M., Green, A.J., Mateo, R., 2011. Effects of lead exposure on oxidative stress biomarkers and plasma biochemistry in water birds in the field. *Environmental Research* 111, 530-538.

Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J., 1994. Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 17, 235-248.

Miller, L.L., Rasmussen, J.B., Palace, V.P., Hontela, A., 2009. The physiological stress response and oxidative stress biomarkers in rainbow trout and brook trout from selenium-impacted streams in a coal mining region. *Journal of Applied Toxicology* 29, 681-688.

Ndayibagira, A., Spear, P.A., 1999. Esterification and hydrolysis of vitamin A in the liver of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the influence of a coplanar polychlorinated biphenyl. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 122, 317-325.

Nikinmaa, M., McCairns, R.J., Nikinmaa, M.W., Vuori, K.A., Kanerva, M., Leinonen, T., Primmer, C.R., Merilä, J., Leder, E.H., 2013. Transcription and redox enzyme activities: comparison of equilibrium and disequilibrium levels in the three-spined stickleback. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 280, 20122974.

Nikinmaa, M., Rytönen, K.T., 2011. Functional genomics in aquatic toxicology-Do not forget the function. *Aquatic Toxicology* 105, 16-24.

Peltier, M.R., Wilcox, C.J., Sharp, D.C., 1998. Technical note: application of the Box-Cox data transformation to animal science experiments. *Journal of Animal Sciences* 76, 847-849.

Pierron, F., Bourret, V., St-Cyr, J., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2009. Transcriptional responses to environmental metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*) collected in lakes with differing environmental metal concentrations (Cd, Cu, Ni). *Ecotoxicology* 18, 620-631.

Pierron, F., Normandeau, E., Defo, M.A., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2011. Effects of chronic metal exposure on wild fish populations revealed by high-throughput cDNA sequencing. *Ecotoxicology* 20, 1388-1399.

Rajotte, J.W., Couture, P., 2002. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 1296-1304.

Rajotte, J.W., Couture, P., 2003. Morphometric and metabolic indicators of metal stress in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from Sudbury, Ontario: a review. *Journal of Environmental Monitoring* 5, 216-221.

Regoli, F., Giuliani, M.E., Benedetti, M., Arukwe, A., 2011. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquatic Toxicology* 105, 56-66.

Romeo, M., Bennani, M., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girard, J.P., 2000. Cadmium and copper display different response towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology* 48, 185-194.

Scandalios, J.G., 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38, 995-1014.

Serpil Mişer Yonar, 2013. Toxic effects of malathion in carp, *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of lycopene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 97, 223-229.

Souid, G., Souayed, N., Yaktiti, F., Maaroufi, K., 2013. Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 89, 1-7.

Tsangaris, C., Kormas, K., Strogyloudi, E., Hatzianestis, I., Neofitou, C., Andral, B., Galgani, F., 2010. Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 151, 369-378.

Uren Webster, T.M., Bury, N., van Aerle, R., Santos, E.M., 2013. Global transcriptome profiling reveals molecular mechanisms of metal tolerance in a chronically exposed wild population of brown trout. *Environmental Science and Technology* 43, 8869-8877.

Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S., 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: An overview. *Current Pharmaceutical Design* 10, 1677-1694.

Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cellular and Molecular Biology* 46, 407-417.

Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 2006. *Principles of Ecotoxicology*. CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Raton.

PARTIE III : ANNEXE

ANNEXE A

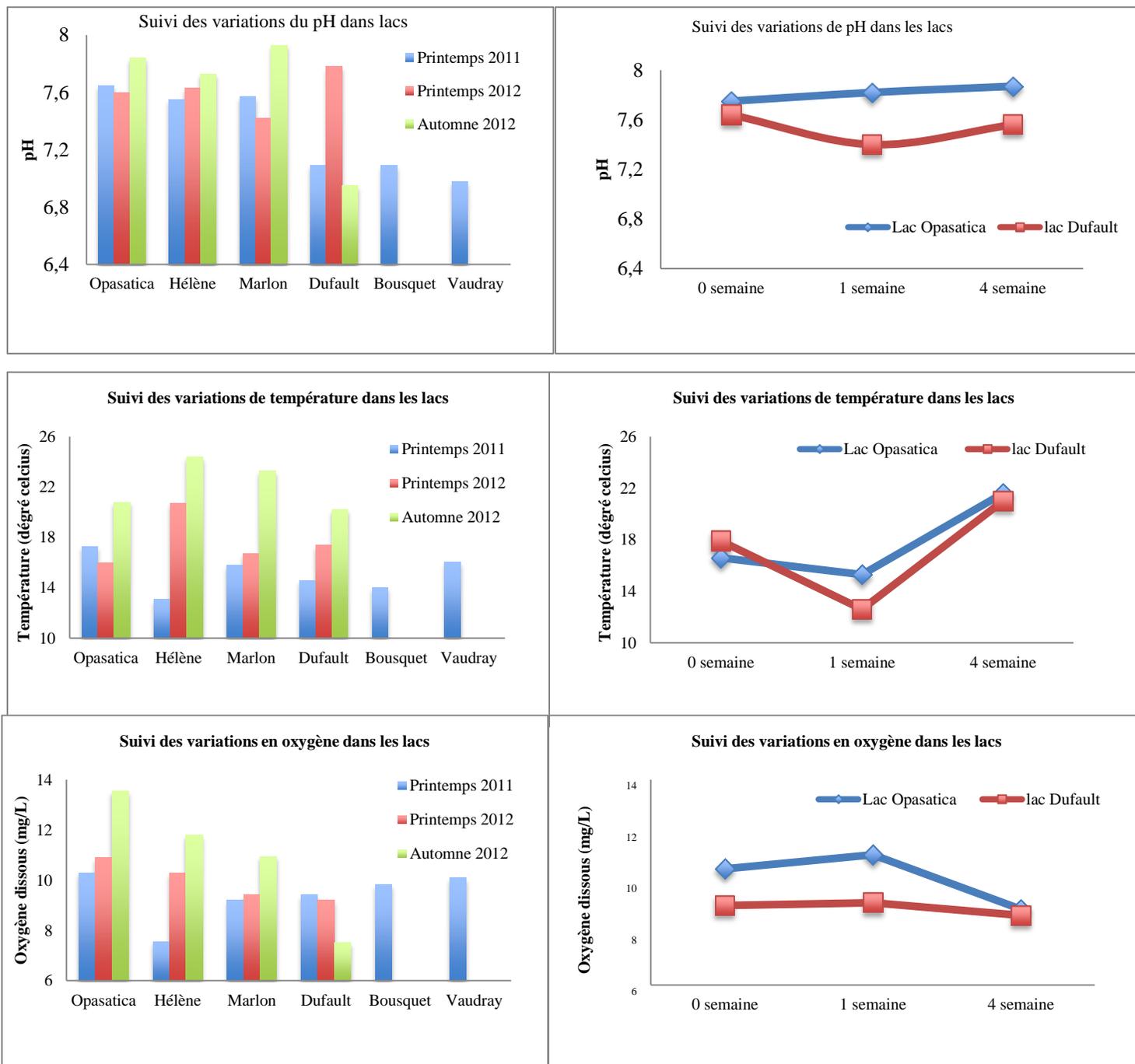


Figure 1 : Suivi des paramètres physicochimiques dans les échantillonnages de gradient (section de gauche) et dans l'expérimentation de transplantation (section de droite).

ANNEXE B

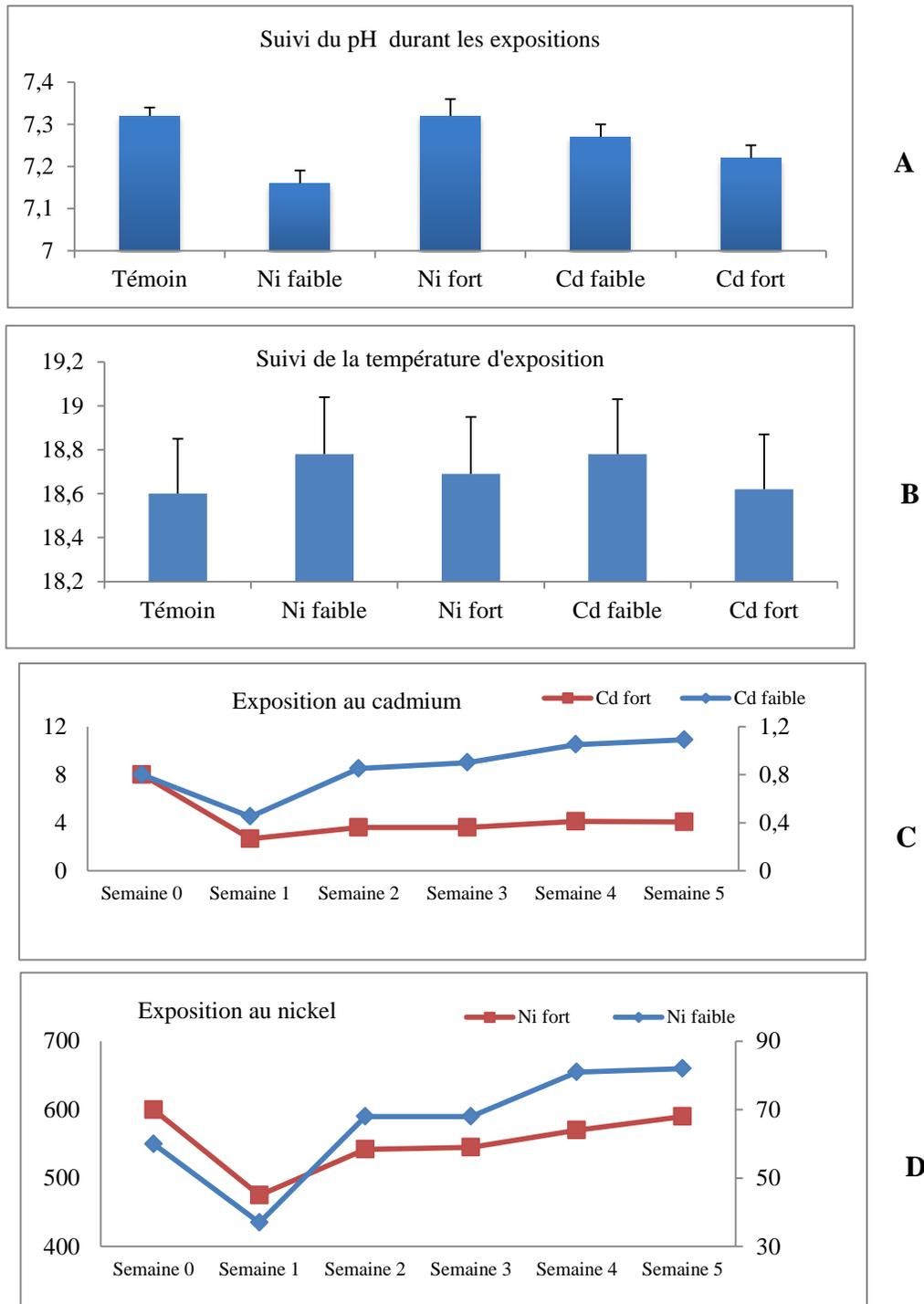


Figure 2 : Suivi du pH (A), de la température (B) et des concentrations ($\mu\text{g/L}$), de Cd (C) et de Ni (D) contenus dans les aquariums durant la phase d'exposition. Sur chacun des graphiques C et D, le côté gauche de l'axe des ordonnées représente les valeurs de l'exposition à la forte concentration alors que le côté droit représente celles de l'exposition à la faible concentration métallique.

ANNEXE C

Principe et méthode de dosage des métaux à l'ICP-MS et l'ICP-AES

Contrairement à l'ICP-AES, instrument utilisé pour quantifier simultanément les éléments présents à des doses relativement élevées comme le Zn, l'ICP-MS, en plus de faire une lecture simultanée des éléments à l'état de traces dans une solution aqueuse, est plus sensible et permet de doser à l'échelle du $\mu\text{g/L}$. La technique de l'ICP-MS repose sur la séparation, l'identification et la détermination de la concentration des éléments présents dans un échantillon en fonction de leur masse et de leur charge. Le système d'introduction de l'échantillon constitué d'une pompe péristaltique aspire l'échantillon jusqu'à la chambre de vaporisation pour le fragmenter en fines gouttelettes. En présence de l'argon cet échantillon est nébulisé puis conduit au centre du plasma où il règne de très hautes températures de l'ordre de $6000\text{-}8000^\circ\text{C}$ où il est atomisé et ionisé. Par la suite, une séparation selon le rapport masse/charge est rendu possible grâce à une interface composée de deux cônes de Ni et d'une série de lentilles permettant de stopper les photons et de diriger les ions jusqu'au quadripôle pour leur séparation. La détection s'effectue grâce à un multiplicateur d'électrons qui analyse le faisceau ionique. L'ensemble du système est connecté à une interface numérique informatisée. La méthode d'analyse à l'ICP-AES se différencie de l'ICP-MS au niveau de la séparation. En effet, les électrons des atomes ayant subi une excitation vont retourner à l'état fondamental en émettant un photon dont l'énergie d'une certaine longueur d'onde est spécifique de l'élément.

Afin de s'affranchir des biais de teneur en eau due par exemple à la congélation des échantillons, nous avons passé les tissus dans un lyophilisateur (appareil Dura-Top et Dura-Dry de la marque FTS SYSTEMSTM) pendant une durée de 3 jours minimum dans le but d'obtenir le poids sec de chaque échantillon à analyser. Étant donné que le dosage des métaux se fait en milieu liquide, nous avons par la suite digéré sous la hotte et à température ambiante, les

échantillons de tissus secs en milieu acide concentré (HNO_3 68-70 % grade « métal trace ») dans les tubes Eppendorf durant 48 h. Les digestats obtenus étaient subséquemment traités pendant 24 h au peroxyde d'hydrogène puis dilués avec de l'eau ultra-pure (MilliQ, Millipore®) et enfin stockés à 4°C jusqu'à l'analyse à l'ICP-MS/AES. Le volume d'acide et de peroxyde utilisé était fonction de la masse d'échantillons à analyser pour avoir une solution de 10 % HNO_3 à la fin. En pratique, pour 1 mg d'échantillon (poids sec) on ajoute 100 μL d'acide nitrique et 40 μL de peroxyde d'hydrogène et on complète à 1 mL avec de l'eau. Afin de vérifier la justesse et la reproductibilité de notre méthode, 8 échantillons certifiés (TORT-2 : hépatopancréas de homard fournis par le CNRC (Conseil National de Recherche du Canada)) ainsi que 4 blancs (acide pur, témoin d'une éventuelle contamination métallique) ont subi le même traitement que les échantillons biologiques. De plus les échantillons d'eau d'exposition des poissons au laboratoire et acidifiés à 5 % ont aussi été analysés.

Les calculs des différentes concentrations des métaux analysés sont faits en se basant sur les courbes d'étalonnage. Plusieurs corrections sont appliquées afin d'avoir les valeurs qui reflètent les concentrations réelles. Les différentes corrections portent sur les interférences potentielles telles celles liées à la formation d'oxydes et sur la soustraction des valeurs obtenues des blancs, celles-ci pouvant être dues à la contamination des réactifs du matériel utilisé ou bien du système d'analyse lui-même. Les valeurs des blancs étaient en général négligeables par rapport aux valeurs obtenues pour chacun des métaux et pour chaque individu. Par exemple, pour l'analyse des métaux de l'année 2011, les pourcentages de correction par rapport aux blancs étaient respectivement de 0,2 %, 5%, 0% et 0,2% pour le Cd, le Cu, le Ni et le Zn. La limite de détection de la méthode était calculée en multipliant 3 fois la valeur de l'écart type d'un point quelconque (une concentration de la solution, $N=10$) servant à établir la courbe d'étalonnage.

ANNEXE D

Optimisation des paramètres de la LdRAT hépatique

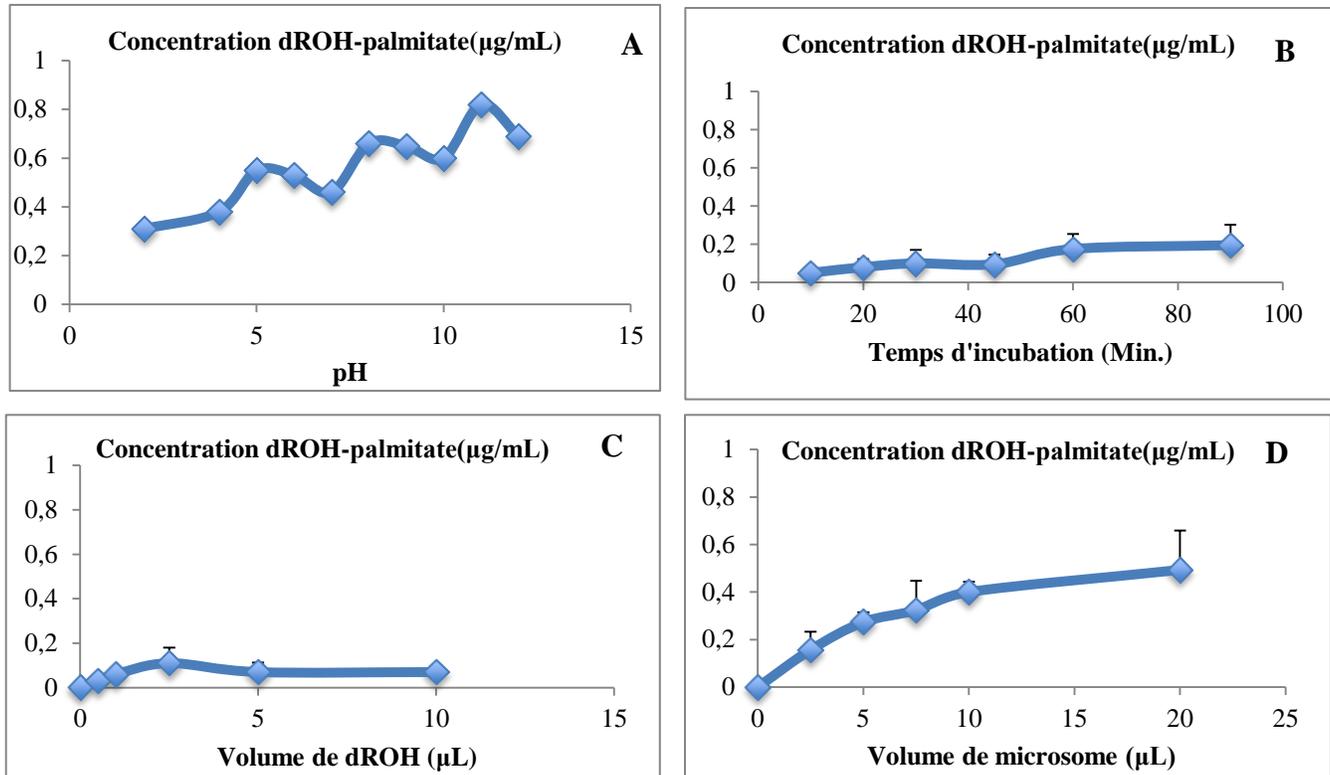


Figure 3 : Différente concentration du dROH-palmitate obtenues lors de la mise au point du pH (A), du temps d'incubation (B), de la concentration du substrat principal (C) et de la concentration des protéines contenue dans les microsomes (D). Pour l'optimisation du pH, les conditions suivantes étaient maintenues constantes : temps d'incubation de 90 min et les volumes de dROH, DPPC et microsomes étaient respectivement de 2,5 µL, 50 µL et 10 µL. Les mêmes conditions ont été maintenues pour la mise au point du temps d'incubation, mais avec un pH = 11. Pour la concentration du substrat (dROH), le temps d'incubation était de 90 min le pH = 11, les volumes de microsomes et de DPPC restant inchangés. S'agissant de la concentration des protéines (microsome), le pH était fixé à 11, le temps d'incubation à 90 min les volumes de dROH et de DPPC respectivement maintenus a 2,5 µL et 50 µL.

ANNEXE E

Optimisation des paramètres de la REH hépatique

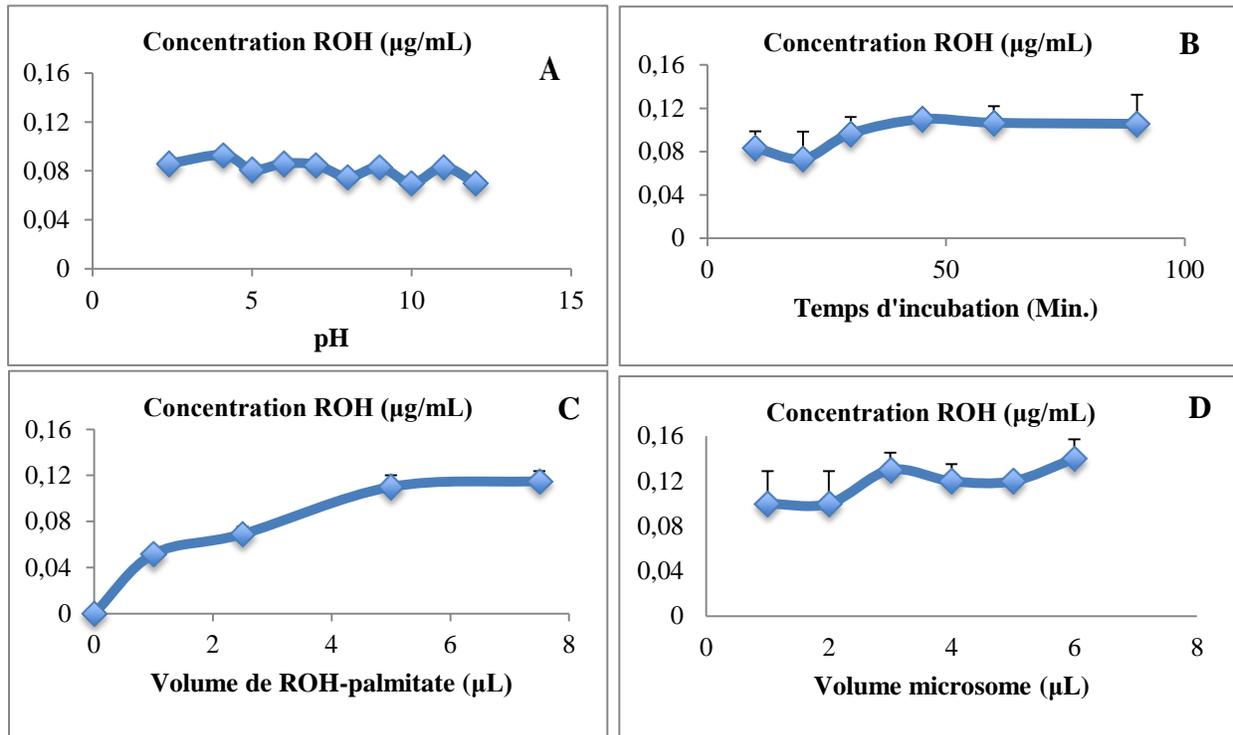


Figure 4 : Différente concentration du ROH obtenue lors de la mise au point du pH (A), du temps d'incubation (B), de la concentration du substrat (C) et de la concentration des protéines contenue dans les microsomes (D). Pour l'optimisation du pH, les conditions suivantes étaient maintenues constantes : temps d'incubation de 45 min et les volumes de ROH-palmitate et microsomes étaient de 5 µL. Les mêmes conditions ont été maintenues pour la mise au point du temps d'incubation, mais avec un pH = 4,2. Pour la concentration du substrat (ROH-palmitate), le temps d'incubation était de 45 min le pH = 4,2 et le volume de microsomes était inchangé. S'agissant de la concentration des protéines (microsome), le pH était fixé à 4,2 le temps d'incubation à 45 min et la concentration de ROH-palmitate de 5 µL.

ANNEXE F

Méthode, conditions et recettes pour la mesure des activités enzymatiques du stress oxydant

Après avoir préparé les différents tampons et solutions pour les analyses enzymatiques, les échantillons de foie et de muscle blanc fraîchement sortis du congélateur à -80°C étaient dégelés sur glace. Une portion était ensuite pesée, coupée en petits morceaux puis placée pour homogénéisation dans un tube pour ICP-MS. L'homogénéisation du reste de l'échantillon se fait dans un tampon d'homogénéisation (HEPES-EDTA) dans un rapport 1:10 (m/v). L'homogénéisation a lieu dans la glace avec un appareil de type Ultra Turrax T25 à la puissance maximale de l'homogénéisateur, pendant trois périodes de 10 secondes chacune, avec un intervalle de 1 minute pour s'assurer que l'échantillon reste au froid. Par la suite, l'homogénat est divisé en quatre aliquotes. Pour la mesure de l'activité de la SOD, le premier aliquote d'homogénat est centrifugé à 1500 g pendant 5 min à 4°C alors que le deuxième aliquote est centrifugé à 10000 g pendant 15 min à 4°C, pour la mesure de l'activité de la CAT. Après cette phase d'homogénéisation, les surnageants étaient collectés et gardés sur glace ou bien conservés à -80°C pour un maximum d'un mois jusqu'à la mesure de ces activités et la quantification de leur protéine. Le troisième aliquote d'homogénat destiné à la détermination des activités de la G6PDH et la GST était ensuite transféré dans un tube Eppendorf (1,5 mL) puis dilué dans le tampon d'homogénéisation en fonction des résultats obtenus dans la phase préliminaire d'optimisation de chaque enzyme. Par la suite le reste de l'homogénat 1/10 était conservé au congélateur pour la détermination des concentrations de protéines devant servir à exprimer les activités de la G6PDH et la GST.

Après mélange des différentes solutions dans l'homogénat dilué, la mesure de l'activité des enzymes (contrôle et essai) s'est faite dans les microplaques de 96 puits de 200 µL chacun. La

réaction était mesurée pendant 10 min et une portion linéaire d'au moins 3 min était utilisée pour calculer la vitesse de la réaction. Les activités de la CAT et la SOD se sont faites à l'aide des kits d'analyse d'enzymes. Chacun des essais de même que la quantité des protéines dans un échantillon étaient mesurés en triplicata et les activités sont exprimées en μmol de substrat/min/g de protéines.

Glutathione S-transférase (GST et mGST ; EC 2.5.18.) ; pH 6,5

- ❖ Tampon phosphate (50 mM KH_2PO_4 , 50 mM K_2HPO_4 et 1 mM EDTA)
- ❖ 2 mM CDNB (foie)
- ❖ 1 mM CDNB (muscle)
- ❖ Volume homogénat 10 μL dilution 1/100
- ❖ 6 mM GSH (omis dans le control)
- ❖ Absorbance 340 nm

Glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH; EC 1.1.1.49.) ; pH 7,5

- ❖ Tampon imidazole (50 mM imidazole, 20 mM MgCl_2 et 70 mM KCl)
- ❖ 0,5 mM β -NADH
- ❖ Volume homogénat 10 μL dilution 1/100
- ❖ 100 mM glucose-6-phosphate (omis dans le control)
- ❖ Absorbance 340 nm

Catalase (CAT ; EC 1.11.1.6.) ; (Cayman's catalase assay kit)

- ❖ Volume homogénat 20 μL
- ❖ Dilution 1/5000 (foie)
- ❖ Dilution 1/50 (muscle)
- ❖ Absorbance 540 nm

Superoxyde dismutase (SOD ; EC 1.15.1.1.) ; (Cayman's SOD assay kit)

- ❖ Volume homogénat 10 μL
- ❖ Dilution 1/1000 (foie)
- ❖ Dilution 1/50 (muscle)
- ❖ Absorbance 450 nm

ANNEXE G

Accumulation rénale du Zn dans les échantillonnages de gradient et de saison (A) et dans l'expérimentation de transplantation (B).

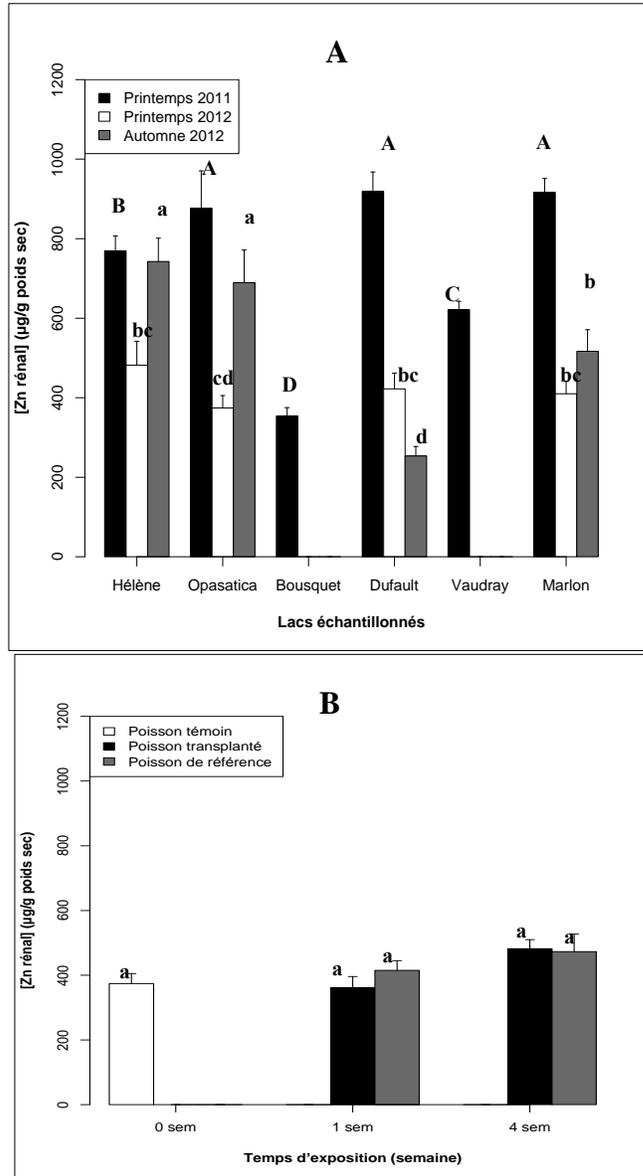


Figure 5 : A représente les concentrations totales de Zn mesurées dans les reins des perchaudes capturées lors des échantillonnages de gradient et de saisons dans les lacs de la région de Rouyn-Noranda. Alors B représente les concentrations totales de Zn mesurées dans l'expérimentation de transplantation. Les données sont présentées par : moyenne \pm erreur type (N = 20/lac ou condition). Les moyennes portant des lettres majuscules et minuscules différentes dénotent une différence significative entre les lacs échantillonnés au printemps 2011 et aux printemps et automne 2012 respectivement (figure A). Dans la figure B, les moyennes portant des lettres différentes indiquent une différence significative entre les conditions (valeur de $p < 0,05$).

ANNEXE H

Tableau 1 : Niveaux de transcription des gènes et activités enzymatiques d'autres voies métaboliques (moy. ± SE)[§] mesurées dans le foie des perchaudes issues des échantillonnages de gradient et de saison (printemps et automne 2012). Les lettres différentes dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les lacs ou les saisons.

Études	Lacs	Niveau de transcription des gènes [‡]			Activités enzymatiques [✱]		
		<i>mts</i>	<i>cco-1</i>	CCO	PK	NDPK	LDH
	Printemps						
	Hélène	/	/	/	/	/	/
	Opasatica	0,34 ± 0,03 ^c	0,53 ± 0,10 ^{ab}	0,32 ± 0,05 ^a	0,022 ± 0,003 ^a	0,61 ± 0,06 ^a	0,026 ± 0,005 ^a
	Dufault	0,96 ± 0,25 ^b	0,68 ± 0,11 ^{ab}	0,20 ± 0,03 ^b	0,033 ± 0,005 ^a	0,61 ± 0,08 ^a	0,025 ± 0,004 ^a
Variation saisonnière	Marlon	1,63 ± 0,39 ^b	0,73 ± 0,15 ^a	0,08 ± 0,01 ^c	0,026 ± 0,005 ^a	0,81 ± 0,08 ^a	0,018 ± 0,003 ^a
	Automne						
	Hélène	1,78 ± 0,46 ^b	0,58 ± 0,06 ^{ab}	0,35 ± 0,04 ^a	0,020 ± 0,003 ^a	0,84 ± 0,08 ^a	0,035 ± 0,007 ^a
	Opasatica	2,62 ± 0,60 ^a	0,47 ± 0,05 ^{ab}	0,30 ± 0,02 ^a	0,015 ± 0,003 ^a	0,83 ± 0,09 ^a	0,020 ± 0,006 ^a
	Dufault	1,57 ± 0,21 ^b	0,42 ± 0,09 ^b	0,34 ± 0,04 ^a	0,023 ± 0,003 ^a	0,88 ± 0,11 ^a	0,025 ± 0,004 ^a
	Marlon	1,70 ± 0,60 ^b	0,43 ± 0,09 ^b	0,36 ± 0,04 ^a	0,029 ± 0,010 ^a	0,89 ± 0,07 ^a	0,027 ± 0,008 ^a

§ Moyenne ± erreur type

‡ Exprimée en quantification relative (RQ)

✱ Exprimée en U g/protéine

Tableau 2 : Activités enzymatiques d'autres voies métaboliques (moy. ± SE)[§] mesurées dans le muscle des perchaudes issues des échantillonnages de gradient et de saison (printemps et automne 2012). Les lettres différentes dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les lacs ou les saisons.

Études	Saisons	Activités enzymatiques [✱]			
		PK	LDH	NDPK	CCO
	Printemps				
	Hélène	2,08 ± 0,31 ^b	0,47 ± 0,08 ^{cd}	3,39 ± 0,38 ^b	0,21 ± 0,02 ^{bc}
	Opasatica	1,93 ± 0,56 ^b	0,53 ± 0,10 ^{bcd}	4,64 ± 0,32 ^b	0,35 ± 0,03 ^a
	Dufault	3,69 ± 0,71 ^a	1,16 ± 0,20 ^a	4,03 ± 0,63 ^b	0,08 ± 0,02 ^d
Variation saisonnière	Marlon	0,53 ± 0,08 ^d	0,41 ± 0,06 ^d	4,14 ± 0,66 ^b	0,11 ± 0,01 ^{cd}
	Automne				
	Hélène	0,70 ± 0,07 ^c	0,62 ± 0,06 ^{bcd}	4,08 ± 0,33 ^b	0,15 ± 0,01 ^{cd}
	Opasatica	0,82 ± 0,11 ^c	0,92 ± 0,11 ^{abc}	4,54 ± 0,17 ^b	0,15 ± 0,02 ^{cd}
	Dufault	0,92 ± 0,17 ^c	0,68 ± 0,11 ^{abcd}	6,06 ± 0,50 ^a	0,36 ± 0,03 ^a
	Marlon	1,43 ± 0,15 ^b	0,98 ± 0,10 ^{ab}	5,30 ± 0,63 ^{ab}	0,31 ± 0,04 ^{ab}

§ Moyenne ± erreur type

✱ Exprimée en U g/protéine

ANNEXE I

Tableau 3 : Niveaux de transcription des gènes et activités enzymatiques d'autres voies métaboliques (moy. ± SE)[§] mesurées dans le foie des perchaudes issues des expérimentations de transplantation en milieu naturel. Les lettres différentes dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les différentes conditions.

Expérimentation	Conditions¶	Niveau de transcription des gènes ⁺		Activités enzymatiques [*]	
		<i>mts</i>	<i>cco-1</i>	NDPK	CCO
Effet contamination	0Ind-Op	0,34 ± 0,03 ^c	0,53 ± 0,10 ^b	1,04 ± 0,06 ^{bc}	0,101 ± 0,004 ^b
	1Ref-Op	0,70 ± 0,15 ^{ab}	1,10 ± 0,13 ^a	1,20 ± 0,06 ^b	0,094 ± 0,007 ^{bc}
	1Con-Op	0,56 ± 0,10 ^{bc}	1,04 ± 0,22 ^{ab}	1,08 ± 0,03 ^{bc}	0,082 ± 0,005 ^c
	4Ref-Op	0,52 ± 0,07 ^{bc}	1,17 ± 0,08 ^a	0,85 ± 0,09 ^c	0,078 ± 0,012 ^{bc}
	4Con-Op	0,54 ± 0,09 ^{bc}	1,08 ± 0,09 ^a	1,03 ± 0,09 ^{bc}	0,080 ± 0,009 ^{bc}

§ Moyenne ± erreur type

¶ Le chiffre indiqué dans les conditions de l'expérience de transplantation indique la durée de l'exposition (semaine) ; **Ind-Op** = Individu en nage libre dans le lac Opatatica ; **Ref-Op** = Poisson du lac de référence (Opatatica) mis en cage dans le même lac ; **Con-Op** = Poisson du lac de référence transplanté dans le lac contaminé (Dufault)

⁺ Exprimée en quantification relative (RQ)

^{*} Exprimée en U g/protéine

Tableau 4 : Activités enzymatiques d'autres voies métaboliques (moy. ± SE)[§] mesurées dans le muscle des perchaudes issues des expérimentations de transplantation en milieu naturel. Les lettres différentes dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les différentes conditions.

Expérimentation	Conditions¶	Activités enzymatiques [*]		
		LDH	NDPK	CCO
Effet contamination	0Ind-Op	1,09 ± 0,23 ^c	5,19 ± 0,45 ^b	0,060 ± 0,006 ^b
	1Ref-Op	3,54 ± 1,42 ^a	11,16 ± 4,24 ^{ab}	0,330 ± 0,130 ^a
	1Con-Op	1,61 ± 0,34 ^{ab}	7,19 ± 1,54 ^{ab}	0,110 ± 0,030 ^{ab}
	4Ref-Op	1,28 ± 0,29 ^b	10,28 ± 2,18 ^{ab}	0,110 ± 0,020 ^{ab}
	4Con-Op	2,08 ± 0,40 ^{ab}	13,77 ± 3,29 ^a	0,100 ± 0,020 ^{ab}

§ Moyenne ± erreur type

^{*} Exprimée en U g/protéine

¶ Le chiffre indiqué dans les conditions de l'expérience de transplantation indique la durée de l'exposition (semaine) ; **Ind-Op** = Individu en nage libre dans le lac Opatatica ; **Ref-Op** = Poisson du lac de référence (Opatatica) mis en cage dans le même lac ; **Con-Op** = Poisson du lac de référence transplanté dans le lac contaminé (Dufault).

ANNEXE J

Tableau 5 : Niveaux de transcription des gènes et activités enzymatiques d'autres voies métaboliques (moy. ± SE)[§] mesurés dans le foie des perchaudes exposées en laboratoire aux Cd et Ni. Les lettres différentes en minuscules (exposition au Cd) et en majuscule (exposition au Ni) dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les différentes conditions.

Expérimentations	Conditions	Niveau de transcription des gènes ⁺				Activités enzymatiques [*]	
		<i>igf</i>	<i>mts</i>	<i>hsp-90</i>	<i>cco-1</i>	NDPK	CCO
Exposition des poissons au Cd (µg/L) en laboratoire	Contrôle	0,59 ± 0,05 ^b	1,24 ± 0,18 ^a	/	0,70 ± 0,11 ^b	0,60 ± 0,02 ^b	0,043 ± 0,008 ^b
	0,8	0,76 ± 0,08 ^{ab}	1,69 ± 0,27 ^a	/	0,76 ± 0,06 ^{ab}	1,04 ± 0,19 ^a	0,145 ± 0,051 ^a
	8	0,99 ± 0,14 ^a	1,80 ± 0,18 ^a	/	1,06 ± 0,07 ^a	1,07 ± 0,20 ^a	0,113 ± 0,040 ^{ab}
Exposition des poissons au Ni (µg/L) en laboratoire	Contrôle	0,59 ± 0,05 ^A	1,24 ± 0,18 ^A	0,59 ± 0,06 ^B	0,70 ± 0,11 ^A	0,60 ± 0,02 ^A	0,043 ± 0,008 ^A
	60	0,72 ± 0,10 ^A	1,44 ± 0,19 ^A	0,81 ± 0,06 ^A	0,89 ± 0,06 ^A	0,81 ± 0,15 ^A	0,091 ± 0,021 ^A
	600	0,65 ± 0,08 ^A	1,95 ± 0,21 ^A	0,65 ± 0,05 ^{AB}	0,89 ± 0,08 ^A	1,08 ± 0,21 ^A	0,112 ± 0,038 ^A

§ Moyenne ± erreur type

* Exprimée en U g/protéine

+ Exprimée en quantification relative (RQ)

Tableau 6 : Niveaux de transcription des gènes et activités enzymatiques d'autres voies métaboliques (moy. ± SE)[§] mesurés dans le muscle des perchaudes exposées en laboratoire aux Cd et Ni. Les lettres différentes en minuscules (exposition au Cd) et en majuscule (exposition au Ni) dans chaque colonne indiquent une différence significative entre les différentes conditions.

Expérimentations	Conditions	Niveau de transcription des gènes ⁺				Activités enzymatiques [*]	
		<i>igf</i>	<i>mts</i>	<i>hsp-90</i>	<i>cco-1</i>	LDH	CCO
Exposition des poissons au Cd (µg/L) en laboratoire	Contrôle	1,82 ± 0,19 ^b	2,89 ± 0,46 ^a	/	1,73 ± 0,14 ^a	0,58 ± 0,08 ^a	0,028 ± 0,010 ^a
	0,8	3,07 ± 0,32 ^a	3,10 ± 0,60 ^a	/	2,17 ± 0,13 ^a	0,56 ± 0,09 ^a	0,023 ± 0,004 ^a
	8	2,58 ± 0,55 ^{ab}	2,24 ± 0,18 ^a	/	2,07 ± 0,14 ^a	0,59 ± 0,04 ^a	0,023 ± 0,001 ^a
Exposition des poissons au Ni (µg/L) en laboratoire	Contrôle	1,82 ± 0,19 ^A	2,89 ± 0,46 ^A	2,93 ± 0,60 ^A	1,73 ± 0,14 ^A	0,58 ± 0,08 ^A	0,028 ± 0,010 ^A
	60	1,88 ± 0,20 ^A	3,06 ± 0,50 ^A	2,04 ± 0,28 ^A	1,90 ± 0,22 ^A	0,87 ± 0,04 ^A	0,046 ± 0,004 ^A
	600	2,38 ± 0,29 ^A	2,50 ± 0,33 ^A	2,20 ± 0,05 ^A	2,04 ± 0,22 ^A	0,81 ± 0,04 ^A	0,037 ± 0,004 ^A

§ Moyenne ± erreur type

* Exprimée en U g/protéine

+ Exprimée en quantification relative (RQ)

ANNEXE K

Tableau 7 : Récapitulatif des tendances non significatives des effets des métaux sur les autres paramètres du métabolisme des rétinoïdes

Type d'exposition	Temps d'exposition	Voie d'exposition	Période d'échantillonnage	Tissu cible	Effets observés
Milieu naturel Suivant un gradient de concentration en Cd	Infini	Mixte	Printemps	Muscle	<ul style="list-style-type: none"> ↗ [Déhydrorétinol] ↗ Pourcentage de déhydrorétinol
			Automne	Foie	<ul style="list-style-type: none"> ↗ [Déhydrorétinol] ↗ [Déhydrorétinyl palmitate] ↘ Pourcentage de déhydrorétinol =Niveau de transcription de <i>rdh-2</i>
				Muscle	<ul style="list-style-type: none"> ↗ [Déhydrorétinol] ↗ [Déhydrorétinyl stéarate] ↗ Pourcentage de déhydrorétinol
Milieu naturel avec une concentration en Cd élevée dans l'eau	4 semaines	Mixte	Printemps	Foie	<ul style="list-style-type: none"> ↘ [Déhydrorétinol]
				Muscle	<ul style="list-style-type: none"> ↗ [Déhydrorétinol] = [Déhydrorétinyl stéarate] ↘ Pourcentage de déhydrorétinol
Exposition en laboratoire au Cd (µg/L)	6 semaines	Directe	/	Foie	<ul style="list-style-type: none"> ↘ [Déhydrorétinol] ↘ [Déhydrorétinyl palmitate]

= : Aucun effet mesurable

↗: Tendance à l'augmentation

↘: Tendance à la diminution du paramètre analysé

Tableau 8 : Récapitulatif des tendances non significatives des effets des métaux sur les autres biomarqueurs traditionnellement mesurés dans la réponse au stress oxydant

Type d'exposition	Temps d'exposition	Voie d'exposition	Période d'échantillonnage	Tissue cible	Effets observés
Milieu naturel Suivant un gradient de concentration en Cd	Infini	Mixte	Printemps	Foie	=Niveau de transcription de la <i>cat</i> ↗ Niveau de transcription de la <i>sod-1</i> ↗ Niveau de transcription de la <i>mgst-3</i> ↗ Activité de la CAT =Activité de la GST
				Muscle	↗ Activité de la CAT =Activité de la SOD ↘ Activité de la GST
			Automne	Foie	=Niveau de transcription de la <i>cat</i> =Niveau de transcription de la <i>sod-1</i> ↘ Niveau de transcription de la <i>g6pdh</i> ↗ Niveau de transcription de la <i>mgst-3</i> ↗ Activité de la CAT ↘ Activité de la SOD ↓ Activité de la G6PDH =Activité de la GST
				Muscle	=Activité de la CAT ↘ Activité de la SOD =Activité de la GST
Exposition en laboratoire au Cd (µg/L)	6 semaines	Directe	/	Foie	=Activité de la SOD ↗ Activité de la MGST
				Muscle	=Niveau de transcription de la <i>cat</i> ↗ Niveau de transcription de la <i>g6pdh</i> =Niveau de transcription de la <i>mgst-3</i> ↗ Activité de la CAT =Activité de la SOD

= : Aucun effet mesurable

↗: Tendance à l'augmentation

↘: Tendance à la diminution du paramètre analysé