

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

Exposition de la perchaude (*Perca flavescens*) à un mélange de cadmium et nickel : répartition subcellulaire des métaux accumulés et conséquences métaboliques

Par
Ophélie Drevet

Mémoire présentée pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Landis Hare
INRS-ETE

Examineur externe

Jonathan Verreault
Département des sciences biologiques
Université du Québec à Montréal

Directeur de recherche

Patrice Couture
INRS-ETE

Codirecteur de recherche

Peter G.C. Campbell
INRS-ETE

Résumé

L'effet des métaux traces sur les poissons a été grandement étudié. Cependant, la plupart des études se focalisent sur des métaux individuels. Dans ce projet, la répartition subcellulaire et les conséquences métaboliques de l'exposition à un mélange de métaux traces sont étudiées sur la perchaude. Au laboratoire, les poissons ont été exposés au cadmium et nickel seuls ou en mélange à des concentrations aqueuses de 4 et 450 µg/L, respectivement, pour une période de 49 jours. Une étude de terrain a aussi été menée dans des lacs où ces métaux présentent des gradients de concentration. La distribution subcellulaire du cadmium et du nickel et l'influence de la concentration d'un métal sur la distribution de l'autre ont été examinées dans le foie. De plus, des essais enzymatiques ont été conduits dans le foie et dans le muscle afin d'examiner les effets de l'exposition à ce mélange de métaux traces sur les capacités glycolytique, aérobie et biosynthétique et sur la réponse au stress oxydant. Au laboratoire, la présence du nickel dans le rein influence la prise en charge de cadmium, mais ce n'est pas réciproque. Cette tendance est aussi visible pour la répartition subcellulaire du cadmium dans le foie. Cependant le cadmium limite les effets du nickel sur les capacités métaboliques hépatiques lorsqu'ils se retrouvent en mélange. Sur le terrain, les perchaudes présentent une accumulation avec moins de différences entre les lacs pour les différentes fractions de la cellule. De plus, les capacités métaboliques étudiées dans le foie des poissons sauvages ne varient pas le long du gradient de contamination. Les effets synergiques et antagonistes de l'exposition à des mélanges de métaux chez la perchaude et les causes possibles des différences entre les poissons sauvages et ceux du laboratoire seront discutés.

Remerciements

Tout d'abord, merci à mon directeur Patrice Couture sans qui ce projet n'aurait jamais eu lieu. Il a su me soutenir et m'aider à donner le meilleur de moi-même pour parvenir à mener à bien ma maîtrise. Merci aussi à mon co-directeur Peter Campbell qui m'a permis de pousser plus loin mes recherches tout en m'encourageant dans mes démarches.

Merci au personnel de l'INRS et des laboratoires de m'avoir aidé et conseillé pendant mon passage à l'INRS, notamment Jean-Daniel Bourgault. J'aimerais remercier en particulier Julie Perreault, qui m'a énormément aidée pendant mes recherches, que ce soit pour me débloquer quand j'étais à l'ICP-MS ou tout simplement échanger avec moi sur des sujets divers.

Je tiens aussi à remercier mes collègues du laboratoire 5432, en particulier Julie Grasset, Bérénice Bougas et Antoine Caron, qui m'ont beaucoup aidé en me formant aux différentes techniques, mais aussi pour m'avoir soutenue dans les moments plus difficiles en me changeant les idées. Je remercie aussi tous ceux du secteur écotoxicologie pour m'avoir appris de nouvelles techniques (Maikel Rosabal) et mis de la joie dans les couloirs du 5^e étage (Sébastien Leguay, Camille Guilleux, Cédric Beaubien, Anne Crémazy, etc.). Merci à mes amis de la promo qui m'ont permis de passer certains caps difficiles pendant les cours et les longues heures de révision, mais aussi pour toutes les bonnes soirées qui font de l'université un endroit plein de joie.

Je désire aussi dire un grand merci à Simon Boisvert qui m'a soutenue et supportée pendant ces deux années. Enfin, j'aimerais dire un énorme merci à mes parents (Josette Laurent et Thierry Drevet) et ma sœur (Adeline) qui m'ont toujours aidée à réaliser mes rêves et soutenue dans mes choix. Je vous aime.

Table des matières

Résumé.....	III
Remerciements.....	IV
Liste des figures.....	VII
Liste des tableaux.....	XI
Liste des annexes	XII
1 Introduction.....	1
1.1 Les métaux traces d'intérêt.....	2
1.1.1 Toxicité du cadmium.....	2
1.1.2 Toxicité du nickel.....	9
1.2 La perchaude.....	13
1.2.1 Généralités.....	13
1.2.2 Rôle de bio-indicateur.....	13
1.3 Indices biométriques.....	13
1.4 Enzymes.....	14
1.4.1 Enzymes d'intérêt.....	15
1.5 Répartition subcellulaire.....	17
1.6 Objectifs et hypothèses de recherche.....	18
2 Méthodologie.....	20
2.1 Expérience de laboratoire.....	20
2.2 Échantillonnage terrain.....	21
2.3 Mesure et tissus prélevés.....	22
2.4 Analyses biométriques.....	22
2.4.1 Indice de Fulton.....	22
2.4.2 Indice des <i>cæca pyloriques</i>	22
2.5 Détermination des concentrations en métaux dans les tissus.....	23
2.6 Fractionnement subcellulaire.....	23
2.6.1 Centrifugation différentielle.....	23
2.6.2 Détermination des concentrations métalliques dans chaque fraction.....	24
2.6.3 Contrôle de qualité de l'expérience.....	25
2.7 Essais enzymatiques.....	25

2.7.1	<i>Préparation des échantillons</i>	25
2.7.2	<i>Mesures de l'activité enzymatique</i>	25
2.7.3	<i>Protéines</i>	28
2.8	Analyses statistiques	28
3	Résultats	30
3.1	Expérience de laboratoire	30
3.1.1	<i>Condition des poissons et concentration en métaux</i>	30
3.1.2	<i>Influence d'un métal sur l'autre pour leur répartition subcellulaire</i>	32
3.1.3	<i>Conséquences métaboliques</i>	36
3.2	Échantillonnage terrain	43
3.2.1	<i>Condition des poissons</i>	43
3.2.2	<i>Répartition subcellulaire du cadmium et du nickel</i>	45
3.2.3	<i>Conséquences métaboliques</i>	47
4	Discussion	52
4.1	Expérience de laboratoire	52
4.1.1	<i>Influence des métaux sur les poissons</i>	52
4.1.2	<i>Répartition subcellulaire du nickel</i>	54
4.1.3	<i>Répartition subcellulaire du cadmium</i>	55
4.1.4	<i>Effet des métaux sur les capacités métaboliques du foie</i>	56
4.1.5	<i>Effet des métaux sur les capacités métaboliques du muscle</i>	60
4.2	Échantillonnage terrain	62
4.2.1	<i>Influence des métaux sur les poissons</i>	62
4.2.2	<i>Répartition subcellulaire du cadmium</i>	63
4.2.3	<i>Répartition subcellulaire du nickel</i>	64
4.2.4	<i>Effet des métaux sur les capacités métaboliques du foie et du muscle</i>	64
4.3	Comparaison perchaudes naïves versus perchaudes acclimatées	66
5	Conclusions	67
6	Perspectives futures	68
7	Références	70
	Annexes	80

Liste des figures

Figure 1. Hypothétique relation entre l'exposition chronique à un métal et la répartition subcellulaire de celui-ci (Campbell et coll., 2004).....	2
Figure 2. Spéciation des métaux dissous dans l'environnement (Peter Campbell. Comm. Pers. 2013).....	5
Figure 3. Concentrations et teneurs en Cd de différentes parties du corps de deux organismes récoltés dans des lacs contaminés (A) le bivalve <i>Pyganodon grandis</i> prélevé dans le lac Vaudray (Couillard et coll., 1993), (B) la perchaude <i>Perca flavescens</i> prélevée dans le lac Dufault (Giguère, 2003).....	6
Figure 4. Rétroinhibition de la première enzyme dans la voie par la liaison réversible du produit final (Modifié de Stryer, 1988). Croix rouge : enzyme inhibé par le produit D.....	15
Figure 5. Distinction entre un inhibiteur compétitif et non-compétitif. En haut : complexe enzyme-substrat. Au milieu : un inhibiteur compétitif empêche la liaison d'un substrat. En bas : un inhibiteur non-compétitif n'empêche pas la liaison mais change la conformation de l'enzyme (Stryer, 1988).....	15
Figure 6. Disposition des aquariums et des réserves d'eau lors de l'exposition au laboratoire (LARSA). Blanc : Témoins, Jaune : Nickel, Rouge : Cadmium et Noir : Mélange (Julie Grasset, INRS-ETE, Comm. Pers. 2012).....	21
Figure 7. Protocole de répartition subcellulaire (adaptée de Giguère et coll., 2006).....	23
Figure 8. Indice de Fulton des quatre conditions : témoin (n=48), cadmium (n=48), nickel (n=50) et mélange (n=47). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).....	31
Figure 9. Concentration en nickel dans le rein pour les quatre conditions : témoin (n=50), cadmium (n=50), nickel (n=50) et mélange (n=47) pour les temps dix jours (A) et 49 jours (B). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$)..	31
Figure 10. Concentration en cadmium dans le rein pour les quatre conditions : témoin (n=50), cadmium (n=50), nickel (n=50) et mélange (n=47) pour les temps dix jours (A) et 49 jours (B). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$)..	32
Figure 11. Concentrations en nickel dans les six fractions (mitochondries, granules, organelles, HDP, HSP et débris) des cellules de foie selon les concentrations en nickel dans l'homogénat (moyennes \pm erreur standard; n=3).....	33

Figure 12. Pourcentage de l'homogénat pour les six fractions (mitochondrie, granules, organelles, HDP, HSP et débris) en fonction de la condition d'exposition (Tf-T : 49 jours – témoin, T10-T : 10 jours – témoin, T0 : zéro jour, T10-Ni : 10 jours – nickel, Tf-Ni : 49 jours – nickel, T10-Cd : 10 jours – cadmium; T10-Mix : 10 jours – mélange, Tf-Cd : 49 jours – cadmium, Tf-Mix : 49 jours – mélange). HDP bis et HSP bis correspondent aux tendances sans les points extrêmes.	33
Figure 13. Pourcentage de l'homogénat pour les six fractions (mitochondrie, granules, organelles, HDP, HSP et débris) en fonction de la condition d'exposition (Tf-T : 49 jours – témoin, T10-T : 10 jours – témoin, T0 : zéro jour, T10-Ni : 10 jours – nickel, Tf-Ni : 49 jours – nickel, T10-Cd : 10 jours – cadmium; T10-Mix : 10 jours – mélange, Tf-Cd : 49 jours – cadmium, Tf-Mix : 49 jours – mélange).....	34
Figure 14. Concentration en cadmium dans les six fractions (mitochondrie, granules, organelles, HDP, HSP et débris) des cellules de foie pour les concentrations en cadmium dans l'homogénat (n=3). B) Agrandissement de l'encadré de la figure A.	35
Figure 15. Concentration en protéines (mg/g de p.f.) pour les poissons utilisés dans la quantification des activités de la CCO, NDPK et LDH dans le foie en fonction des conditions d'exposition (temps zéro, temps final : témoin, nickel, cadmium et mélange). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).	37
Figure 16. Activité de la SOD (UI/g de p.f.) dans le foie en fonction des conditions d'exposition (temps zéro, temps final : témoin, nickel, cadmium et mélange). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).	38
Figure 17. Activité de la CAT (UI/g de p.f.) dans le foie en fonction des conditions d'exposition (temps zéro, temps final : témoin, nickel, cadmium et mélange). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).	38
Figure 18. Concentration en protéines (mg/g de p.f.) pour les poissons utilisés dans la quantification l'activité de la NDPK et de la LDH dans le muscle en fonction des conditions d'exposition (temps zéro, temps final : témoin, nickel, cadmium et mélange). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).	40
Figure 19. Activité de la SOD (UI/g de p.f.) dans le foie en fonction des conditions d'exposition (temps zéro, temps final : témoin, nickel, cadmium et mélange). Comparaison des	

moyennes (+ erreur standard) avec le test de Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).....	40
Figure 20. Indice des cæca pyloriques des quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec de test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=50$).....	44
Figure 21. Indice de Fulton des quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec de test de Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=50$).	44
Figure 22. Concentration en nickel dans le rein pour les quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=50$).....	44
Figure 23. Concentration en cadmium dans le rein pour les quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=50$).	44
Figure 24. Concentration en cadmium dans les six fractions (mitochondrie, granules, organelles, HDP, HSP et débris) des cellules de foie en fonction de la concentration en cadmium dans l'homogénat ($n=3$).	45
Figure 25. Pourcentage de l'homogénat pour les six fractions (mitochondries, granules, organelles, HDP, HSP et débris) en fonction des lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson).....	46
Figure 26. Concentration en nickel dans les six fractions (mitochondries, granules, organelles, HDP, HSP et débris) des cellules de foie en fonction de la concentration en cadmium dans l'homogénat ($n=3$).	47
Figure 27. Activité de la CCO (UI/g de p.f) dans le muscle pour les quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).	49
Figure 28. Activité de la NDPK (UI/g de p.f) dans le muscle pour les quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).	49

Figure 29. Activité de la LDH (UI/g de p.f.) dans le muscle pour les quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).....49

Figure 30. Concentration en protéines (mg/g de p.f.) pour les poissons utilisés dans la quantification l'activité de la LDH dans le muscle pour les quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).....49

Figure 31. Activité de la SOD (UI/g de p.f.) dans le muscle pour les quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).....50

Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux changements morphologiques causés par la contamination au chlorure de cadmium (CdCl_2) chez l'omble de fontaine (<i>Salvelinus fontinalis</i>), F : Foie, R : Rein et M : muscle (Brillant, 1993).....	9
Tableau 2. Activité des enzymes (UI/mg de protéines) du foie et du muscle en fonction des conditions d'exposition (temps zéro, temps final : témoin, nickel, cadmium et mélange). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer et Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).....	41
Tableau 3. Corrélations de Spearman entre les activités enzymatiques (UI/g de poids frais) dans le foie et les concentrations en métaux dans les reins ($\mu\text{g/g}$). Les corrélations significatives sont mises en gras ($p < 0,05$, $n=8$).....	41
Tableau 4. Corrélations de Spearman entre les activités enzymatiques (UI/g de poids frais) dans le muscle et les concentrations en métaux dans les reins ($\mu\text{g/g}$). Les corrélations significatives sont mises en gras ($p < 0,05$, $n=8$).....	42
Tableau 5. Activités des enzymes (UI/mg de protéines) du muscle en fonction des lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).....	50
Tableau 6. Corrélations de Spearman entre les activités enzymatiques (UI/g de p.f.) dans le foie et les concentrations en métaux dans les reins ($\mu\text{g/g}$). Les corrélations significatives sont mises en gras ($p < 0,05$).....	51
Tableau 7. Corrélations de Spearman entre les activités enzymatiques (UI/g de p.f.) dans le muscle et les concentrations en métaux dans les reins ($\mu\text{g/g}$). Les corrélations significatives sont mises en gras ($p < 0,05$).....	51

Liste des annexes

Annexe 1. Protocole de digestion à froid adapté de Borgmann et coll. (2001).....	80
Annexe 2. Résultats supplémentaires	80

1 Introduction

À l'heure actuelle et depuis son développement, l'industrialisation a apporté des modifications à l'environnement. En effet, la contamination de l'environnement entourant les lieux d'activités anthropiques est une problématique grandissante. Ainsi, plusieurs études ont été menées afin de quantifier l'impact de ces activités sur les milieux aquatiques. Les rejets dans ces écosystèmes peuvent prendre plusieurs formes telles que des molécules organiques de synthèse pour les usines de traitements des eaux ou des contaminants inorganiques pour les mines. La spécialité du domaine de l'environnement s'intéressant à l'effet des polluants sur les écosystèmes est appelée écotoxicologie et regroupe plusieurs champs de recherche tels que la biologie et la chimie. Cette discipline est apparue dans les années 1970 et est une combinaison de l'écologie et de la toxicologie. Elle permet d'englober l'ensemble de la biosphère et des populations afin d'en apprendre plus sur les contaminants (toxicité, moyens d'entrée dans les organismes, etc.) présents dans l'environnement.

Dans les régions où les activités minières et les fonderies sont importantes, les écotoxicologues s'intéressent particulièrement aux effets des métaux sur les écosystèmes entourant ces industries. Blaise et Couture (1984) et Couillard et coll. (2009) ont mis en évidence que ces entreprises rejettent une quantité notable de métaux traces dans les environnements aquatiques, et ainsi, en changeant les conditions physicochimiques. Aussi, Luoma et Rainbow (2008) et Environnement Canada (2012b) ont montré que les métaux avaient des impacts importants sur l'ensemble de la chaîne trophique des populations lotiques et lacustres. Les écosystèmes les plus contaminés ont vu leur diversité d'espèces diminuer pour ne garder que les organismes les plus résistants aux contaminants (Kovecses et coll., 2005; Rasmussen et coll., 2008).

Au fil des années, avec la prise de conscience de l'importance de la protection de l'environnement, les rejets de métaux traces dans les écosystèmes diminuent progressivement. Cependant, il reste encore beaucoup à faire afin de développer une industrie n'ayant pas d'impact sur l'environnement. Il est donc important de continuer à faire des efforts et d'en apprendre toujours plus sur l'effet et le devenir des métaux dans l'environnement.

1.1 Les métaux traces d'intérêt

Il existe deux catégories de métaux traces : ceux dits essentiels, qui ont une utilité pour l'organisme et qui sont nécessaires pour son maintien, et les non essentiels, qui n'ont, a priori, aucun rôle dans l'organisme (Goyer, 1997). Quand un métal non essentiel passe la barrière cellulaire, les organismes vont réagir suivant la concentration de celui-ci. Ainsi, quand le métal est en faible concentration dans la cellule, il sera lié par des ligands pour mener à sa détoxification, tandis que lorsqu'il se retrouve en forte concentration, il va se lier à des molécules sensibles et induire une toxicité (fig. 1 ; modèle du « spillover »). De nos jours, il est possible de retrouver davantage de métaux non essentiels dans l'environnement dû aux diverses activités anthropiques.

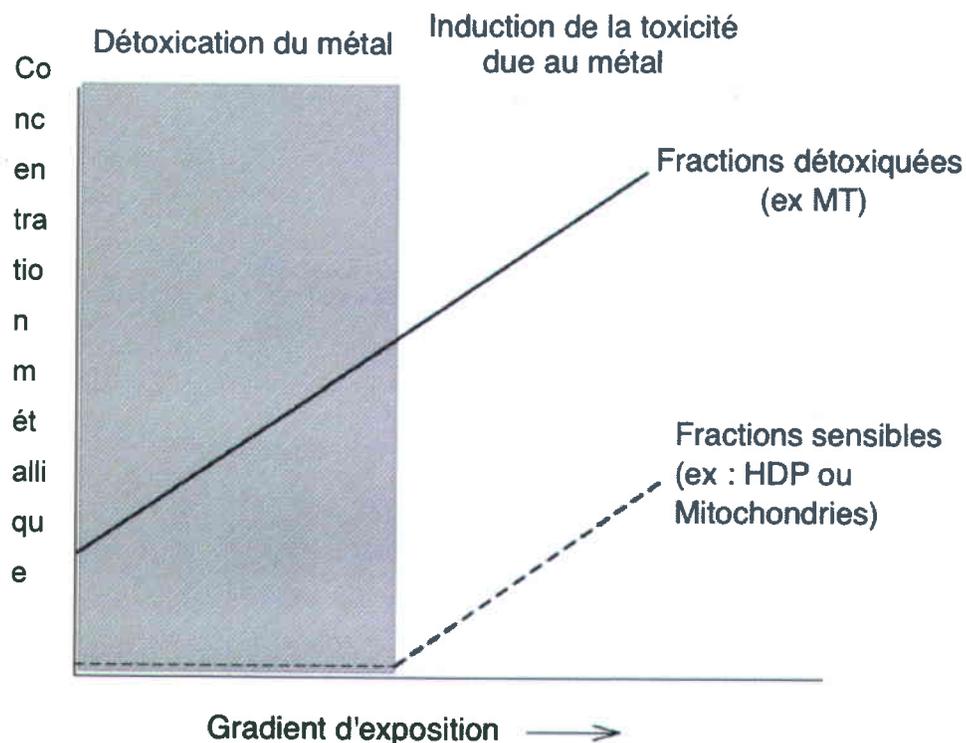


Figure 1. Hypothétique relation entre l'exposition chronique à un métal et la répartition subcellulaire de celui-ci (Campbell et coll., 2004)

1.1.1 Toxicité du cadmium

1.1.1.1 Généralités

Le cadmium, un métal blanc argenté, se ternit rapidement à l'air libre. De plus, il est comparable au zinc et peut le remplacer dans presque tous les minerais (Santé Canada, 1986). D'après Ressources naturelles Canada (2009), en 2008, le Canada était le 6^e producteur mondial de

cadmium. Aussi, la Loi canadienne sur la protection de l'environnement classe le cadmium comme étant une substance d'intérêt prioritaire (Environnement Canada. Santé Canada, 1994). Le cadmium est toxique pour l'environnement et pour les organismes (Environnement Canada. Santé Canada, 1994; Cullen et Maldonado, 2013). Cependant, suivant les espèces étudiées, il peut y avoir des métaux traces plus dangereux, par exemple, les algues sont beaucoup plus sensibles au cuivre qu'au cadmium (Lavoie, 2008).

1.1.1.2 Sources

Dans l'environnement, il est possible de retrouver naturellement du cadmium, cependant ce dernier est plutôt rare. Il se répartit relativement uniformément dans la croûte terrestre suivant la nature des sols et les types de roches et c'est le 65^e élément naturel retrouvé au niveau de la lithosphère (Pinot et coll., 2000; Actu-environnement, 2013). Les émissions annuelles naturelles dans l'atmosphère totaliseraient 1300 tonnes (Nriagu, 1989) et seraient dus en particulier à des feux de forêt et des éruptions volcaniques (USEPA, 2001; INERIS, 2011). Les roches cadmifères sont naturellement altérées de telle sorte que le cycle d'oxydation s'enclenche libérant, sous forme soluble, du cadmium (Environnement Canada, 2010). Ainsi, le cadmium se retrouve dans l'eau par des processus d'érosion et de transport éolien.

Cependant, les apports de cadmium viennent principalement de sources anthropogéniques. Ainsi, le cadmium se retrouvant dans les plans d'eau peut provenir de dépôts atmosphériques, par la pluie ou le vent, en raison des émissions atmosphériques des industries, particulièrement des sidérurgies et de la combustion fossile, du lessivage des dépôts miniers, des décharges industrielles ou des sols agricoles utilisant des fertilisants contenant du cadmium. Les rejets industriels issus de l'utilisation du cadmium comme anticorrosif (électroplastie) et l'épandage de boues d'épuration sont d'autres sources de contamination possibles (Alabaster et Lloyd, 1984; USEPA, 2001; Environnement Canada, 2010; INERIS, 2011; Cullen et Maldonado, 2013).

En 2010, au Canada, les rejets de cadmium dans l'eau totalisent 2670 kg et ont pour origines les provinces de l'Ontario (31%), de la Colombie-Britannique (27%) et du Québec (26%). Majoritairement, ce sont les usines de traitement des eaux et les industries de pâtes et papiers qui sont la source de ces rejets (Environnement Canada, 2012a).

La contamination perdure depuis longtemps malgré son utilisation assez récente, car les métaux avec lesquels le cadmium se retrouve naturellement sont utilisés depuis longtemps dans l'histoire : cuivre, plomb et zinc (Friberg et coll., 1974 ; Cullen et Maldonado, 2013). Au Québec,

dans les lacs de régions au passé minier comme Rouyn-Noranda, des concentrations en cadmium dans l'eau d'ordres très différents ont été rapportées dans la littérature suivant la localisation : 0,018 et 2,37 nM Cd (Tessier et coll., 1993); 0,8 à 2,8 nM (Couillard et coll., 1993); 0,11 à 7,72 nM (Giguère et coll., 2004) et 0,03 à 0,93 nM Cd²⁺ (Perceval et coll., 2006).

1.1.1.3 Cycle biogéochimique du cadmium

Il existe plusieurs formes de cadmium retrouvées dans les plans d'eau suivant les composés présents dans l'environnement (matière organique, chlorure, carbonates, etc.; fig. 2; Roesijadi et Robinson, 1994; Cullen et Maldonado, 2013). Le cadmium dans les eaux naturelles peut se retrouver sous forme libre (Cd²⁺). Cependant, le cadmium a une forte tendance à se complexer avec la matière organique naturelle (ex : acides fulviques). La complexation dépend de plusieurs facteurs tels que le pH, la forme de carbone organique dissous ou encore la présence d'autres cations (Ca²⁺, Mg²⁺), mais aussi de la constante de complexation (K_c) (Crea et coll., 2013; Cullen et Maldonado, 2013). Il peut aussi se lier à des composants inorganiques. Ainsi, il a une forte affinité avec les ligands doux tels que le Cl⁻ et une plus faible avec les ligands donneurs d'oxygène (OH⁻, CO₃²⁻) (Crea et coll., 2013). De plus, un des facteurs importants qui contrôle les potentiels effets du cadmium dans l'environnement est l'adsorption. En effet, le cadmium a tendance à s'adsorber sur les particules en suspension dans l'eau et à se sédimenter (Cullen et Maldonado, 2013).

D'autres formes existent dans l'environnement, mais elles sont en moins grande abondance. En solution, c'est la forme Cd²⁺ qui est le meilleur prédicteur de la biodisponibilité et de la toxicité du cadmium envers les organismes aquatiques (Roesijadi et Robinson, 1994; Martin-Garin et Simon, 2004).

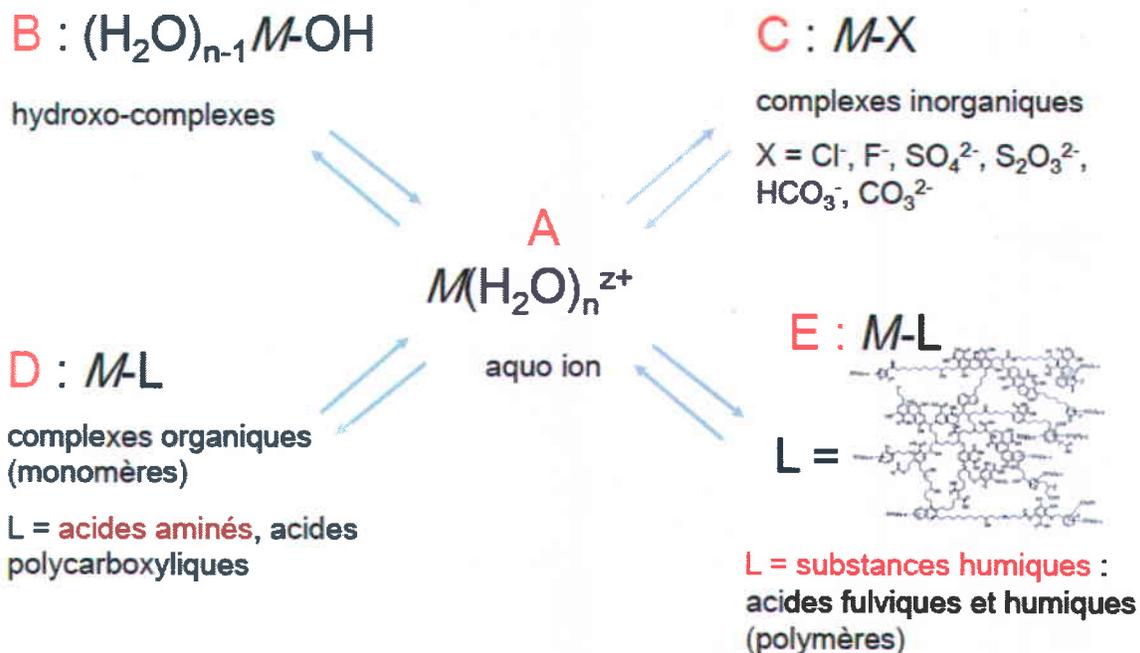


Figure 2. Spéciation des métaux dissous dans l'environnement (Peter Campbell. Comm. Pers. 2013).

1.1.1.4 Affinité et voies d'entrée dans les poissons

Étant un métal non essentiel, le cadmium n'a pas de transporteur spécifique à lui pour entrer dans les cellules des organismes. Ainsi, celui-ci va emprunter la voie des métaux essentiels tels que le calcium, le zinc, le manganèse ou le fer (Goyer, 1997). Le cadmium peut entrer de différentes manières dans les cellules des organes, soit par simple diffusion (s'il est présent sous forme lipophile), par transport facilité, ou par endocytose (Brillant, 1993 ; Coombs, 1979). Plusieurs études ont démontré que, dans les branchies, le cadmium peut utiliser les sites de transport du calcium pour pénétrer dans la cellule ou encore, des transporteurs spécifiques comprenant des groupes sulfhydryle (Limaye et Shaikh, 1999). Cependant, Wicklund-Glynn et coll. (1994) ont montré que le cadmium entrait principalement dans les branchies par les cellules à chlorure (Niyogi et coll., 2004).

Au sein de l'organisme, l'ion cadmium (Cd^{2+}) peut se lier avec différents substrats. Ainsi, il a une affinité importante avec les molécules organiques (protéines, purines, acides nucléiques, etc.) et avec les groupes sulfhydryles (thiol déprotoné ; Aylett, 1979). Cependant, cet ion peut être lié par d'autres ligands intracellulaires comme le glutathion ou les « Heavy Metal Binding Protein » dont les métallothionéines (MT) qui sont impliquées dans les réponses à la toxicité du cadmium (voir section 1.5; Martin-Garin et Simon, 2004).

1.1.1.5 Effets sur les organismes aquatiques

Les animaux aquatiques peuvent être contaminés par le cadmium via la voie aqueuse, la diète ou un mélange des deux. Une fois entré dans ceux-ci, le cadmium s'accumule principalement dans le foie, les reins et les branchies (fig.3; Niyogi et coll., 2004).

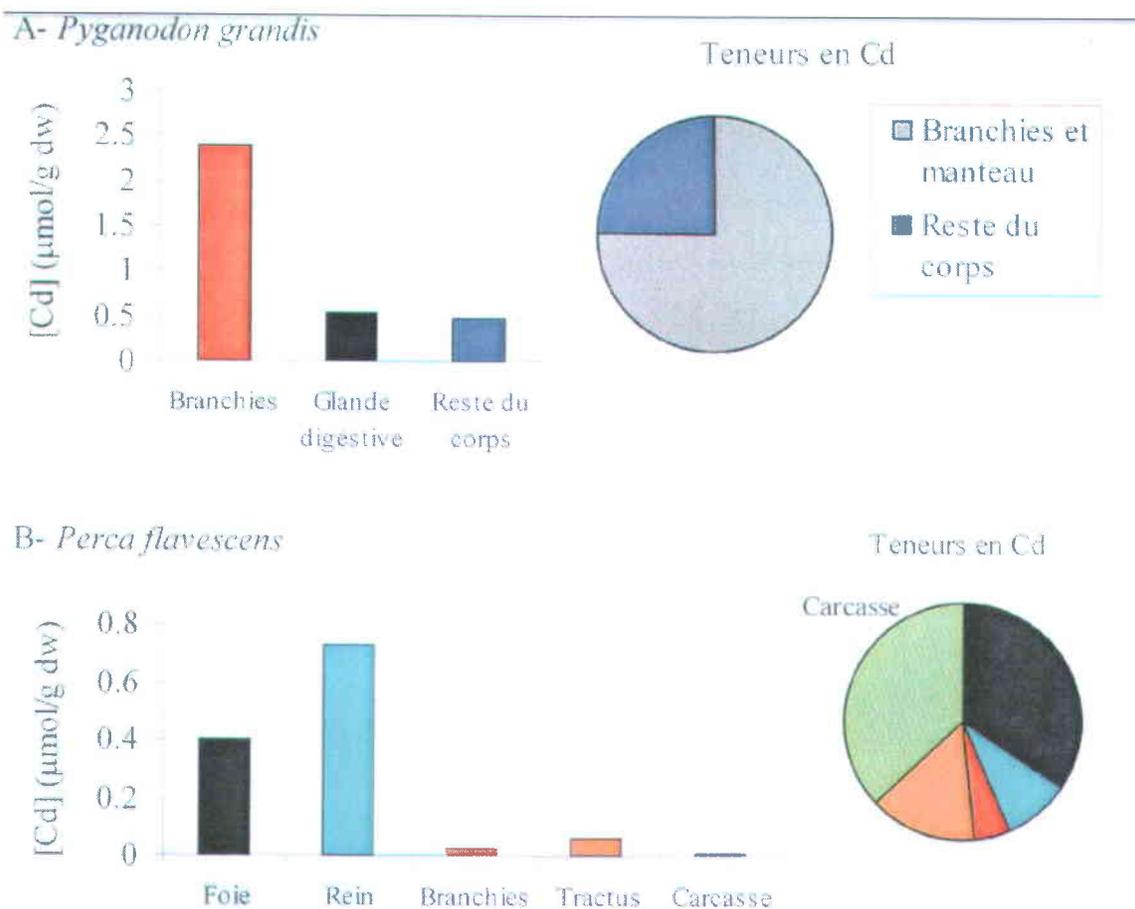


Figure 3. Concentrations et teneurs en Cd de différentes parties du corps de deux organismes récoltés dans des lacs contaminés (A) le bivalve *Pyganodon grandis* prélevé dans le lac Vaudray (Couillard et coll., 1993), (B) la perchaude *Perca flavescens* prélevée dans le lac Dufault (Giguère, 2003).

De plus, pour tous les maillons de la chaîne trophique, le cadmium est accumulé (Martin-Garin et Simon, 2004). Il est possible de voir que la sensibilité des organismes au cadmium varie et peut être classée en ordre croissant, du plus sensible au moins sensible : invertébrés aquatiques, poissons/amphibiens et producteurs primaires (EU, 2003). Aussi, il est important de prendre en compte les particularités de chacun des organismes tels l'espèce, la taille des individus, leur stade de développement, leur état nutritionnel et de santé, la constitution interne de l'organisme et le sexe qui ont une grande influence sur la toxicité du contaminant (Sprague, 1985).

Les effets du cadmium sur les organismes vivants sont très bien documentés dans la littérature. Ainsi, il serait difficile de décrire tous les impacts de ce métal sur l'ensemble des organismes. Ce mémoire portant sur l'effet de métaux traces sur les poissons, l'accent sera mis sur les effets du cadmium sur ces derniers.

Lors d'une exposition aiguë au contaminant, la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) va présenter plusieurs altérations endocriniennes (Hontela et coll., 1996 ; O'Norris et coll., 1997 ; Brodeuret coll., 1998 ; Leblond et Hontela, 1999 ; O'Norris et coll., 1999). Par exemple, ces chercheurs ont observé une élévation du taux de cortisol dans le poisson. Le cortisol est important dans l'élaboration des moyens de défenses de la faune piscicole (Leblond et Hontela, 1999). Aussi, à des doses sous-létales de cadmium, les mêmes observations qu'en exposition aiguë pour la fonction endocrinienne sont constatées (Ricard et coll., 1997). Par contre, quand le contaminant est en forte concentration, les dommages et les perturbations de la fonction endocrine sont plus importants chez la truite. Ainsi, les moyens de défense des individus vont être réduits en raison de la diminution du taux de cortisol dans le plasma (Hontela et Vijayan, 2008).

Pour plusieurs poissons telles que la perchaude ou la truite arc-en-ciel, le cadmium va interagir sur l'homéostasie et le métabolisme calcique en induisant une inhibition de la Ca^{2+} ATPase, ce qui pourrait conduire à la mort de l'organisme (Staessen et coll., 1996; Niyogi, 2004).

Plusieurs changements ont été observés chez les poissons. Cependant, il est important de prendre en compte que ces effets ont été observés suite à des expositions à de très fortes concentrations de cadmium (de l'ordre du mg/L) qu'il n'est pas possible de retrouver sur le terrain. Par exemple, au niveau morphologique, le mené (*Phoxinus sp.*) développe une scoliose de la colonne vertébrale (Bengtsson, et coll., 1976) et la truite mouchetée (*Salvelinus fontinalis*) des déformations après trois générations (Tableau 1; Benoit et coll., 1976). Au niveau comportemental, la truite montre une hyperactivité lors d'une exposition à moyen terme (huit semaines ; Benoit et coll., 1976). La plie (*Pleuronectes platessa*), quant à elle, affiche une hypersensibilité, des mouvements natatoires non coordonnés, la perte d'équilibre, une léthargie et un déséquilibre ionique (Larsson, et coll., 1981). Au niveau respiratoire, les branchies et le système respiratoire sont affectés négativement par le cadmium. Ainsi, les membranes respiratoires sont endommagées et cela mène à une asphyxie du poisson (Leland et Kuwabara, 1985). Au niveau métabolique, lors d'une exposition chronique au cadmium, si la concentration

de celui-ci est faible, le métabolisme des sucres sera modifié chez la truite arc-en-ciel (Larsson et Haux, 1981). De plus, chez tous les poissons, le cadmium perturbe les enzymes du foie et du rein essentielles aux fonctions vitales (Forlin et coll., 1985).

Lors d'une exposition chronique, la perchaude (*Perca flavescens*) subit aussi des altérations endocrinienne et métabolique, comme une réduction du taux de cortisol dans le plasma (Campbell et coll., 2004; Hontela et Vijayan, 2008). De plus, plusieurs études sur le terrain ont mis en avant que les activités de plusieurs enzymes du foie et du muscle sont perturbées par les métaux traces présents dans leur environnement dont le cadmium (Rajotte et Couture, 2002; Audet et Couture, 2003; Couture et Kumar, 2003; Giguère et coll., 2004; Gauthier et coll., 2011). Cependant, dans ces études, il est assez difficile de conclure avec certitude quels facteurs abiotiques comme le cadmium ou biotiques comme la densité des individus sont responsables de ce que l'on voit. Ces études viennent donc en complément des études de laboratoire qui peuvent avoir un contrôle sur tous les facteurs. Plusieurs de ses organes vont aussi être affectés par le cadmium. Ainsi, le foie est altéré et les cellules du rein subissent l'action toxique du cadmium (néphrotoxicité ; Olsson et Haux, 1985). Au niveau génétique, le cadmium induit une surexpression ou une sous expression de plusieurs gènes, tels acetylcoenzyme A synthetase, phosphoenolpyruvate carboxykinase ou encore la biotinidase, qui sont importants pour la survie de l'organisme (Pierron et coll., 2009). Au niveau physiologique, la réduction des réserves énergétiques au niveau du foie retarde la maturité et la croissance des organismes (Lévesque et coll., 2003), qui se voit par une diminution de l'indice de condition des poissons des environnements contaminés au cadmium (Gauthier et coll., 2011). Enfin, là encore, les réserves énergétiques du foie sont altérées par le contaminant (Campbell et coll., 2004).

Tableau 1. Principaux changements morphologiques causés par la contamination au chlorure de cadmium (CdCl₂) chez l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*), F : Foie, R : Rein et M : muscle (Brillant, 1993).

	Chronique			Subaigüe			Aigüe		
	F	R	M	F	R	M	F	R	M
Accumulation membranaire	x			xx		x	xx		
Augmentation du réticulum endoplasmique lisse	x			xx			xx	xxx	
Désorganisation des mitochondries	x	x		xx	xx	x	xxx		
Dépôts cytoplasmiques	x			xx			xx		
Vacuolisation de l'hétérochromatine				xx			xx		
Réticulum concentrique				xx			xx		
Réduction des organites cellulaires							xx		xx
Accumulation des lipides membranaires							xx		

F=foie, R=rein, M=muscle

1.1.2 Toxicité du nickel

1.1.2.1 Généralités

Le nickel, un métal argenté dur ou une poudre grise, se retrouve rarement à l'état naturel (24^e élément constituant la croûte terrestre; Carex Canada, 2009). C'est un autre métal auquel s'intéresse le monde entier, car il est exploité dans plusieurs mines à travers le monde. En 2007, le Canada était le 2^e producteur mondial de nickel juste après la Russie avec 15% de la production mondiale (Carex Canada, 2009; Ressources naturelles Canada, 2008). De plus, ayant un rayon ionique et une électronégativité comparable au cobalt, au fer et au magnésium, il peut remplacer ces éléments dans les minéraux (Nriagu, 1980).

1.1.2.2 Sources

Malgré sa rareté à l'état naturel, il est possible de retrouver du nickel dans l'environnement venant de l'altération et de l'érosion naturelle de matériaux géologiques ou du transport atmosphérique (poussières du sol, volcans, feux de forêts, etc.; Galbreath et coll., 1991; Environnement Canada. Santé Canada, 1984). Aussi, il est présent en éléments traces dans d'autres minéraux et dans les embruns maritimes pendant l'hiver. Cependant, la principale source de libération de nickel est la poussière du sol et la végétation (Environnement Canada.

Santé Canada, 1984). Au Canada, en 1975, les rejets naturels de nickel dans l'atmosphère étaient de 595 à 11 200 t (poussière de sol, 480 - 2 400 t; feux de forêt, 15 - 7 500 t; végétation, 100 - 1 300t) (CNRC, 1982).

Les sources naturelles de nickel dans les plans d'eau sont minimales comparées aux sources anthropiques. Ainsi, les dépôts atmosphériques, les effluents, les lixiviats et les processus industriels tels que les opérations d'extractions, de fusion, de combustion de combustibles fossiles peuvent être des voies d'entrées du nickel (Galbreath et coll., 1991; Ressources naturelles Canada, 2008). Les eaux de ruissellement des routes peuvent aussi apporter du nickel aux écosystèmes aquatiques.

Au Canada, la production annuelle de nickel a été évaluée à 260 Mt en 2008 (Ressources naturelles Canada, 2008). Les provinces canadiennes productrices de nickel sont l'Ontario (53% de la production; Ressources naturelles Canada, 2008), le Manitoba, le Québec et l'Alberta (Ressources naturelles Canada, 2008 ; Environnement Canada. Santé Canada, 1984).

1.1.2.3 Cycle biogéochimique du nickel

Il existe plusieurs formes de nickel retrouvées dans les cours d'eau suivant les composés présents dans l'environnement (matière organique, autres métaux, pH, etc.; Hazardous Substances Data Bank, 2011; Environnement Canada. Santé Canada, 1984). En effet, comme le cadmium, le nickel existe sous forme libre (Ni^{2+}) dans les eaux naturelles. D'après Hazardous Substances Data Bank (2011), le nickel est le métal le plus mobile dans l'environnement aquatique. Malgré ça, le nickel peut se complexer dans cet environnement. Ainsi, il peut se lier avec des ligands inorganiques ($NiSO_4$) ou avec des ligands organiques d'origine synthétique (acide nitrilotriacétique, NTA; acide éthylène-diamine-tétracétique, EDTA) ou encore avec des ligands organiques naturels (acides aminés; acides humique et fulvique; CECPI, 1984; Hazardous Substances Data Bank, 2011). De plus, comme le cadmium, le nickel a tendance à s'adsorber sur les particules en suspension présentes dans l'environnement aquatique et ensuite à se sédimenter (CECPI, 1984; Hazardous Substances Data Bank, 2011). La plupart des composants du nickel se retrouvent sous forme particulaire à température ambiante (Cotton et Wilkinson, 1980; Environnement Canada. Santé Canada, 1984; Lide 1992; Hazardous Substances Data Bank, 2011). Donc, les risques relatifs au nickel sont dépendants de son transfert dans l'environnement, de son absorption et de sa métabolisation par les êtres vivants.

1.1.2.4 Affinité et voies d'entrée dans l'organisme

Présentement, l'essentialité ou la non-essentialité du nickel est ambiguë. En effet, les chercheurs ne sont pas encore arrivés à un consensus. Certains pensent que le nickel est un métal non essentiel pour les organismes aquatiques, car il n'aurait pas de transporteur spécifique à lui pour entrer dans leurs cellules. Ainsi, celui-ci pourrait emprunter le transporteur du Mg^{2+} (Pyle et Couture, 2011). D'autres pensent qu'il est essentiel, car il semble subir une régulation active une fois entrée dans l'organisme (Chowdhury et coll. 2008). D'après plusieurs études, le nickel peut entrer dans les animaux aquatiques par deux voies : les branchies ou l'intestin/estomac. Pour les poissons, le nickel, entrant par les branchies, va être absorbé et transporté par le sang jusqu'aux différents organes, causant des effets néfastes à l'organisme (Kubrak et coll., 2012). Le nickel contenu dans le sang va être lié par des albumines ou des peptides courts (Pyle et Couture, 2011).

Au sein de l'organisme, l'ion nickel (Ni^{2+}) peut se lier avec différents substrats. Ainsi, il a une affinité importante pour certains acides aminés comme l'histidine, et pour d'autres ligands ayant l'oxygène et l'azote comme atomes donneurs, mais en contraste avec le Cd il n'a qu'une faible affinité pour les groupements thiol (-SH). Le nickel se lie aux acides nucléiques et aux protéines, ce qui peut entraîner l'inhibition de certaines ATPases tels les Mg^{2+} ATPase et Ca^{2+} ATPase (Pyle et Couture, 2011; Asthana et coll., 1992).

Dans le plasma, le nickel peut passer les barrières cellulaires en formant un complexe avec l'histidine, pouvant ainsi atteindre le noyau et les autres composants subcellulaires (Pyle et Couture, 2011).

1.1.2.5 Effets sur les organismes aquatiques

Les animaux aquatiques sont exposés au nickel via l'eau et leur alimentation. Il va s'accumuler principalement dans les os, les branchies et les reins (Pyle et Couture, 2011). Suivant les organismes (espèce, la taille des individus, leur stade de développement, leur état nutritionnel et de santé, la constitution interne de l'organisme et le sexe), le nickel va avoir une toxicité et des effets différents. Ainsi, les poissons juvéniles seront plus impactés que les autres stades de vie (Andral, 1994; Pyle et Couture, 2011).

Les chercheurs ont montré que le nickel a des effets sur les poissons. Cependant, là encore, les concentrations auxquelles ont été exposés les poissons étaient élevées (de l'ordre du mg/L), ce qui excède largement les concentrations les plus élevées retrouvées sur le terrain. Le nickel peut

avoir un impact au niveau de la croissance, de la reproduction, de la respiration et du comportement. De plus, il peut aussi créer des dommages au niveau génétique, histopathologique et de l'homéostasie du Mg^{2+} chez les poissons (Pyle et Couture, 2011). En effet, il est reconnu pour endommager les tissus et avoir des effets génotoxiques (Environnement Canada. Santé Canada, 1984; Pyle et Couture, 2011). Au niveau physiologique, des lésions branchiales sont observées avec une augmentation de la distance de diffusion et donc une diminution des fonctions respiratoires. De plus, des effets tératogènes ont pu être observés chez plusieurs poissons (Pyle et Couture, 2011).

Le nickel peut entraîner des perturbations métaboliques en forçant l'organisme à produire de l'ATP en anaérobie plutôt qu'en aérobie. Afin de supporter ce changement, il induit des altérations dans le métabolisme des glucides, la diminution des réserves de glycogène et une augmentation de la glycémie (hyperglycémie) et des concentrations en lactate (Kubrak et coll., 2012; Pyle et Couture, 2011). L'étude de Maxwell et Salnikow (2004) a montré que l'ion nickel peut se substituer au fer de l'hydroxylase prolyl et ainsi inhiber l'« hypoxia inducible factor » (HIF) qui est une protéine permettant la transcription pendant l'hypoxie. De plus, il peut inhiber la réponse au stress oxydant en diminuant les enzymes antioxydantes tel que la catalase (Kubrak et coll., 2012)

Au niveau cellulaire, le nickel va engendrer des dommages oxydatifs dans les tissus. La bande 3, protéine membranaire de l'hématie, assurant le transport de l'oxygène et du CO_2 , va alors subir un changement de sa structure dû à l'oxydation du groupe SH et de la contraction des cellules (augmentation du passage de K^+ et de la phosphorylation de la tyrosine). Ce changement amène à réduire l'habilité de la bande 3 à réguler le transport des anions, mais aussi affecte la cinétique d'absorption des sulfates (De Luca et coll., 2007; Pyle et Couture, 2011). Le dommage induit aux membranes lysosomales conduit à une réduction des protéines intracellulaires (Pyle et Couture, 2011).

Cependant, le nickel est généralement moins toxique que plusieurs autres métaux (Cd, Cu, Pb; Pyle et Couture, 2011) et il peut jouer un rôle important dans les cellules de certains microorganismes. Ainsi, l'étude d'Othmer (2003) a montré que le nickel pourrait activer certaines enzymes, avoir un rôle dans la stabilisation de l'ARN et de l'ADN ou encore dans la structure des membranes ou du métabolisme.

1.2 La perchaude

1.2.1 Généralités

La perchaude (*Perca flavescens*) est un poisson dulcicole qui fait partie de la famille des Percidés. Elle est endémique et très répandue à travers l'Amérique du Nord et il est possible de la retrouver dans différents habitats tels des lacs, des rivières tranquilles ou des étangs. De plus, la perchaude est relativement tolérante aux faibles teneurs en oxygène et tolère une large gamme de températures, mais sa température optimale se situe entre 7 et 11°C (Clady, 1976; Scott et Crossman, 1973). Suivant son stade de vie, la perchaude va adapter son alimentation passant du plancton au stade juvénile, au benthos, puis une fois adulte, elle devient piscivore (Scott et Crossman, 1973; Sherwood et coll., 2002).

1.2.2 Rôle de bio-indicateur

Contrairement à la truite arc-en-ciel ou autête de boule, dites espèces sensibles, la perchaude est considérée comme une espèce tolérante aux métaux (Niyogi et coll. 2004). Qu'elle soit au stade juvénile ou adulte, la perchaude est très exposée aux métaux par son alimentation et par l'eau. Elle est très abondante dans les lacs contaminés et souvent elle va être la dernière espèce piscicole à être encore présente dans les lacs fortement contaminés. D'après l'étude de Niyogi et coll. (2004), la perchaude est 400 fois plus tolérante que la truite arc-en-ciel à l'exposition aqueuse aiguë de cadmium. De ce fait, la truite arc-en-ciel est très utilisée pour les recherches en toxicologie, surtout au laboratoire.

1.3 Indices biométriques

Afin de quantifier les effets des changements environnementaux chez les poissons, des indications de base sur la condition, la santé et le taux d'alimentation des organismes peuvent être obtenues avec des indices biométriques. Il en existe plusieurs, mais dans ce mémoire ce sont l'indice de Fulton et l'indice des cæca pyloriques qui seront étudiés.

Les cæca pyloriques sont situés dans la partie supérieure de l'intestin des poissons. Ils sont formés de digitations qui ont pour rôle d'accroître la surface de contact des aliments afin d'avoir une meilleure absorption des nutriments par l'organisme. Ils jouent aussi un rôle important dans la décomposition enzymatique (Buddington and Diamond, 1987). Sa forme et le nombre de digitations varient selon les espèces. Ainsi, chez la perchaude la majorité du temps, les cæca en auront trois. De plus, différentes études ont montré que la quantité de nourriture ingérée par l'individu influence la taille des cæca (Shaibani et coll.. 2013 ; Gauthier et coll. 2009).

Afin de faire fonctionner leur organisme, les poissons ont besoin de réserves énergétiques. Suivant leur stade de vie, cela peut être pour la croissance, la reproduction ou encore pour maintenir le métabolisme de base. La quantité de ces réserves va dépendre de leur alimentation et des différents stress extérieurs. L'indice de Fulton, aussi appelé indice d'embonpoint, permet d'avoir une estimation de la santé des poissons individuellement ou au sein d'une population en se basant sur leur masse et leur longueur. Cela renseigne sur l'alimentation et l'accumulation des réserves énergétiques des dernières semaines. Cet indice peut aussi permettre de savoir si les poissons vont survivre ou pour les jeunes savoir s'ils vont passer leur premier hiver (Dutil et Lambert, 2000; Engelhard and Helno, 2006; Bennett and Janz, 2007). Des facteurs internes peuvent avoir une influence sur l'indice d'embonpoint. Tout d'abord, le poisson peut avoir un gain de poids suite à la croissance des gonades ou encore à l'accumulation de protéines et de lipides. Néanmoins, il peut perdre du poids ou de l'énergie lors de la reproduction, d'une croissance en longueur ou encore lors de changements dans le métabolisme que ce soit du aux métaux, à l'hypoxie ou tout autre stress. De plus, beaucoup de facteurs externes, directs ou indirects, peuvent influencer cet indice tels que la température de l'eau (-), la concentration en oxygène (-), la quantité et la qualité des proies consommées (+/-), la présence de prédateurs (+) ou la densité des individus (+/-). Aussi, plusieurs études ont montré que les métaux traces non essentiels retrouvés dans l'environnement peuvent influencer sur la condition des poissons (Gauthier et coll. 2009; Gauthier, 2010; Pyle et coll., 2008).

1.4 Enzymes

Les enzymes sont considérées comme des catalyseurs biologiques. Ainsi, leur rôle est de réguler (accélérer ou ralentir) les réactions chimiques à l'intérieur des cellules afin de créer ou de transformer de l'énergie provenant des réactifs. Ces actions peuvent être rassemblées en deux catégories, le catabolisme et l'anabolisme. Le premier permet dégrader des molécules complexes afin de libérer de l'énergie tandis que le deuxième fait de la biosynthèse en utilisant l'énergie obtenue du catabolisme afin de créer des molécules complexes. De plus, elles sont principalement des protéines, mais il existe d'autres formes comme les ribozymes. Leurs principales caractéristiques sont leur pouvoir catalytique et leur spécificité. Ainsi, avec les enzymes, les réactions intra- et inter-cellulaires se complètent au minimum 10^5 fois plus vite que lorsqu'elles ne sont pas présentes. Par exemple, l'hydratation du dioxyde de carbone par l'*anhydrase carbonique* est plus de 10^6 fois plus rapide que sans cette enzyme; c'est l'une des enzymes les plus rapides dans les organismes (Stryer, 1988). Par contre, du à leur spécificité,

chaque enzyme va intervenir dans une seule réaction ou un ensemble de réactions similaires en catalysant et en choisissant les réactifs ou substrats appropriés afin que l'enzyme soit à son potentiel maximal (Stryer, 1988).

Pour une meilleure efficacité, l'action des enzymes est, elle aussi, régulée en fonction des besoins de l'organisme. Ainsi, le produit final, des modifications de conformation ou encore des protéines régulatrices peuvent inhiber ou stimuler l'activité de l'enzyme afin que le produit soit en quantité suffisante pour l'organisme (fig. 4; Stryer, 1988). Cependant, des sources extérieures peuvent aussi inhiber ou stimuler l'activité enzymatique de façon réversible ou irréversible. Lors de l'inhibition, il existe deux formes d'inhibiteurs, les compétiteurs et les non-compétiteurs, qui n'ont pas le même moyen d'action (fig. 5; Stryer, 1988). Les métaux font partie de cette deuxième catégorie et peuvent donc empêcher les enzymes de fonctionner correctement et ainsi impacter l'organisme entier (Prescott et coll., 2003).



Figure 4. Rétroinhibition de la première enzyme dans la voie par la liaison réversible du produit final (Modifié de Stryer, 1988). Croix rouge : enzyme inhibé par le produit D.

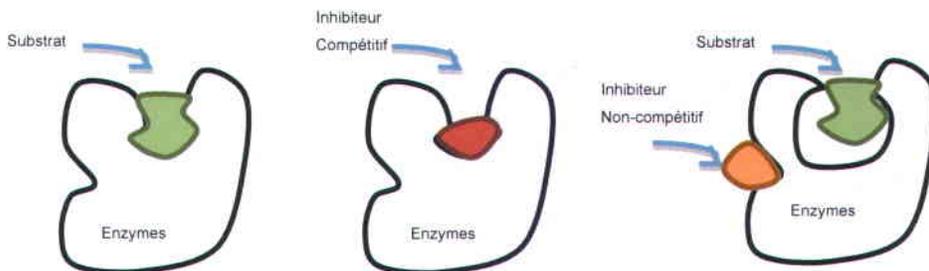


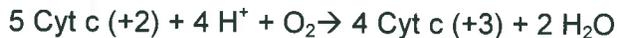
Figure 5. Distinction entre un inhibiteur compétitif et non-compétitif. En haut : complexe enzyme-substrat. Au milieu : un inhibiteur compétitif empêche la liaison d'un substrat. En bas : un inhibiteur non-compétitif n'empêche pas la liaison mais change la conformation de l'enzyme (Stryer, 1988).

1.4.1 Enzymes d'intérêt

Il existe plusieurs types d'enzymes suivant leurs rôles. Dans cette étude, l'importance sera mise sur les capacités glycolytique et aérobie, la biosynthèse et la réponse au stress oxydant. Pour ce faire, cinq enzymes ont été choisies en fonction des précédentes études qui ont montré que

les voies métaboliques, représentées par ces enzymes-clés, pouvaient être perturbées par les métaux traces (Audet et Couture, 2003; Couture et coll., 2008; Couture et Pyle, 2008).

Tout d'abord, l'enzyme cytochrome C oxydase (CCO) fait partie du métabolisme aérobie. Elle forme le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne des mitochondries. Elle permet de catalyser le transfert d'électrons entre le cytochrome C et la molécule d'oxygène suivant la formule (Stryer, 1988) :



Cette enzyme est intéressante à quantifier car elle donne un indice de la capacité du système de transport des électrons.

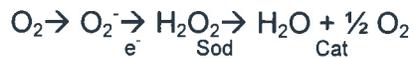
Ensuite, lors d'un effort intense ou quand l'apport d'oxygène est limité, l'organisme peut utiliser l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) afin de réduire le pyruvate en lactate et transformer le NADH en NAD⁺ en conditions anaérobies. De plus, cette transformation permet d'obtenir de l'énergie sous forme d'ATP (Stryer, 1988). En suivant cette enzyme, il est possible d'avoir un indice sur les capacités anaérobies de l'organisme et donc sur la production d'énergie sous condition anaérobie. Lorsque ce dernier est soumis à un stress extérieur, par exemple la présence de cadmium, il a été vu que l'activité enzymatique était plus faible dans le muscle et plus forte dans le foie des perchaudes des lacs contaminés (Audet et Couture, 2003).

Afin d'estimer le potentiel de biosynthèse des protéines, le dosage de l'enzyme nucléoside diphosphate kinase (NDPK) est intéressant. Ainsi, cette enzyme interconvertit les nucléotides diphosphates et triphosphates, ce qui fait qu'elle a une large spécificité (Stryer, 1988).

Afin de contrer les effets néfastes des espèces réactives d'oxygène (ROS), l'enzyme superoxyde dismutase catalyse, et donc accélère, la dismutation de l'anion superoxyde en le transformant en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Au niveau de la défense antioxydante des cellules des organismes aérobies, la SOD est une partie importante du système de défense contre les radicaux libres. Cette enzyme se retrouve en forte concentration dans plusieurs organes, dont le foie et le rein (Stryer, 1988).

À la suite de la SOD, une autre enzyme antioxydante est présente : la catalase. Son action empêche l'organisme de subir les effets néfastes et oxydants du peroxyde d'hydrogène, en partie formé par la SOD. Présente, elle aussi, dans la majorité des cellules aérobies, elle permet

de catalyser la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et molécule d'oxygène (Stryer, 1988).



1.5 Répartition subcellulaire

La distribution des métaux traces dans les différentes fractions de la cellule est appelée la répartition subcellulaire. La régulation des métaux au sein des cellules est très importante pour la survie de l'organisme. Ainsi, quand les métaux traces sont internalisés, ils vont se lier aux ligands de la cellule. Le choix du ligand dépend de la concentration en métaux, du métal, de la préexposition, de la tolérance, de la voie d'entrée et de l'espèce (Roesijadi et Robinson, 1994; Mason et Jenkins, 1995).

La classification des fractions où vont se retrouver les métaux traces se fait suivant leur sensibilité aux métaux (Wallace et coll., 2003; Giguère et coll., 2006). Tout d'abord, les protéines dénaturées à la chaleur (enzymes; « Heat denaturable proteins » ou HDP), les organelles et les mitochondries sont classées dans les fractions dites sensibles, car leurs fonctions biologiques vont être affectées par les métaux non essentiels. Ensuite, les protéines stables à la chaleur (« Heat stable proteins » ou HSP), dont les métallothionéines (MT), et les granules sont identifiées comme les fractions détoxiquées. Les MT sont des peptides présentant une faible masse et contenant beaucoup de cystéine. Elles détiennent des affinités de liaisons sélectives pour certains métaux. D'ailleurs, elles participent à la régulation de la concentration de certains métaux essentiels (ex. : zinc et cuivre; Kagi, 1991; Laflamme et coll., 2000). Elles se retrouvent principalement dans le foie, les branchies et l'intestin, mais il est possible de les retrouver dans l'ensemble des cellules en quantité moindre. Cependant, c'est le foie qui est le principal organe de détoxification. Un autre type de séquestration des métaux peut s'effectuer, cette fois, via des polyphosphates dans les lysosomes ou via la séquestration par des sulfures ou des polysulfures, qui contribuent à les faire précipiter (Weis et coll., 1986; Lanno et coll., 1987; Mason et Jenkins, 1995; Martin-Garin et Simon, 2004). Les polyphosphates sont composés de longs polymères, de centaines ou de milliers d'orthophosphates, qui sont liés par des liens phosphoanhydrides de hauts niveaux d'énergie et possédant des résidus pouvant complexer le calcium et le magnésium, mais aussi le cadmium. La séquestration par les sulfures ou les polysulfures est possible grâce à la forte affinité du cadmium pour le soufre réduit. Ainsi

combinés, ils ont tendance à précipiter au sein des vacuoles, d'où la dénomination de granules, et peuvent alors être potentiellement exclus des cellules par l'exocytose (Mason et Jenkins, 1995). Enfin, la détermination de la quantité de métaux traces présents dans les fractions sensibles devrait donner une indication sur la toxicité engendrée par les métaux. Cependant, il y a relativement peu d'études qui ont réussi à montrer une relation entre la répartition subcellulaire des métaux et leur toxicité.

1.6 Objectifs et hypothèses de recherche

De nos jours, la majorité des études (éco)toxicologiques portent sur des métaux traces individuels. Cependant, dans l'environnement aquatique, les métaux se retrouvent la plupart du temps en mélange. Il paraît donc important de savoir si les mélanges de métaux induisent des changements différents de ceux propres aux métaux individuels dans les mécanismes d'internalisation et dans la toxicité des métaux.

L'objectif principal de cette étude est de quantifier les interactions et les effets toxiques qui en découlent pour les deux métaux traces (Cd et Ni) lorsqu'ils sont en mélange. Le devenir du cadmium et du nickel dans les cellules et les voies métaboliques impactées par ces derniers seront étudiés lorsqu'ils sont en mélange, mais aussi quand ils sont seuls. Puisque les mécanismes de toxicité de ces deux métaux sont différents, mon hypothèse est qu'il n'y a pas d'influence d'un métal sur l'autre au niveau de la répartition subcellulaire et des conséquences métaboliques et donc sur la toxicité propre de ces deux métaux lorsqu'ils se retrouvent en mélange.

Tout d'abord, une expérience au laboratoire a été menée afin de quantifier les impacts venant des métaux séparément puis en mélange. Au laboratoire, pour les poissons exposés par voie aqueuse au cadmium et au nickel individuellement ou en mélange, les objectifs spécifiques sont de comparer (1) la répartition subcellulaire des deux métaux; (2) l'influence de la présence d'un métal sur la distribution de l'autre; et (3) les réponses toxiques au niveau physiologique.

Par la suite, une campagne de terrain a été menée avec pour objectif spécifique de faire un parallèle entre l'exposition à court terme au laboratoire de poissons non acclimatés aux métaux traces et les expositions chroniques au Cd et au Ni en milieu naturel. Au vu de la différence de temps d'exposition, mon hypothèse est que la réponse aux métaux, aussi bien au niveau de la

répartition subcellulaire qu'au niveau des capacités métaboliques, ne sera pas identique, car les perchaudes ont eu le temps de s'acclimater voire même de s'adapter.

2 Méthodologie

2.1 Expérience de laboratoire

Durant l'automne 2012, une expérience en laboratoire a été conduite au Laboratoire de Recherche en Sciences Aquatiques (LARSA) de l'Université Laval (CIPA #1305-01). Pour ce faire, 450 perchaudes juvéniles (âge <1 an, 6 à 10cm), achetées chez l'aquaculteur Trevor Thomas en Ontario, ont été exposées à différentes conditions : sans métaux, nickel (450 µg/L), cadmium (4 µg/L) et un mélange de cadmium et nickel (4 µg/L et 450 µg/L respectivement). Ces concentrations ont été choisies suite aux études antérieures faites dans notre laboratoire. Elles représentent les concentrations qui peuvent être retrouvées dans les lacs contaminés au nickel et au cadmium des régions minières. Celles-ci ont été soumises à deux périodes d'exposition : dix jours et 49 jours. De plus, les paramètres physicochimiques de l'eau des bassins étaient maintenus stables (T: 10°C, O₂: 100%, alimentation quotidienne : 3% de leur biomasse en *Artemia salina* congelées (Gauthier et coll., 2008)). Les concentrations en métaux ont été mesurées plusieurs fois tout au long de l'expérience et des changements d'eau ont été effectués aux deux jours afin de maintenir les concentrations métalliques stables dans les aquariums. Les poissons ont été acclimatés à leur environnement dans un grand bassin pendant deux semaines. Par la suite, ils ont été séparés en groupes homogènes (taille et poids) de 25 individus puis mis dans les aquariums de 40L. Chaque condition métallique était représentée par 100 individus, soit quatre aquariums (fig. 6).

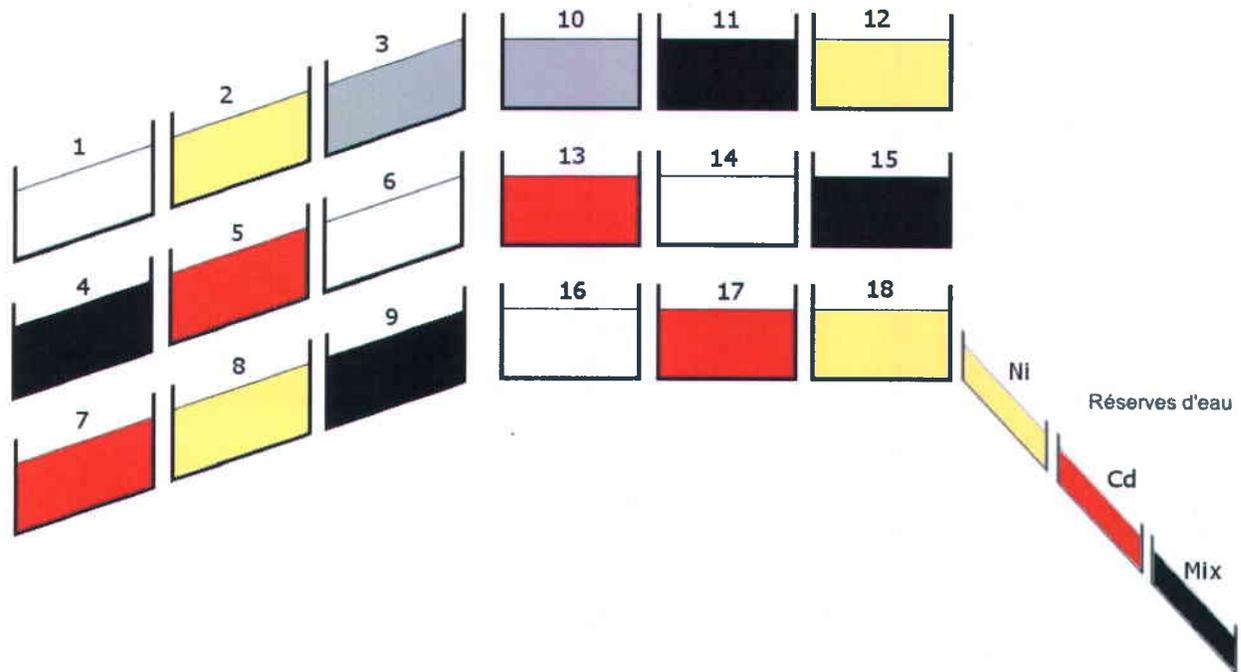


Figure 6. Disposition des aquariums et des réserves d'eau lors de l'exposition au laboratoire (LARSA). Blanc : Témoins, Jaune : Nickel, Rouge : Cadmium et Noir : Mélange (Julie Grasset, INRS-ETE, Comm. Pers. 2012)

Au temps zéro, 50 perchaudes ont été sacrifiées afin de vérifier les niveaux de base de contamination. À dix jours, les poissons de deux aquariums par condition ont été sacrifiés et à 49 jours, le reste des poissons ont été prélevés.

2.2 Échantillonnage terrain

Au mois de juin 2013, une campagne d'échantillonnage a été effectuée à Sudbury et à Bracebridge en Ontario. La région de Sudbury a été choisie, car c'est l'une des plus grandes régions minières exploitant le nickel dans le monde. Les deux lacs contaminés échantillonnés étaient les lacs Hannah (Ni : 117 µg/L, Comm. Personnelle B. Bougas, 2013; Cd : 0,3 µg/L, Giguère et coll., 2006) et Whitson (Ni : 98 µg/L, Audet et Couture, 2003; Cd : 0,6, Rajotte et Couture, 2002) et les deux lacs considérés comme propres étaient les lacs Dickie et RedChalk de la région de Bracebridge. Cinquante perchaudes juvéniles (0+, 6 à 12 cm) ont été récoltées dans chaque lac grâce à une seine de rivage, puis disséquées sur place. Aussi, le pH, la température de l'eau ainsi que l'oxygène dissous ont été quantifiés (YSI, Thermoscientific Orion 3 star DO portable et pH/mV meter, Denver instrument UP-10).

2.3 Mesure et tissus prélevés

Suite à la mise à mort par dislocation cervicale, chaque individu a été pesé ($\pm 0,01g$), mesurée la tête au bout de la nageoire caudale (longueur totale; $\pm 0,05cm$) et sexé (mâle, femelle ou indéterminé). Par la suite, le foie, les cæca pyloriques, les reins et les muscles blancs ont été prélevés. Entre chaque individu, les outils de dissection et de mesure ont été nettoyés afin de ne pas avoir de contamination croisée. Les tissus ont été mis directement dans un tube cryogénique et transférés dans l'azote liquide pour le transport et la conservation jusqu'à leur utilisation puis ils ont été conservés à $-80^{\circ}C$. Enfin, le foie et les gonades ont été pesés ($\pm 0,01g$).

Ces tissus ont servi à différentes analyses :

Les reins : Concentration totale en métaux (analysé individuellement, tous les individus)

Le foie : Répartition subcellulaire (analysé en échantillons composites, 30 individus par temps, par condition) et essais enzymatiques (analysé individuellement, huit individus par temps, par condition)

Les muscles blancs: essais enzymatiques (analysé individuellement, huit individus par temps, par condition)

Les cæca pyloriques : Indices biométriques (analysé individuellement, tous les individus)

2.4 Analyses biométriques

2.4.1 Indice de Fulton

Pour chaque poisson, l'indice de condition a été calculé grâce à la formule suivante :

$$CF = (M/L^3) * 100$$

où M est la masse du poisson(g) et L la longueur totale (cm).

2.4.2 Indice des cæca pyloriques

Les cæca ont été décongelés et rincés, afin qu'il ne reste plus de nourriture à l'intérieur et par la suite, ils ont été pesés ($\pm 0,00005g$). Afin de standardiser les résultats, une correction allométrique a été effectuée, suivant la formule (Gauthier et coll., 2009) :

$$M_{corr} = (M_m/M_f)^b * M_c$$

où M_{corr} est la masse du cæca corrigée, M_m est la masse moyenne des individus de la condition, M_f est la masse de l'individu, b est le coefficient allométrique étant la pente de la relation entre le log de la masse du poisson et le log de la masse du cæcum et M_c la masse du cæcum.

2.5 Détermination des concentrations en métaux dans les tissus

Afin de déterminer les concentrations en métaux dans les tissus, ces derniers ont d'abord été séchés complètement à l'aide d'un lyophilisateur puis pesés. Par la suite, les échantillons ont été digérés suivant une méthode adaptée de Borgmann et coll. (2001) (HNO₃, peroxyde, eau; annexe 1). Enfin, le dosage des métaux a été fait par spectrométrie de masse à plasma à couplage (inductif ICP-MS). Pour le contrôle de qualité, un blanc et un étalon certifié (TORT-2, National Research Council Canada, Halifax, NS, Canada) ont été ajoutés par groupe de 15 échantillons.

2.6 Fractionnement subcellulaire

2.6.1 Centrifugation différentielle

La centrifugation différentielle utilisée est celle de Giguère et al. (2006), qui avait été adaptée du protocole de Wallace et coll. (2003). La figure 7 permet de voir les six fractions obtenues : 1 : les mitochondries, 2 : les microsomes et les lysosomes, 3 : les protéines stables à la chaleur, 4 : les protéines dénaturées à la chaleur, 5 : les granules et 6 : les débris.

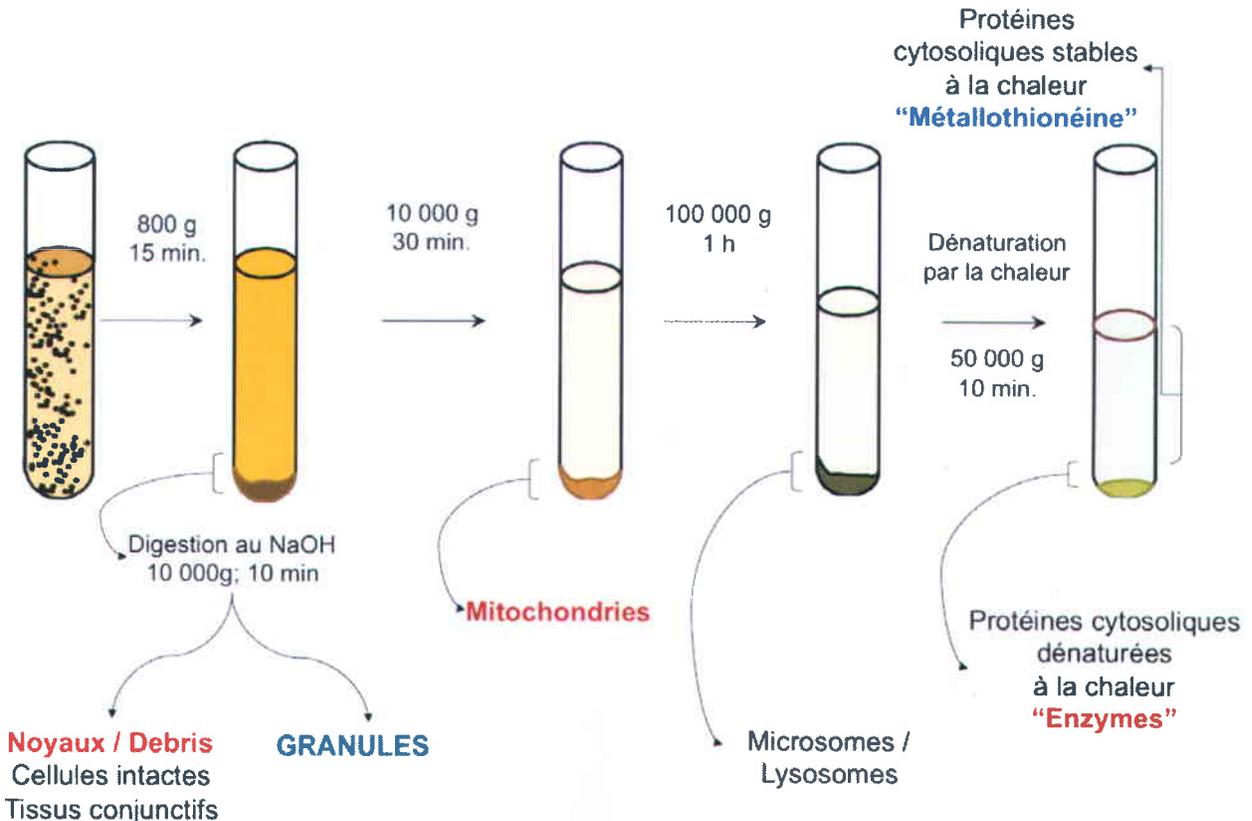


Figure 7. Protocole de répartition subcellulaire (adaptée de Giguère et coll., 2006)

Afin de minimiser la variabilité individuelle (Giguère et coll., 2004), dix foies ont été mis ensemble, formant un réplicat, avec pour chaque condition, un total de trois réplicats. Ces derniers avaient un poids humide minimum de 200mg. L'homogénéisation des foies a été faite dans une solution de Tris/Sucrose(10mM et 250mM respectivement, pH 7,4) grâce à un homogénéiseur(Mastercraft, modèle 55-5917-0) à une vitesse de 570 tours par minute suivant la séquence : cinq fois trois secondes, à toutes les dix secondes. Par la suite, une première centrifugation à 800 x g (4°C, 15 min) a été effectuée afin de séparer les débris/granules des autres parties de la cellule (Étape 1). Le surnageant a été de nouveau centrifugé, cette fois-ci à 10 000 x g (4°C, 30 min), afin de séparer les mitochondries (culot) du reste (Étape 2). Le surnageant a ensuite été centrifugé dans une ultracentrifugeuse à 100 000 x g (4°C, 1h) pour dissocier les microsomes/lysosomes (culot; Étape 4). Pour séparer les protéines stables à la chaleur (surnageant) de celles dénaturées par celle-ci (culot), un choc thermique a dû être fait sur le surnageant (Étape 5). Pour ce faire, il a été mis dans un bain d'huile à 80°C pendant 10 minutes, conservé à 4°C pour une heure et enfin centrifugé à 50 000 x g (4°C, 10 min). Pour le premier culot, il a été re-suspendu dans 500mL d'H₂O milliQ et chauffé à 100°C pendant 2 minutes. Puis, 500mL de NaOH 1N, préalablement filtrés avec un filtre en polyéthersulfone de 0,45µm, afin d'enlever le plus possible le nickel particulaire déjà présent dans la solution, a été ajouté et le mélange a été chauffé à 60°C pendant une heure. Enfin, il a été centrifugé à 10 000x g (20°C, 10 min) pour obtenir les fractions débris (surnageant) et granules (culot).

Pour conserver les fractions jusqu'à la mesure de la concentration métallique, les culots ont été mis au congélateur -4°C et les fractions liquides ont été mises à 4°C avec 100µL de HNO₃ (grade ultra pur).

2.6.2 Détermination des concentrations métalliques dans chaque fraction

Afin de déterminer la concentration totale en métaux dans l'homogénat, un sous-échantillon de 100µL est conservé au début de l'expérience. Pour les fractions solides, le protocole utilisé est le même que dans la section 2.5. Pour les fractions liquides, le protocole de Borgmann et coll. (2001) a été adapté afin de ne pas avoir à assécher les fractions. Ainsi, on assume que 1 ml équivaut à 1 g donc une conversion a été faite pour obtenir la masse correspondante au volume de nos échantillons.

2.6.3 Contrôle de qualité de l'expérience

Afin de savoir si les résultats obtenus sont valides, il faut faire un contrôle de qualité. Pour ce faire, la somme des concentrations en métaux dans les fractions est divisée par la concentration en métaux déterminée dans l'homogénat et multipliée par 100 pour obtenir un pourcentage. Ce dernier doit être compris entre 80 et 120%. Pour le cadmium, ces pourcentages sont respectés, cependant, le nickel est plus problématique à cause de l'ajout du NaOH qui apporte une contamination variable en Ni, et donc la fourchette acceptée se situe entre 80 et 150%.

2.7 Essais enzymatiques

2.7.1 Préparation des échantillons

Les essais enzymatiques ont été effectués sur des échantillons de foie et de muscle blanc de laboratoire et du terrain, conservés à -80°C . À chaque début d'expérience, un morceau de chacun des échantillons du jour a été prélevé puis suspendu dans un tampon d'homogénéisation (pH 7.5; 20 mM HEPES; 1 mM EDTA; 0.1% Triton® X-100) à 1:25 ou, dans certains cas où les enzymes avaient moins d'activité, à 1:10. Par la suite, les échantillons ont été homogénéisés, à l'aide d'un homogénéisateur rotor-stator (Janke & Junkel Ultra-Turrax® T25, IKA-Labortechnik), à une vitesse de 24 000 tours/min, trois fois pendant dix secondes à des intervalles de 30 secondes. Les échantillons ont ensuite été conservés sur glace jusqu'à la fin de l'expérience, pour un maximum de sept heures. Enfin, trois aliquotes ont été conservées au début de l'expérience dans des eppendorfs à -80°C afin de pouvoir doser ultérieurement les protéines et les enzymes SOD et CAT.

2.7.2 Mesures de l'activité enzymatique

Toutes les mesures enzymatiques et de protéines ont été faites à l'aide d'un spectrophotomètre (Cary 50, Varian inc.) lisant les microplaques Costar de 96 puits, soit en cinétique (LDH, NDPK et CCO), suivant les protocoles expérimentaux de Lapointe et coll. (2011) pour la NDPK et ceux adaptés de Pelletier et coll. (1994) pour la CCO et la LDH, soit en concentration (SOD, CAT et protéines) afin d'obtenir l'activité de ces cinq enzymes. Les dilutions nécessaires pour chacune des enzymes ont été déterminées suite aux études menées précédemment au laboratoire et ont été préparées dans le tampon d'homogénéisation avant chaque essai et maintenues sur glace. Pour la LDH, la NDPK et la CCO, chaque plaque a été lue pendant huit minutes afin d'être certain d'avoir un minimum de trois minutes linéaires, nécessaire à la détermination de l'activité enzymatique (UI/g de tissus). La pente de contrôle a été soustraite de la pente de réaction. Pour la SOD et la CAT, une courbe standard a été faite au début de chaque journée d'expérience afin

de déterminer la concentration de chaque échantillon en suivant les instructions du kit (détails dans les sections suivantes SOD et CAT). Aussi, afin d'avoir des résultats plus robustes, chaque homogénat a été dosé trois fois.

À chaque jour, les solutions pour les essais enzymatiques ont été préparées au fur et à mesure et gardées sur glace. Les pesées des poudres ont cependant été effectuées au préalable et conservées à -20°C.

Cytochrome C oxydase (CCO, E.C. 1.9.3.1)

L'activité de la CCO a été mesurée à 550nm afin de suivre l'oxydation du cytochrome C réduit à 550 nm, dont le coefficient d'extinction molaire est de 19,1 (L·mmol⁻¹·cm⁻¹). Pour ce faire, une première solution de Cytochrome C (CytC) à 0,07M a été préparée dans un tampon phosphate (pH 7.0; concentration de phosphate finale de 100 mM, obtenu par le mélange de 0,0615 % volume/volume de solution 1 M de K₂HPO₄ et de 0,0385 % volume/volume de solution 1 M de KH₂PO₄ dans de l'eau ultra pure). Afin de réduire ce dernier, la solution a été bullée pendant cinq minutes avec une pincée de dithionite de sodium. Pour vérifier si le Cytochrome C était bien réduit, l'absorbance de la solution a été mesurée à 550nm et à 565nm; le rapport du premier sur le deuxième devait être supérieur à 9. Une deuxième solution de ferricyanure de potassium (K₃Fe(CN)₆; 0,33% poids/volume) a été préparée dans le tampon phosphate; 10µL de cette solution ajoutés à 990µL de la solution de CytC permet d'avoir le contrôle. Pour l'expérience de laboratoire, les échantillons ont été dilués à 1:500 et 1:100 pour le foie et le muscle respectivement. Pour les échantillons du terrain, ils ont été dilués à 1:1000 et 1:100 pour le foie et le muscle respectivement.

Pour la lecture des échantillons, 190µL de la solution de CytC ont été ajoutés à 10µL d'échantillon dans chacun des puits, puis 200µL de la solution contrôle ont été déposés dans quatre puits.

Nucléoside diphosphate kinase (NDPK, E.C. 2.7.4.6)

L'activité de la NDPK a été mesurée indirectement à 340nm via l'oxydation du β-NADH en NAD⁺, dont le coefficient d'extinction molaire de 6,22 (L·mmol⁻¹·cm⁻¹). La solution de contrôle a été préparée dans un tampon d'imidazole (pH 7,5; 50 mM d'imidazole-HCl, 20 mM de MgCl₂·6H₂O, 70 mM de KCl, dans de l'eau ultra pure) et contient du β-NADH (24 mM), de l'adénosine-5'-triphosphate sous forme de selsodique (ATP, 2 mM), de l'acide phosphoénolpyruvique sous forme de sel sodique hydraté (PEP, 1,1 mM), de l'apyruvate kinase

(PK) et de la lactate déshydrogénase (LDH) en excès. La solution de réaction a été préparée à partir de la solution de contrôle et contient de la thymidine-5'-diphosphate sous forme de sel sodique (TDP) à 5,25 mM (foie) ou 3,5 mM (muscle). Les échantillons ont été dilués à 1:500 et 1:1000 pour le foie et le muscle respectivement.

Dans la plaque de contrôle, 170µL de cette solution ont été ajoutés à 10µL d'échantillon puis lus pendant huit minutes. Pour avoir la réaction, 20µL de la solution de TDP ont été ajoutés à chacun des puits et lus pendant huit minutes. La soustraction des deux pentes donnait l'activité enzymatique pour chacun des échantillons.

Lactate déshydrogénase (LDH, E.C. 1.1.1.27)

L'activité de la LDH a été mesurée à 340nm en suivant l'oxydation du β -NADH en NAD^+ , dont le coefficient d'extinction molaire de 6,22 ($\text{L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). La solution de contrôle a été préparée dans le même tampon phosphate que la CCO avec du β -NADH à 0,16 mM. La solution de réaction a été préparée à partir de la solution de contrôle et contient du pyruvate de sodium à 5 mM (foie) ou 10 mM (muscle). Pour l'expérience de laboratoire, les échantillons ont été dilués à 1:10 ou à 1:25 pour le foie et à 1:1000 pour le muscle. Pour les échantillons du terrain, ils ont été dilués à 1:25 ou 1:50 pour le foie et à 1:1000 pour le muscle.

Dans la plaque de contrôle, 170µL de cette solution ont été ajoutés à 10µL d'échantillon puis lus pendant huit minutes. Pour avoir la réaction, 20µL de la solution de TDP ont été ajoutés à chacun des puits et lus pendant huit minutes. La soustraction des deux pentes donnait l'activité enzymatique pour chacun des échantillons.

Superoxyde dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1)

L'activité de la SOD a été mesurée en suivant les instructions d'un kit d'essais (Nos. 706002) acheté à la Cayman Chemical Company Inc. (Ann Arbor, MI, USA). En effet, l'activité de la SOD a été mesurée à 450 nm par rapport à une courbe standard préparée au préalable allant de 0 à 0,25 U/mL. Dans chacun des puits, 200 µL de solution de détection de radicaux (radical detector) ont été ajoutés à 10 µL de chaque échantillon ou de standard. Pour initier la réaction, 20 µL de Xanthine oxydase ont été ajoutés dans tous les puits. La plaque a ensuite été incubée pendant 20 minutes à température ambiante. Les aliquotes ont été centrifugées à 1500×g pendant 5 min à 4°C. Les échantillons ont été dilués avec du tampon d'homogénéisation à 1:1000 et 1:50 pour le foie et le muscle respectivement. Le dosage s'est effectué sur le surnageant.

Catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6)

L'activité de la CAT a été mesurée en suivant les instructions d'un kit d'essais (Nos. 707002) acheté à la Cayman Chemical Company Inc. (Ann Arbor, MI, USA). En effet, l'activité de la CAT a été mesurée à 540 nm par rapport à une courbe standard préparée au préalable allant de 0 à 75 μ M de formaldéhyde. Dans chacun des puits, 100 μ L de tampon d'essai et 30 μ L de méthanol ont été ajoutés à 20 μ L d'échantillon, de standard ou de contrôle positif. Pour initier la réaction, 20 μ L de peroxyde d'hydrogène ont été ajoutés dans tous les puits. La plaque a ensuite été incubée pendant 20 minutes à température ambiante. Pour terminer la réaction, 30 μ L d'hydroxyde de potassium ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque est encore une fois incubée pendant 10 min à température ambiante. Pour finir, 10 μ L de periodate de potassium ont été ajoutés dans les puits et la plaque incubée pendant 5 minutes. Les aliquotes ont été centrifugées à 10 000 \times g pendant 15 min à 4°C. Les échantillons ont été dilués avec du tampon d'homogénéisation à 1:1500 et 1:50 pour le foie et le muscle respectivement. Le dosage s'est effectué sur le surnageant.

2.7.3 Protéines

La quantification des protéines dans les échantillons a été faite à l'aide du protocole développé pour les microplaques de BioRad (BioRad Protein Assay) qui se base sur le protocole de Bradford (1976). Les échantillons conservés ont été sortis et mis sur glace pour décongeler tranquillement, puis dilués à 1:500 dans le tampon d'homogénéisation pour la CAT et à 1:1000 pour la CCO, la NDPK, la LDH et la SOD. La lecture des échantillons a été faite à 595nm avec une courbe standard comprise entre 0,03 et 0,6 mg/mL.

2.8 Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été faite à l'aide du logiciel de statistique JMP 9. Tout d'abord, des analyses de variances (ANOVA) ont été utilisées afin de déterminer les différences entre les moyennes. Les distributions ont aussi été analysées pour savoir si les données suivaient la loi normale et si les variances entre les conditions étaient homogènes. Si les conditions (normalité et homoscedasticité) étaient respectées, le test de HSD Tukey-Kramer était utilisé à la suite de l'ANOVA afin de tester la significativité des différences entre les moyennes multiples. Si les conditions n'étaient pas respectées, le test non-paramétrique de Wilcoxon était utilisé. Les deux avaient pour seuil de significativité $p = 0,05$. Afin de corrélérer les enzymes entre elles et avec les concentrations en métaux dans le rein, des corrélations non-paramétriques de Spearman ont été faites sur les données avec pour seuil $p = 0,05$.

Néanmoins, dans les analyses statistiques effectuées, un biais a pu exister. En effet, suivant notre protocole expérimental, les poissons de chaque aquarium sont des pseudo-réplicats et non des réplicats proprement dits, puisque l'indépendance entre les échantillons ne pouvait pas être présumée. Cependant, mon analyse statistique est valable grâce à l'utilisation des contrôles et l'allocation aléatoire des traitements sur les répétitions qui permettent de traiter nos échantillons comme des réplicats (Salamin, 2012; Borcard, 2014).

3 Résultats

3.1 Expérience de laboratoire

3.1.1 Condition des poissons et concentration en métaux

Au cours de l'expérience de laboratoire, des perchaudes ont été mises dans un environnement témoin ou en présence de métaux seuls ou en mélange. À 49 jours, les poissons exposés aux métaux avaient une condition significativement moins bonne que les poissons témoins ($p < 0,001$; fig. 8). Cependant, ce n'était pas encore visible sur les poissons sacrifiés à dix jours (données non montrées). L'indice des cæca pylorique montrait que les poissons avaient le même taux d'alimentation tout au long de l'expérience, c'est à dire que l'exposition aux métaux n'a pas eu d'influence sur ce paramètre. Toutefois, les perchaudes sacrifiées au début de l'expérience (temps zéro) avaient un taux d'alimentation supérieur aux poissons sacrifiés au bout de dix jours ou 49 jours (Annexe 2).

L'accumulation en nickel dans le rein était significative dès dix jours et se confirmait après 49 jours (fig. 9). À la fin de l'expérience, les poissons exposés au nickel avaient des concentrations en nickel 12 fois plus élevées que ceux non exposés (fig. 9B).

Pour ce qui est de l'accumulation en cadmium, à dix jours, seuls les poissons exposés au mélange de métaux avaient une concentration en cadmium dans le rein supérieure à ceux exposés à des traitements sans cadmium (fig. 10A). À 49 jours, les perchaudes des traitements cadmium et mélange avaient accumulé respectivement deux fois et trois fois plus de cadmium que celles des traitements nickel et témoin (fig. 10B). De plus, la concentration en cadmium dans le rein des perchaudes exposées au mélange de métaux était significativement plus élevée que celle des perchaudes exposées au cadmium seul (fig. 10B).

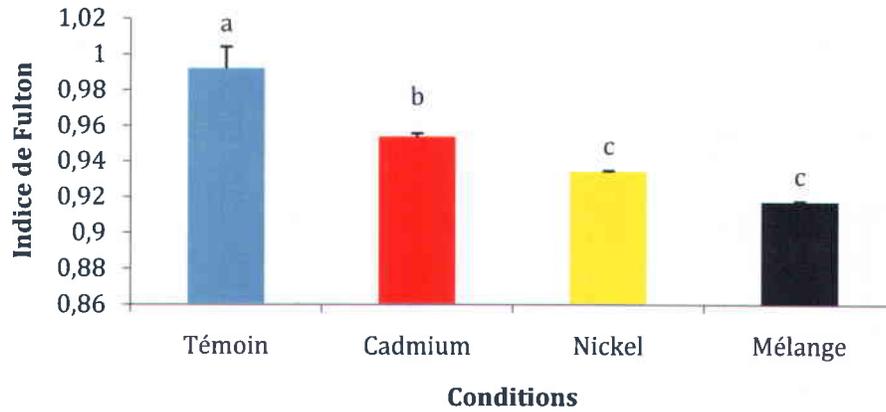


Figure 8. Indice de Fulton des quatre conditions : témoin (n=48), cadmium (n=48), nickel (n=50) et mélange (n=47). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).

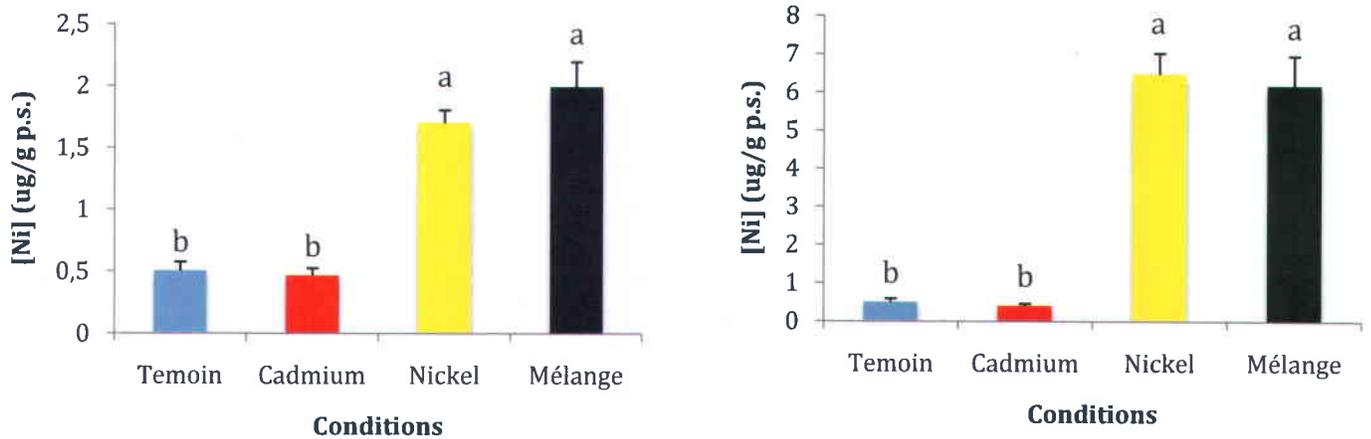


Figure 9. Concentration en nickel dans le rein pour les quatre conditions : témoin (n=50), cadmium (n=50), nickel (n=50) et mélange (n=47) pour les temps dix jours (A) et 49 jours (B). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).

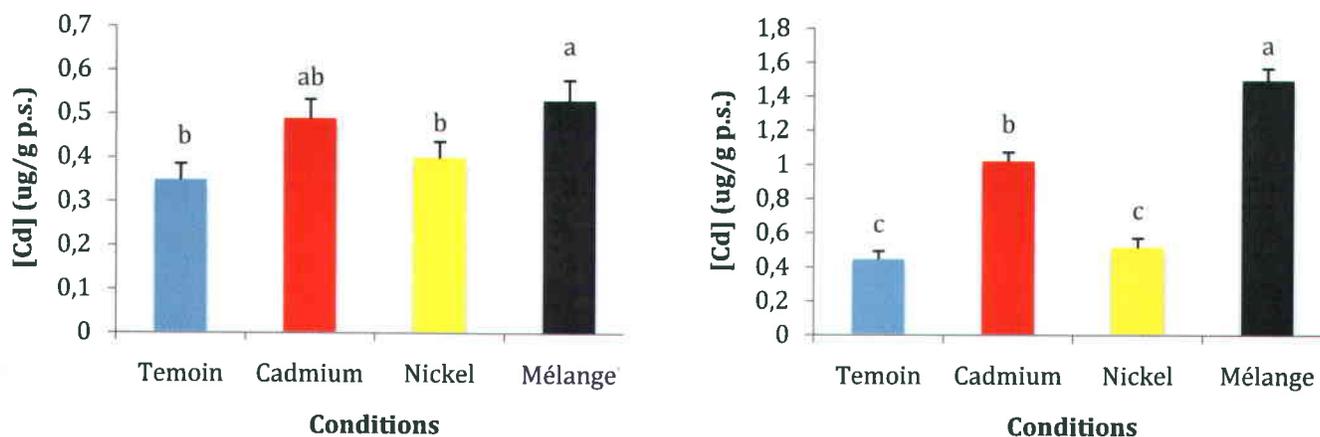


Figure 10. Concentration en cadmium dans le rein pour les quatre conditions : témoin (n=50), cadmium (n=50), nickel (n=50) et mélange (n=47) pour les temps dix jours (A) et 49 jours (B). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).

3.1.2 Influence d'un métal sur l'autre pour leur répartition subcellulaire

Contrairement à ce qui a été vu pour les métaux totaux dans le rein, les foies des perchaudes du traitement nickel sacrifiées à dix jours avaient la plus grande concentration en nickel dans l'homogénat. Par la suite se trouvaient les poissons exposés pendant 49 jours et enfin les poissons du traitement mélange du temps dix jours (fig. 11).

Le nickel se retrouvait en majorité dans la fraction débris pour les poissons sacrifiés à dix jours. Par contre, il était plutôt dans la fraction des protéines stables à la chaleur pour les poissons de 49 jours. Les granules, quant à elles, avaient une concentration en nickel supérieure dans les poissons exposés au nickel ou au mélange de métaux pendant dix jours par rapport aux poissons exposés pendant 49 jours aux traitements nickel et mélange. À part ces trois dernières fractions, les concentrations en nickel dans les autres fractions (mitochondries, organelles et HDP) restaient stables indépendamment du temps d'exposition et du traitement subi par les poissons (fig. 11).

La figure 12 montre que le pourcentage de nickel dans les différentes fractions ne variait pas beaucoup entre les conditions sauf pour les deux points extrêmes pour les poissons témoins sacrifiés à 49 jours.

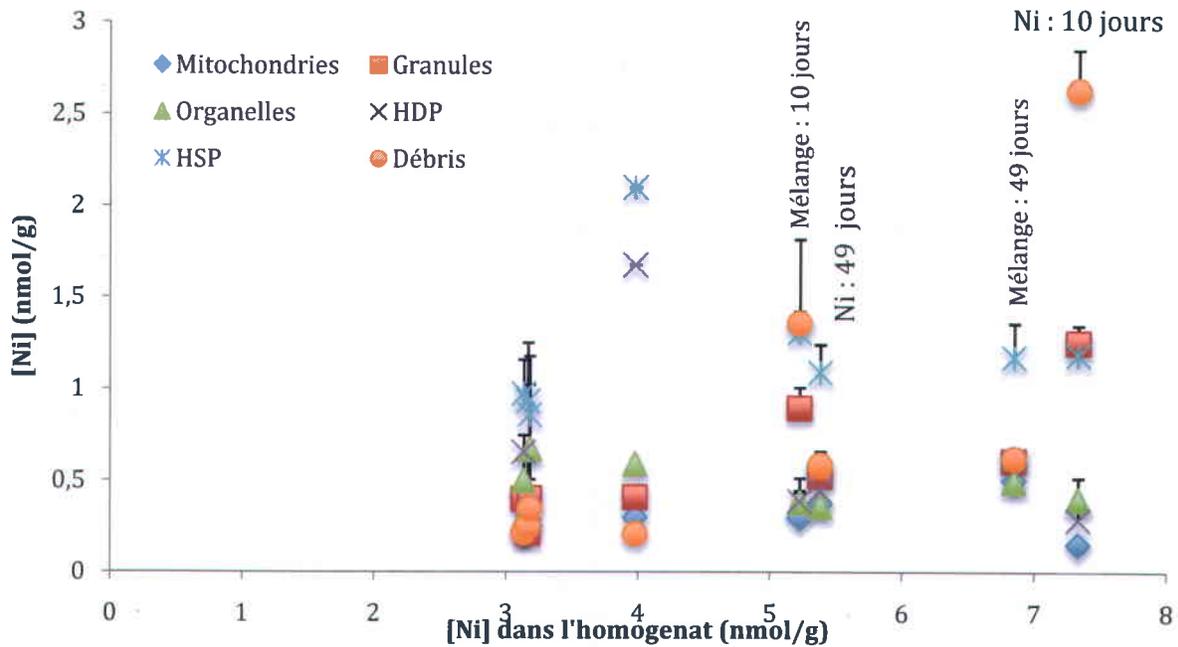


Figure 11. Concentrations en nickel dans les six fractions (mitochondries, granules, organelles, HDP, HSP et débris) des cellules de foie selon les concentrations en nickel dans l'homogénat (moyennes \pm erreur standard; n=3).

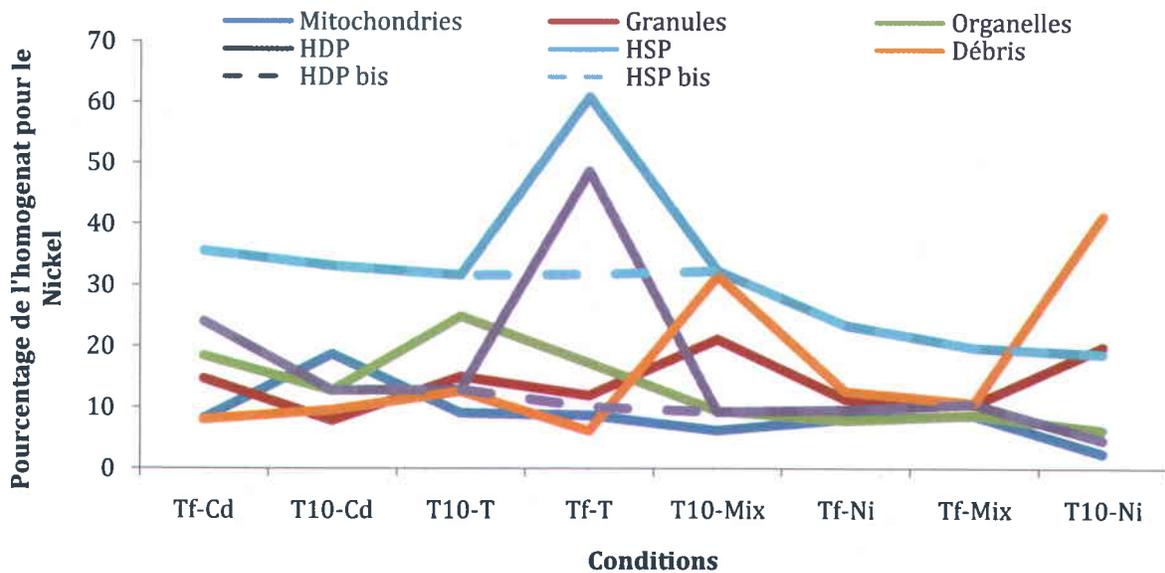


Figure 12. Pourcentage de l'homogénat pour les six fractions (mitochondrie, granules, organelles, HDP, HSP et débris) en fonction de la condition d'exposition (Tf-T : 49 jours – témoin, T10-T : 10 jours – témoin, T0 : zéro jour, T10-Ni : 10 jours – nickel, Tf-Ni : 49 jours – nickel, T10-Cd : 10 jours – cadmium; T10-Mix : 10 jours – mélange, Tf-Cd : 49 jours – cadmium, Tf-Mix : 49 jours – mélange).HDP bis et HSP bis correspondent aux tendances sans les points extrêmes.

La figure 13 permet de voir que le pourcentage des différentes fractions ne variait pas beaucoup entre les conditions, à part la fraction HDP qui augmente pour les conditions à 49 jours : cadmium et mélange.

La figure 14 montre que les poissons sacrifiés à 49 jours avaient les plus grandes concentrations en cadmium dans les homogénats de leurs foies. Ils avaient de trois à quatre fois plus d'accumulation que les autres traitements. À faible concentration dans l'homogénat, la majorité du cadmium se trouvait dans les fractions détoxiquées. À forte concentration, l'accumulation dans les différentes fractions augmentait. Cependant, cette augmentation était très faible dans les fractions débris et organelles.

À 49 jours, en comparant les traitements mélange et cadmium, on constate que les concentrations dans les différentes fractions restaient les mêmes, sauf pour les deux fractions sensibles qui elles augmentaient : les mitochondries et les protéines dénaturées à la chaleur (voir les flèches, fig. 14).

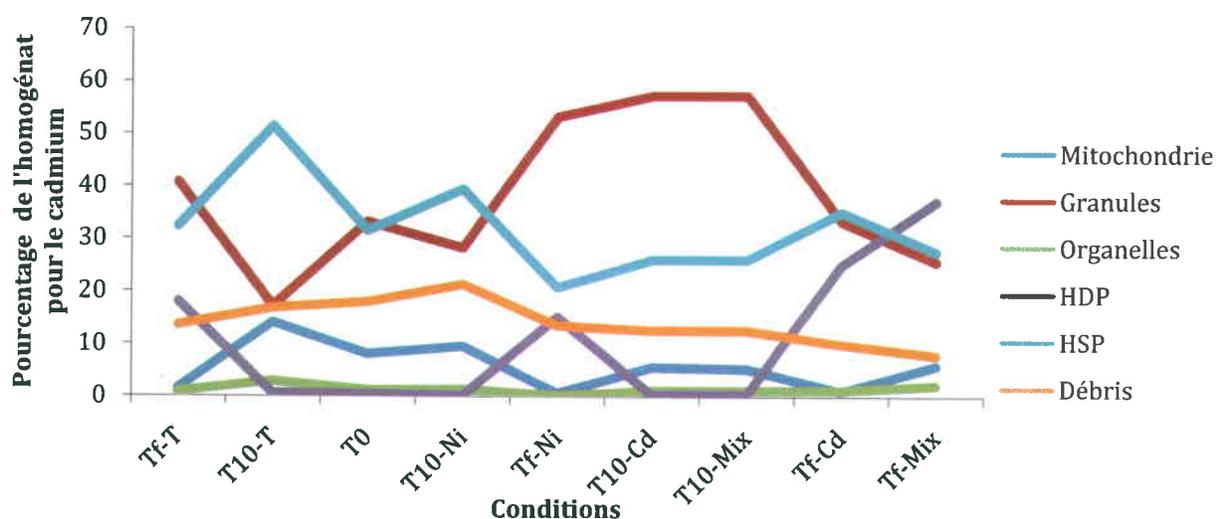


Figure 13. Pourcentage de l'homogénat pour les six fractions (mitochondrie, granules, organelles, HDP, HSP et débris) en fonction de la condition d'exposition (Tf-T : 49 jours – témoin, T10-T : 10 jours – témoin, T0 : zéro jour, T10-Ni : 10 jours – nickel, Tf-Ni : 49 jours – nickel, T10-Cd : 10 jours – cadmium; T10-Mix : 10 jours – mélange, Tf-Cd : 49 jours – cadmium, Tf-Mix : 49 jours – mélange).

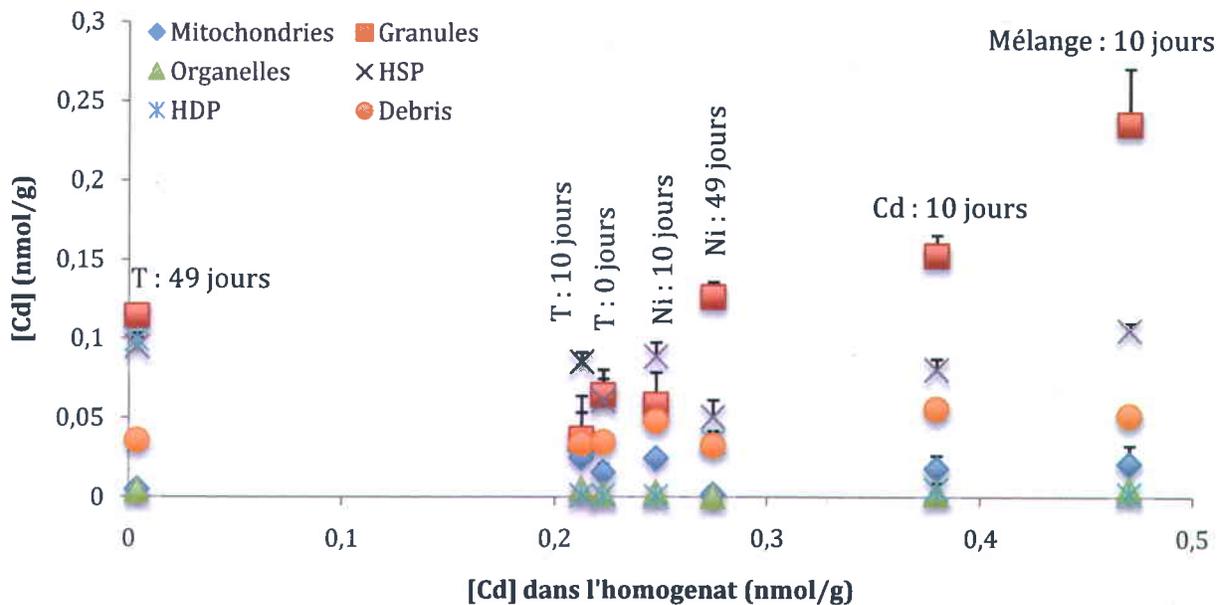
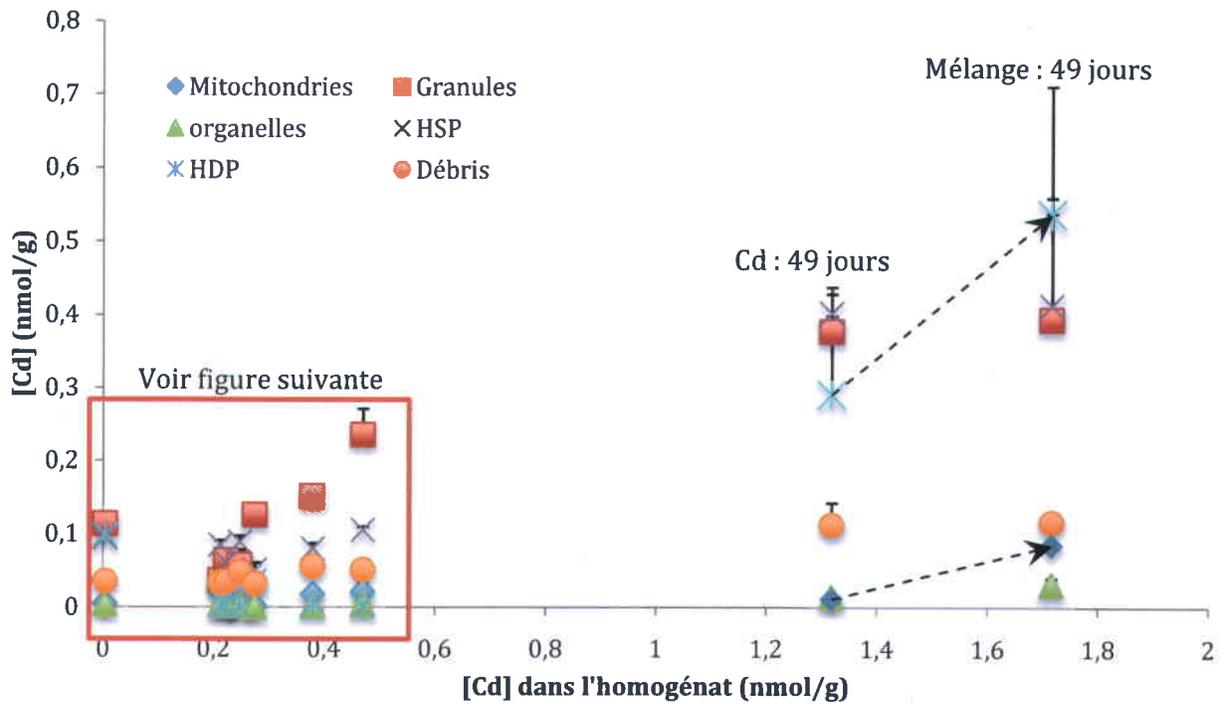


Figure 14. Concentration en cadmium dans les six fractions (mitochondrie, granules, organelles, HDP, HSP et débris) des cellules de foie pour les concentrations en cadmium dans l'homogénat (n=3). B) Agrandissement de l'encadré de la figure A.

3.1.3 Conséquences métaboliques

Les activités enzymatiques ont été exprimées sous deux formes : par gramme de poids frais afin de voir les effets directs sur le métabolisme tissulaire et par milligramme de protéines (activité spécifique) pour comparer les changements d'activité enzymatique par rapport au pool général de protéines, dont la concentration est affectée par divers stressseurs. Dans le foie, les enzymes CCO, NDPK et LDH n'avaient pas de différence d'activité entre les différents traitements des poissons exposés pendant 49 jours, lorsqu'exprimée par unité de poids frais (Annexe 2), mais la figure 15 montre les variations des concentrations en protéines pour chacun des traitements. Le temps d'exposition n'influçait pas la concentration en protéines (fig. 15; tableau 2). Cependant, les poissons exposés au nickel avaient une concentration en protéines deux fois plus faible que les autres (fig. 15). Les poissons du groupe nickel ont donc exprimé une activité de la CCO par mg de protéines deux fois plus élevée que ceux des autres groupes (tableau 2). Pour l'activité de la NDPK par mg de protéines, le groupe nickel ressortait aussi, mais de manière moins prononcée, tandis que l'activité de la LDH par mg de protéines était trois fois plus importante que dans les autres traitements (tableau 2).

Au niveau de l'activité de la SOD (UI/g de poids frais, p.f.), aucune différence significative n'était visible entre les poissons sacrifiés à 49 jours. Cependant, la figure 16 montre que le temps d'exposition faisait diminuer de moitié l'activité de l'enzyme, pour tous les groupes. Cette dernière a été standardisée en la divisant par la concentration en protéines, mais l'activité de la SOD par mg de protéines suivait la même tendance que l'activité par g de poids frais (tableau 2).

L'activité de la catalase (UI/g de p.f.) était aussi influencée par le temps d'exposition, mais pas par l'exposition aux métaux (fig. 17). Là encore, les poissons sacrifiés à 49 jours avaient deux fois moins d'activité que ceux sacrifiés au départ. Aussi, l'activité (UI/g de p.f.) a été divisée par la concentration en protéines, mais les variations de ces dernières faisaient qu'il n'y avait pas de différence dans l'activité de la catalase par mg de protéines (tableau 2).

Les activités de certaines enzymes du foie (UI/g de p.f.) étaient corrélées avec la concentration en métaux dans les reins (corrélacion de Spearman, $p < 0,05$). Ainsi, la SOD et la CAT étaient corrélées négativement avec la concentration rénale de Cd tandis que la NDPK et la LDH étaient corrélées positivement avec la présence de Cd et de Ni respectivement (tableau 3). Les activités enzymatiques étaient aussi souvent corrélées entre elles. La CCO était corrélée

positivement avec la NDPK, la SOD et la CAT et la SOD était corrélée positivement avec la CAT (tableau 3).

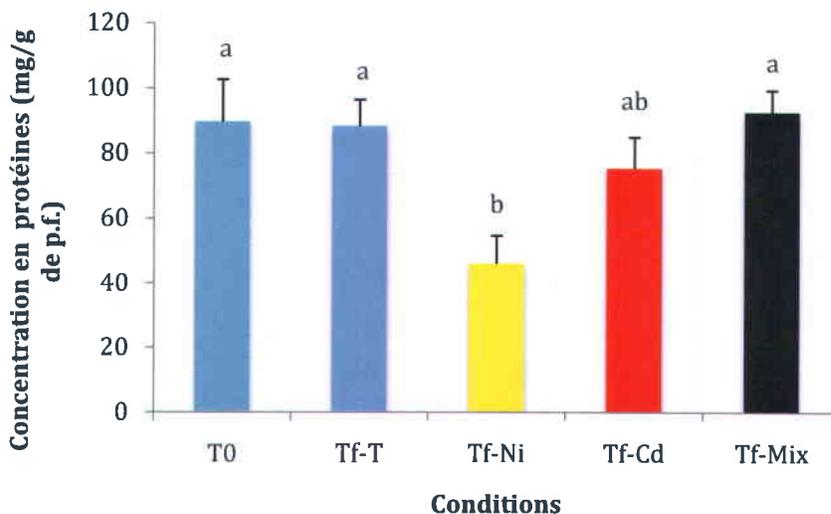


Figure 15. Concentration en protéines (mg/g de p.f.) pour les poissons utilisés dans la quantification des activités de la CCO, NDPK et LDH dans le foie en fonction des conditions d'exposition (temps zéro, temps final : témoin, nickel, cadmium et mélange). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).

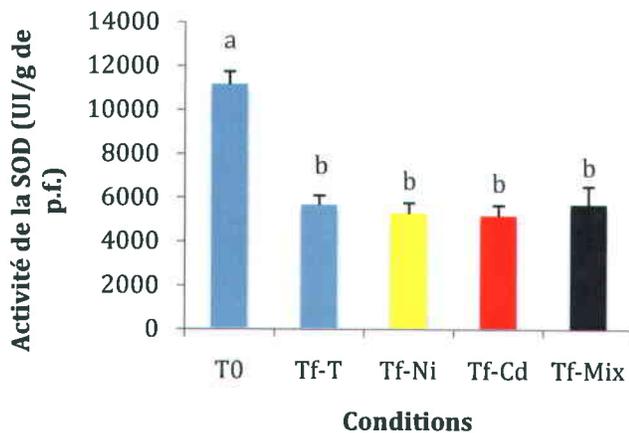


Figure 16. Activité de la SOD (UI/g de p.f.) dans le foie en fonction des conditions d'exposition (temps zéro, temps final : témoin, nickel, cadmium et mélange). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).

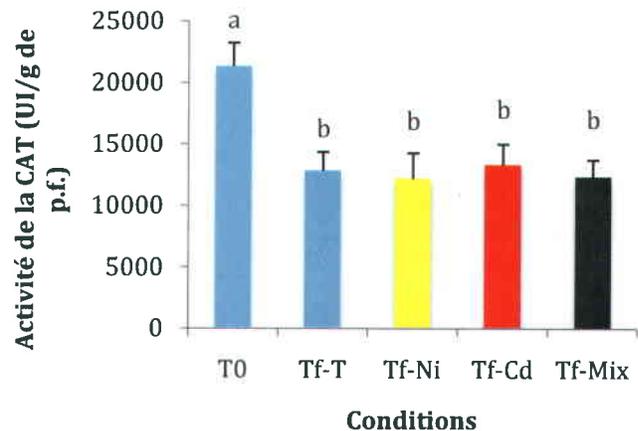


Figure 17. Activité de la CAT (UI/g de p.f.) dans le foie en fonction des conditions d'exposition (temps zéro, temps final : témoin, nickel, cadmium et mélange). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).

Dans le muscle, les activités de la CCO, de la NDPK et de la LDH par gramme de poids frais ne variaient pas, malgré l'exposition des poissons à des métaux (données non montrées). Cependant, pour les poissons ayant servi à la quantification de l'activité de la NDPK et de la LDH, les concentrations en protéines fluctuaient en fonction des conditions d'exposition (fig. 18). Ainsi, les poissons exposés pendant 49 jours aux métaux avaient plus de protéines que ceux du groupe témoin. Cela avait pour conséquence que l'activité de la NDPK par mg de protéines des poissons exposés au nickel et au cadmium était plus basse que celles des témoins et de ceux exposés au mélange de métaux (tableau 2).

Pour la LDH, ce phénomène était moins marqué, seuls les poissons exposés au nickel avaient une activité exprimée par mg de protéines significativement inférieure à ceux exposés au mélange, sinon, les autres traitements n'avaient pas d'influence notable (tableau 2).

À part pour l'activité de la SOD par gramme de poids frais, le temps d'exposition n'avait pas d'influence sur l'activité des enzymes étudiées (fig.19). Cependant, cet effet du temps d'exposition n'était pas visible quand l'activité de la SOD était exprimée en fonction de la concentration en protéines. Seule l'activité de la SOD (UI/mg de protéines) des poissons traités

au nickel était plus faible que celle des poissons témoins (tableau 2). Lors de l'étude de l'activité de la catalase dans le muscle (UI/g de p.f.), aucune différence entre les traitements n'a été révélée pour les poissons sacrifiés à 49 jours.

Dans le muscle, certaines activités (UI/g de p.f.) étaient corrélées avec la concentration en métaux dans les reins (tableau 4). Ainsi, la CCO était corrélée positivement avec la présence de Cd tandis que la SOD était corrélée négativement avec le Cd. Les activités d'enzymes étaient aussi parfois corrélées entre elles. La SOD était corrélée négativement avec la LDH et la CAT. La CCO était aussi corrélée négativement avec la NDPK.

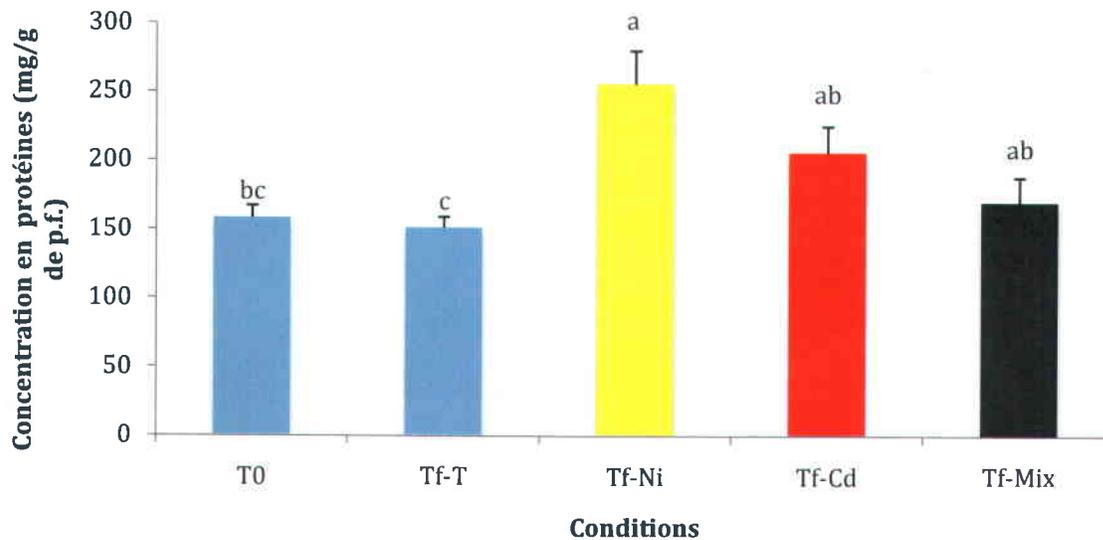


Figure 18. Concentration en protéines (mg/g de p.f.) pour les poissons utilisés dans la quantification l'activité de la NDPK et de la LDH dans le muscle en fonction des conditions d'exposition (temps zéro, temps final : témoin, nickel, cadmium et mélange). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).

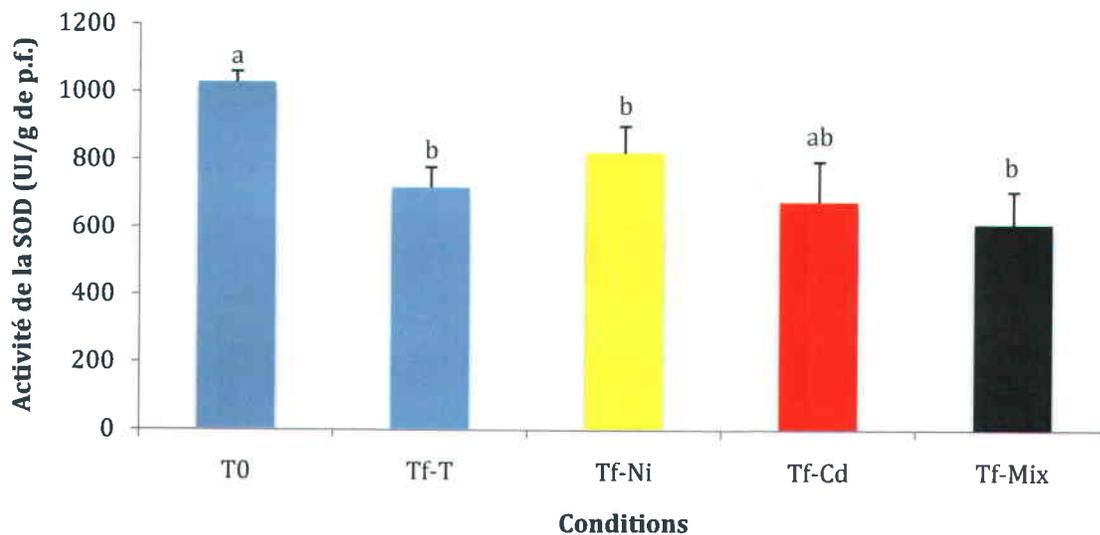


Figure 19. Activité de la SOD (UI/g de p.f.) dans le foie en fonction des conditions d'exposition (temps zéro, temps final : témoin, nickel, cadmium et mélange). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).

Tableau 2. Activité des enzymes (UI/mg de protéines) du foie et du muscle en fonction des conditions d'exposition (temps zéro, temps final : témoin, nickel, cadmium et mélange). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer et Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).

	FOIE					MUSCLE		
	CCO	NDPK	LDH	SOD	CAT	NDPK	LDH	SOD
T0	0,19 ± 0,03 b (8)	0,57 ± 0,06 ab (8)	0,013 ± 0,002 b (8)	130,70 ± 7,59 a (8)	290,7 ± 29,4 ab (8)	1,07 ± 0,11 a (8)	0,71 ± 0,06 ab (8)	26,24 ± 5,79 ab (7)
Tf-T	0,15 ± 0,01 b (8)	0,59 ± 0,06 ab (8)	0,011 ± 0,001 b (8)	83,04 ± 5,94 b (8)	240,3 ± 35,2 ab (8)	1,15 ± 0,10 a (8)	0,68 ± 0,06 ab (8)	26,55 ± 5,42 a (8)
Tf-Ni	0,36 ± 0,09 a (8)	0,90 ± 0,17 a (8)	0,025 ± 0,004 a (7)	79,24 ± 10,70 b (8)	189,6 ± 30,6 b (8)	0,71 ± 0,15 b (8)	0,49 ± 0,07 b (8)	12,74 ± 2,66 b (8)
Tf-Cd	0,19 ± 0,02 b (8)	0,60 ± 0,07 ab (8)	0,014 ± 0,003 ab (7)	73,98 ± 10,47 b (8)	244,1 ± 18,8 ab (8)	0,73 ± 0,08 b (7)	0,63 ± 0,06 ab (8)	15,07 ± 2,38 ab (7)
Tf-Mix	0,16 ± 0,01 b (8)	0,49 ± 0,05 b (8)	0,010 ± 0,001 b (5)	83,57 ± 6,12 b (8)	201,0 ± 19,3 ab (8)	1,08 ± 0,12 a (7)	0,87 ± 0,14 a (8)	23,24 ± 5,43 ab (6)

Tableau 3. Corrélations de Spearman entre les activités enzymatiques (UI/g de poids frais) dans le foie et les concentrations en métaux dans les reins ($\mu\text{g/g}$). Les corrélations significatives sont mises en gras ($p < 0,05$, $n=8$).

	CCO	NDPK	LDH	SOD	CAT
NDPK	0,2536				
LDH	-0,0578	0,0102			
SOD	0,3993	0,0789	0,1409		
CAT	0,3333	0,0732	0,0261	0,71	
Ni	-0,1062	-0,0472	0,2441	-0,0681	-0,1427
Cd	-0,0781	0,2739	-0,0493	-0,3446	-0,3183

Tableau 4. Corrélations de Spearman entre les activités enzymatiques (UI/g de poids frais) dans le muscle et les concentrations en métaux dans les reins ($\mu\text{g/g}$). Les corrélations significatives sont mises en gras ($p < 0,05$, $n=8$).

	CCO	NDPK	LDH	SOD	CAT
NDPK	-0,2396				
LDH	0,0968	0,1533			
SOD	-0,1361	0,0423	-0,3133		
CAT	0,0498	0,0875	0,04	-0,2476	
Ni	0,2214	-0,021	0,0649	-0,0895	0,0033
Cd	0,3066	0,0768	0,2027	-0,4476	0,0805

3.2 Échantillonnage terrain

3.2.1 Condition des poissons

Mes résultats suggèrent que les poissons récoltés dans les quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson) n'avaient pas le même taux d'alimentation. Ainsi, la figure 20 montre que l'indice des cæca pyloriques des poissons du lac Hannah était deux fois moins élevé que celui des poissons des lacs Dickie et Whitson et trois fois moins élevé que celui des poissons de Red Chalk. La condition des poissons des différents lacs n'était pas non plus identique. Les poissons de Red Chalk étaient en moins bonne condition que ceux de Whitson qui étaient eux même en moins bonnes conditions que ceux de Dickie et d'Hannah (fig. 21).

L'accumulation en nickel dans les reins des poissons des lacs considérés comme contaminés (Hannah et Whitson) était significativement plus élevée que celle des lacs propres (Dickie et Red Chalk; fig. 22). La concentration en nickel était dix fois plus élevée dans les reins des poissons du lac Whitson et six fois plus élevée dans les reins des poissons du lac Hannah par rapport aux deux autres lacs (fig. 22).

La concentration en cadmium dans les reins des poissons des quatre lacs était différente. Ainsi, les poissons de Dickie avaient le moins d'accumulation, les poissons de Red Chalk, Hannah et Whitson avaient respectivement deux, trois et quatre fois plus d'accumulation que ces derniers (fig. 23).

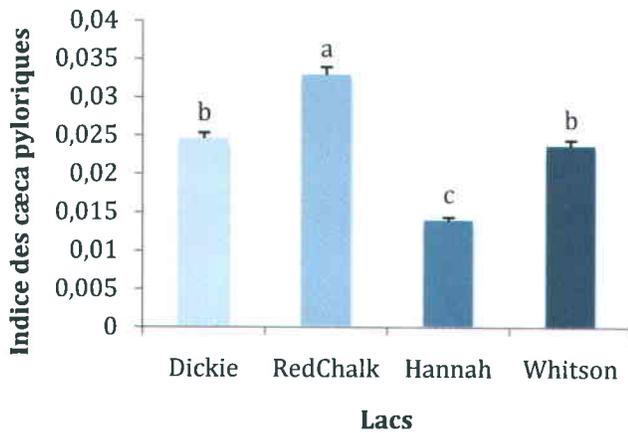


Figure 20. Indice des caeca pyloriques des quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec de test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=50$).

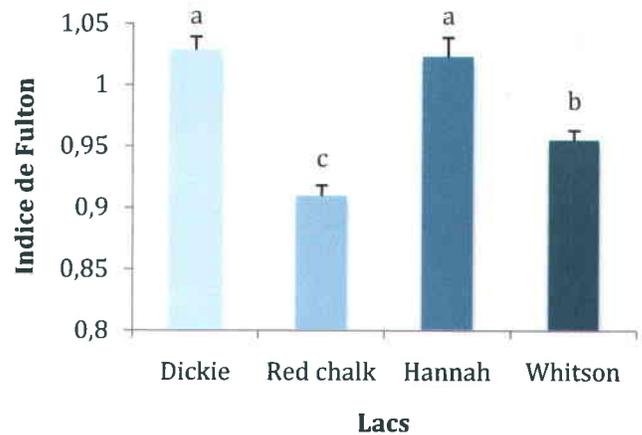


Figure 21. Indice de Fulton des quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec de test de Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=50$).

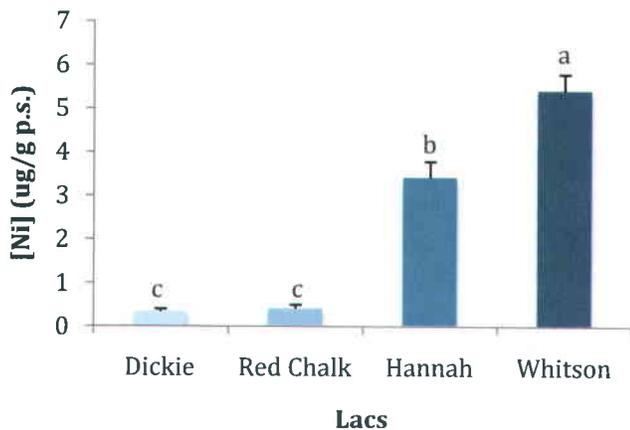


Figure 22. Concentration en nickel dans le rein pour les quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=50$).

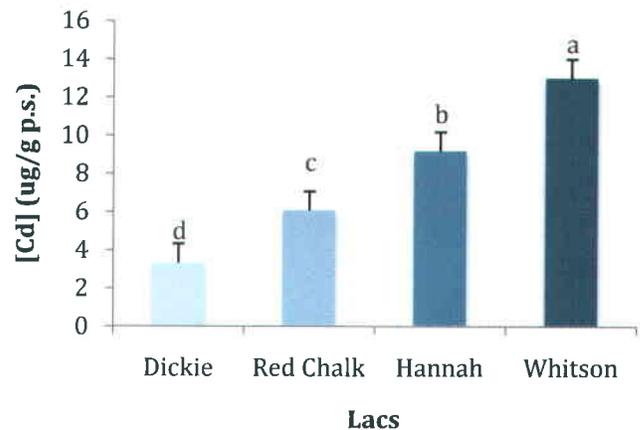


Figure 23. Concentration en cadmium dans le rein pour les quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=50$).

3.2.2 Répartition subcellulaire du cadmium et du nickel

La répartition subcellulaire du cadmium dans les cellules du foie des perchaudes sauvages montre que la majorité du cadmium se trouvait dans la fraction HSP (fig. 24). Ainsi, la concentration en Cd dans la fraction HSP, ainsi que le pourcentage de Cd dans cette fraction, augmentaient toutes les deux quand la concentration totale dans l'homogénat augmentait (fig. 24 et 25). Une faible augmentation dans les mitochondries était aussi à noter (fig. x). La concentration en Cd dans les autres fractions restait relativement stable entre les lacs propres et ceux contaminés.

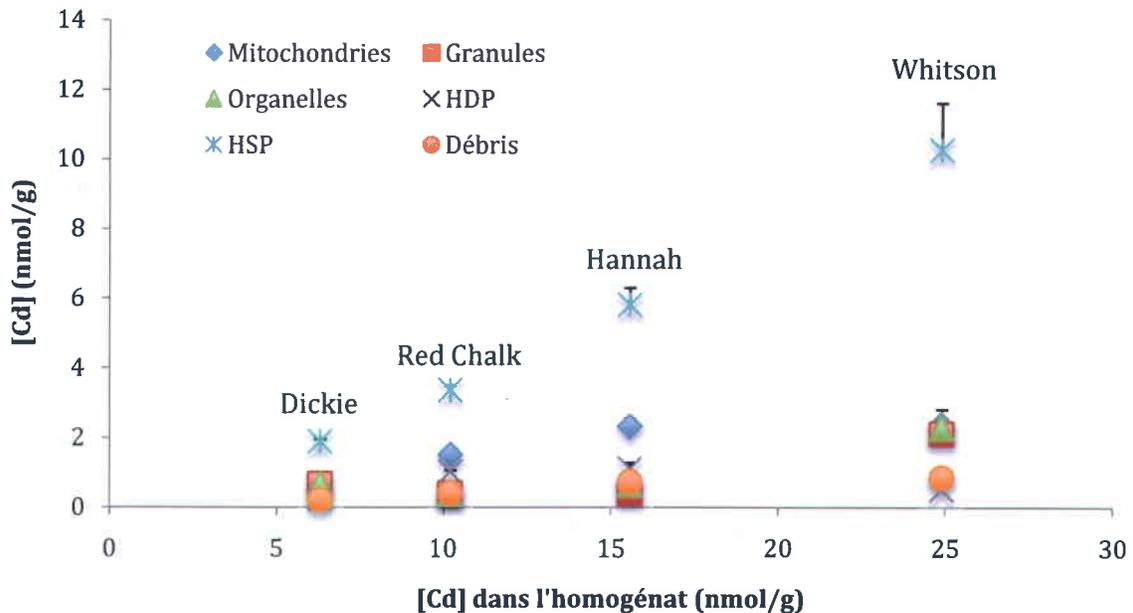


Figure 24. Concentration en cadmium dans les six fractions (mitochondrie, granules, organelles, HDP, HSP et débris) des cellules de foie en fonction de la concentration en cadmium dans l'homogénat (n=3).

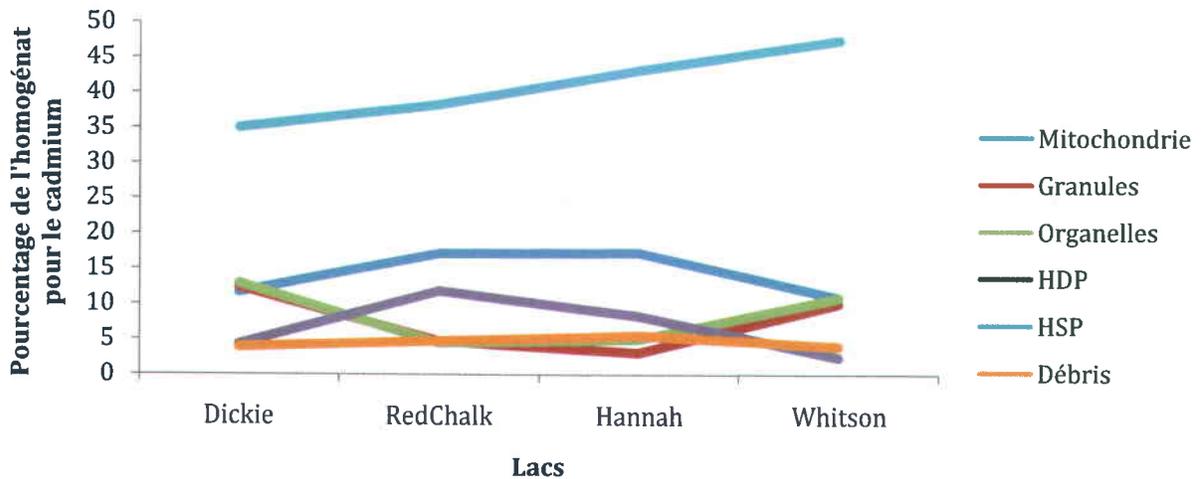


Figure 25. Pourcentage de l'homogénat pour les six fractions (mitochondries, granules, organelles, HDP, HSP et débris) en fonction des lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson).

La répartition subcellulaire du nickel dans l'homogénat des foies de poissons montrait que la majorité du nickel se trouvait dans la fraction des granules, mais aussi dans les HSP (fig. 26). Avec l'augmentation de la concentration en nickel dans l'homogénat, on constate une augmentation de ce dernier dans toutes les fractions. Les fractions sensibles étaient aussi exposées aux métaux avec l'augmentation du nickel dans l'homogénat. Par exemple, la fraction des organelles des poissons de Whitson a subi une importante augmentation de sa concentration en nickel. Cependant, l'augmentation croissante dans les granules et les HSP en fonction de la concentration dans l'homogénat n'est pas visible dans les foies des poissons de Red Chalk (fig. 26).

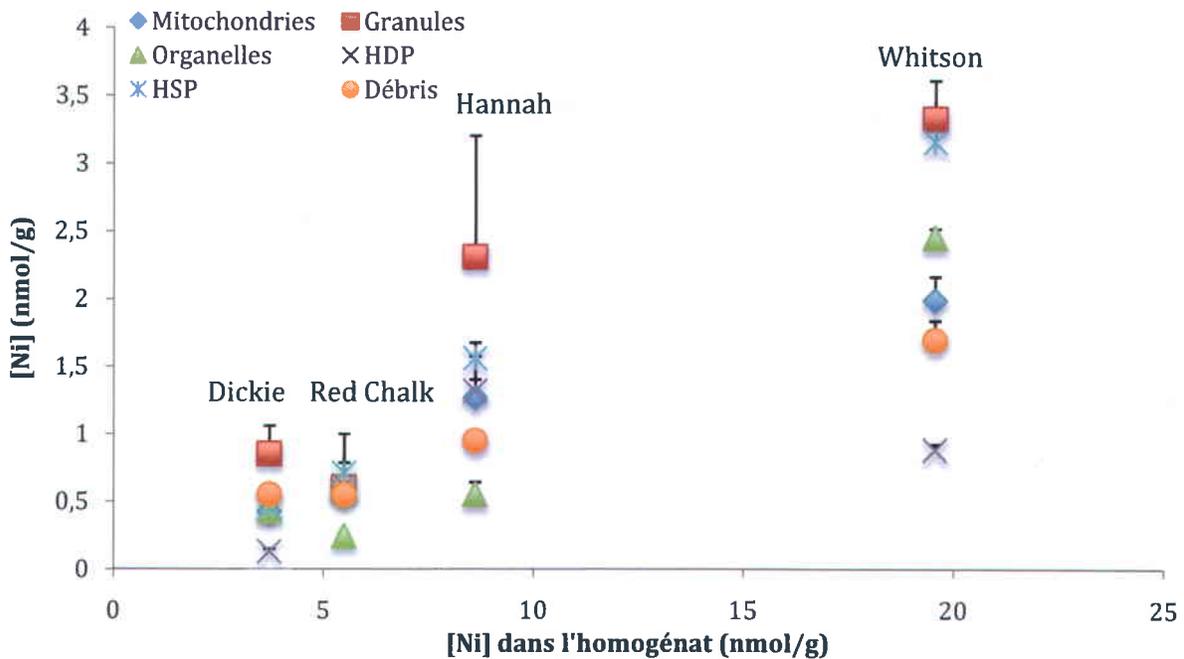


Figure 26. Concentration en nickel dans les six fractions (mitochondries, granules, organelles, HDP, HSP et débris) des cellules de foie en fonction de la concentration en cadmium dans l'homogénat (n=3).

3.2.3 Conséquences métaboliques

Les poissons récoltés sur le terrain dans les lacs propres et contaminés n'avaient aucune différence dans l'activité des enzymes étudiées dans le foie (données non montrées).

Dans le foie, seulement deux enzymes étaient corrélées positivement entre elles, la SOD et la CAT. De plus, les concentrations des deux métaux dans les reins étaient aussi corrélées positivement entre elles (tableau 6).

L'étude de la CCO dans le muscle (UI/g de p.f.) montre que les poissons du lac Whitson avaient une plus grande activité enzymatique que les poissons des lacs propres. Cependant, les poissons du lac Hannah n'affichaient pas cette différence (fig. 27). L'activité enzymatique de la NDPK (UI/g de p.f.) était la plus importante chez les poissons des lacs Dickie et Hannah et les poissons du lac Red Chalk avaient la plus basse activité enzymatique. Ces derniers n'étaient pas différents de ceux du lac Whitson, mais étaient distincts de ceux des deux autres lacs. Les poissons du lac Whitson étaient aussi dissemblables de ceux de Dickie. Les poissons des lacs contaminés n'étaient quant à eux pas différents (fig. 28). Pour ces deux enzymes, leur activité

enzymatique (UI/mg de protéines) et leur concentration en protéines ne différaient pas entre les différents lacs.

Les figures 29 et 30 montrent que l'activité musculaire de la LDH (UI/g de p.f.) était la plus importante chez les poissons du lac Red Chalk tandis que la quantité de protéines était moindre chez ceux-ci. En conséquence, l'activité de la LDH (UI/mg de protéines) était plus de deux fois plus importante pour les poissons du lac Red Chalk que pour les poissons des autres lacs (tableau 5).

Les poissons du lac Hannah avaient une activité de la SOD dans le muscle (UI/g de p.f.) supérieure à ceux des lacs Red Chalk et Whitson. Ces derniers avaient aussi plus d'activité enzymatique que ceux du lac Dickie (fig. 31). Lorsque ces activités ont été divisées par la concentration en protéines, l'activité enzymatique de la SOD (UI/mg de protéines) était trois à cinq fois plus importante pour les poissons du lac Hannah que pour les autres (tableau 5).

Dans le muscle, certaines activités enzymatiques (UI/g de poids frais) étaient corrélées avec la concentration en métaux dans les reins. Ainsi, l'activité de la CCO était corrélée positivement avec la concentration des deux métaux. L'activité de la SOD était aussi corrélée positivement avec la présence de Cd tandis que la LDH était corrélée négativement avec la présence de Ni (tableau 7). Aussi, l'activité de la NDPK était corrélée négativement avec l'activité de la LDH.

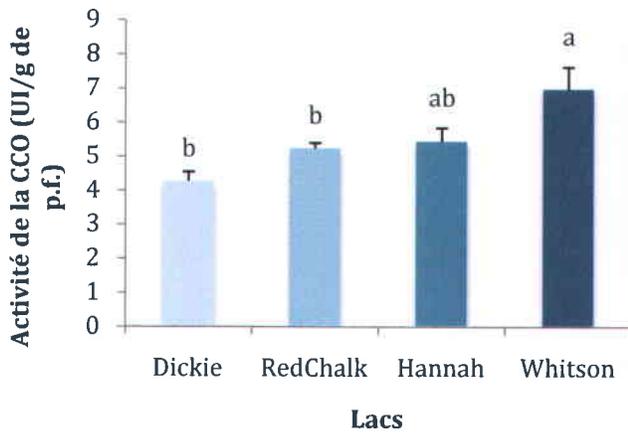


Figure 27. Activité de la CCO (UI/g de p.f.) dans le muscle pour les quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).

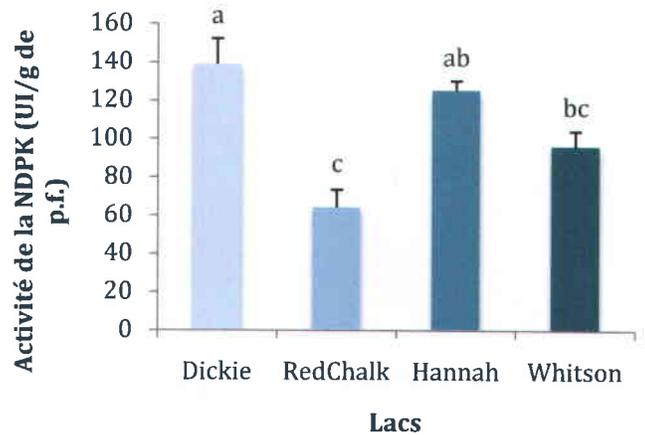


Figure 28. Activité de la NDPK (UI/g de p.f.) dans le muscle pour les quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).

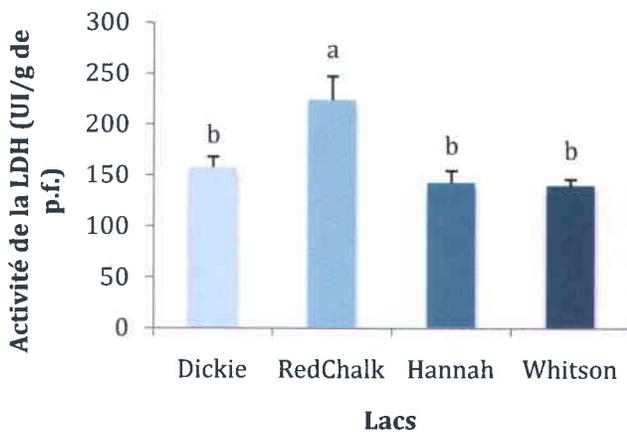


Figure 29. Activité de la LDH (UI/g de p.f.) dans le muscle pour les quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).

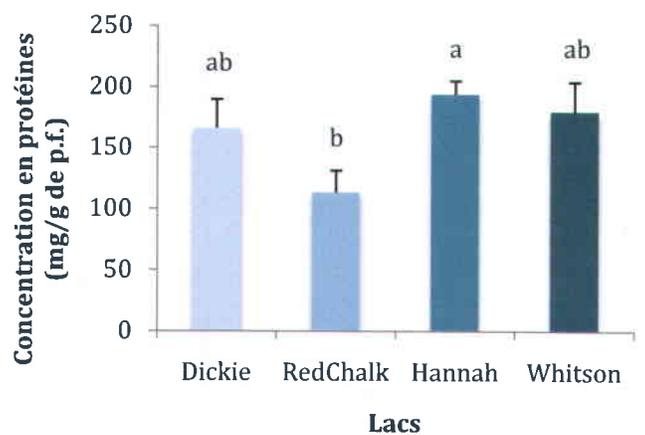


Figure 30. Concentration en protéines (mg/g de p.f.) pour les poissons utilisés dans la quantification l'activité de la LDH dans le muscle pour les quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).

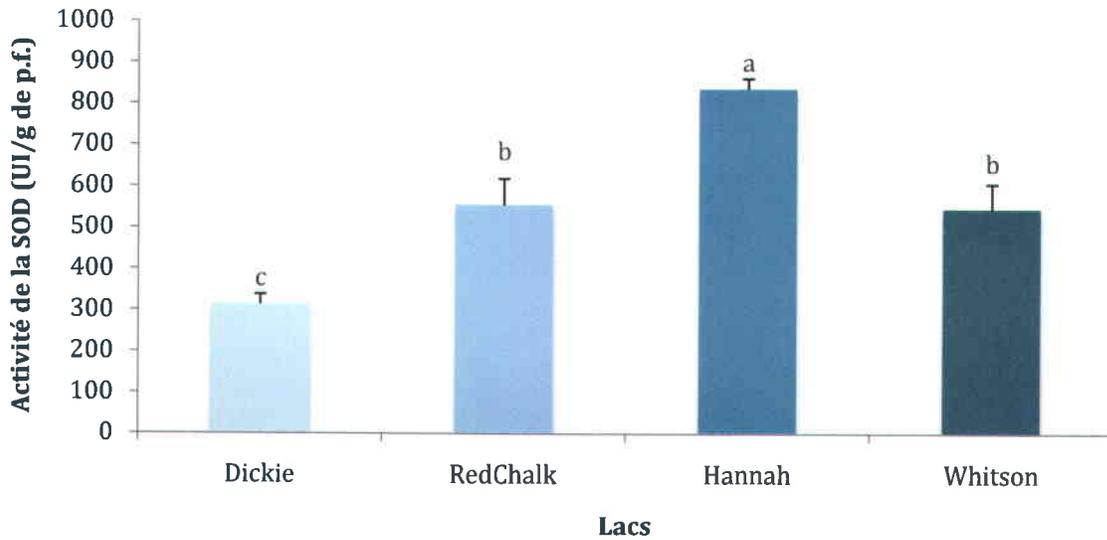


Figure 31. Activité de la SOD (UI/g de p.f.) dans le muscle pour les quatre lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).

Tableau 5. Activités des enzymes (UI/mg de protéines) du muscle en fonction des lacs (Dickie, Red Chalk, Hannah et Whitson). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).

	LDH	SOD
Dickie	$1,08 \pm 0,13$ b (8)	$13,55 \pm 1,70$ b (7)
Red Chalk	$2,19 \pm 0,25$ a (8)	$19,15 \pm 2,52$ b (8)
Hannah	$0,76 \pm 0,08$ b (8)	$95,41 \pm 25,19$ a (8)
Whitson	$0,86 \pm 0,09$ b (8)	$35,46 \pm 15,43$ b (8)

Tableau 6. Corrélations de Spearman entre les activités enzymatiques (UI/g de p.f.) dans le foie et les concentrations en métaux dans les reins ($\mu\text{g/g}$). Les corrélations significatives sont mises en gras ($p < 0,05$).

	CCO	NDPK	LDH	SOD	CAT	Ni
NDPK	0,0733					
LDH	-0,1362	0,0412				
SOD	-0,0797	0,2398	-0,0192			
CAT	-0,0762	-0,0496	-0,071	0,3892		
Ni	0,0544	0,1295	0,0213	-0,2993	-0,0496	
Cd	0,0293	-0,0059	0,2229	-0,0449	0,0988	0,7135

Tableau 7. Corrélations de Spearman entre les activités enzymatiques (UI/g de p.f.) dans le muscle et les concentrations en métaux dans les reins ($\mu\text{g/g}$). Les corrélations significatives sont mises en gras ($p < 0,05$).

	CCO	NDPK	LDH	SOD	CAT	Ni
NDPK	-0,2534					
LDH	-0,0337	-0,3895				
SOD	0,029	0,1099	-0,2524			
CAT	-0,0313	-0,81	-0,2169	0,1256		
Ni	0,4578	0,0409	-0,5057	0,3376	0,1243	
Cd	0,5638	-0,1675	-0,2005	0,3996	0,0918	0,7135

4 Discussion

4.1 Expérience de laboratoire

4.1.1 Influence des métaux sur les poissons

L'indice de condition des poissons est important afin de quantifier l'impact des métaux sur les organismes. Ainsi, les individus exposés aux métaux avaient une condition moindre comparée à ceux non-exposés. D'après les résultats, aux concentrations utilisées au laboratoire, le nickel avait un plus fort impact sur les poissons que le cadmium. Cela est confirmé par les poissons exposés au mélange de métaux qui avaient une condition similaire aux poissons exposés au nickel. L'effet des métaux sur les poissons pourrait être expliqué par le fait que l'accumulation de réserves énergétiques est moindre chez les poissons exposés aux métaux (Couture et coll., 2010). Aussi, Audet et Couture (2003) et Eastwood et Couture (2002) avaient montré que les poissons des lacs contaminés, exposés aux métaux dont le cadmium et le nickel, avaient un indice de condition plus faible que les poissons des lacs propres. De plus, d'après ce que suggère l'indice des cæca pyloriques, la consommation alimentaire était restée la même tout au long de l'expérience. Cela suggère que l'énergie apportée par l'alimentation n'avait pas pu être utilisée pour la croissance, mais plutôt pour compenser l'effet néfaste des métaux (Couture et Pyle, 2008). La différence qui existe au niveau des cæca pyloriques entre les poissons du temps zéro et les autres peut être due au stress du voyage combiné à l'arrivée dans un nouvel environnement où la nourriture a été modifiée ou encore au fait que les poissons ont moins mangé au laboratoire que durant l'élevage avant l'arrivée au laboratoire.

À la fin des expositions de laboratoire, les poissons exposés au nickel avaient une concentration en nickel dans le rein supérieure à ceux non-exposés. Cela montre que les poissons étaient susceptibles d'absorber le nickel et qu'il était accumulé dans les tissus. Le fait que dès dix jours la concentration en nickel dans le rein avait déjà augmenté de manière significative, alors que l'exposition était par voie aqueuse, cela amène à penser que la prise en charge par les branchies était probablement la voie dominante. De plus, les résultats montrent que le cadmium n'avait pas d'influence décelable sur la concentration rénale en nickel. À notre connaissance, aucune autre étude n'a été menée sur ce mélange de métaux en eau douce. Par contre, Palaniappan et Karthikeyan (2008) ont exposé le cyprinidé *Cirrhinus mrigala* à un mélange de chrome et de nickel. Contrairement à mes résultats, leur étude montrait que les deux métaux

avaient un effet synergique l'un sur l'autre pour leur accumulation, mais leur exposition au nickel était non représentative de ce qu'on peut retrouver sur le terrain (2,87mg/L).

Au niveau de la concentration en cadmium dans les reins, le fait qu'à dix jours il n'existait pas encore de différences significatives entre les traitements cadmium et témoin, comme il a été vu pour la concentration en nickel, laisse supposer que l'absorption de ce métal était moins rapide que pour le nickel. Cela pourrait être expliqué par les concentrations en métaux dans l'eau, qui étaient 100 fois inférieures pour le cadmium par rapport à celles en nickel. De plus, dès dix jours et encore plus à 49 jours, il était possible de voir que la concentration en cadmium du tissu rénal des perchaudes du traitement mélange était plus importante que celle des poissons du traitement cadmium seul. Cela suggère que le nickel avait un effet sur la prise en charge du cadmium. Ainsi, il favoriserait l'assimilation de cadmium dans l'organisme. L'explication de cet effet synergique n'est pas connue, mais plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Tout d'abord, les études d'Al-Attar (2007) et de Pane et coll. (2004) montrent que les branchies du tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) ont été irritées par l'exposition au nickel (16 mg/L et 10,7 mg/L respectivement). Cette irritation altère les structures des branchies et aussi l'échange ionique, ce qui pouvait créer une asphyxie du poisson. Al-Attar (2007) a mis en évidence que les métaux ainsi que les molécules à faible poids moléculaire pouvaient passer plus facilement la barrière branchiale. De plus, afin de compenser la perte en ions, l'organisme éliminait beaucoup d'urine pour activer l'assimilation de ces ions et donc augmentait le nombre de transporteurs membranaires. Cela pourrait conduire à une absorption plus importante des métaux à travers les branchies. Pane et coll. (2004) ont, quant à eux, montré qu'un effort ventilatoire était observé afin de compenser la limitation de la diffusion des gaz à travers les membranes. Cette hyperventilation pourrait aussi mener à une absorption plus grande du cadmium présent dans l'eau. Cependant, cette hypothèse ne fait pas l'unanimité dans le monde scientifique. En effet, Hughes and Flos (1978) ont mis en évidence, qu'il n'y avait pas de relation entre l'augmentation du taux ventilatoire et l'augmentation de la concentration en métal chez la truite arc-en-ciel. Cette explication n'est donc pas celle à prioriser.

Si dans notre cas, le nickel a un effet synergique sur la concentration en cadmium dans le rein, Kargin et Cogun (1999) ont montré que le zinc avait un effet antagoniste sur l'accumulation du cadmium. Ainsi, la concentration de ce dernier dans le foie, les branchies et le muscle du tilapia diminuait quand il se retrouvait en mélange avec le zinc. Enfin, d'après l'étude de Verriopoulos et Dimas (1988), qui étudiaient la toxicité combinée de plusieurs métaux en mélange chez un

copépode marin, le cadmium et le nickel avait un effet de potentialisation l'un sur l'autre, soit un effet synergique l'un sur l'autre lorsqu'ils sont en mélange.

4.1.2 Répartition subcellulaire du nickel

Effectuer la répartition subcellulaire des métaux n'est pas chose facile. En effet, les échantillons et les solutions sont facilement contaminables par l'environnement extérieur. Giguère et coll. (2006) ont aussi eu cette difficulté au cours de leurs manipulations. Grâce à la filtration de la solution de NaOH pour en réduire la concentration de nickel particulaire, les résultats répondaient aux critères de qualité. Cependant, l'interprétation des données pour les fractions granules et débris pourrait être influencée par une contamination résiduelle de la solution de NaOH. Néanmoins, la même solution de NaOH a été prise pour l'ensemble de l'expérience, et donc s'il y a un biais, il sera le même pour l'ensemble des conditions, étant donné que la solution a été passée à l'ICP-MS afin de vérifier que les concentrations en métaux n'ont pas augmenté.

Le fait que ce soit les poissons du groupe nickel sacrifiés à dix jours qui aient la plus grande concentration totale en nickel dans le foie soulève plusieurs questions. Il est possible qu'une exposition de 49 jours permette aux perchaudes de mettre en place des stratégies pour favoriser l'élimination du nickel ou pour réduire son assimilation. Peu d'études se sont intéressées à ces mécanismes chez la perchaude, mais chez le tête de boule (*Pimephales promelas*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), il a été mis en avant que le nickel subissait une régulation active dans l'organisme lors d'une exposition à long terme, que ce soit par l'eau ou par la combinaison de l'eau et de la nourriture (Lapointe et Couture, 2009; Chowdhury et coll., 2008). Aussi, Chowdhury et coll. (2008) ont suggéré que le nickel était un élément essentiel pour les poissons. Les résultats de notre étude, qui montrent une diminution de la concentration totale de nickel dans le foie entre 10 jours et 49 jours d'exposition, accompagnée d'une augmentation dans le rein, supportent ces conclusions, la régulation active étant une caractéristique des métaux essentiels.

De plus, la concentration moindre en nickel dans l'homogénat de foie des perchaudes du traitement mélange sacrifiées à dix jours, comparée à celle des perchaudes exposées au nickel individuel pour le même temps, amène à penser que le cadmium a peut-être eu un effet antagoniste par rapport au nickel en diminuant son absorption, du moins à court terme.

Une grande partie du nickel chez les poissons sacrifiés à dix jours se trouvait dans les débris, ce qui amène à se questionner sur la nature de cette fraction. Sinon, comme dans les publications de Lapointe et Couture (2009) et Lapointe et coll. (2009), le nickel, en plus d'être dans les débris, se retrouvait dans les HSP et les granules, qui sont connues pour être des fractions permettant la détoxification des métaux. Aussi, que ce soit à dix jours ou à 49 jours, la fraction HSP avait la même concentration en nickel tandis que les fractions granules et débris diminuaient entre les deux temps d'exposition. Cette observation pourrait renforcer l'idée que les granules permettent l'excrétion du nickel à moyen terme (Lapointe et coll., 2009; Wallace et coll., 2003),

Ce qui est intéressant à noter, c'est que les fractions sensibles avaient peu de concentration en nickel peu importe la condition. La même observation avait été faite sur des têtes de boule exposés au nickel par voie aqueuse (Lapointe et Couture, 2009). Mes résultats suggèrent donc que les parties sensibles aux métaux, importantes pour le fonctionnement de la cellule telles que les enzymes, n'étaient que peu affectées par le nickel. Cela semble être corroboré par l'analyse des activités enzymatiques (UI/g de p.f.) qui montrait que les activités enzymatiques étudiées ne variaient suite à une exposition au nickel.

4.1.3 Répartition subcellulaire du cadmium

L'étude de la répartition subcellulaire du cadmium indiquait que la concentration en cadmium dans l'homogénat du foies des perchaudes exposées à ce métal augmentait progressivement dans le temps ($[T_{10}] < [T_f]$). La majorité des études montrent que le cadmium se trouve principalement dans la fraction HSP, qui contient les métallothionéines (Giguère et coll., 2006; Olsson et Haux, 1985), mais nos résultats montrent qu'une part importante allait dans les granules aussi (environ 40%, contre 30% dans les HSP). Cependant, ces études antérieures ont été faites sur les poissons natifs d'environnements contaminés, alors que les perchaudes de mon expérience étaient naïves avant leur exposition. Mes résultats suggèrent donc que lors de l'exposition initiale, les poissons utilisent plusieurs stratégies de détoxification pour prévenir la contamination (HSP + granules). En effet, comme énoncé plus haut, les granules sont connues pour leur rôle détoxiquant chez les poissons (Weis et coll., 1986; Lanno et coll., 1987).

À faible concentration de cadmium dans l'homogénat, peu de cadmium se retrouvait dans les fractions sensibles, alors qu'en présence d'une plus grande concentration de cadmium, l'ensemble des fractions subissaient un accroissement de leur concentration. Mes résultats

appuient le modèle de Campbell et coll. (2004) sur la protection des fractions sensibles par les fractions détoxiquées jusqu'à l'atteinte d'une concentration trop importante en métaux où elles se retrouvent dépassées (fig. 1). Au contraire, les résultats de Giguère et coll. (2006) ont montré que les perchaudes sauvages exposés aux métaux ne suivaient pas ce modèle de « spillover ». Ils pensaient que la principale différence venait de l'acclimatation des poissons. Ainsi, les perchaudes naïves, comme dans mon expérience, réagiraient différemment que les perchaudes acclimatées et exposées chroniquement depuis plusieurs générations aux métaux (Giguère et coll. (2006).

Les concentrations rénales en cadmium étaient influencées par la présence de nickel. Avec l'étude de la répartition subcellulaire, il a été possible de voir que le même phénomène se produisait dans le foie. Ainsi, la concentration en Cd dans l'homogénat de foie des perchaudes exposées au mélange pendant 49 jours était plus importante que celui des poissons exposés au cadmium seul pour le même temps d'exposition. Mais, ce qui est important à noter, c'est que seule les fractions HDP et mitochondries étaient touchées par l'ajout du nickel, comme le décrivent les flèches de la figure 14 qui montrent l'augmentation de concentration du cadmium des deux fractions entre les conditions, alors que l'ensemble des autres fractions restait stable. Cette constatation suggère que la capacité à détoxiquer des HSP et des granules était dépassée. Ainsi, le cadmium, au lieu d'être lié aux protéines qui vont permettre sa détoxification, va plutôt se lier avec des molécules sensibles, ce qui pourrait induire des changements au niveau de métabolisme cellulaire. Le nickel aurait donc un impact négatif sur la condition des poissons, car il renforcerait l'effet néfaste du cadmium, en accélérant le dépassement des mécanismes de protection des cellules.

4.1.4 Effet des métaux sur les capacités métaboliques du foie

Les activités de la CCO, de la NDPK et de la LDH par gramme de poids frais dans le foie ne variaient pas malgré l'exposition aux métaux. Cela semble donc dire que les métaux n'avaient pas d'effet direct sur les capacités métaboliques des poissons. En effet, les poissons n'avaient pas de changement dans leur métabolisme aérobie (CCO) et n'avaient donc pas eu besoin de solliciter leur mécanisme anaérobie (LDH) malgré le stress métallique. Ces observations étaient corroborées par Almeida et coll. (2000) et Almeida et coll. (2002) qui n'ont, eux aussi, observé aucune différence entre les traitements cadmium et témoin pour l'activité de la LDH chez le tilapia du Nil. De plus, chez le tête-de-boule exposé au nickel par voie aqueuse, aucune différence significative n'a été constatée pour l'activité des trois enzymes (CCO, NDPK et LDH) par rapport aux témoins (Lapointe et Couture, 2010). Par contre, les études faites sur le terrain

montraient qu'il existait des différences entre les poissons des lacs contaminés et ceux des lacs propres pour l'activité de ces enzymes, mais plusieurs autres paramètres, comme l'acclimatation et la nourriture peuvent expliquer cette différence entre les résultats du terrain et ceux du laboratoire (Audet et Couture, 2003; Couture et Kumar, 2003). Cependant, l'exposition aux métaux faisait diminuer la concentration en protéines dans le foie des poissons exposés au nickel, mais pas dans ceux exposés au cadmium ou au mélange de métaux. Cela suggère que le cadmium avait un effet antagoniste au nickel et annulerait ces effets néfastes. Chez la carpe, De Smet et Blust (2001) avaient aussi montré que le cadmium n'avait pas d'influence sur la concentration en protéines dans le foie. De plus, l'augmentation de la concentration en protéines pour les poissons exposés au nickel a aussi été montrée dans le plasma des truites arc-en-ciel exposées au nickel par voie aqueuse (Pane et coll., 2002). Le fait qu'il y ait moins de concentration en protéines dans le foie des poissons exposés au nickel pourrait être dû à une augmentation de l'activité de la peptidase (protéase), une enzyme qui sert à briser les liaisons peptidiques des protéines, ce qui ferait diminuer la concentration de celles-ci. Ainsi, Sreedevi et coll. (1992) ont montré chez la carpe (*Cyprinus carpio*) que l'exposition létale au nickel amenait à une forte augmentation de l'activité de cette enzyme dans les branchies et les reins et donc à une diminution de la concentration en protéines dans ces tissus. Ainsi, il y aurait une dominance de l'activité protéolytique par rapport à l'activité de synthèse lors d'un stress au nickel. Plusieurs hypothèses peuvent être émises suite à ces observations. Premièrement, il est possible qu'il n'y ait pas de resynthèse des protéines, car l'énergie normalement utilisée pour cette activité est peut-être réacheminé afin de combattre la contamination. Deuxièmement, les protéines pourraient être endommagées par la présence de Ni ce qui engendrerait leur dégradation et par la suite leur élimination. Troisièmement, le nickel pourrait inhiber directement la synthèse protéique. Enfin, une combinaison des trois hypothèses pourrait aussi expliquer mes résultats.

Cette différence de concentration en protéines avait une influence directe sur les activités normalisées de ces trois enzymes (UI/mg de protéines). Ainsi, malgré la diminution de la concentration totale en protéines tissulaires chez les poissons exposés au traitement nickel, l'activité enzymatique par gramme de poids frais est restée constante. Cela signifie que l'organisme était encore capable de compenser les effets de la contamination en augmentant la production cellulaire de ces enzymes, ce qui aurait permis de maintenir leurs fonctions métaboliques (Upregulation). Le fait que ces mécanismes étaient mis en place montre que les poissons avaient encore la capacité de se défendre contre la contamination au nickel. Ainsi, si les activités enzymatiques et la concentration en protéines avaient diminué avec la

contamination, cela aurait suggéré que l'organisme n'était plus capable de combattre les effets néfastes des métaux et cela pourrait donc mener à sa mort. Pour aller plus loin, sachant que le foie est composé en majorité de lipides, d'eau et de protéines, il serait intéressant de doser les lipides et la teneur en eau pour voir ce qu'a engendré la diminution de la concentration tissulaire en protéines. Enfin, la quantification du taux de transcription des gènes impliqués dans la réparation tissulaire et la synthèse protéique pourrait aussi aider à mieux comprendre les mécanismes engendrés.

Le foie est un organe impliqué dans la détoxification des métaux (Giguère et coll., 2005). Cependant, ces derniers induisent des dommages aux cellules et des coûts de réparation importants. D'ailleurs, l'activité de la CCO peut aussi être affectée par l'exposition aux métaux et subir une augmentation à cause du coût métabolique imposé par la réparation cellulaire. Cependant, pour que cela soit possible, cette dernière doit être appuyée par l'augmentation de la synthèse de protéines. La corrélation positive entre la CCO et la NDPK trouvée dans mon expérience appuie cette suggestion. Par ailleurs, à l'intérieur de chaque groupe il y a une grande variation dans les concentrations métalliques et dans les activités enzymatiques, ce qui peut rendre difficile la détection de différences significatives entre les groupes. En effet, à exposition égale, certains poissons accumulent plus de métaux que d'autres. Ainsi, bien que les activités de la NDPK n'étaient pas significativement différentes entre les conditions, la variabilité interindividuelle des perchaudes dans chacune des conditions pouvait expliquer que son activité était corrélée positivement avec la concentration en Cd dans le rein. Cela montre que les poissons répondent à l'accumulation de métaux par des modifications d'activités enzymatiques. En effet, l'exposition au cadmium induit des dommages cellulaires ayant un coût métabolique important. L'exposition à ce métal pourrait augmenter l'activité de la NDPK afin de pouvoir investir plus dans la réparation cellulaire. De plus, pour la même raison citée plus haut, la corrélation positive entre l'activité de la LDH et la concentration en nickel, pouvait être due à la variabilité interindividuelle des perchaudes dans chacune des conditions.

Au niveau des réponses au stress oxydatif, l'exposition aux métaux n'avait aucun impact sur l'activité de la SOD et de la CAT (UI/g de p.f.). Cependant, le temps d'exposition jouait un rôle important sur ces activités en les faisant diminuer. Cette variation dans le temps peut être due à l'acclimatation des poissons. Ainsi, les poissons sacrifiés au début de l'expérience ont eu moins de deux semaines d'acclimation à leur nouvel environnement. Les stress du voyage, d'un nouvel environnement et du changement de nourriture pouvaient donc être des facteurs provoquant

cette différence. L'exposition aux métaux n'induisant pas de changements dans l'activité de ces enzymes, il est donc possible de penser que soit les poissons n'avaient pas subi de stress oxydatif lors de l'exposition ou soit que ceux-ci ont trouvé un moyen de compenser ce stress. Cela pouvait être à cause de la faible concentration en cadmium dans l'eau, ou alors à cause de la durée de l'exposition, qui leur avait permis de s'acclimater à ce stress.

Suivant les études, le fait qu'aucune différence significative, entre les traitements à 49 jours, n'est remarquée, peut être confirmé ou infirmé. Shi et coll. (2005) ont montré qu'à faible dose de cadmium ($< \mu\text{g/L}$), en exposition aigu, il n'y avait aucune différence avec le contrôle pour l'activité de la SOD et de la CAT chez le poisson rouge (*Carassius auratus*). Néanmoins, Basha et Rani (2003) ont mis en évidence que les activités de la CAT et de la SOD chez le tilapia ont augmenté lorsqu'il est exposé au cadmium entre 7 et 30 jours. Cependant, dans cette étude, il est possible de voir qu'après l'atteinte du pic d'activité à 15 jours d'exposition, l'activité de ces enzymes diminuait. Ainsi, notre exposition durant 49 jours, les poissons ont peut être pu retrouver leur taux normal d'activité. De plus, chez les poissons sacrifiés à dix jours dans notre étude (données non-montrées), il était possible de voir une différence entre le traitement cadmium et les témoins chez ces deux enzymes, comme dans l'étude de Basha et Rani. Aussi, chez le tilapia du Nil une augmentation significative a été vue pour l'activité de la SOD (Almeida et coll., 2002), mais les concentrations auxquelles ont été exposés les poissons étant vraiment importantes (mg/L), les résultats ont pu être amplifiés et étaient non représentatifs par rapport à mon étude. Pour ce qui est du nickel, à ce jour, peu d'études sur les poissons se sont intéressées à l'effet de ce métal sur les défenses antioxydantes. Mais, chez la souris et le rat, il a été montré que l'exposition au nickel menait à une diminution des activités de la CAT et de la SOD dans leur foie (Rodriguez et coll., 1991; Das et coll., 2001).

L'analyse des corrélations entre les enzymes du foie et les concentrations rénales en métaux a été faite à partir de l'ensemble des poissons : ceux sacrifiés au début de l'expérience, à dix jours et à 49 jours. Comme expliqué plus haut, la corrélation négative qui était visible entre la SOD et CAT avec la concentration en cadmium dans le rein pouvait être due à la variabilité interindividuelle des perchaudes dans chacune des conditions. Aussi, la complémentarité des deux enzymes antioxydantes (SOD et CAT) peut expliquer que l'activité de la SOD était corrélée positivement avec celle de la CAT. Enfin, ces deux enzymes étaient corrélés positivement avec la CCO, car elles sont reliées directement au métabolisme aérobie en empêchant les impacts du dioxygène transformé en anion superoxyde lors de la respiration.

4.1.5 Effet des métaux sur les capacités métaboliques du muscle

Comme dans le foie, les activités de la CCO, de la NDPK et de la LDH (UI/g de p.f.) n'étaient pas affectées par l'exposition aux métaux. Ainsi, les poissons n'avaient pas de changement dans leur métabolisme aérobie (CCO) et n'avaient donc pas eu besoin de solliciter leur mécanisme anaérobie (LDH) malgré le stress métallique. Cependant, pour la NDPK et la LDH, les poissons exposés au traitement nickel avaient des concentrations en protéines plus élevées que ceux exposés aux autres traitements, ce qui contraste avec le foie où les poissons exposés au nickel avait une diminution de leur concentration en protéines par rapport aux autres poissons. D'après mes recherches, il n'existe pas d'étude expliquant ces résultats dans le muscle. Cependant, Sreedevi et coll. (1992) ont regardé l'effet du nickel sur les cellules des branchies et des reins et ils sont arrivés à la conclusion que cette augmentation pourrait être due à une stimulation du mécanisme de synthèse des protéines qui servirait à développer une résistance contre le nickel et ainsi renforcer l'organe. En effet, si le nickel augmentait le nombre d'acides aminés libres dans les cellules des branchies et des reins, cela permettrait la synthèse de nouvelles protéines et enzymes qui seraient capables de détoxiquer les métaux dans ces organes (Sreedevi et coll., 1992). Contrairement à nos résultats, Almeida et coll. (2000) ont montré qu'il n'y avait pas de différence pour les concentrations protéiques entre les tilapias du Nil exposés au cadmium (320 µg/L) et les témoins, mais ils ont observé une diminution à partir d'une exposition à 640 µg/L. Cependant, les concentrations en cadmium utilisées par ces auteurs sont très importantes comparées à la nôtre (4 µg/L).

L'augmentation de la concentration en protéines chez les poissons exposés au cadmium pourrait être expliquée en partie par une plus forte concentration en protéines impliquées dans les mécanismes de réparation et de détoxification. L'explication de Rajotte et Couture (2002) allait dans le même sens que cette hypothèse. Ainsi, selon eux, chez la perchaude des lacs contaminés en métaux (Cd, Ni, Zn, Cu, etc.), l'augmentation de la concentration en protéines dans le muscle serait due à une plus forte synthèse, mais aussi, à un renouvellement du taux de protéines impliqué dans les mécanismes de réparation et de détoxification (ex. : MT).

Les variations des concentrations en protéines, en fonction des traitements auxquels ont été exposées les perchaudes, induisaient des différences sur l'activité spécifique de la NDPK et de la LDH (UI/mg de protéines). Pour la NDPK, les poissons exposés aux métaux individuellement se retrouvaient avec une activité significativement moindre que les poissons témoins ou exposés au mélange de métaux. Cela amène à penser que les deux métaux avaient des effets

antagonistes l'un sur l'autre qui annulaient leurs effets néfastes respectifs. Pour la LDH, l'activité de l'enzyme était moindre chez les poissons exposés au nickel que chez les poissons exposés au mélange. Là aussi, le cadmium avait peut être un effet antagoniste au nickel et diminuait les effets de celui-ci sur l'activité de l'enzyme. Contrairement au foie, en réponse à l'exposition au nickel seul, l'organisme a induit une « upregulation » de plusieurs protéines, augmentant ainsi la concentration de protéines totales musculaires, mais cela n'a pas modifié l'activité de la LDH et de la NDPK (UI/g de p.f.). Comme dans le foie, sachant que le muscle est composé en majorité de protéines, d'eau et de lipides, il serait intéressant de mesurer les teneurs en lipides et en eau pour voir l'influence de l'augmentation de la concentration de protéines sur la composition générale du tissu. Enfin, la quantification du taux de transcription des gènes impliqués dans la synthèse des protéines pourrait aussi aider à mieux comprendre les mécanismes engendrés.

Comme vu plus haut, les poissons exposés aux métaux avaient un indice de condition moindre par rapport aux poissons témoins. Cette observation supporte l'hypothèse que l'énergie apportée par la nourriture ne servait pas seulement à la croissance, mais aussi à réparer les dommages causés par les métaux, ce qui pourrait représenter un coût métabolique important. Alors que dans le foie l'activité de la CCO et celle de la NDPK étaient corrélées positivement, à l'inverse dans le muscle c'est une corrélation négative qui est observée. Puisque la capacité aérobie, telle que reflétée par l'activité de la CCO, n'était aucunement affectée par les métaux mais que l'exposition aux métaux individuellement induisait une réduction de l'activité de la NDPK, mes résultats démontrent que les activités de biosynthèse orientées vers la croissance et la réparation sont ralenties en présence de cadmium ou de nickel, peut-être pour favoriser le maintien des capacités natatoires. Cependant, l'augmentation de l'activité de la NDPK musculaire (retour aux valeurs témoin) chez les poissons exposés au mélange de métaux indique que ce stress exige un effort de détoxification et de réparation pour préserver la fonction musculaire, avec des conséquences négatives sur les réserves énergétiques tel que reflété dans l'indice de condition.

Dans le muscle, seule la CCO était corrélée positivement avec la concentration en cadmium dans le rein. Cependant, l'activité de cette enzyme (UI/g de p.f.) n'était pas influencée chez les poissons exposés au cadmium ou au mélange de métaux. Mais, comme expliqué plus haut, cette corrélation entre la CCO et le Cd pourrait être expliquée par la variabilité inter-individuelle des perchaudes dans chacune des conditions. De plus, une corrélation négative entre la SOD et la LDH met en avant que la barrière contre le stress oxydatif a un effet inverse par rapport au

métabolisme anaérobie. Cet effet peut être expliqué par le fait que l'augmentation du stress oxydatif (diminution de l'activité de la SOD) oblige l'organisme à utiliser son métabolisme anaérobie (augmentation de la LDH) pour diminuer l'accumulation d'espèces réactives d'oxygène et d'anions superoxyde tout en maintenant la production d'énergie nécessaire au bon fonctionnement de l'individu.

Comme dans le foie, l'activité de la SOD (UI/g de p.f.) dans le muscle n'était pas influencée par l'exposition aux métaux, mais le temps d'exposition avait un impact négatif. Là encore, cette différence peut être due à l'acclimatation des poissons à leur arrivée. L'exposition aux métaux n'induisant pas de changements dans l'activité de ces enzymes, il est donc possible de penser que soit les poissons n'avaient pas subi de stress oxydatif lors de l'exposition ou soit que ceux-ci avaient trouvé un moyen de compenser ce stress. L'étude de l'activité de la SOD dans le muscle du tilapia du Nil par Almeida et coll. (2002) a montré que l'activité était moindre chez les poissons exposés au cadmium. Mais, comme dit plus haut, les concentrations aqueuses étaient très importantes, donc les résultats ne sont pas facilement comparables avec les nôtres. Cependant, dans notre étude, lorsque l'activité de la SOD était exprimée en fonction de la concentration en protéines, aucune différence n'était visible.

Dans l'analyse des corrélations entre les activités enzymatiques musculaires (UI/g de p.f.) et les concentrations métalliques dans le rein, l'activité de la SOD était corrélée négativement avec la concentration en Cd. Contrairement à nos résultats, chez le bivalve *Megapitaria squalida*, il existait une corrélation positive entre l'activité de la SOD (UI/mg de protéines) et la concentration en Cd (Cantu-Medellin et coll., 2008). Mais, nos résultats d'activité enzymatique ne sont pas exprimés dans les mêmes unités, donc cela peut induire un biais. De plus, les différences inter-taxon rendent difficiles la comparaison aux vues des variations interspécifiques potentielles. Contrairement à ce qui est vu dans le foie, les activités de la SOD et de la CAT étaient corrélées négativement, ce qui est atypique vu leur complémentarité.

4.2 Échantillonnage terrain

4.2.1 Influence des métaux sur les poissons

Comme nous nous y attendions, les concentrations rénales en cadmium et nickel étaient plus importantes chez les poissons des lacs Hannah et Whitson, des lacs contaminés. Mes résultats étaient pour les reins, mais l'étude de Couture et Kumar (2003) montrait la même tendance dans le foie des perchaudes de ces deux lacs. De plus, plusieurs autres études dans les lacs de

Sudbury ont aussi mis en évidence une accumulation du cadmium et du nickel dans le foie et les reins des perchaudes y habitant (Rajotte et Couture, 2002; Audet et Couture; 2003; Rasmussen et Coll., 2008; Pierron et coll., 2009).

Entre les quatre lacs du terrain, d'après ce que suggère l'indice des cæca pyloriques, les poissons prélevés ne semblaient pas avoir la même consommation de nourriture. En effet, les poissons des lacs Hannah et Whitson, qui sont considérés comme contaminés, avaient un indice de cæca plus faible que ceux du lac Red Chalk. Cela pourrait s'expliquer par la différence d'activités entre les individus ou encore par un changement dans les habitudes d'alimentation dû à la recherche de plus petites proies (Gauthier et coll., 2009). Cependant, le fait que les poissons du lac Dickie aient le même taux d'alimentation que ceux du lac Whitson, cela soulève des questions, car ce lac était considéré comme propre. Néanmoins, cette consommation pouvait être la résultante d'autres stress non pris en compte, comme la présence de prédateurs qui limite le temps de recherche de nourriture (Gauthier et coll., 2009). De plus, Gauthier et coll. (2008) ont montré que l'alimentation était reliée positivement à la condition des poissons. Ainsi, lorsque l'on regarde l'indice de Fulton, le fait que les poissons d'Hannah, qui selon l'indice des cæca pyloriques, avaient la plus basse taux d'alimentation, aient un indice de condition proche de 1, est atypique. Cela suggère que les poissons réussissaient à compenser la diminution de nourriture dans leur environnement. Les poissons des lacs Dickie et Whitson avaient le même indice des cæca pyloriques, mais leur condition n'était pas identique. En effet, ceux de Whitson avaient une condition moindre par rapport à ceux de Dickie. La différence pourrait venir de la contamination en métaux importante dans le lac Whitson, qui oblige les poissons à utiliser leur énergie pour compenser les effets néfastes de l'exposition aux métaux. Cependant, les métaux ne sont pas les seuls facteurs à prendre en compte. Ainsi, les poissons du lac Red Chalk, qui avaient la meilleure alimentation, d'après leur indice de cæca pyloriques, avaient une condition beaucoup plus basse que celle des poissons des trois autres lacs. Cela suggère qu'il y avait plusieurs facteurs, autres que les métaux, tels que la présence de prédateurs ou la densité des organismes, qui n'avaient pas été pris en compte dans la présente étude, qui avaient une influence sur les résultats (Kaufman et coll., 2006). Il est possible de voir ici la limite des études sur le terrain par rapport aux études en laboratoire.

4.2.2 Répartition subcellulaire du cadmium

Dans le foie, la majorité du cadmium se trouvait dans les protéines stables à la chaleur, comme vu aussi dans les études de Giguère et coll. (2006), d'Olson et Haux (1985) et Kraemer et coll. (2005). Le cadmium est fortement lié par les MT, qui se retrouvent dans les HSP et qui

permettent la détoxification de ce métal. Ce mécanisme amène à penser que les poissons avaient peut-être la capacité d'augmenter leur concentration en MT afin de compenser l'exposition au cadmium et ainsi protéger leur métabolisme (Giguère et coll., 2006). Cependant, pour confirmer cette hypothèse, il faudrait, comme dans plusieurs autres études, doser les métallothionéines dans les cellules des poissons exposés aux métaux (Giguère et coll., 2006; Laflamme et Coll., 2000; Olsson et Haux, 1985). Malgré l'augmentation du cadmium dans l'homogénat du foie des perchaudes sauvages, les fractions sensibles n'avaient que très peu de cadmium. Contrairement à nos résultats, l'étude de Giguère et coll. (2006) montrait une augmentation dans les fractions sensibles lorsque la concentration en cadmium augmentait dans l'homogénat. Cette différence de résultats peut venir de l'ordre de grandeur des concentrations dans le foie. Ainsi, les perchaudes de leur étude avaient six fois plus de cadmium dans leur homogénat que nos perchaudes (comparaison pour le lac Hannah qui a été étudié dans les deux études). Dans notre étude, le fait que la concentration n'augmentait pas dans les fractions sensibles signifiait que le pouvoir détoxiquant des HSP était encore effectif et n'était pas dépassé.

4.2.3 Répartition subcellulaire du nickel

Dans les quatre lacs, les granules stockaient la majorité du nickel, suivi par la fraction HSP. Ces deux fractions étant considérées comme détoxiquantes, cela suggère que l'organisme essayait de combattre l'entrée du nickel. Peu d'études ont effectué la répartition subcellulaire du nickel dans le foie de poissons sauvages (Giguère et coll., 2006; Campbell et coll., 2008). Par ailleurs, celle de Giguère et coll. (2006) ne montrait pas les mêmes conclusions que dans cette étude. Pour eux, le nickel se retrouvait principalement dans les HDP et les mitochondries. Les fractions sensibles étaient donc directement touchées par les effets du nickel, contrairement à celles de notre étude. Malgré la détoxification par les granules et les HSP, l'augmentation de la concentration en nickel dans le foie faisait augmenter la concentration de ce métal dans l'ensemble des fractions, y compris celles sensibles. Encore une fois, cette différence de résultats peut venir de l'ordre de grandeur des concentrations dans le foie. Ainsi, les perchaudes de leur étude avaient trois fois plus de nickel dans leur homogénat que nos perchaudes (comparaison pour le lac Hannah qui a été étudié dans les deux études).

4.2.4 Effet des métaux sur les capacités métaboliques du foie et du muscle

Dans le foie, aucune différence significative n'a été trouvée entre les lacs pour les activités des cinq enzymes (UI/g de p.f. et UI/mg de protéines). Donc, selon les indicateurs de capacité métabolique utilisés dans la présente étude, les perchaudes des lacs contaminées n'étaient pas

affectées par les métaux présents. Ces résultats viennent appuyer ceux de la répartition subcellulaire qui montrait une protection des fractions sensibles par une séquestration dans les fractions détoxiquées. Ainsi, il est possible de penser que les fonctions vitales de la cellule du foie n'étaient pas trop touchées par les effets néfastes du cadmium. Au niveau des corrélations, la complémentarité des deux enzymes antioxydantes (SOD et CAT) peut expliquer que l'activité de la SOD était corrélée positivement avec celle de la CAT. De plus, sur le terrain, les concentrations des deux métaux étaient corrélés positivement, ce qui était prévisible.

Dans le muscle, l'analyse de l'activité de la CCO révélait que les perchaudes des lacs contaminés avaient plus d'activité que les poissons des lacs propres. Donc, les capacités aérobies de ces poissons étaient augmentées afin de compenser l'effet néfaste des métaux ou d'autres stress non quantifiés. D'ailleurs, l'activité de la CCO était corrélée positivement avec la concentration métallique en cadmium et nickel dans les reins. Cependant, cette corrélation n'a pas été vue chez les perchaudes de Sudbury étudiées par Pierron et coll. (2009).

Les activités de la NDPK étaient très différentes entre les deux lacs propres, ce qui montre que des éléments extérieurs, tels que le parasitisme, la prédation ou encore l'abondance des proies influençaient, cette enzyme. De plus, les perchaudes des deux lacs contaminés n'avaient pas de différences significatives avec l'un ou l'autre des lacs propres, ce qui signifie que les métaux n'étaient, encore une fois, pas le seul facteur qui faisait varier l'activité de cette enzyme. Suivant les études (Rajotte et Couture, 2002; Couture et Kumar, 2003), les résultats variaient pour les mêmes lacs, donc il est possible de penser que la NDPK est fortement influencée par l'environnement. Pour la LDH, ces deux études montrent aussi des variations dans les réponses dans les mêmes lacs, donc les facteurs, autres que les métaux, avaient aussi une influence. Dans mon étude, l'activité de la LDH était corrélée négativement avec la concentration rénale en nickel. Comme expliqué dans la discussion de la partie laboratoire, cela pouvait être dû à la variabilité interindividuelle des perchaudes dans chacune des conditions.

L'activité de la SOD était corrélée positivement avec la concentration en Cd, ce qui était prévisible puisque les poissons des lacs contaminés avaient une activité de la SOD supérieure à celle des lacs témoins. Là encore, plusieurs facteurs non quantifiés tels l'abondance des proies et des prédateurs, la densité ou encore le parasitisme seraient à prendre en compte pour avoir une analyse complète.

4.3 Comparaison perchaudes naïves versus perchaudes acclimatées

Comparer les réponses physiologiques et cellulaires de perchaudes naïves et acclimatées est intéressant, car ça permet de comprendre l'effet de l'acclimatation de ces poissons. Cependant, il est difficile d'avoir une comparaison directe point par point. En effet, en laboratoire, les conditions sont contrôlées et il est possible de savoir exactement ce que l'on fait varier et ce qu'il faut prendre en compte, alors que sur le terrain, bien qu'on regarde certains paramètres, plusieurs autres non pris en compte pourraient avoir une influence directe sur les réponses de nos tests (ex : température, diversité, abondance de prédateurs, etc.). Dans cette comparaison, les résultats du terrain seront comparés à ceux des poissons exposés pendant 49 jours au traitement mélange.

Tout d'abord, au niveau de l'alimentation, il est certain que les poissons du terrain ne se nourrissent pas de la même manière que ceux du laboratoire, puisque pour ces derniers leur portion est calculée en fonction de leur poids et est non contaminée. Cependant, la condition des poissons des lacs contaminés était meilleure que celle des poissons du laboratoire, ce qui montrait que les poissons du terrain avaient réussi à outrepasser le stress métallique ou que les poissons du laboratoire étaient stressés par le confinement. De plus, si les concentrations rénales en nickel étaient similaires entre les poissons du terrain et ceux du laboratoire (7 µg/g et 6 µg/g respectivement), les concentrations en cadmium étaient environ dix fois supérieures sur le terrain. Les perchaudes du terrain avaient donc une meilleure condition que les poissons du laboratoire malgré la plus grande concentration interne en cadmium. La répartition subcellulaire des deux métaux n'était pas non plus la même entre les perchaudes naïves et celles du terrain. Ainsi, sur le terrain, la fraction HSP avait un rôle important dans la séquestration du cadmium alors qu'au laboratoire, le cadmium était détoxiqué à la fois dans les HSP et les granules. De plus, les fractions sensibles des perchaudes naïves étaient exposées aux métaux tandis que celles des perchaudes sauvages l'étaient peu. Ceci suggère que sur le terrain les poissons ont trouvé un moyen de protéger leur métabolisme et le fonctionnement de la cellule contre l'effet néfaste du cadmium. À l'inverse, le nickel se trouvait dans les fractions sensibles des poissons sur le terrain seulement et alors que celles des poissons naïfs en avaient peu. Ce qui veut dire que les perchaudes acclimatées ont dû trouver des moyens pour compenser l'effet néfaste du nickel dans les fractions sensibles, car au niveau des capacités métaboliques, dans le foie, ni les poissons exposés au traitement mélange, ni les poissons du terrain ne montraient d'impacts causés par les métaux. Le rôle détoxiquant du foie pourrait expliquer ces résultats. Dans le muscle, les perchaudes du laboratoire n'avaient pas d'impact direct de l'exposition au mélange

de métaux. Par contre, celles du terrain avaient leurs activités enzymatiques (CCO, NDPK et LDH) qui variaient en fonction des lacs. Cependant, comme discuté plus haut, ces enzymes étaient probablement affectées par des facteurs intrinsèques et/ou extrinsèques et pas seulement par les métaux étudiés. Il est donc possible de voir que des perchaudes naïves et des perchaudes acclimatées ne réagissaient pas de la même manière contre le stress métallique, ce qui veut dire que soit celles du terrain ont développé des défenses et se sont adaptées, soit que des facteurs autres que les métaux étudiés ont un impact qu'il serait intéressant de quantifier. Mais, le plus plausible serait une combinaison de ces deux hypothèses.

5 Conclusions

Les perchaudes exposées au cadmium et au nickel au laboratoire présentent une accumulation significative dans leur foie et leurs reins. De plus, l'exposition aqueuse des perchaudes à un mélange de cadmium et nickel au laboratoire a permis d'en apprendre plus sur le fonctionnement des deux métaux lorsqu'ils se retrouvent en mélange. Ainsi, mes résultats démontrent que l'accumulation du cadmium dans les reins des perchaudes était facilitée en présence de nickel, ce qui se traduisait au niveau subcellulaire par une augmentation de la concentration en cadmium dans deux fractions sensibles (HDP et mitochondries). Contrairement à ces résultats, l'accumulation du nickel dans les reins ne semble pas influencée par la présence de cadmium, mais ce dernier paraît diminuer l'accumulation du nickel à dix jours dans le foie.

Les perchaudes exposées au cadmium et nickel ont montré plusieurs effets directs à cette exposition tels une diminution de leur condition. L'analyse de leur indice de condition suggère qu'au moins aux concentrations étudiées le nickel serait plus néfaste que le cadmium puisque les poissons exposés à ce dernier ont un indice de condition plus bas que les autres. Les capacités métaboliques ne semblent pas directement impactées par les métaux individuels ou en mélange, du moins aux concentrations utilisées dans cette étude. Cependant, l'analyse de la concentration en protéines révèle les effets du nickel seul, qui les augmente dans le foie, mais qui les diminue dans le muscle. Néanmoins, il est intéressant de noter que le cadmium a eu un effet antagoniste par rapport au nickel sur la concentration en protéines, car les poissons exposés au mélange de métaux n'ont pas subi la diminution dans le foie ni l'augmentation dans les muscles de la concentration en protéines observée chez ceux exposés au nickel seul.

Enfin, une fois entrés dans les poissons, les métaux en mélange n'ont pas le même comportement et n'induisent pas les mêmes effets que quand ils sont seuls. Ces résultats viennent réfuter mon hypothèse puisqu'ils démontrent des interactions entre les deux métaux tant au niveau de la répartition subcellulaire qu'au niveau des conséquences métaboliques. Les deux métaux ensemble vont donc influencer la toxicité propre à chacun lorsque des perchaudes y sont exposées, du moins au laboratoire.

Les différences entre les poissons du terrain et ceux du laboratoire sont très nettes. En effet, que ce soit au niveau de la condition des poissons, de l'accumulation, de la répartition subcellulaire ou encore des conséquences métaboliques dans le muscle, les deux groupes de poissons ont peu en commun. Néanmoins, ni les poissons du terrain ni ceux du laboratoire n'ont réagi à l'exposition aux métaux, au niveau des capacités métaboliques hépatiques. La condition des poissons des lacs contaminés était meilleure que celle des poissons du laboratoire exposés au mélange de métaux. De plus, si les concentrations rénales en nickel étaient similaires entre les poissons du terrain et ceux du laboratoire (7 µg/g et 6 µg/g respectivement), les concentrations en cadmium étaient environ dix fois supérieures sur le terrain. Les perchaudes du terrain avaient donc une meilleure condition que les poissons du laboratoire malgré une plus grande concentration interne en cadmium. Il est donc possible de voir que les perchaudes naïves et les perchaudes acclimatées ne réagissaient pas de la même manière contre le stress métallique, ce qui veut dire que soit celles du terrain ont développé des défenses et se sont adaptées, soit que des facteurs autres que les métaux (ex : génétique/héréditaire) ont un impact positif qu'il serait intéressant d'identifier. Ces observations viennent confirmer l'hypothèse de départ qui prédisait que la réponse aux métaux, aussi bien au niveau de la répartition subcellulaire qu'au niveau des capacités métaboliques, ne sera pas identique entre les poissons de laboratoire et ceux des milieux naturels, car les perchaudes sauvages ont eu le temps de s'acclimater voire même de s'adapter. Mon étude suggère que les perchaudes du terrain sont plus tolérantes que les perchaudes du laboratoire, mais plusieurs facteurs tel que le stress des poissons du laboratoire n'ont pas été pris en compte et pourrait donc modifier la conclusion.

6 Perspectives futures

Lors de mon étude, plusieurs questions sont apparues. En effet, les variations dans les concentrations en protéines dans le foie et le muscle ne peuvent être expliquées, donc il serait intéressant pour continuer les recherches sur ce mélange de métaux, d'ajouter une composante

génomique. Ainsi, la quantification par PCR des gènes impliqués dans la réparation tissulaire et la synthèse protéique serait intéressante à faire afin de mieux comprendre la réponse des cellules aux mélanges de métaux. Aussi, la quantification des gènes de la SOD et de la CAT pourrait être faite afin de faire un parallèle avec les résultats d'activités enzymatiques étudiées. Pour aller plus loin, sachant que le foie est composé en majorité de lipides, d'eau et de protéines, il serait intéressant de doser les lipides et la teneur en eau pour mieux comprendre les conséquences sur la composition proximale du foie de la diminution de la concentration tissulaire en protéines. Enfin, la concentration en métallothionéines pourrait être mesurée pour en apprendre plus sur leur rôle et leur impact direct sur les métaux lorsqu'ils sont en mélange, car ces protéines sont importantes dans le cycle de détoxification des métaux.

Au niveau de la législation, étant données les conclusions de mon étude et de la littérature sur les effets sur les poissons d'autres mélanges de métaux, il serait important de développer des seuils pour les rejets dans l'environnement aquatique. Bien que la mise en place de seuils ou de limites de concentrations acceptables pour des mélanges de métaux serait difficile étant donné le nombre de métaux présents dans l'environnement et la complexité de leurs interactions avec le vivant, cette étude démontre que le développement de normes pour des métaux individuels ne fournit pas une protection adéquate de la faune piscicole.

7 Références

- Actu-environnement. 2013. Définition, cadmium. [En ligne]
http://www.actuenvironnement.com/ae/dictionnaire_environnement/definition/cadmium_cd.php4
(Page consultée le 18 février 2013).
- Alabaster J.S. et R. Lloyd. 1984. Cadmium. Dans : Alabaster JS, Lloyd R, eds. Water quality criteria for freshwater fish. 2^e éd. Cambridge University Press; 1984:121-9.
- Al-Attar. 2007. The influences of nickel exposure on selected physiological parameters and gill structure in the teleost fish, *Oreochromis niloticus*. J. Biol. Sci. 7 : 77-85
- Almeida, J.A., E.L.B. Novellib, M. Dal Pai Silva et R. Alves Junior. 2000. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Environ. Pollut.114 : 169-175.
- Almeida, J.A., Y.S. Dinizb, S.F.G. Marquesa, L.A. Faineb, B.O. Ribasc, R.C. Burneikob et E.L.B. Novellib. 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. Environ. Int. 27 : 673–679.
- Andral, B. 1994. Ecotoxicité du nickel pour les organismes marins. Direction de l'environnement et de l'aménagement littoral. IFREMER, Issy-les-moulineaux. 17p.
<http://archimer.ifremer.fr/doc/00105/21584/19164.pdf>
- Asthana, R.K., S.P. Singh, R.K. Singh. 1992. Nickel effects on phosphate uptake, alkaline phosphatase, and ATPase of a cyanobacterium. Bull. Environ. Contamin.Toxicol.48 : 45-54
- Audet D. et P. Couture. 2003. Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments. Can. J. Fish.Aquat. Sci. 60 : 269–278
- Aylett, B.J. 1979. The chemistry and biochemistry of cadmium. Dans Webb, M. Topics in environmental health. The chemistry, biochemistry and biology of cadmium. Elsevier, New York. 2 : 1-44
- Basha, P.S. et A.U. Rani. 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). Ecotoxicol. Environ. Safety 56 : 218–221
- Bengtsson, B-E., C. H. Carlin, A. Larsson, et O. Svandberg, 1976. Vertebral damage in minnows. *Phoxinus phoxinus* L. exposed to cadmium. Ambio.4 : 166-168
- Bennett, P.M. et D.M. Janz. 2007. Bioenergetics and growth of young-of the-year northern pike (*Esox lucius*) and burbot (*Lota lota*) exposed to metal mining effluent. Ecotoxicol. Environ. Saf.68 : 1–12.
- Benoit, D. A., E. N. Leonard, M. Christensen, et T. Fiandt. 1976. Toxic effects of cadmium on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) Trans. Am. Fish. Soc. 105 : 550-560

Blaise, C. et P. Couture. 1984. Détection à l'aide d'un bio-essai (*Selenastrum capricornutum*) des répercussions d'un rejet minier sur l'environnement aquatique : toxicité ou enrichissement en substance essentielle? *Hydrobiologia*. 114: 39-50

Borcard, D. 2014. Plans d'expérience et pseudoréplication. Département de sciences biologiques. Université du Québec à Montréal. Québec, Canada. 16p
http://biol09.biol.umontreal.ca/bio2042/Plans_exp.pdf

Borgmann, U., W.P. Norwood, T.B. Reynoldson et F. Rosa. 2001. Identifying cause in sediment assessments: bioavailability and the Sediment Quality Triad. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 58 : 950-960.

Bradford M.M. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.

Brillant, E. 1993. Effets de l'intoxication au chlorure de cadmium chez la truite mouchetée, *Salvelinus fontinalis*, Mitchill. Mémoire de maîtrise. UQAC. Québec. Canada. 157 p.
<http://dx.doi.org/10.1522/1485704>

Brodeur, C., C. Daniel, A.C. Ricard et A. Hontela. 1998. In vitro response to ACTH of the interrenal tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cadmium. *Aquat. Toxicol.* 42 : 103-113

Buddington, R.K. et J.M. Diamond. 1987. Pyloric cæca of fish : a "new" absorptive organ. *Am. J. Phys.* 252 : 65-76.

Carex Canada. 2009. Le nickel et ses composés [En ligne]. School of Environmental Health. University of British Columbia. Vancouver, BC.
<http://www.carexcanada.ca/fr/nickel.pdf> (Page consulté le 24 mars 2014)

Campbell, P.G.C., A. Giguere, E. Bonneris et L. Hare. 2004. Cadmium-handling strategies in two chronically exposed indigenous freshwater organisms—the yellow perch (*Perca flavescens*) and the floater mollusc (*Pyganodon grandis*). *Aquat. Toxicol.* 72 : 83–97

Campbell, P.G.C., L.D. Kraemer, A. Giguère, L. Hare et A. Hontella. 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 Ecol. Risk Assess.* 14 : 290–316

CECPI (Commission Européenne Consultative pour les Pêches dans les eaux Intérieures). 1984. Groupe de travail sur les critères de qualité des eaux pour les poissons d'eau douce européens, Critères de qualité des eaux pour les poissons d'eau douce européens. Rapport sur le nickel et les poissons d'eau douce. (Document Technique de la CECPI; 45). FAO, Rome, 16 p.
<http://www.fao.org/docrep/017/ap673f/ap673f.pdf>

Chowdhury, M.J. et C.M. Wood. 2008. Pre-exposure to waterborne nickel downregulates gastrointestinal nickel uptake in rainbow trout: indirect evidence for nickel essentiality. *Environ. Sci. Technol.* 42 : 1359–1364

Clady, M.D., 1976. Influence of temperature and wind on the survival of early stages of yellow perch, *Perca flavescens*. *J. Fish. Res. Board Can.* 33 : 1887-1893

CNRC (Conseil national de recherches du Canada). 1982. Effets du nickel sur l'environnement canadien, Comité associé du CNRC sur les critères scientifiques concernant l'état de l'environnement, rapport CNRC n° 18569, 349 p.

Coombs, Th. L. 1979. Cadmium in aquatic organisms. Dans : Webb, M. Ed. The chemistry biochemistry and biology of cadmium (Topics in environmental health; 2). Elsevier, New York. pp : 93-140

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

Couillard, Y., S. Masson, A. Hontela, B. Pinel-Alloul, C. Olsen, L. Martel, L. Parent et P.G.C. Campbell. 2009. Développement d'outils d'évaluation du milieu récepteur pour l'industrie minière. *Déchets sciences & techniques* 54 : 41-48

Couture, P., et P.R. Kumar. 2003. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquat. Toxicol.* 64 : 107-120.

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

Couture, P., J.W. Rajotte et G.G. Pyle. 2008. 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 Ecol. Risk Assess.* 14 : 146-165

Couture, P., P.G.C. Campbell, L. Bernatchez et G.G. Pyle. 2010. L'écotoxicogénomique, un nouvel outil pour détecter le stress lié à la contamination environnementale chez les organismes aquatiques : Le cas de la perchaude de régions minières, présentation rédigée à l'occasion des Vingt-troisièmes entretiens du Centre Jacques Cartier, 11/2010, Lyon <http://goo.gl/o65dTs>

Crea, F., C. Foti, D. Milea et S. Sammartano. 2013. Speciation of cadmium in the environment. Dans : Sigel, A., H. Sigel, R.K.O. Sigel. *Cadmium: from toxicity to essentiality*. Springer Science, Dordrecht, pp. 63-83.

Cullen, J.T. et M.T. Maldonado. 2013. Biogeochemistry of cadmium and its release to the environment. Dans A. Sigel, H. Sigel, and R.K.O. Sigel (eds.), *Cadmium: from toxicity to essentiality, metal ions in life sciences*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 31-62.

Das, K.K., S.N. Das et S.D. Gupta. 2001. Influence of ascorbic acid against nickel-induced hepatic lipid peroxidation in rats. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 12 : 187-196

De Luca, G., T. Gugliotta, G. Parisi, P. Romano, A. Geraci, O. Romano, A. Scuteri et L. Romano. 2007. Effects of nickel on human and fish red blood cells. *Biosci. Rep.* 27 : 265-273.

De Smet, H. et R. Blust. 2001. Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Ecotox. Environ. Safe* 48 : 255-262

Dutil, J.-D. et Y. Lambert. 2000. Natural mortality from poor condition in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57 : 826–836.

Environnement Canada. Santé Canada. 1984. Loi canadienne sur la protection de l'environnement. Liste des substances d'intérêt prioritaire. Rapport d'évaluation. Le nickel et ses composés. Approvisionnement et Services Canada, Ottawa. 101 p.
http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/contaminants/psl1-lsp1/compounds_nickel_composes/nickel-fra.pdf

Environnement Canada. 2010. Composés inorganiques du cadmium. [En ligne]
<http://www.ec.gc.ca/toxiques-toxics/Default.asp?lang=Fr&n=98E80CC6-1&xml=B1F78D6F-21C9-470B-AB05-FFCB5B215D3C> (Page consultée le 18 février 2013)

Environnement Canada. 2012a. Rejets de cadmium dans l'eau. [En ligne]
<http://www.ec.gc.ca/indicateurs-indicators/default.asp?lang=fr&n=7F04A6AB-1#cd2>
(Page consultée le 18 février 2013)

Environnement Canada. 2012b. Atelier sur la recherche des causes du programme d'étude de suivi des effets sur l'environnement des mines de métaux. Environnement Canada, Gatineau, Québec.
<https://www.ec.gc.ca/esee-eem/495426D1-675E-4A00-B693-DA80B2BCF1F2/AtelierRechercheDesCausesProgrammeEtudesSEEDesMinesdeMetaux%5B1%5D.pdf>

Eastwood S. et P. Couture. 2002. Seasonal variations in condition and liver metal concentrations of yellow perch (*Perca flavescens*) from a metal-contaminated environment. Aquat. Toxicol. 58 : 43–56

Engelhard, G.H. et M. Helno. 2006. Climate change and condition of herring (*Clupea harengus*) explain long-term trends in extent of skipped reproduction. Oecologia 149,593–603.

EUROPEAN UNION (EU).2003. European union risk assessment report. Risk assessments on cadmium metal and oxide. EC regulation 793/93. Draft version of 3 July 2003 (environment). Belgium: Rapporteur. 1. Brussels, Belgium.

Forlin, L, C. Haux, L. Karlsson-Norrgren, et P. Runn. 1985. Biotransformation enzyme activities and histopathology in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, treated with cadmium. Dans Karlsson - Norrgren, L. ed. Cadmium and aluminium in fish; Body distribution and morphological effects. Can. Techn. Report fish, aquat. Sci. 1368 : 405-408.

Friberg, L., M. Piscator, G.F. Nordberg et T. Kjellstrom. 1974. Cadmium in the environment, 2^e Edition. CRC Press, Cleveland, Ohio, USA, 1974.

Gagnon, E. 2006. Inhibition réciproque du transport de cadmium et de calcium dans les cellules adrénocorticales de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Mémoire de maîtrise. UQAM. Québec. Canada. 108 p. <http://www.archipel.uqam.ca/2107/1/M9226.pdf>

Galbreath, K.C., C.R. Crocker, C.M. Nyberg, F.E. Huggins et G.P. Huffman. 1991. Nickel speciation of urban particulate matter from Davie, Florida. University of North Dakota. University of Kentucky. Prepr. Pap.-Am. Chem. Soc., Div. Fuel Chem. 48 : 779-781

Gauthier, C. 2010. L'utilisation d'indices biométriques et métaboliques pour une meilleure compréhension de l'impact de la contamination par les métaux sur la santé des perchaudes (*Perca flavescens*) sauvages. Thèse de doctorat. Institut national de la recherche scientifique. Québec, Canada. 289 p. <http://espace.inrs.ca/1548/>

Gauthier, C., P.G.C. Campbell et P. Couture. 2008. Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*). *Comp. Biochem. Physiol.* 151:526–532.

Gauthier, C., P.G.C. Campbell, P. Couture. 2009. Condition and pyloric cæca as indicators of food web effects in fish living in metal-contaminated lakes. *Ecotox. Environ. Safe.* Québec, Canada. 72 : 2066–2074.

Gauthier, C., P.G.C. Campbell, P. Couture. 2011. Enzymatic correlates of energy status in wild yellow perch inhabiting clean and contaminated environments. *Environ. Toxicol. Chem.* 30 : 2148–2156

Giguère, A. 2003. Accumulation et répartition subcellulaire des métaux (Cd, Cu, Zn, Ni) chez deux organismes aquatiques exposés à un gradient métallique en milieu naturel: liens avec le stress oxydant. Thèse de doctorat. Institut national de la recherche scientifique. Québec, Canada. 282 p. <http://espace.inrs.ca/1558/>

Giguère, A., P.G.C. Campbell, L. Hare, D. G. McDonald et J. Rasmussen. 2004. Influence of lake chemistry and fish age on cadmium, copper, and zinc concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). *Can. J. Fish.Aquat. Sci.* 61 : 1702-1716.

Giguère, A. P.G.C. Campbell, L. Hare et C. Cossu-Leguille. 2005. Metal bioaccumulation and oxidative stress in yellow perch (*Perca flavescens*) collected from eight lakes along a metal contamination gradient (Cd, Cu, Zn, Ni). *Can. J. Fish.Aquat. Sci.* 62 : 563–577

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

Goyer, R.A. 1997. Toxic and essential metal interactions. *Annu. Rev. Nutr.* 17 : 37–50.

Hazardous Substances Data Bank. 2011. Nickel compounds. [En ligne] <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB> Mot clé : Nickel. (Page consulté le 7 mars 2014)

Hontela, A., C. Daniel et A.C. Ricard. 1996. Effects of acute and subacute exposures to cadmium on the interrenal and thyroid function in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat.Toxicol.* 35 : 171-182

Hontela, A. et M.M. Vijayan. 2008. Adrenal toxicology in fishes. Dans : Harvey, P.W., D. Everett et C. Springall. (Eds.), *Adrenal toxicology (target organ toxicology series)*. Informa Healthcare, New York, NY, USA, pp. 233-255.

Hughes, G.M. and R. Flos. 1978. Zinc content of the gills of rainbow trout (*S. gairdneri*) after treatment with zinc solutions under normoxic and hypoxic conditions. *J. Fish Biol.* 13: 717-728.

INERIS. 2011. Cadmium et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales

des substances chimiques. Verneuil-en-Halatte, INERIS. 82 p.
http://www.ineris.fr/rsde/fiches/fiche_cadmium.pdf

Kagi, J.H.R. 1991. Overview of metallothionein. Dans : Abelson J.N. et M.I. Simon. Methods in enzymology. Academic Press, Inc., San Diego, pp 613-626.

Kargin, F. et H.Y. Cogun. 1999. Metal interactions during accumulation and elimination of zinc and cadmium in tissues of the freshwater fish *Tilapia nilotica*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 63:511-519

Kaufman, S.D., J.M. Gunn, G.E. Morgan et P. Couture. 2006. Muscle enzymes reveal walleye (*Sander vitreus*) are less active when larger prey (cisco, *Coregonus artedii*) are present. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 63 : 970–979

Kraemer, L.D. P.G.C. Campbell et L. Hare. 2005. Seasonal variations in hepatic Cd and Cu concentrations and in the sub-cellular distribution of these metals in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). Environ. Pollut. 142 : 313-325

Kovecses, J., G.D. Sherwood et J.B. Rasmussen. 2005. Impacts of altered benthic invertebrate communities on the feeding ecology of yellow perch (*Perca flavescens*) in metal-contaminated lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 62 : 153–162

Kubrak, O.I., B.M. Rovenko, V.V. Husak, J.M. Storey, K.B. Storey, V.I. Lushchak. 2012. Nickel induces hyper glycemia and glycogenolysis and affects the antioxidant system in liver and white muscle of gold fish *Carassius auratus* L. Ecotox. Environ. Safe. 80 :231–237

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. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57 : 1692–1700

Lanno, R.P., B. Hicks et J.W. Hilton. 1987. Histological observations on intrahepatocytic copper-containing granules in rainbow trout reared on diets containing elevated levels of copper. Aquat. Toxicol. 10 : 251–263.

Lapointe, D. et P. Couture. 2009. Influence of the route of exposure on the accumulation and subcellular distribution of nickel and thallium in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). Arch Environ. Contam. Toxicol. 57 : 571–580

Lapointe, D et P. Couture. 2010. Accumulation and effects of nickel and thallium in early-life stages of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Ecotox. Environ. Safe. 73 : 572–578

Lapointe, D., S. Gentes, D. Ponton., L. Hare et P. Couture. 2009. Influence of prey type on nickel and thallium assimilation, subcellular distribution and effects in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). Environ. Sci. Technol. 43 : 8665–8670

Lapointe, D. 2009. Accumulation, répartition subcellulaire et effets du nickel et du thallium dissous ou d'origine alimentaire chez le tête-de-boule (*Pimephales promelas*). Thèse de doctorat. Institut national de la recherche scientifique. Québec, Canada. 172 p.
<http://espace.inrs.ca/1811/>

Lapointe D, F. Pierron et P. Couture. 2011. Individual and combined effects of heat stress and

aqueous or dietary copper exposure in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat.Toxicol.* 104 : 80-85.

Larsson, A., B-E. Bengtsson, et C. Haux. 1981. Disturbed ion balance in flounder, *Flatichthus flesus* L. exposed to sublethal levels of cadmium. *Aquat.toxicol.* 1 : 19-53

Larsson, A. et C. Haux. 1982. Altered carbohydrate metabolism in fish exposed to sublethal levels of cadmium. *J. Environ. Biol.* 3 : 71-81

Lavoie, M. 2008. Synthèse de peptides thiolés et distribution intracellulaire du cadmium chez deux algues vertes (*Chlamydomonas reinhardtii* et *Pseudokirchneriella subcapitata*). Mémoire de maîtrise. Institut national de la recherche scientifique. Québec. Canada. 249 p. <http://espace.inrs.ca/1828/>

Lavoie, M., C. Fortin et P.G.C. Campbell. 2012. Influence of essential elements on cadmium uptake and toxicity in a unicellular green alga: the protective effect of trace zinc and cobalt concentrations. *Environ. Toxicol.Chem.* 31 : 1445–1452.

Leblond V et A. Hontela. 1999. Effects of in vitro exposures to cadmium, mercury, zinc and 1-(2-Chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane on steroidogenesis by dispersed interrenal cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 157 : 16-22.

Leland, H. V. et S. J. Kuwabara. 1985. Trace metals. Dans Rand, G. M., et Petrocelli, S. R. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere, Washington 374-415

Levesque, H.M., I. Dorval, A. Hontela, G.J. Van Der Kraak, P.G.C. Campbell. 2003. Hormonal, morphological, and physiological responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to chronic environmental metal exposures. 1. *Toxicol. Environ. Health.* 66 : 657-676

Lide, D.R. 1992. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 73^e édition, CRC Press, Boca Raton, FL. 2660 p.

Limaye, D.A. et Z.A. Shaikh. 1999. Cytotoxicity of cadmium and characteristics of its transport in cardiomyocytes. *Toxicol. Appl. Pharm.* 154 : 59–66.

Lyons-Alcántara, M., J.V. Tarazona, et C. Mothersill. 1996. The differential effects of cadmium exposure on the growth and survival of primary and established cells from fish and mammals. *Cell Biol. Toxicol.* 12 : 29-38.

Luoma, S.N. et P.S. Rainbow. 2008. *Metal contamination in aquatic environments: science and lateral management*. Cambridge University Press, 573 p.

Maloney, F. 2007. Influence de paramètres physico-chimiques (dureté, pH et présence d'un agent chélateur, l'EDTA) sur la réponse toxique au cadmium de l'algue verte d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata*. Mémoire de maîtrise. Institut national de la recherche scientifique. Québec. Canada. 138 p. <http://espace.inrs.ca/447/>

Martin-Garin, A. et O. Simon. 2004. Fiche radionucléide, Cadmium 109 et environnement. Direction de l'environnement et de l'intervention – service d'étude du comportement des radionucléides dans les écosystèmes. IRSN, Fontenay-aux-Roses. France. 14 p. <http://www.irsn.fr/FR/Larecherche/publications-documentation/fiches->

Mason, A.Z. et K.D. Jenkins. 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. Dans : Tessier, A. et D. Turner. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. J. Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 479-608.

Maxwell, P. et K. Salnikow. 2004. HIF-1 : an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biol. Ther.* 3 : 29–35.

Mircic, D., D. Blagojevic, V. Peric-Mataruga, L. Ilijin, M. Mrdakovic, M. Vlahovic, et J. Lazarevic. 2012. Cadmium effects on the fitness-related traits and antioxidative defense of *Lymantria dispar* L. larvae. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 : 209–218

Misra, M., R.E. Rodriguez et K.S. Kasprzak. 1990. Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicology.* 64: 1–17

Niyogi, S., P. Couture, G. Pyle, D.G. McDonald et C.M. Wood. 2004. Acute cadmium biotic ligand model characteristics of laboratory-reared and wild yellow perch (*Perca flavescens*) relative to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 61 : 942–953

Nriagu, J.O. 1980. Nickel in the environment. Wiley Interscience, New York. 833 p.

Nriagu, J.O. 1989. Assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature* 338 : 47-49

Olsson, P.E. et C. Haux. 1985. Alterations in hepatic metallothionein content in perch, *Perca fluviatilis*, environmentally exposed to cadmium. *Marine Environ. Res.* 17 : 181-183

O'Norris, D.O., S.B. Felt, D. Woodling et R.M. Dores. 1997. Immunocytochemical and histological differences in the interrenal axis of feral brown trout, *Salmo trutta*, in metal-contaminated waters. *Gen. Compar. Endocrin.* 108 : 343-351.

O'Norris, D.O., S. Donahue, K.M. Dores, L.K. Lee, T.A. Maldonado, T. Ruth et D. Woodling. 1999. Impaired adrenocortical response to stress by brown trout, *Salmo trutta*, living in metal-contaminated waters of the Eagle river, Colorado. *Gen. Compar. Endocrin.* 113 : 1-8.

Othmer, K. 2003. Encyclopedia of Chemical Technology. 3^{ème} éd. Wiley, New York. 1978-1984, 26 vol.

Palaniappan, PL. MR. et S. Karthikeyan. 2008. Bioaccumulation and depuration of chromium in the selected organs and whole body tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* individually and in binary solutions with nickel. *J. Environ. Sci.* 21 : 229–236

Pane, E.F., J.G. Richards, C.M. Wood. 2002. Acute waterborne nickel toxicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) occurs by a respiratory rather than ionoregulatory mechanism. *Aquat. Toxicol.* 63 : 65-82

Pane, E.F., A. Haque et C.M. Wood. 2004. Mechanistic analysis of acute, Ni-induced respiratory toxicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an exclusively branchial phenomenon. *Aquat. Toxicol.* 69 : 11–24

Pelletier D, J.D. Dutil, P. Blier et H. Guderley. 1994. Relation between growth rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*. J. Comp. Physiol. B-Biochem. Syst. Environ. Physiol. 164 : 179-190.

Perceval, O., Y. Couillard, B. Pinel-Alloul, E. Bonneris et P.G.C. Campbell. 2006. Long-term trends in accumulated metals (Cd, Cu and Zn) and metallothionein in bivalves from lakes within a smelter impacted area. Sci. Tot. Environ. 369 : 403-416

Pierron, F., V. Bourret, J. St-Cyr, P.G.C. Campbell, L. Bernatchez et P. Couture. 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

Pinot, F., S.E. Kreps, M. Bachelet, P. Hainaut, M. Bakonyi et B.S. Poila. 2000. Cadmium in the environment: sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers Reviews on Environ. Health.15 : 299-323

Prescott, M.L., J.P. Harley et D.A. Klein. 2003. Microbiologie. De Boeck, Bruxelles. 1137 p.

Pyle, G.G., P. Busby, C. Gauthier, J.W. Rajotte et P. Couture. 2008. Seasonal and regional variations in metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) a long two polymetallic gradients. II. Growth patterns, longevity, and condition. Hum. Ecol. Risk Assess. 14 : 126–145.

Pyle, G. et P. Couture. 2011. Nickel. Dans : Farrell, A. P., Wood, C. M., Brauner, C. J. (Éds.), Fish Physiology : Homeostasis and Toxicology of Essential Metals, Elsevier, Burlington. pp.253–289.

Rajotte J.W. et P. Couture. 2002. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 59 : 1296–1304

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

Ressources naturelles Canada. 2009. Annuaire des minéraux du Canada (AMC) – 2009 : Tableaux 1-7 – Production. [En ligne]
<http://www.rncan.gc.ca/mineraux-metaux/industrie-marches/annuaire-mineraux-canada/revue-2009/statistiques/3877> (Page consultée le 18 février 2013)

Ressources naturelles Canada. 2008. Annuaire des minéraux du Canada (AMC) – 2008 : Nickel. [En ligne]
<https://www.rncan.gc.ca/mines-materiaux/marches/annuaire-mineraux-canada/2008/revue-produits-mineraux/8535> (Page consultée le 24 mars 2014)

Ricard, A.C., C. Daniel, P. Anderson et A. Hontela. 1997. Effects of subchronic exposure to cadmium chloride on endocrine and metabolic functions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 34: 377-381.

Rodriguez, R.C., M. Misra, S.L. North et K. S. Kasprzak. 1991. Nickel-induced lipid peroxidation in the liver of different strains of mice and its relation to nickel effects on antioxidant systems. *Toxicol.Lett.*57 : 269–281

Roesijadi, G. et W.E. Robinson. 1994. Metal Regulation in Aquatic Animals: Mechanisms of Uptake, Accumulation and Release Dans: Malins, D.C. et G.K. Ostrander, *Aquatic toxicology: molecular, biochemical, and cellular perspectives*. Lewis, Boca Raton, FL., pp. 387-420

Salamin, N. 2012. Introduction au design expérimental, Partie I. Université de Lausanne. Suisse. 25p. http://www2.unil.ch/phylo/teaching/expdesign/lecture1_handout.pdf

Santé Canada. 1986. Le cadmium. [En ligne]
<http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/cadmium/index-fra.php#Generalites> (Page consultée le 18 février 2013)

Scott, W.B. et E.J. Crossman. 1973. *Freshwater Fishes of Canada*. Bulletin 184. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa. 966 p.

Shaibani, M.E., B.M. Amiri, S. Khodabandeh. 2013. Starvation and refeeding effects on pyloric caeca structure of Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*, Kessler 1877) juvenile. *Tissue Cell* 45 : 204– 210

Sherwood, G.D., I. Pazzia, A. Moeser, A. Hontela, and J.B. Rasmussen. 2002. Shifting gears: enzymatic evidence for the energetic advantage of switching diet in wild-living fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59 : 229-241

Shi, H., Y. Sui, X. Wang, Y. Luo et L. Ji. 2005. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 140 : 115–121

Sprague, J.B. 1985. Factors that modify toxicity. Dans : Rand, G.M. et S.R. Petrocelli, *Fundamentals of aquatic toxicology*. CRC Press, New York. pp.124-163.

Sreedevi, P., B. Sivaramakrishna, A. Suresh et K. Radhakrishnaiah. 1992. Effect of nickel on some aspects of protein metabolism in the gill and kidney of the freshwater fish, *Cyprinus carpio* L. *Environ.poll.*77 : 59-63

Staessen, A., J.P. Buchet, G. Ginocchio, R.R. Lauwerys, P. Lijnen, H. Roes et R. Fagard. 1996. Public health implications of environmental exposure to cadmium and lead: an overview of epidemiological studies in Belgium. Working groups. 1. *Cardiovasc. Risk.*3 : 26-41.

Stryer, L. 1988. *Biochemistry*. 3^e édition. W. H. Freeman company, New York. 1090 p.

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

USEPA. 2001. Update of ambient water quality criteria for cadmium. EPA-822-R-01-001. Washington, D.C. 166 p.

Verriopoulos, G. et S. Dimas. 1988. Combined toxicity of copper, cadmium, zinc, lead, nickel,

and chrome to the copepod *Tisbe holothuriae*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 41 : 378-384

Wallace, W.G., B-G. Lee et S.N. Luoma. 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). Mar. Ecol. Prog. Ser. 249 :183–197.

Weis, P., J.D. Bodgen et E.C. Enslee. 1986. Hg- and Cu-induced hepatocellular changes in the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. Environ. Health Perspect. 65 : 167–173.

Wicklund-Glynn, A., L. Norrgren et A. Mussener. 1994. Differences in uptake of inorganic mercury and cadmium in the gills of zebrafish, *Brachydanio rerio*. Aquat. Toxicol. 30 : 13–26.

Annexes

Annexe 1. Protocole de digestion à froid adapté de Borgmann et coll. (2001).

Annexe 2. Résultats supplémentaires

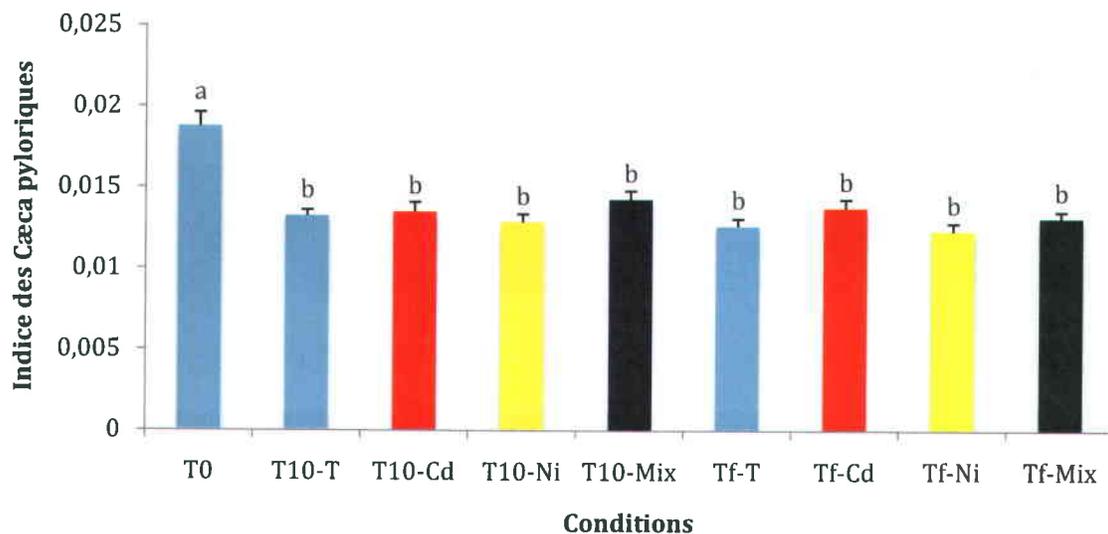


Figure A 1. Indice des cæca pyloriques pour les conditions d'exposition (voir fig. 12). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec de test de Wilcoxon. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=50$).

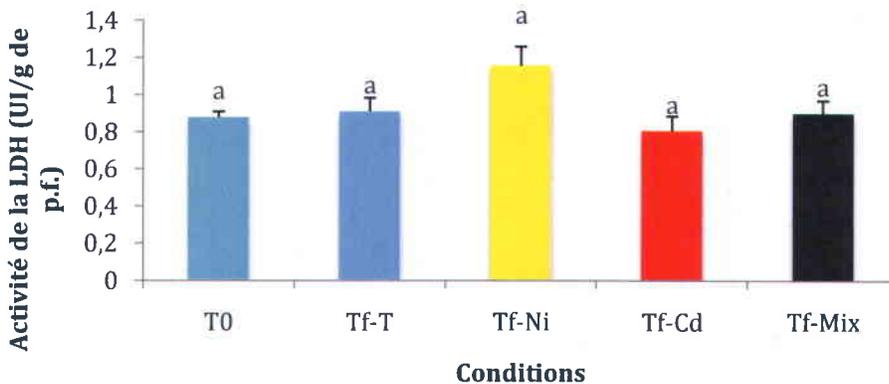
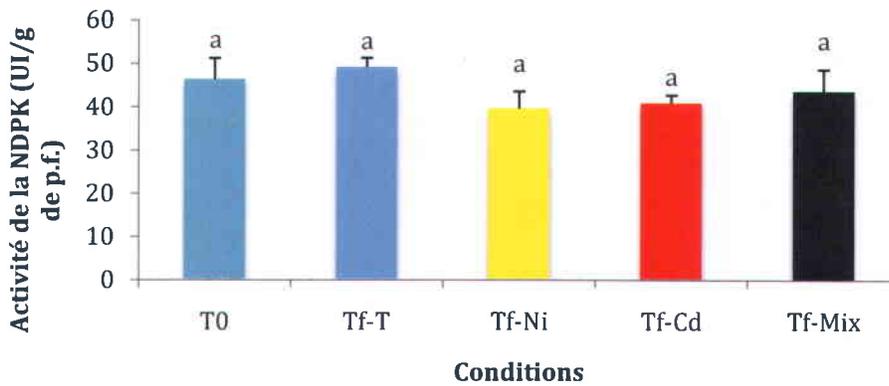
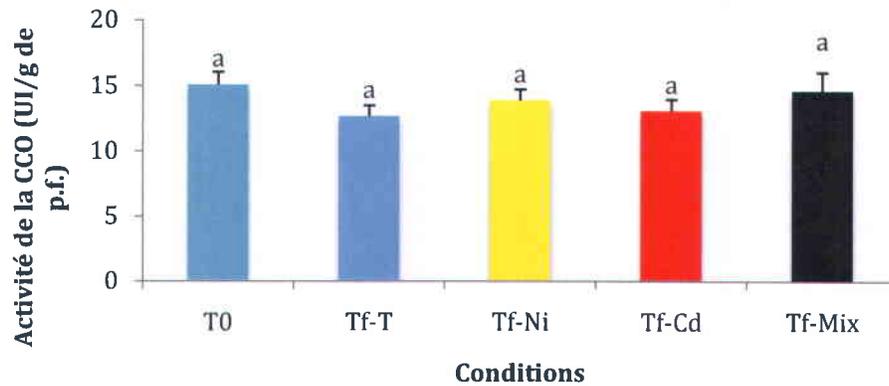


Figure A 2. Activité de la CCO (A), de la NDPK (B) et de la LDH (C; UI/g de p.f.) dans le foie en fonction des conditions d'exposition (temps zéro, temps final : témoin, nickel, cadmium et mélange). Comparaison des moyennes (+ erreur standard) avec le test de Tukey-Kramer. Les moyennes qui portent des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$, $n=8$).

Digestion

Adapté de Borgmann et al. 2001

Matériel

Vaisselle sans métaux traces

Acide nitrique sans métaux traces à 70%

Peroxyde d'hydrogène à 30% (aussi sans métaux traces)

Eau Milli-Q

Embouts de pipette de la 1000uL ou autre si nécessaire

Tubes Corning® 15 mL pré-identifiés allant à l'ICP-MS (volume final) si possible

Tubes plus gros pré-identifiés et bien gradués en cas où le précédent est impossible

Cylindre gradué en verre de 50 mL

Vortex

Préalable

Se référer aux proportions des volumes indiqués soit pour un échantillon biologique sec (dans Borgmann et al. 2001 c'est un amphipode), soit pour les sédiments secs. Préparer à l'avance un tableau de tous les volumes impliqués dans la méthode en référence à la masse sèche de chaque échantillon, l'imprimer et le coller dans le cahier de laboratoire. Par ailleurs, calibrer à l'avance les tubes utilisés pour le volume final total, au besoin.

Volumes pour échantillons biologiques secs

Échantillon Masse sèche (mg)	Acide nitrique HNO ₃ 70% (uL)	Peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂ 30% (uL)	Volume final total (mL)
1	25 100	20 40	1

Proportions

1000 : 25 : 20 : 1000

1 : 1/40 : 1/50 : 1

2 jours

1 jour

(Proposé par
L. Houe)

Volumes pour échantillons de sédiments secs

Échantillon Masse sèche (mg)	Acide nitrique HNO ₃ 70% (uL)	Peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂ 30% (uL)	Volume final total (mL)
20	500	400	10

Proportions

20 000 : 500 : 400 : 10 000

2 : 1/20 : 1/25 : 1

