

Institut national de la recherche scientifique
Centre Eau Terre Environnement
Université du Québec
Québec

**IMPACTS DU CUIVRE ET
DE LA RESTRICTION ALIMENTAIRE
CHEZ LE TÊTE-DE-BOULE**

Par
AUDREY MOFFETT

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
Maître ès sciences (M.Sc)
en sciences de l'eau
Juillet 2012

Directeur de recherche

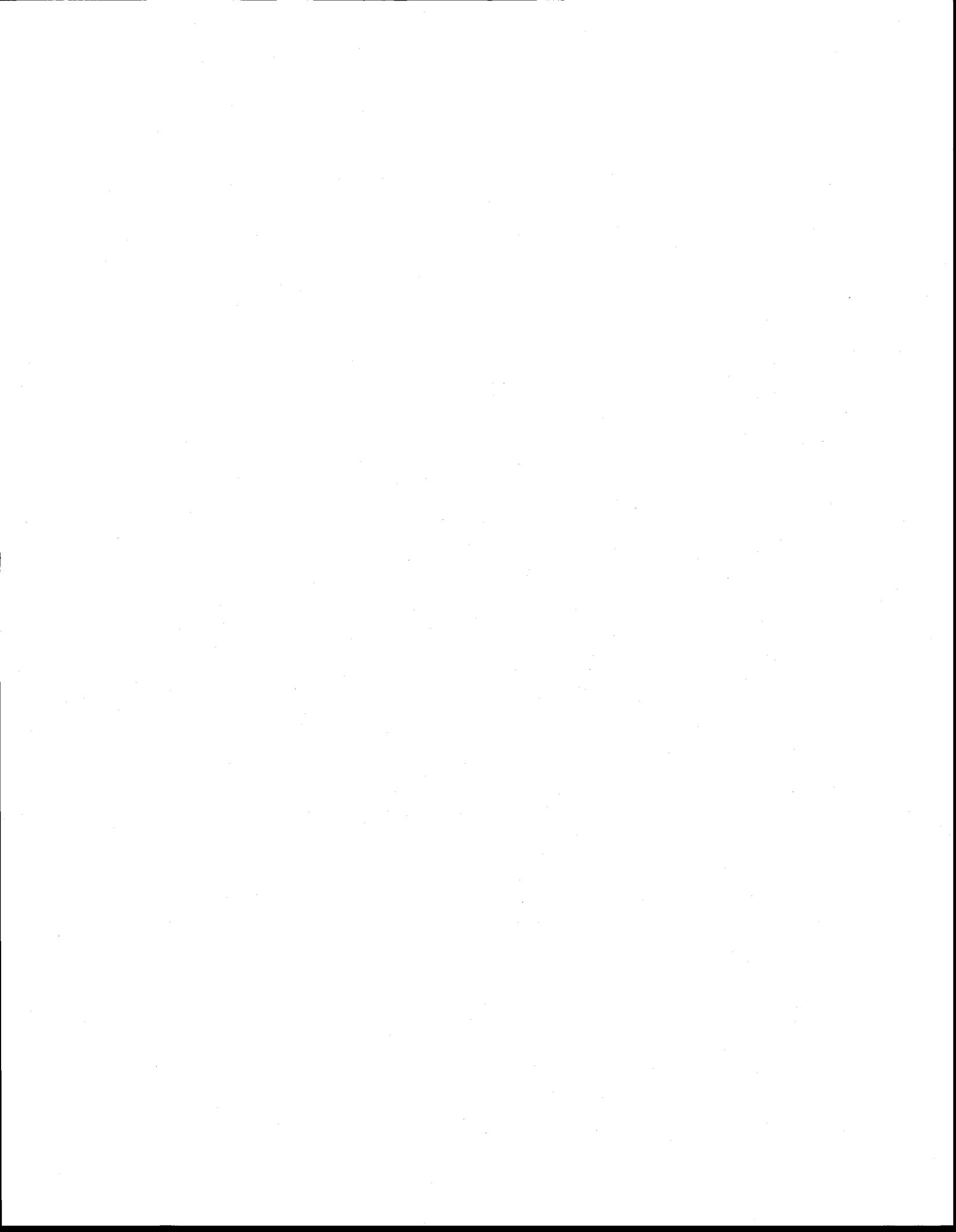
Patrice Couture
INRS-ETE

Examineur interne

Landis Hare
INRS-ETE

Examinatrice externe

Mery L. Martínez-Garcia
Université Laurentienne



Résumé

Un champ de recherche grandissant en écotoxicologie est l'étude de la bioaccumulation et des effets liés à l'ingestion des métaux par la voie alimentaire, et non seulement par la voie aqueuse, chez les organismes aquatiques. Comme le cuivre présent dans le poisson provient généralement de son alimentation, les effets qui y sont associés sont encore peu documentés. Dans les écosystèmes aquatiques, maints facteurs biotiques et abiotiques tels que la productivité des milieux et la température varient au gré des saisons. L'accès à un régime alimentaire adéquat fluctue donc naturellement au cours du cycle vital des poissons et influence leur métabolisme. Les métaux, en plus des dépenses énergétiques qu'ils occasionnent lorsqu'ils sont absorbés en excès par les poissons, entraînent dans ces milieux contaminés une réduction de la diversité et de la disponibilité de leur nourriture. Ainsi, ce mémoire examine les conséquences simultanées de deux agents stressants, la restriction du régime alimentaire combinée à l'exposition au cuivre par l'ingestion d'une proie naturelle (*Lumbriculus variegatus*), sur les réserves énergétiques, le taux métabolique, les capacités métaboliques et la croissance du tête-de-boule (*Pimephales promelas*). De plus, grâce à une alimentation individualisée, il incorpore des informations sur la bioaccumulation du cuivre. Même si la croissance était défavorisée pour tous les poissons, la présence simultanée des deux types de stress a entraîné une altération supérieure de la croissance au cours de la phase initiale de l'exposition. La restriction alimentaire affectait rapidement et abondamment le métabolisme du tête-de-boule. Étonnamment, la variation du taux d'alimentation parmi les groupes ayant ingéré ou non des proies contaminées n'influait pas la bioaccumulation corporelle du cuivre, qui au final, était inférieure chez les groupes ayant ingéré des proies contaminées, et expliquée en partie par la charge journalière ingérée de cuivre. De surcroît, l'exposition au cuivre portait moins atteinte en fin d'exposition aux réserves énergétiques et aux capacités glycolytiques des tête-de-boules que l'absence de contamination de leur nourriture. Les différents patrons de bioaccumulation du cuivre suggèrent que l'épithélium du tube digestif protégeait les poissons qui ingéraient plus de proies contaminées et que les mécanismes d'homéostasie de ce métal essentiel variaient selon le temps d'exposition. Pour mieux cibler les effets potentiellement toxiques du cuivre provenant de la nourriture, les travaux futurs gagneraient à mieux définir le trajet du cuivre en examinant sa bioaccumulation dans le tube digestif, la bile et le foie séparément du reste du poisson selon une approche individuelle de l'alimentation.



Abstract

Ecotoxicological studies are increasingly interested in looking at metal-related effects and bioaccumulation in aquatic biota not only through water but also dietary pathways. Although copper in fish is mainly accumulated from their food, such dietary-related effects are still poorly documented. In freshwater ecosystems, many abiotic and biotic factors such as productivity and temperature fluctuate according to seasonal patterns. Accessibility to an adequate diet is therefore naturally varying throughout the life cycle of fish and influences its metabolism. In addition to energetic costs related to excessive metal absorption in fish from contaminated environments, metal contamination leads to decreasing food diversity and availability. Thus, this thesis examines simultaneous consequences of two stressor agents, restriction of feeding regime combined to dietary copper exposure by using a natural prey (*Lumbriculus variegatus*), on energy reserves, metabolic rate, metabolic capacities and growth of fathead minnow (*Pimephales promelas*). Moreover, this thesis incorporates information on copper bioaccumulation obtained from an individualized feeding experimental design. The simultaneous presence of two stressors during the initial exposure period has led to a greater impairment in fish growth even though all fish experienced growth reductions. Restriction of feeding regime rapidly led to an important impairment in fathead minnow metabolism. Surprisingly, variation in feeding rate did not influence copper bioaccumulation in fish body which was lower in fish fed contaminated prey and partly explained by daily copper ingested dose. Furthermore, under our experimental conditions of dietary restriction for all fish, those ingesting a contaminated prey displayed less decreases in energy reserves and glycolytic capacities than fish ingesting a non contaminated prey. Various patterns of copper bioaccumulation suggest that the digestive tract epithelium was protecting fish fed more contaminated prey and that homeostatic mechanisms of this essential metal varied with duration of exposure. Future studies would benefit from a better understanding of the potentially toxic effects of dietary copper in fish by examining bioaccumulation in digestive tract, gallbladder and liver separately from the remaining carcass according to an individual feeding approach that would improve our knowledge of the routes of copper regulation.

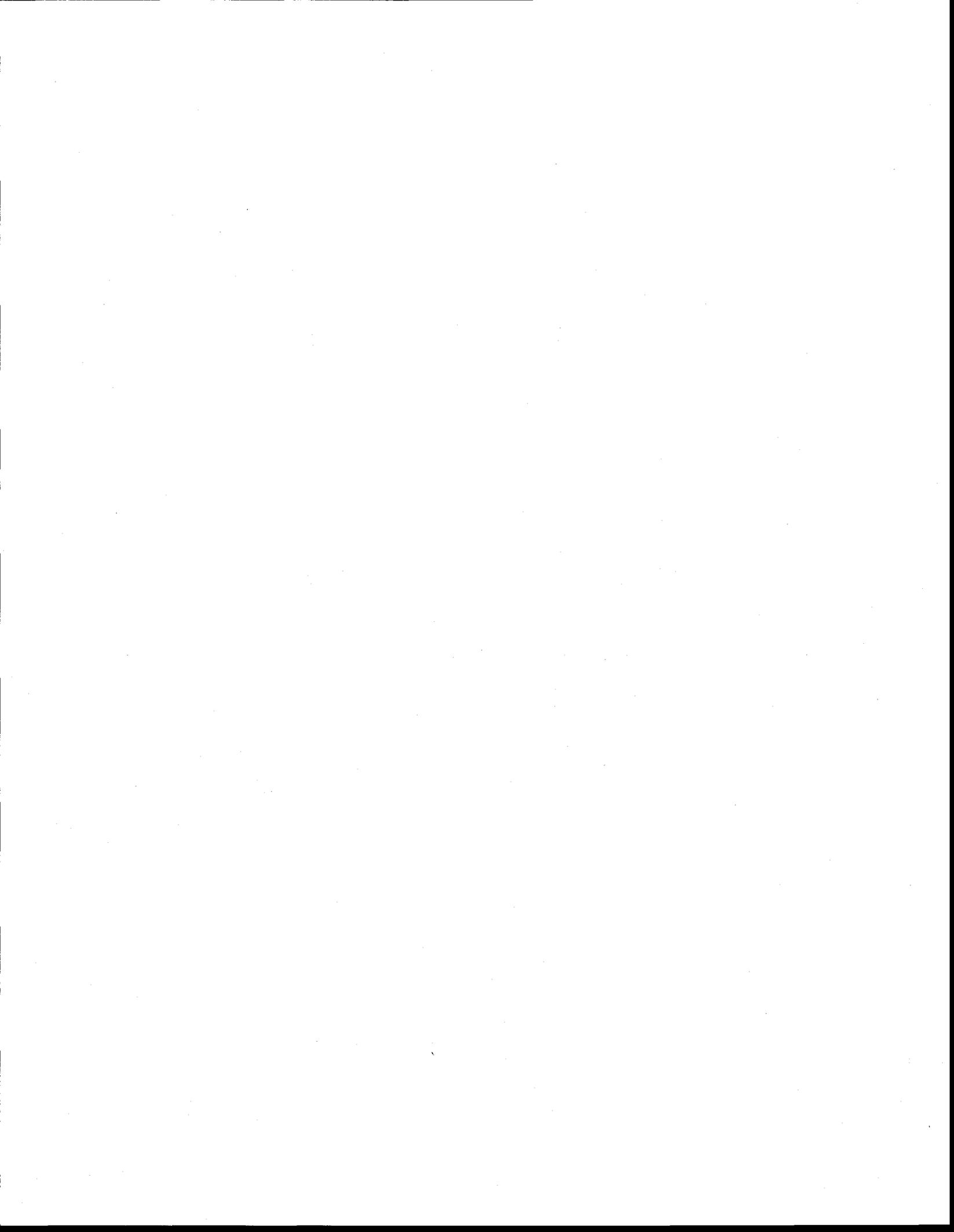


Avant-propos

Voilà maintenant presque quatre ans que je me suis aventurée dans cette tumultueuse ascension dans le monde de la recherche scientifique. Ponctuée de défis, de craintes, de joies et de réussites, j'ai sans nul doute persévéré dans ce chemin cahoteux en étant entraînée par la passion que je portais depuis toujours, mais qui s'est finalement révélée dans mon intérêt soulevé par les sciences biologiques et environnementales. J'ai finalement retrouvé ce regard parmi d'autres personnalités inspirantes qui m'ont donné envie d'emboîter le pas, en ce qui réside aujourd'hui, et avec soulagement, dans ce mémoire... Un ouvrage qui ne saurait représenter la valeur de l'expérience que j'ai acquise sur le plan personnel au cours de ce cheminement de carrière.

J'aimerais donc saluer l'entourage qui m'a épaulée et a contribué de près ou de loin à me supporter ou m'encourager. Mes parents, Marie Thibault et Jean Moffett, ma famille et mes proches, mes précieuses amitiés, entre autres Sébastien M., Stéphanie L.-G., Sébastien B., les gens que j'ai côtoyés depuis le CIRSA et le laboratoire de Helga G., l'équipe de l'INRS, mes collègues de laboratoire, de couloir et bureau, Iris K., de cafés et bières, de soirées spanglish, salsa et d'heureux voyages. Dominique L. et Charles G. pour vos conseils au labo, mes anciens et nouveaux collègues. Merci à David J. Páez, entre autres, pour la réalisation des analyses statistiques. Enfin, merci Charles pour ta présence dans les derniers milles. Il était plus que temps ; je n'aurais jamais pu me douter qu'à ce stade-ci j'aurais entamé le doctorat !

Le dernier et non le moindre, mon directeur Patrice Couture. Merci Patrice, tu m'as ouvert les portes de ton laboratoire avec enthousiasme et encouragements, sans quoi je n'aurais eu cette chance de progresser dans l'élaboration et la concrétisation d'un projet qui aurait autant pu susciter mon intérêt pour la science. Tu t'es montré inspirant, ouvert d'esprit, patient, et tu m'as offert une telle confiance ! Un appui m'ayant permis de clore ce chapitre, mais d'en commencer un nouveau. Je sais que nous serons longtemps en contact et j'espère que le meilleur reste à venir.



À tous ceux que j'ai

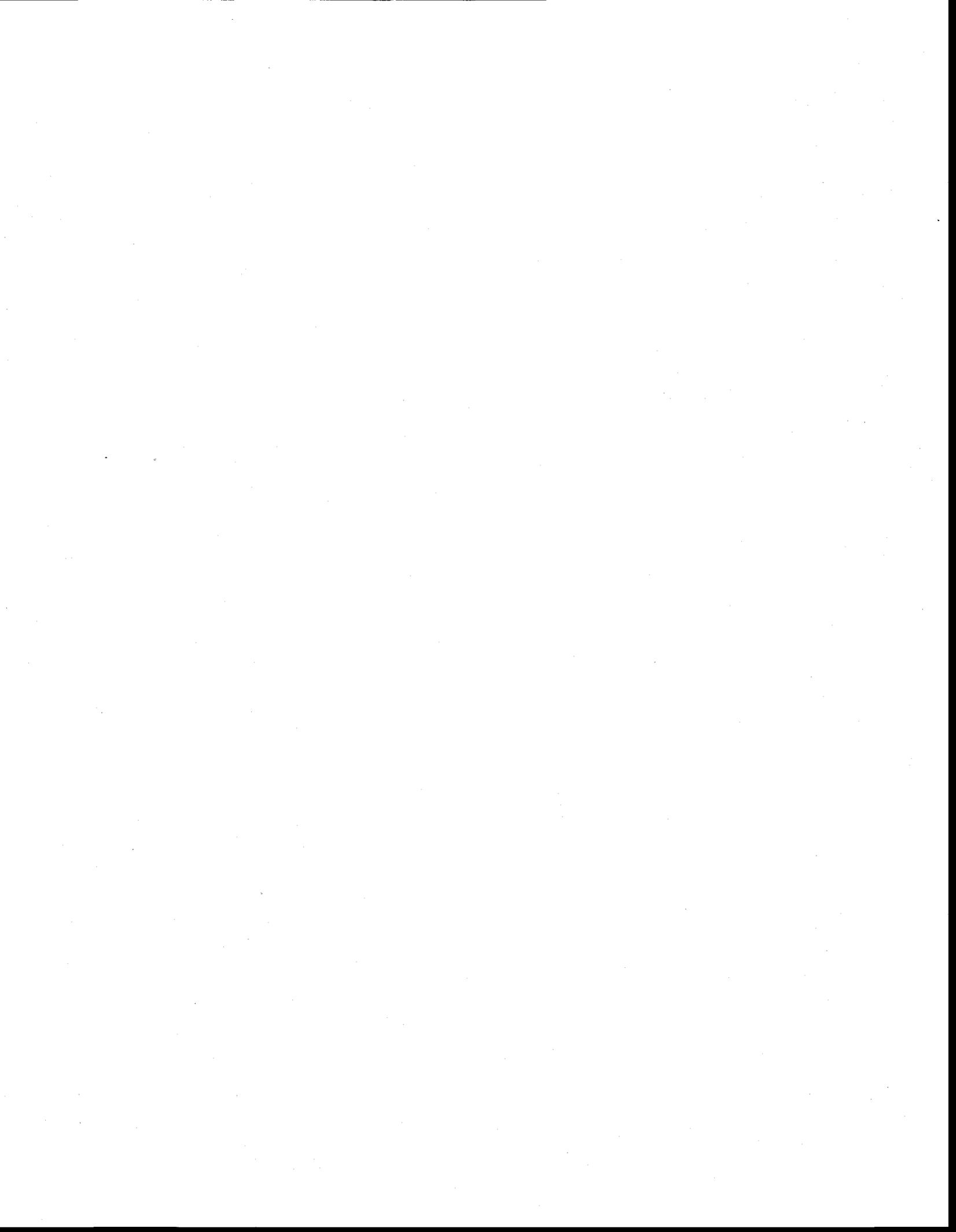


Table des matières

Résumé.....	iii
<i>Abstract</i>	v
Avant-propos.....	vii
Table des matières.....	xi
Liste des tableaux.....	xv
Liste des figures.....	xix
1. INTRODUCTION.....	1
1.1. Présentation générale.....	1
1.2. Le cuivre dans l'environnement.....	2
1.3. L'importance du cuivre alimentaire.....	3
1.4. Les impacts métaboliques du cuivre.....	8
1.5. Le métabolisme énergétique.....	13
1.6. Les voies métaboliques étudiées.....	14
1.7. Les modèles étudiés.....	17
1.8. Problématique et objectifs.....	18
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	21
2.1. Animaux expérimentaux.....	21
2.2. Exposition des proies.....	22
2.3. Design expérimental.....	26
2.4. Alimentation, Croissance, Échantillonnage.....	26
2.5. Taux métabolique de routine.....	27
2.6. Quantification des enzymes.....	28
2.7. Dosage du cuivre.....	32
2.8. Dosage des protéines, lipides et glucides.....	33

2.9. Paramètres calculés.....	35
2.9.1 Exposition alimentaire au cuivre.....	35
2.9.2 Bioaccumulation du cuivre.....	35
2.9.3 Statut énergétique.....	39
2.10. Analyse des données et statistiques.....	41
3. RÉSULTATS.....	43
3.1. Exposition alimentaire au cuivre.....	43
3.2. Bioaccumulation du cuivre.....	43
3.3. Statut énergétique.....	50
3.4. Voies métaboliques.....	56
4. DISCUSSION.....	61
4.1. Impact du taux d'alimentation.....	62
4.1.1. Statut énergétique.....	62
4.1.2. Voies métaboliques.....	64
4.1.3. Bioaccumulation du cuivre.....	68
4.2. Impact de l'exposition au cuivre.....	71
4.2.1. Statut énergétique.....	71
4.2.2. Voies métaboliques.....	74
4.2.3. Bioaccumulation du cuivre.....	75
4.3. Impacts combinés du cuivre et du régime alimentaire.....	78
4.3.1. Statut énergétique.....	78
4.3.2. Voies métaboliques.....	79
4.3.3. Bioaccumulation du cuivre.....	80
5. CONCLUSIONS.....	83
5.1. Résultats principaux.....	83
5.2. Implications.....	87
5.3. Perspectives.....	89
6. LISTE DES RÉFÉRENCES.....	93

7. ANNEXES	101
Annexe A : Statistiques sommaires du rendement alimentaire de charge du cuivre pour les poissons soumis à l'ingestion de proies contaminées au cuivre sous conditions expérimentales.....	103
Annexe B : Statistiques sommaires des tests ANOVA et de comparaisons multiples Tukey pour les variables expliquées du mémoire.....	105
B1. Bioaccumulation du cuivre.....	105
B1.1. Concentrations de cuivre dans le corps et la paroi du tube digestif.....	105
B1.2. Rendement alimentaire de charge du cuivre pour le corps.....	106
B1.3. Rendement alimentaire de charge du cuivre pour la paroi du tube digestif.....	107
B2. Statut énergétique.....	108
B2.1. Composition du corps, première partie : Protéines, lipides et glucides.....	108
B2.2. Composition du corps, deuxième partie : Eau, réserves et TMR.....	109
B2.3. Croissance, première partie : Masses et indices d'embonpoint.....	110
B2.4. Croissance, deuxième partie : Efficacités de conversion de la nourriture, taux de croissance spécifiques à la masse et taux de croissance spécifiques à la longueur.....	111
B3. Voies métaboliques.....	112
B3.1. Activité enzymatique, première partie : PK, LDH et HOAD.....	112
B3.2. Activité enzymatique, deuxième partie : CS, CCO et NDPK.....	113
B3.3. Activité enzymatique, troisième partie : SODT, SODM et SODCE.....	114
B3.4. Activité enzymatique, quatrième partie : CAT et GST.....	115
B3.5. Activité spécifique des enzymes, première partie : PK, LDH et HOAD.....	116
B3.6. Activité spécifique des enzymes, deuxième partie : CS, CCO et NDPK.....	117
B3.7. Activité spécifique des enzymes, troisième partie : SODT, SODM et SODCE.....	118
B3.8. Activité spécifique des enzymes, quatrième partie : CAT et GST.....	119
Annexe C : Statistiques sommaires des variables expliquées du mémoire pour les poissons du groupe témoin initial de l'expérience.....	121



Liste des tableaux

Tableau 3.1 Statistiques sommaires de l'alimentation des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours

Note : Les protéines, lipides, glucides et l'eau sont exprimés selon des unités en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tissus frais, les réserves disponibles en $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ tissus frais, le taux d'alimentation en $\%\cdot\text{jour}^{-1}$, la concentration de cuivre en $\mu\text{g Cu}\cdot\text{g}^{-1}$ tissus sec de proie, et la charge journalière ingérée de cuivre en $\mu\text{g Cu}\cdot\text{g}^{-1}$ poisson frais $\cdot\text{jour}^{-1}$. Les 4 traitements découlant de la combinaison des facteurs expérimentaux sont énumérés ci-après : 1%*nourriture propre (1P), 1%*nourriture contaminée au cuivre (1Cu), 5%*nourriture propre (5P), 5%*nourriture contaminée au cuivre (5Cu). Les données présentées dans le tableau suivent cette séquence : moyenne \pm écart-type (n) 44

Tableau 3.2 Statistiques sommaires des concentrations de cuivre mesurées dans le corps (sans le tube digestif) ainsi que dans la paroi du tube digestif des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours

Note : La concentration de cuivre est exprimée selon des unités en $\mu\text{g Cu}\cdot\text{g}^{-1}$ tissus sec. Les 4 traitements découlant de la combinaison des facteurs expérimentaux sont énumérés ci-après : 1%*nourriture propre (1P), 1%*nourriture contaminée au cuivre (1Cu), 5%*nourriture propre (5P), 5%*nourriture contaminée au cuivre (5Cu). Les données présentées dans le tableau suivent cette séquence : moyenne \pm écart-type (n). Les résultats statistiques (Effets significatifs) proviennent des tests ANOVA effectués selon le facteur d'alimentation (taux d'alimentation; TA), le facteur d'exposition (présence ou absence de contamination des proies ingérées ; Cu) et selon l'interaction des 2 facteurs expérimentaux (TA*Cu). Tous les effets présentés sont significatifs ($p<0,05$), et les lettres indiquent les différences significatives ($p<0,05$) issues des tests de comparaisons multiples Tukey (entre les 4 traitements).... 45

Tableau 3.3 Statistiques sommaires de la composition du corps (sans le tube digestif) et du taux métabolique de routine des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (statut énergétique)‡

Note : Les protéines, lipides, glucides et l'eau sont exprimés selon des unités en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tissus frais, les réserves disponibles en $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ tissus frais, et le taux métabolique de routine (TMR) en $\text{mg O}_2\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Les 4 traitements découlant de la combinaison des facteurs expérimentaux sont énumérés ci-après : 1%*nourriture propre (1P), 1%*nourriture contaminée au cuivre (1Cu), 5%*nourriture propre (5P), 5%*nourriture contaminée au cuivre (5Cu). Les données présentées dans le tableau suivent cette séquence : moyenne \pm écart-type (n). Les résultats statistiques (Effets significatifs) proviennent des tests ANOVA effectués selon le facteur d'alimentation (taux d'alimentation ; TA), le facteur d'exposition (présence ou absence de contamination des proies ingérées ; Cu) et selon l'interaction des 2 facteurs expérimentaux (TA*Cu). Tous les effets présentés sont significatifs ($p<0,05$).
‡ Voir le tableau 3.4 pour les résultats de croissance..... 52

Tableau 3.4 Statistiques sommaires de la croissance des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (statut énergétique)

Note : La masse (M) est exprimée selon des unités en g, l'indice d'embonpoint (IE) n'a pas d'unité, et l'efficacité de conversion de la nourriture (ECN), le taux de croissance spécifique à la masse (TCSM) ainsi que le taux de croissance spécifique à la longueur (TCSL) sont exprimés en %·jour⁻¹. Les 4 traitements découlant de la combinaison des facteurs expérimentaux sont énumérés ci-après : 1%*nourriture propre (1P), 1%*nourriture contaminée au cuivre (1Cu), 5%*nourriture propre (5P), 5%*nourriture contaminée au cuivre (5Cu). Les 4 suivis ponctuels de croissance (M et IE) sont représentés par les chiffres 0, 16, 32 et 48 pour le nombre de jours auxquels les poissons ont été exposés à leur traitement, alors que les 3 intervalles de croissance (ECN, TCSM, TCSL) compris entre ces suivis sont représentés par les chiffres correspondant à la fin de chaque intervalle de 0 à 16 jours (16), 16 à 32 jours (32) ainsi que de 32 à 48 jours (48). Les données présentées dans le tableau suivent cette séquence : moyenne ± écart-type (n). Les résultats statistiques (Effets significatifs) proviennent des tests ANOVA effectués selon le facteur d'alimentation (taux d'alimentation ; TA), le facteur d'exposition (présence ou absence de contamination des proies ingérées ; Cu) et selon l'interaction des 2 facteurs expérimentaux (TA*Cu). Tous les effets présentés sont significatifs (p<0,05), et les lettres indiquent les différences significatives (p<0,05) issues des tests de comparaisons multiples Tukey (entre les 4 traitements)..... 53

Tableau 3.5 Statistiques sommaires de l'activité enzymatique des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (voies métaboliques)

Note : Activité enzymatique en UI·g⁻¹tissus frais de la pyruvate kinase (PK), lactate déshydrogénase (LDH), β-hydroxyacyl Co-A déshydrogénase (HOAD), citrate synthase (CS), cytochrome C oxydase (CCO), nucléotide diphosphate kinase (NDPK), superoxyde dismutase totale (SODT), mitochondriale (SODM) et cytosolique & extracellulaire (SODCE), catalase (CAT), et glutathion S-transférase (GST). Les 4 traitements découlant de la combinaison des facteurs expérimentaux sont énumérés ci-après : 1%*nourriture propre (1P), 1%*nourriture contaminée au cuivre (1Cu), 5%*nourriture propre (5P), 5%*nourriture contaminée au cuivre (5Cu). Les données présentées dans le tableau suivent cette séquence : moyenne ± écart-type (n). Les résultats statistiques (Effets significatifs) proviennent des tests ANOVA effectués selon le facteur d'alimentation (taux d'alimentation ; TA), le facteur d'exposition (présence ou absence de contamination des proies ingérées ; Cu) et selon l'interaction des 2 facteurs expérimentaux (TA*Cu). Tous les effets présentés sont significatifs (p<0,05)..... 58

Tableau 3.6 Statistiques sommaires de l'activité spécifique des enzymes des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (voies métaboliques)

Note : Activité spécifique en UI·mg⁻¹protéines de la pyruvate kinase (PK), lactate déshydrogénase (LDH), β-hydroxyacyl Co-A déshydrogénase (HOAD), citrate synthase (CS), cytochrome C oxydase (CCO), nucléotide diphosphate kinase (NDPK), superoxyde dismutase totale (SODT), mitochondriale (SODM) et cytosolique & extracellulaire (SODCE), catalase (CAT), et glutathion S-transférase (GST). Les 4 traitements découlant de la combinaison des facteurs expérimentaux sont énumérés ci-après : 1%*nourriture propre (1P), 1%*nourriture contaminée au cuivre (1Cu), 5%*nourriture propre (5P), 5%*nourriture contaminée au cuivre (5Cu). Les données présentées dans le tableau suivent cette séquence : moyenne ± écart-type (n). Les résultats statistiques (Effets significatifs) proviennent des tests ANOVA effectués selon le facteur d'alimentation (taux d'alimentation ; TA), le facteur d'exposition (présence ou absence de contamination des proies ingérées ; Cu) et selon l'interaction des 2 facteurs expérimentaux (TA*Cu). Tous les effets présentés sont significatifs (p<0,05)..... 59



Liste des figures

- Figure 1.** Représentation simplifiée des voies métaboliques du catabolisme chez le poisson indiquant certaines des enzymes étudiées. En haut à droite, une cellule animale et le grossissement d'une mitochondrie. En bas à gauche, les voies métaboliques sont superposées à la mitochondrie. La glycolyse se produit à l'extérieur de la mitochondrie dans le cytosol et le cycle de Krebs se déroule dans la matrice mitochondriale. Au bas de l'image à droite, la plus grosse production d'ATP de la cellule est représentée à travers une coupe de la double membrane mitochondriale par la propulsion du flux de protons (H⁺) de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale. *Images modifiées et tirées de Villeneuve 2008, ©CCDMD*..... 15
- Figure 2.1** À gauche, juvéniles de tête-de-boule (*Pimephales promelas*) en période d'acclimatation en bassin commun avant l'expérience. À droite, tête-de-boules non soumis aux conditions expérimentales. Ils ont commencé à se différencier en mâle (haut) ou en femelle (bas). *Images de Audrey Moffett*..... 23
- Figure 2.2** Trois différentes représentations des vers oligochètes d'eau douce *Lumbriculus variegatus* dans un des bassins de culture (à gauche) ou tels que prélevés pour la période de pesée alimentaire quotidienne (au milieu et à droite). Ces vers n'ont pas été exposés au cuivre. *Images de Audrey Moffett*..... 23
- Figure 2.3** Concentrations en cuivre du contenu stomacal ([Cu] contenu stomacal) de perchaudes sauvages résidentes dans des lacs associés à deux gradients polymétalliques de régions géographiques distinctes canadiennes au cours de l'été, la première étant à Rouyn-Noranda au Québec (barres noires), la deuxième à Sudbury en Ontario (barres blanches). Le niveau de contamination globale (20 métaux) dans les deux régions est énuméré (abscisse) : référence (1,2), intermédiaire (3), et contaminé (4,5). Les barres d'erreur en y représentent les erreur-types des moyennes. Le nombre d'échantillons (n) se situe entre 7 et 32. Résultats non publiés ; G. Pyle, Lakehead University, On, Canada (la mise en contexte de l'étude est publiée dans Couture *et al.* 2008).... 25
- Figure 2.4** À gauche, les 10 aquariums du dispositif expérimental pour les poissons. Au milieu, représentation d'un aquarium fournissant 16 unités expérimentales bordées de filet. Les quatre traitements étaient disposés selon un design factoriel répété dans chaque aquarium. À droite, quelques unités accueillant les poissons expérimentaux. Chaque unité offrait 503 mL d'espace dans l'eau par poisson. *Images de Audrey Moffett*..... 25

Figure 3.1 Relation entre la concentration de cuivre mesurée dans les tissus corporels ([Cu] corps) et la charge journalière ingérée de cuivre (Cu *ingéré*) par les poissons après 32 ou 48 jours d'exposition, en A et B, respectivement. Relation entre la concentration de cuivre mesurée dans la paroi du tube digestif ([Cu] tube digestif) et la charge journalière ingérée de cuivre par les poissons après 32 ou 48 jours d'exposition, en C et D, respectivement. Les données ont été transformées en valeurs log et utilisées pour les tests de relation présentés. Nombre d'échantillons (n) : 55 (A et B), 41 (C) et 40 (D). Toutes les relations présentées sont significatives ($p < 0,05$). Les unités des données originales étaient exprimées en $\mu\text{g Cu}\cdot\text{g}^{-1}$ masse sèche pour les concentrations et en $\mu\text{g Cu}\cdot\text{g}^{-1}$ poisson frais $\cdot\text{jour}^{-1}$ pour la charge journalière ingérée de cuivre..... 48

Figure 3.2 Trois paramètres de rendement alimentaire de charge du cuivre déterminés pour les deux groupes de poissons ayant ingéré des proies contaminées pendant 32 ou 48 jours, selon les barres blanches et noires, respectivement. Différence d'accumulation du cuivre (DACu) dans le corps et la paroi du tube digestif, en A et B, respectivement. Différence de rendement alimentaire de charge du cuivre (DRACu) calculée pour le corps et la paroi du tube digestif, en C et D, respectivement. Bilan journalier de rendement alimentaire de charge du cuivre (BRACu) dans le corps et la paroi du tube digestif, en E et F, respectivement. Comme les paramètres soustraient la valeur moyenne du groupe témoin de même taux d'alimentation (voir la section 2.9), seulement deux traitements découlant de la combinaison des facteurs expérimentaux sont énumérés (abscisse) : 1%*nourriture contaminée au cuivre (1Cu) et 5%*nourriture contaminée au cuivre (5Cu). Nombre d'échantillons (n) selon la séquence (abscisse) : 10 et 15 (1Cu) ; 7 et 13 (5Cu). Les barres d'erreur en y représentent les erreur-types des moyennes. Les lettres indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) issues des tests ANOVA selon le facteur d'alimentation entre ces 2 traitements..... 49

1. INTRODUCTION

1.1 Présentation générale

Le cuivre est un élément de transition essentiel à la santé des organismes vivants. Il entre dans la composition de protéines et dans l'accomplissement d'étapes clés du métabolisme comme la respiration cellulaire (Linder & Hazegh-Azam 1996 ; Bury *et al.* 2003 ; Momčilović 2004). Les organismes aquatiques doivent combler leurs besoins de base en cuivre en équilibrant leur prise en charge journalière de cuivre, ayant pour origines simultanées la voie aqueuse et alimentaire, avec la gestion de la distribution corporelle de ce métal, sa détoxification et son excrétion (Kamunde *et al.* 2002b). La plupart des vertébrés ont cette capacité de maintenir l'homéostasie du cuivre en faisant moduler les différentes voies de régulation (Linder & Hazegh-Azam 1996), une caractéristique commune des poissons envers les métaux essentiels, à l'inverse des métaux non essentiels pour lesquels leur concentration corporelle a plutôt tendance à refléter le niveau de contamination du milieu (Luoma & Rainbow 2008). Lorsque cette capacité possiblement évolutive — étant donné la présence de molécules de transport homologues parmi les poissons téléostéens (Bury *et al.* 2003) — mais variant selon l'espèce considérée n'est pas outrepassée, la carence et la toxicité en cuivre devraient être évitées (Kamunde *et al.* 2002b ; Luoma & Rainbow 2008). Comme les poissons en phase rapide de croissance peuvent avoir des besoins de base plus élevés en cuivre (Clearwater *et al.* 2002), ils peuvent apparemment être plus sujets à une carence ou à la toxicité de celui-ci, mais cela serait aussi dû au fait qu'en cette phase de leur cycle de vie, les jeunes poissons ont une plus haute efficacité d'absorption couplée à l'immaturation de leur système d'excrétion (revu par Kamunde *et al.* 2002b).

Lorsqu'il parvient en excès jusqu'aux cellules, le cuivre peut se lier à des sites non appropriés et induire des effets néfastes (toxicité directe). Étant un métal de transition, le cuivre a une forte tendance à se complexer, à être impliqué dans la biosynthèse de macromolécules y compris celles dont il fait partie de leur composition, mais spécialement dans des processus exploitant des

réactions associées à son potentiel d'oxydo-réduction (oscillation entre l'état cuprique CuII et cupreux CuI de sa forme ionique libre, dépendamment de la physico-chimie de la cellule ou du milieu, et de la présence d'oxygène). Cette même instabilité, très utile à l'activité de la cellule, porte atteinte à son intégrité lorsque ce métal, présent en excès dans la cellule, initie la production de radicaux libres qui iront oxyder les lipides membranaires, et oxyder directement des sites cellulaires importants comme les groupements sulfurés des protéines (Linder & Hazegh-Azam 1996 ; Momčilović 2004 ; Stohns & Bagchi 1995).

L'émergence des activités humaines du XIV^e siècle a mené à l'intensification de la remise en circulation des minerais, et à la contamination polymétallique de certains écosystèmes aquatiques naturels. Pour le maillon supérieur d'un tel réseau trophique, en plus de la toxicité directe qu'ils peuvent induire, les métaux peuvent générer des effets dans la structure de ce réseau (toxicité indirecte), et entre autres nuire aux besoins nutritionnels d'organismes comme les poissons (Rasmussen *et al.* 2008). Le cuivre présent dans le poisson provient généralement de son alimentation (Kamunde *et al.* 2002a ; Kamunde *et al.* 2002b), mais les effets associés au cuivre d'origine alimentaire sont encore peu documentés (Clearwater *et al.* 2002 ; Bury *et al.* 2003 ; Luoma & Rainbow 2008).

1.2 Le cuivre dans l'environnement

Le cuivre est un métal abondamment trouvé dans l'air, les sols, l'eau et le vivant. Le transport à grande échelle des poussières atmosphériques de cuivre est la plus importante source naturelle émise dans l'environnement. Cette source totalise $12 \cdot 10^6$ t Cu \cdot an⁻¹. Au XIV^e siècle, les activités anthropiques ont intensifié la remise en circulation des minerais de cuivre (Flemming & Trevors 1989), qui localement en zones densément peuplées et industrielles, représentent des émissions atmosphériques dépassant les sources naturelles en atteignant $18 \cdot 10^6$ t Cu \cdot an⁻¹ (Puxbaum & Limbeck 2004). Les retombées d'émissions atmosphériques en métaux solubles de certaines

fonderies de cuivre à l'Est du Canada, tout en étant influencées par les conditions météorologiques locales, sont composées à 70 % de cuivre (selon les retombées sèches et aussi selon les retombées humides). Ces retombées poursuivent leur route jusqu'aux sols de surface, eaux lacustres et sédiments environnants jusqu'à des distances pouvant dépasser, à plusieurs reprises, la centaine de kilomètres (Environnement Canada 2001). Le cuivre est naturellement présent sous forme métallique solide et stable dans les gîtes minéraux (CuO) et se propage dans l'environnement via leur désagrégation. Les formes ioniques (CuI, CuII) ont un comportement plus instable lié à la nature du milieu d'occurrence (Puxbaum & Limbeck 2004). En effet, la spéciation du cuivre est réversible selon les caractéristiques du milieu (Campbell *et al.* 2006).

La spéciation du cuivre dans les milieux aquatiques (ion libre, hydroxo-complexe, complexes organique et inorganique) est inhérente à ses propriétés chimiques et grandement influencée par la physico-chimie de l'eau et des sédiments présents (pH, dureté, présence de matière organique, alcalinité, salinité, force ionique, minéraux, potentiel redox). L'ion de cuivre est facilement complexé, précipité ou adsorbé, il participe à des réactions d'oxydo-réduction et il se lie facilement à d'autres ligands. En eau douce, plus de la moitié du cuivre est liée à de la matière organique. Ainsi, peu ou pas d'ions de cuivre sont naturellement trouvés dans les milieux aquatiques ou dans les systèmes biologiques (Spear & Pierce 1980 ; Flemming & Trevors 1989 ; Linder & Hazegh-Azam 1996 ; Campbell & Couillard 2004).

1.3 L'importance du cuivre alimentaire

Selon une vision schématique de la prise en charge des métaux d'origine alimentaire, celle-ci dépend de trois facteurs : le taux d'alimentation, la concentration en métal de la proie, ainsi que l'efficacité d'assimilation du métal. Mais en réalité, une multitude de facteurs environnementaux, écologiques et biologiques influencent le taux de prise en charge d'un métal via la nourriture ingérée. À titre d'exemple, le besoin d'ingestion de nourriture d'un organisme aquatique

dépendra en partie de son taux métabolique, qui lui, peut varier en fonction de la température du milieu, mais aussi de la disponibilité de nourriture dans l'habitat, ainsi que de la qualité de la nourriture choisie. Dans le milieu naturel, la prise alimentaire des métaux dépend de l'importance relative de cette voie d'exposition par rapport à la voie aqueuse. Lorsque la voie alimentaire domine, la biodisponibilité du métal (cette fraction de métal assimilée dans les tissus de l'organisme-prédateur) peut être suivie par le biais de la mesure de l'efficacité d'assimilation du métal (la mesure quantitative la plus efficace de la biodisponibilité du métal par la nourriture). Cette dernière est influencée par la nature de la nourriture, les facteurs contrôlant la libération digestive du métal de la nourriture, la forme de métal libérée, et si cette forme peut être prise en charge par les cellules épithéliales du tube digestif de l'organisme-prédateur, une étape incontournable pour atteindre la circulation interne (Luoma & Rainbow 2008).

Contrairement à la croyance populaire, l'efficacité d'assimilation relative à la prise en charge du cuivre par la voie de l'eau, ou celle par la voie de l'alimentation, sont très similaires chez le poisson lorsque les doses quotidiennes (relatives à chacune des voies) sont comparées, plutôt que les concentrations respectives (Clearwater *et al.* 2002). Ces deux sources potentielles de prise en charge sont à considérer également (Luoma & Rainbow 2008). Plusieurs études ont amené des éléments de preuve montrant que la voie majeure de prise en charge du cuivre est la voie alimentaire lorsque la croissance des poissons est normale (revu par Bury *et al.* 2003). L'étude effectuée par Kamunde *et al.* (2002a, b) a montré que la voie majeure d'accumulation nouvelle du cuivre était celle de la nourriture préparée avec une concentration élevée en cuivre (pertinente dans l'environnement) lorsque le poisson en santé était en présence simultanée d'une eau contaminée pendant 50 jours en laboratoire. Les chercheurs étaient capables de suivre l'accumulation nouvelle de cuivre dans les différents groupes de poissons en utilisant un radionucléide de cuivre (^{64}Cu). Lorsque les doses journalières de cuivre des deux voies (aqueuse et alimentaire) sont toutes deux considérées et que la nourriture préparée ne fournit pas l'apport adéquat, le cuivre aqueux devient possiblement une source importante de cuivre pour palier à un apport de base alimentaire insuffisant (revu par Clearwater *et al.* 2002 et Bury *et al.* 2003).

Très peu d'auteurs se sont efforcés de rendre le contexte de leur expérience réaliste en étudiant l'effet alimentaire du cuivre chez le poisson par l'ingestion d'une proie vivante. L'étude de Mount *et al.* (2006) compare la santé de deux espèces de poissons en fonction de leur alimentation selon trois différents types de proies naturelles. La valeur nutritive de l'alimentation naturelle (versus artificielle) a été examinée dans une perspective de complémentarité aux études sur la voie d'exposition alimentaire aux métaux. Les auteurs de l'étude de Hansen *et al.* (2004) ont récolté des sédiments naturellement contaminés selon plusieurs métaux et les ont intégrés dans une étude où les poissons ingéraient une proie naturelle ayant biologiquement incorporé les contaminants provenant de ces sédiments. Finalement, les études de Woodward *et al.* (1995) et de Farag *et al.* (1994, 2000) ont utilisé des invertébrés récoltés sur le terrain dans un contexte étudiant l'exposition des poissons par la voie alimentaire via ces vecteurs naturels de contamination polymétallique.

Il manque manifestement d'études pour lesquelles les poissons seraient alimentés avec des proies naturelles (ayant déjà incorporé le cuivre dans leurs tissus), afin de pouvoir comparer la biodisponibilité du cuivre ingéré sous cette forme de celle obtenue d'après les nourritures artificiellement préparées, ou avec des proies récoltées dans les milieux contaminés (Clearwater *et al.* 2002). Par ailleurs, l'étude de Farag *et al.* (1994) a rapporté une réduction de croissance chez les poissons ayant été exposés via des proies naturelles à des concentrations métalliques typiquement inférieures à celles utilisées dans des études où la nourriture avait été artificiellement préparée (revu par Hansen *et al.* 2004). Devant la variabilité associée à différents types de proies naturellement contaminées selon plusieurs métaux (différents lieux d'origines, différents types de proies ingérées selon le poisson-prédateur et la contamination du lieu de récolte, différents types d'expositions liés à des mélanges de métaux variables), il devient difficile d'attribuer des liens de cause à effet attribuables à un métal en particulier lorsque par exemple une croissance réduite des poissons est observée dans les milieux contaminés (Mount *et al.* 2006). Jusqu'à présent, aucune étude ne semble avoir étudié les effets liés à la prise en charge spécifique du cuivre chez le poisson par l'ingestion de proies naturelles.

La physiologie digestive de la plupart des espèces de poissons est similaire à celle des mammifères (revu par Clearwater *et al.* 2002). La digestion survient dans l'environnement acide de l'estomac après quoi l'absorption des nutriments survient en majeure partie dans l'environnement alcalin de l'intestin. Ainsi, les différences entre les espèces de la physiologie de leur tube digestif contribuent à une variation aussi dans la biodisponibilité d'un métal par la nourriture ingérée, et sa possible toxicité.

Les mécanismes d'absorption intestinale du cuivre chez les poissons sont encore peu documentés. Une représentation de la prise en charge intestinale du cuivre et de son internalisation dans le corps des poissons a été réalisée à partir d'éléments de preuve déjà acquis chez les mammifères, et à partir d'études en cours chez les poissons (Handy 1996 ; Linder & Hazegh-Azam 1996 ; Bury *et al.* 2003). Des éléments de preuve appuient l'hypothèse que l'entrée apicale du cuivre dans l'épithélium intestinal soit un processus passif, et que l'étape limitant le taux de prise en charge du cuivre dans le corps via son entrée par l'intestin soit celle de l'extrusion de la membrane basolatérale intestinale vers la circulation interne.

Selon la représentation hypothétique des voies de prise en charge du cuivre chez les poissons (Bury *et al.* 2003), l'arrivée du cuivre dans la lumière intestinale se ferait soit sous une forme liée à un ligand, soit sous forme ionique libre CuII, mais son entrée du côté apical de la cellule intestinale se déroulerait via un transporteur sous sa forme ionique CuI. Par la suite, les métallochaperones se lieraient avec le CuI et le guideraient à l'appareil de Golgi, où il y entrerait via un transporteur CuI-ATPase, puis serait incorporé dans des protéines de séquestration des métaux à l'intérieur de l'appareil de Golgi. Les vésicules golgiennes le déplaceraient alors jusqu'à la membrane basolatérale de la cellule intestinale, là où il serait exporté de l'intestin soit via un symporteur Cu/Cl, soit via un autre transporteur ATPase.

Chez les mammifères et l'humain, le cuivre pénètre dans le liquide interstitiel et le plasma sanguin en étant lié à deux protéines, l'albumine et la transcupréine, alors qu'il circule dans le

système sanguin en route vers le foie. La majorité du cuivre lié est rapidement déposée dans le foie (et dans une moindre mesure les reins). Une fois dans les cellules, le trajet de sa distribution est encore mal connu (revu par Linder & Hazegh-Azam 1996). Lorsqu'il entre dans le foie et les reins, le cuivre nouvellement absorbé (les chercheurs ont pu suivre des radionucléides de cuivre) est incorporé dans plusieurs compartiments cellulaires, ce qui inclut des enzymes, des protéines sécrétées pour lesquelles il est essentiel, et pour ce qui est du foie, dans la bile (revu par Linder *et al.* 1998). Dans le foie, le cuivre est incorporé dans la céruloplasmine, puis, c'est sous cette forme qu'il est relâché dans le plasma pour être transporté jusqu'aux autres organes du corps. Dépendamment de la dose de cuivre reçue, une portion plus ou moins grande du cuivre sera directement transportée à la bile. Plus à de fortes doses, moins à de faibles doses, ce qui est important dans l'homéostasie du cuivre. Généralement, peu de cuivre semble être entreposé dans les tissus parce qu'il est relativement facilement absorbé et excrété. Lorsque la quantité de cuivre dans la bile est particulièrement élevée, la sécrétion biliaire est la plus importante voie d'excrétion du cuivre, une forme de sécrétion où le cuivre est moins sujet à la réabsorption que dans le cas des autres types de sécrétions gastrointestinales où il pourrait se trouver.

Encore chez les mammifères, la carence en cuivre est accompagnée par une anémie liée à une teneur anormale en hémoglobine (hypochrome) et à une taille anormalement petite des érythrocytes (microcytaire) ainsi qu'à l'absence de leur reconstitution (aplastique), associée à une insuffisance de régénérescence des globules blancs de type granulocyte (revu par Linder & Hazegh-Azam 1996). Elle s'accompagne par ailleurs de la diminution de la concentration plasmatique du fer lié à la transférine, et de l'accumulation de fer spécifique au foie tout en étant liée à l'augmentation de l'oxygénase dégradant l'hème (et libérant le fer). Des éléments de preuve suggèrent qu'en cas de carence en cuivre, la priorité est donnée aux provisions de cuivre des composantes cellulaires qui l'intègrent, plutôt qu'à celles qui sont liées l'excrétion du cuivre (revu par Linder *et al.* 1998), ce qui est en accord avec le fait que le cuivre est un micronutriment essentiel. Effectivement, des études réalisées chez les mammifères suggèrent que l'absorption relative du cuivre via la nourriture ingérée varie selon les besoins et serait une capacité

adaptative. Lorsque la faible ingestion alimentaire de cuivre perdure sur des jours et des semaines, le pourcentage absorbé de cuivre disponible s'accroît, et vice versa (revu par Linder & Hazegh-Azam 1996).

Une fois le cuivre lié entrant dans la circulation sanguine des poissons, le foie et la vésicule biliaire sont les premiers organes internes à accumuler de grandes concentrations en cuivre, suivis des branchies, du muscle, et des reins (revu par Clearwater *et al.* 2002). Le mucus de la lumière intestinale joue une part importante dans la protection des tissus intestinaux contre de grandes concentrations en cuivre. Il est une voie importante de l'excrétion du cuivre chez le poisson. Sinon, les deux voies majeures d'excrétion du cuivre d'origine alimentaire sont l'excrétion hépato-biliaire, et les fécès, quoique d'autres voies y contribuent aussi, tel que les branchies, les reins, et possiblement l'épiderme. Apparemment, si la présence du cuivre dans l'alimentation est excessive, et que la capacité de détoxification des cellules intestinales est suffisante, l'absorption du cuivre (dans la circulation interne) est contrecarrée par la séquestration par des métallothionéines du cuivre dans les cellules de l'épithélium intestinal (revu par Bury *et al.* 2003). Cette séquestration de cuivre (en cas de quantité excessive de cuivre à gérer) est potentiellement expulsée dans la lumière de l'intestin via la membrane apicale, puis excrétée dans les fécès, sans qu'il n'ait jamais été internalisé (revu par Bury *et al.* 2003 et Clearwater *et al.* 2002). Ainsi, l'intestin a probablement un rôle homéostatique dans le métabolisme du cuivre (Clearwater *et al.* 2002).

1.4 Les impacts métaboliques du cuivre

Lorsqu'il est en excès dans la cellule et que sa capacité de détoxification est insuffisante, le cuivre peut altérer la structure et la fonction de macromolécules en les oxydant directement (enzymes, ADN, lipides) ou en initiant la production de radicaux libres en présence d'oxygène (réactions de Fenton), qui eux iront oxyder les lipides membranaires. L'altération de la perméabilité des

membranes puis des concentrations d'ions majeurs s'ensuivent. En un mot, l'intégrité de la cellule est mise en jeu (revu dans Flemming & Trevors 1989 ; Stohns & Bagchi 1995 ; Linder & Hazegh-Azam 1996 ; Eisler 1998). L'action toxique du cuivre peut avoir lieu directement sur les composantes cellulaires, ou par l'induction de réponses face au stress occasionné. Dans les deux cas, les perturbations morphologique et physiologique de cette intégrité cellulaire est une conséquence de l'insuffisance des systèmes biochimiques (revu par Carvalho & Fernandes 2008).

D'un point de vue alimentaire, la première action toxique du cuivre chez les poissons serait en majorité la production de radicaux libres dans les tissus où il s'accumule (Bury *et al.* 2003). Peu d'information est connue sur les effets du cuivre alimentaire chez les poissons, son trajet interne et sa toxicité, mais lorsque le poisson est alimenté pour environ une semaine ou plus selon des concentrations élevées en cuivre, il s'accumule à de plus fortes concentrations dans les tissus intestinaux, le foie et la vésicule biliaire (bile), et à plus basses concentrations dans les branchies, le muscle et les reins (une revue détaillée des différentes études sur le cuivre alimentaire est disponible dans Clearwater *et al.* 2002).

Certaines études suggèrent que le cuivre inhiberait directement des enzymes respiratoires chez les mammifères, mais jusqu'à présent aucune étude n'a trouvé des éléments de preuve appuyant cette même hypothèse chez les poissons. Toutefois, des études de terrain dans la région de Sudbury ont démontré que la performance de nage aérobie (vitesse de nage critique) et la capacité enzymatique aérobie (citrate synthase) était altérée chez les perchaudes de milieux contaminés en métaux (Couture & Rajotte 2003). Dans un lac contaminé de la même région, l'altération de l'activité hépatique de la citrate synthase survenait l'été alors que la concentration hépatique en cuivre des perchaudes était plus grande, et, semblait liée, étant donné des concentrations plus élevées en cuivre dans leur contenu stomacal, ainsi qu'un accroissement de leur indice d'embonpoint, à l'augmentation de la prise en charge de cuivre pendant la saison de croissance (Audet & Couture 2003). Alors qu'en laboratoire le taux de consommation en oxygène de truites arc-en-ciel soumises à un effort de nage maximal était plus élevé après 2,5 mois d'exposition à 75

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en cuivre (McGeer *et al.* 2000), le taux de consommation en oxygène au repos de perchaudes chroniquement exposées aux métaux diminuait avec l'accroissement de leur concentration hépatique en cuivre (Couture & Kumar 2003). Chez ces perchaudes provenant de lacs naturels de Sudbury, les capacités anaérobie et biosynthétique de leur foie, suivies respectivement par la mesure de l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase et de la nucléotide diphosphate kinase, étaient plus élevées significativement que celles des perchaudes capturées dans les lacs de référence de la même région. Finalement, le taux de consommation en oxygène mitochondrial était inhibé de 78 à 100 % lorsque des mitochondries de poissons rouges étaient exposées en laboratoire à des concentrations équivalentes à celles typiquement mesurées dans le foie (entre 40 et 50 $\mu\text{g Cu}\cdot\text{g}^{-1}$ masse sèche) de perchaudes sauvages contaminées (Garceau *et al.* 2010). Les auteurs suggèrent que l'altération des capacités aérobies, fréquemment rapportée dans les travaux sur les poissons sauvages des milieux contaminés mettant en contexte cette étude, est au moins en partie due, d'après leurs résultats, à l'effet du cadmium ou du cuivre, bien que les mécanismes n'impliquent pas nécessairement l'inhibition directe de l'activité enzymatique.

Le déclenchement des effets toxiques dépend de la concentration du métal accumulé sous une forme métaboliquement disponible (Rainbow 2002). D'ailleurs, des études en milieu naturel contaminé ont montré que les perchaudes sauvages accumulaient du cuivre dans leurs mitochondries hépatiques (Giguère *et al.* 2006). L'altération des capacités aérobies pourrait affecter la quantité d'énergie disponible à d'autres processus comme la croissance. La réduction du taux de croissance de ces poissons est probablement en partie due à l'augmentation du taux de synthèse et de dégradation des protéines (Rajotte & Couture 2002). La production d'une protéine comme la métallothionéine (MT) est la première étape de détoxification observée suite à l'entrée du métal dans la cellule (Luoma & Rainbow 2008). Bien que le coût précis n'en soit pas connu, le maintien de la concentration de la MT séquestrant le cuivre en excès dans la cellule doit sûrement impliquer des dépenses énergétiques. Comme les protéines ont une durée de vie limitée,

l'effort investi dans le cycle de renouvellement entre la synthèse et la dégradation de la MT n'est pas visible dans le maintien de la concentration de cette protéine.

D'autres ligands importants comme le glutathion (antioxydant) offrent un support important pour contrer la toxicité des métaux. Par ailleurs, des mécanismes intracellulaires complémentaires au rôle de la métallothionéine (au moins certains isoformes) dans le maintien de la concentration intracellulaire en métal ont été « développés », au fil du temps, par le milieu cellulaire des espèces animales aquatiques, incluant la régulation de la prise en charge et de l'excrétion du métal, ainsi que la séquestration du métal dans des granules (revu par Campbell & Hare 2009). D'après une expérience réalisée avec le tête-de-boule exposé au cuivre par l'eau et par une proie naturelle (Lapointe *et al.* 2011), la réponse de transcription des gènes était plus importante dans le cas de la contamination par la nourriture, quantitativement, que par celle de l'eau. Les gènes concernés codaient pour des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique (cytochrome c oxydase, lactate déshydrogénase), la détoxification des métaux (MT) et la protection des protéines (hsp70). Par ailleurs, plus le cuivre s'accumulait dans le muscle de perchaudes sauvages récoltées en milieux contaminés, plus la capacité aérobie (cytochrome c oxydase) diminuait et la concentration en protéines totales augmentait, et plus les gènes codant pour la capacité aérobie (cytochrome c oxydase), les MTs et les protéines de protection hsp70 étaient exprimés fortement (Pierron *et al.* 2009).

Pour fournir la demande d'énergie nécessaire aux processus de détoxification et de réparation liée aux dommages suivant l'exposition des poissons au cuivre, le glycogène et le glucose sont mobilisés dans le foie (Carvalho & Fernandes 2008). Les voies métaboliques sont régulées de manière stricte afin de préserver l'état d'homéostasie de la cellule. Chez les poissons, la cascade glycolytique est contrôlée, selon la vision classique, par la régulation allostérique de quelques enzymes via différentes composantes servant à lier l'activité enzymatique à son état d'énergie cellulaire (revu par Brooks & Storey 1995). Une corrélation a été établie entre les changements de liaison particulière des enzymes glycolytiques de la cellule et les changements dans la

demande métabolique globale. Il semble donc probable que la prise en charge du cuivre en excès, sa régulation, et son excrétion, soient des activités physiologiques pouvant augmenter les coûts métaboliques du poisson, et que ces derniers soient reflétés dans la croissance du poisson.

Bien que les effets du cuivre sur certains aspects de la physiologie digestive des poissons soient subtils (altération de l'activité enzymatique, de la motilité du tube digestif, de la prise en charge des éléments nutritifs et de la commande neuronale de la digestion), et n'aient pas encore été pleinement examinés, ces derniers pourraient représenter une part importante des effets du cuivre alimentaire survenant chez les poissons présents dans les environnements aquatiques contaminés. Jusqu'à présent, le coût que doit avoir cette inhibition enzymatique spécifique à la digestion sur les capacités énergétiques globales de l'organisme n'a pas été éclairci. Du moins, l'altération de la digestion des poissons de ces milieux pourrait nuire à leur croissance (Clearwater *et al.* 2002). Il est aussi possible que le cuivre puisse affecter la digestion sans qu'il n'ait nécessairement été absorbé au préalable à travers le tube digestif des poissons (Clearwater *et al.* 2002), spécialement si ces derniers n'ont pas accès à un régime alimentaire adéquat en condition d'exposition chronique.

Il est difficile de discriminer les effets seulement dus au cuivre lorsque l'impact du cuivre alimentaire sur le métabolisme est étudié, étant donné que le taux d'alimentation des poissons est le plus souvent estimé dans les études de terrain, et que plusieurs métaux sont simultanément assimilés par l'eau et la nourriture (Campbell *et al.* 2003). La croissance chétive de la perchaude des milieux contaminés de l'Est du Canada reflète bien la complexité qu'est l'étude des effets alimentaires indirects liés à l'exposition polymétallique (revu par Campbell *et al.* 2006). Dans les milieux sains, l'alimentation de la jeune perchaude passera progressivement du zooplancton, aux macroinvertébrés, jusqu'aux petits poissons. Par contre, la réduction de la diversité de la taille et des espèces du régime alimentaire de la perchaude dans les milieux contaminés contribuerait à limiter la croissance du poisson (Sherwood *et al.* 2002). En terme de valeurs énergétiques, le régime alimentaire des perchaudes de ces lacs s'appauvrit en « bons » invertébrés (mollusques,

crustacés, éphémères), en étant remplacés par des taxons tolérants aux métaux, tels que les larves de chironomidés, de tricoptères, et les oligochètes (revu par Iles & Rasmussen 2005). Ces perchaudes sont donc parfois contraintes à consommer des macroinvertébrés très contaminés pendant toute leur vie (Rasmussen *et al.* 2008). En plus, de nombreux déplacements de chasse associés à de petites proies, versus de moins nombreux déplacements associés à de grandes proies, sont énergétiquement plus demandants (revu dans Iles & Rasmussen 2005). Effectivement, les perchaudes perçues comme les plus actives seraient les plus petites de ces lacs, mais elles vivraient aussi moins longtemps (Couture & Pyle 2008).

En fait, lorsque l'apport d'énergie de la nourriture ne suffit pas à rencontrer les besoins énergétiques, les réserves corporelles déjà acquises sont métabolisées et le poisson perd de la masse corporelle (Jobling 1994). Certes, on suppose que la quantité de nourriture ingérée doit sûrement influencer l'assimilation du cuivre (possiblement son accumulation ou ses effets) chez le poisson ainsi que les réponses métaboliques face à son exposition aux métaux (Couture & Kumar 2003 ; Campbell *et al.* 2003 ; Hashemi *et al.* 2007). Plusieurs auteurs ont attribué la réduction de la croissance des poissons à un « bilan énergétique négatif » (Rajotte & Couture 2002 ; Couture & Kumar 2003 ; Hansen *et al.* 2004 ; Rennie *et al.* 2005 ; Pyle *et al.* 2005 ; Rasmussen *et al.* 2008).

1.5 Le métabolisme énergétique

Une grande partie du budget énergétique d'un poisson est liée aux demandes métaboliques régulières (répartition entre les coûts minimaux de maintien, d'activités, et ceux relatifs à la digestion, l'absorption et la transformation de la nourriture). Le processus le plus énergiquement demandant du métabolisme est le cycle de renouvellement (entre la synthèse et la dégradation) des protéines et des lipides au niveau cellulaire, après quoi le transport ionique nécessite aussi une contribution importante d'énergie (activité ATPase). La biosynthèse des macromolécules

(protéines, ARN, ADN) représentant un ensemble de réactions consommant beaucoup d'énergie, elle est très sensible aux variations d'approvisionnement d'énergie de l'animal (Buttgereit & Brand 1995). Chez les mammifères, lorsque le taux de consommation d'oxygène au repos (une mesure indirecte de la capacité de production d'énergie de l'organisme) diminue de 30 %, la synthèse de ces composantes tissulaires diminue de 60 % (Buttgereit & Brand 1995). L'alimentation récente est la source d'énergie des poissons, elle influence donc leurs capacités métaboliques et cet ensemble de réactions sensibles. Devant la variation de la disponibilité et de la diversité de la nourriture en milieu naturel, la composition des tissus évolue constamment selon l'équilibre entre les gains et les coûts métaboliques occasionnés (Jobling 1994). Par conséquent, l'histoire d'alimentation détermine les éventuels investissements énergétiques dans la croissance des poissons. Les protéines, les lipides et les glucides ayant toutefois des valeurs énergétiques distinctes, la croissance n'informe pas sur la valeur énergétique associée à ce gain ou à cette possible perte de masse (taux de croissance). Ainsi, une étude sur la croissance des poissons devrait également caractériser la composition biochimique des tissus.

1.6 Les voies métaboliques étudiées

Les enzymes du catabolisme (figure 1) sont impliquées dans l'obtention de l'énergie (ATP) des composantes provenant de la nourriture (les protéines, les lipides et les glucides). Tout d'abord, la glycolyse est menée dans le cytosol de la cellule à partir du glucose, et dont le dernier intermédiaire est converti en pyruvate par la pyruvate kinase (PK), ce qui fournit à la fois une source d'ATP à la cellule. Ce type de production peut soudainement être amplifié lorsque la lactate déshydrogénase (LDH) convertit le pyruvate en lactate, par exemple pour favoriser les activités de performance musculaire rapide, ce qui régénère un carburant nécessaire à cette voie de production d'ATP de la glycolyse.

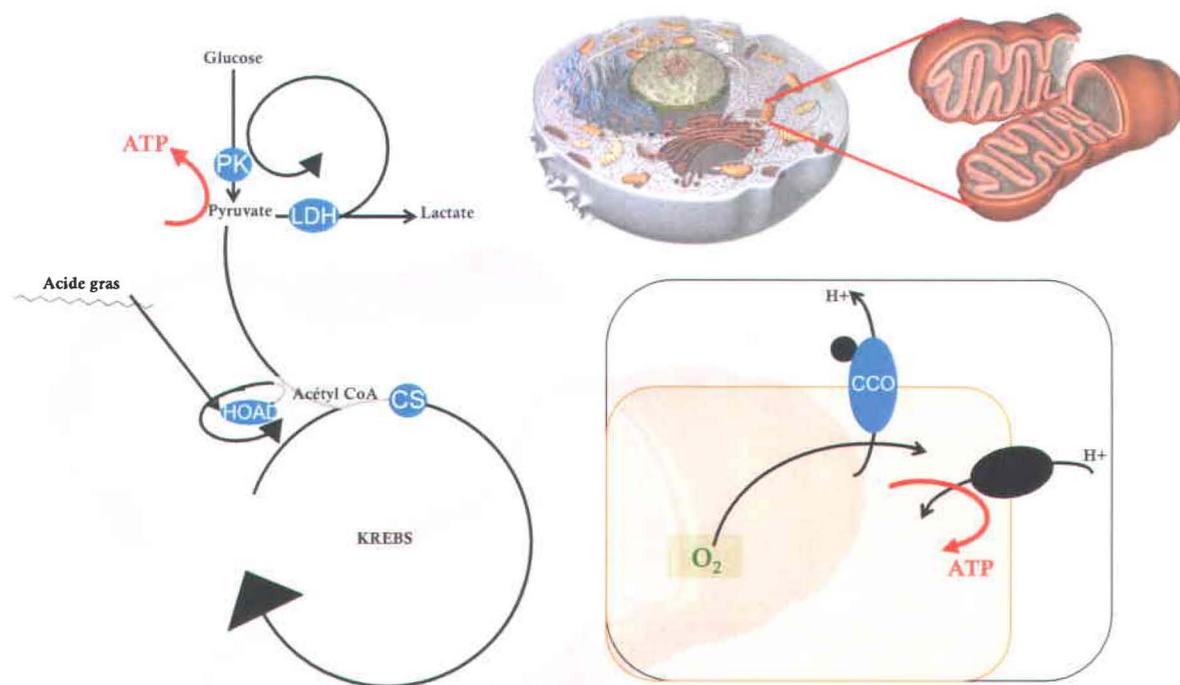


Figure 1. Représentation simplifiée des voies métaboliques du catabolisme chez le poisson indiquant certaines des enzymes étudiées. En haut à droite, une cellule animale et le grossissement d'une mitochondrie. En bas à gauche, les voies métaboliques sont superposées à la mitochondrie. La glycolyse se produit à l'extérieur de la mitochondrie dans le cytosol et le cycle de Krebs se déroule dans la matrice mitochondriale. Au bas de l'image à droite, la plus grosse production d'ATP de la cellule est représentée à travers une coupe de la double membrane mitochondriale par la propulsion du flux de protons (H^+) de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale. *Images modifiées et tirées de Villeneuve 2008, ©CCDMD.*

À son entrée dans la mitochondrie, le pyruvate est converti en acétyl coenzyme A (acétyl CoA). Suite à l'entrée des acides gras dans la mitochondrie, le β -hydroxyacyl coenzyme A déshydrogénase (HOAD) contribue aussi à la série d'étapes nécessaires et aboutissant à la production d'acétyl CoA. Par la suite, l'acétyl CoA entre dans le cycle de Krebs par sa transformation initiale en citrate avec la citrate synthase (CS). Finalement, grâce à (1)

l'accumulation de porteurs d'électrons acquis principalement au cours du cycle de Krebs, à (2) la présence de l'accepteur final d'électrons (l'oxygène), puis au (3) potentiel de protons créé dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie, le flux de protons peut revenir dans la matrice en contribuant à fabriquer la production d'ATP la plus rentable de la cellule. La cytochrome C oxydase (CCO) est une enzyme imbriquée dans la membrane interne de la mitochondrie, et qui utilise la présence d'oxygène pour participer de manière déterminante à ce potentiel inter-membranaire.

Plusieurs produits intermédiaires issus des voies précédentes sont aussi utilisés pour la biosynthèse de molécules dans l'anabolisme. Ces autres voies, à l'inverse, utilisent de l'énergie. Par exemple, la nucléotide diphosphate kinase (NDPK) est un indicateur de la biosynthèse des protéines dans la cellule.

Les cellules ont normalement recours à des protéines de défense contre le stress oxydant. Ce dernier peut être déclenché par des métaux, des substances étrangères toxiques même à faible dose (xénobiotiques), des substances causant naturellement la peroxydation lipidique, et un manque d'eau ou de nourriture (Pelletier *et al.* 2004). L'excès cellulaire de cuivre favorise la production de radicaux libres pouvant causer des dommages oxydatifs, que la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) transforment en molécules moins dangereuses, alors que d'une manière similaire et aussi aux côtés du glutathion, la glutathion S-transférase (GST) contribue à détoxiquer les composés dangereux ou étrangers. La SOD présente trois formes (chez l'humain), une dans le cytosol (CuZn-SOD), une dans les mitochondries (Mn-SOD), et une dans le fluide extracellulaire (CuZn-SOD). La catalase se situe dans les peroxysomes, les mitochondries et le cytosol des cellules. Enfin, la GST est une famille de protéines retrouvées dans le cytosol, les mitochondries, le cytosol, les microsomes et le fluide extracellulaire.

1.7 Les modèles étudiés

Le tête-de-boule *Pimephales promelas* Rafinesque (1820) est de la famille des cyprinidés (les ménés ou les carpes), la plus grande famille de poissons avec ses 275 genres et plus de 1500 espèces à travers le monde. Le tête-de-boule a une grande distribution en eaux douces à travers l'Amérique du Nord, du Canada au Mexique. Au Canada, sa distribution s'étend du Nouveau-Brunswick, à l'Est, jusqu'en Alberta, à l'Ouest (Scott & Crossman 1998). Il est aussi présent dans des régions industrielles contaminées (Pyle *et al.* 2005 ; Gauthier *et al.* 2006) communément étudiées pour la perchaude, un poisson modèle en écotoxicologie (Couture *et al.* 2008 ; Rasmussen *et al.* 2008). Quelques études sur les effets métaboliques du cuivre aqueux chez le tête-de-boule sont déjà répertoriées (Kolok *et al.* 2002 ; Pistole *et al.* 2008 ; Green *et al.* 2010), mais il semble n'exister qu'une seule étude examinant l'exposition au cuivre d'origine alimentaire chez cette espèce (Lapointe *et al.* 2011). Le tête-de-boule est depuis longtemps incorporé dans la gamme d'animaux de laboratoire utilisés dans les tests de toxicité, du moins depuis les années 1960 aux États-Unis (Environnement Canada 1992).

Le ver *Lumbriculus variegatus* Müller (1774) est de la famille des Lumbriculidés (oligochètes d'eau douce), et il est présent dans plusieurs cours d'eau et rivières d'Amérique du Nord, d'Europe et du Japon, quoi que d'après de récentes études les deux clades existant devraient plutôt être considérés comme deux espèces distinctes (Gustafsson *et al.* 2009). Ces vers sont facilement maintenus en laboratoire pour des fins d'études sur l'alimentation (revu dans Hansen *et al.* 2004). Ils présentent un bon nombre de qualités désirables en laboratoire ; ils sont facilement tenus en culture, donnés comme proies intactes et en vie, se reproduisent rapidement, sont tolérants à la contamination par l'eau, la nourriture ou par les deux, conservent facilement dans leurs tissus une dose reçue en xénobiotique, et ils peuvent en être dépurés dans l'eau en relativement peu de temps (revu dans Mount *et al.* 2006). Deux études ont montré que *L. variegatus* était une nourriture adéquate pour l'alimentation de jeunes poissons (Hansen *et al.* 2004 ; Mount *et al.* 2006).

1.8 Problématique et objectifs

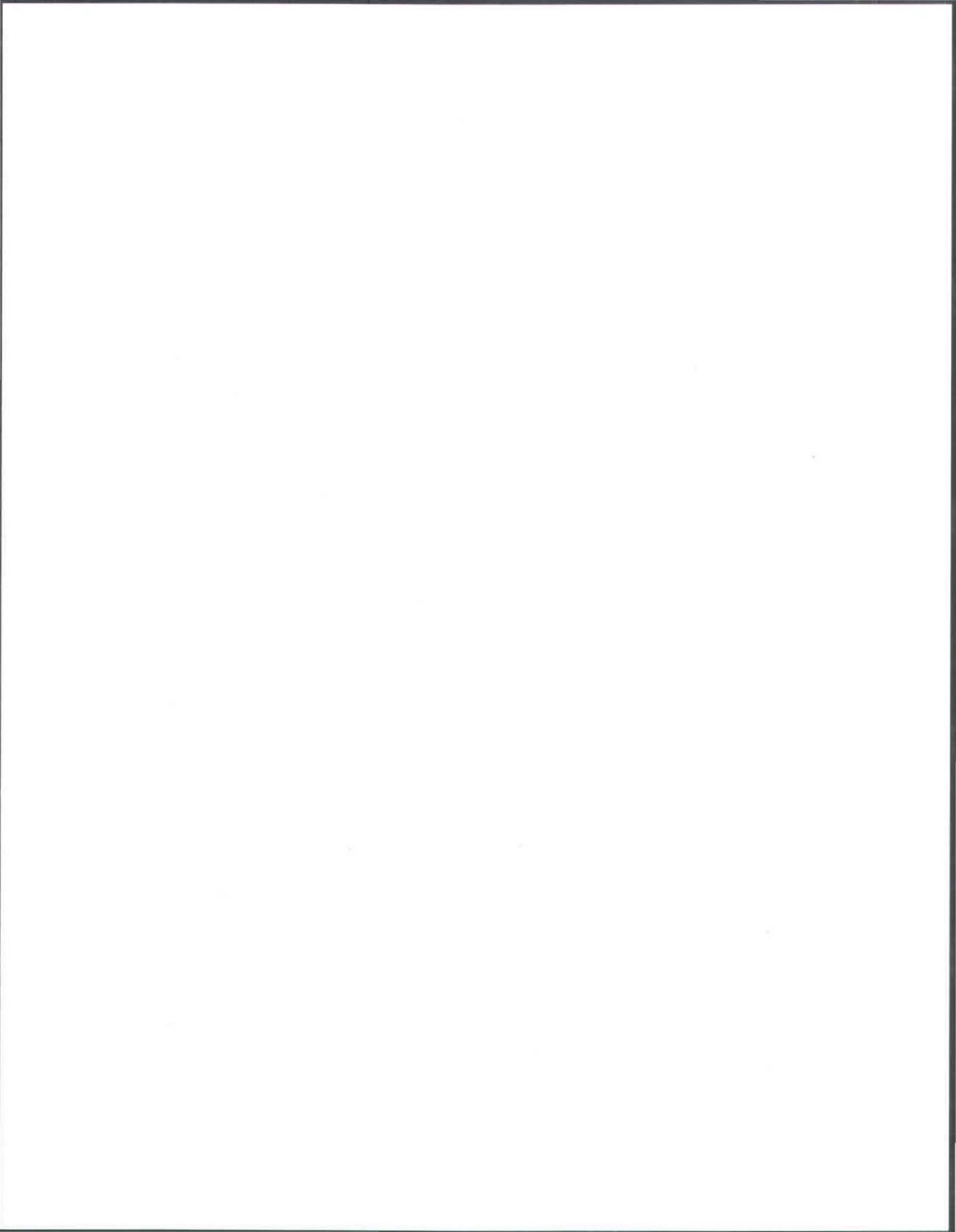
La source principale de cuivre accumulé par les poissons, dans les travaux qui intègrent la prise en charge de cuivre tout en considérant les voies d'exposition alimentaire et aqueuse à parts égales, s'est avérée être celle provenant de la nourriture ingérée (Kamunde *et al.* 2002a ; Kamunde *et al.* 2002b). Par contre, jusqu'à maintenant les études ont le plus souvent utilisé de la nourriture artificielle préparée et mélangée avec du cuivre inorganique afin de procéder à des expériences d'exposition (Baker *et al.* 1998 ; Handy *et al.* 1999 ; Campbell *et al.* 2002 ; Kamunde & Wood 2003 ; Shaw & Handy 2006 ; Hoyle *et al.* 2007). La concentration à laquelle le cuivre produit des effets, l'efficacité d'assimilation du cuivre, son accumulation et ses effets pourraient être différents de ceux induits à partir de l'ingestion d'une proie naturelle. Dans un contexte où un intérêt au sujet des effets métaboliques dus au cuivre est suscité, l'analyse des liens entre le cuivre d'origine alimentaire et la concentration trouvée dans les espèces aquatiques présentes dans les milieux modèles de lac contaminés — des sites où l'exposition est polymétallique — ne permet pas de dissocier l'effet dû au cuivre de l'effet associé au régime alimentaire, dont la quantité et la qualité de nourriture sont variables. Des études ont suggéré que les problèmes de croissance observés chez les poissons de ces milieux contaminés étaient liés aux dépenses énergétiques dues à la contamination (petites proies moins nutritives, gestion des contaminants en excès, augmentation de la locomotion pour s'alimenter), voire à l'effet direct ou indirect du cuivre dans le métabolisme aérobie (Rajotte & Couture 2002 ; Couture & Kumar 2003 ; Hansen *et al.* 2004 ; Rennie *et al.* 2005 ; Pyle *et al.* 2005 ; Rasmussen *et al.* 2008 ; McGeer *et al.* 2000 ; Audet & Couture 2003 ; Garceau *et al.* 2010). Jusqu'à maintenant, peu ou pas de travaux n'ont pu expliquer comment le cuivre, incorporé biologiquement dans une proie naturelle, parvient jusqu'aux tissus des poissons, et quel est le lien avec sa toxicité (Clearwater *et al.* 2000).

En sélectionnant une concentration en cuivre identifiée dans le contenu stomacal de poissons naturellement et chroniquement exposés dans leur habitat, et où le régime alimentaire est variable et appauvri chez certains poissons, mes hypothèses de départ étaient que le cuivre présent en excès dans un régime en proies naturelles puisse produire des effets mesurables liés à une augmentation des dépenses énergétiques, mais que ces derniers effets puissent provenir à la fois de l'effet additif de la variation du régime alimentaire, en particulier dans un contexte de restriction alimentaire, voire, provenir seulement de cette variation. Les variables choisies afin de vérifier ces hypothèses sont les réserves énergétiques, les capacités métaboliques et la croissance des poissons.

Mon objectif général était donc de mesurer les effets individuels et combinés de l'exposition au cuivre par l'ingestion d'une proie naturelle, et de la restriction alimentaire imposée, sur la bioaccumulation du cuivre et le métabolisme énergétique du tête-de-boule.

En examinant des juvéniles de tête-de-boule soumis, ou non, à l'exposition au cuivre d'origine alimentaire combinée à la restriction variable du taux d'alimentation, mon premier objectif était de quantifier le statut énergétique de ces poissons en (1) évaluant les réserves disponibles par la mesure des protéines, des lipides et des glucides, en (2) déterminant le taux métabolique de routine par la mesure de la consommation d'oxygène (concomitante à la production majeure d'ATP, donc une mesure indirecte de la capacité de production d'énergie), et en (3) suivant la croissance de la masse et la longueur.

Mon deuxième objectif était d'évaluer les effets métaboliques de ces deux contraintes en examinant certaines voies métaboliques principales, par la mesure de l'activité (1) d'enzymes du catabolisme (PK, LDH, HOAD, CS, CCO), (2) d'une enzyme de biosynthèse de l'anabolisme (NDPK), et (3) d'enzymes de défense antioxydante (SOD, CAT) et détoxiquante (GST).



2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Animaux expérimentaux

À leur arrivée de chez *Aquatic BioSystems Inc.* (Fort Collins, Colorado, É.-U.) en septembre 2009, les juvéniles de tête-de-boule (~3 mois ; ~0,15 g) ont été placés dans un bassin d'eau reconstituée (25,0 mg·L⁻¹ CaCl₂ ; 15,0 mg·L⁻¹ MgSO₄ ; 48,0 mg·L⁻¹ NaHCO₃ ; 2,0 mg·L⁻¹ KCl ; 0,5 mg·L⁻¹ NaBr ; 25,0 mg·L⁻¹ CaSO₄) de dureté nominale totale équivalant à 53 mg·L⁻¹ en CaCO₃ et dont la composition a progressivement été modifiée jusqu'à stabilité de la physico-chimie désirée pour l'expérience (66,2 mg·L⁻¹ CaCl₂ ; 39,8 mg·L⁻¹ MgSO₄ ; 127,1 mg·L⁻¹ NaHCO₃ ; 5,3mg·L⁻¹ KCl ; 1,4 mg·L⁻¹ NaBr ; 66,2 mg·L⁻¹ CaSO₄) selon une dureté nominale totale équivalant à 140 mg·L⁻¹ en CaCO₃, et un bruit de fond mesuré en cuivre inférieur à 1 µg·L⁻¹ pour tous les aquariums, et ce, avant l'expérience (n = 2), mais aussi pendant celle-ci (n = 8).

Tout au long de l'expérience (suivi quotidien des aquariums), la température de l'eau était maintenue à 20,5 °C (salle à température contrôlée), le pH à 7,6 ; ainsi que la photopériode naturelle de l'espèce à 8 heures d'éclairage de jour et 16 heures de nuit. Chaque aquarium offrait un système de circulation d'eau (45 L) en filtration continue (physique, chimique et biologique) où les poissons assignés à leur traitement expérimental disposaient, individuellement, et à titre d'unité expérimentale, de 503 mL (8 cm de diamètre × 10 cm de hauteur dans l'eau) bordés de filet (Hagen A-1368, Animalerie Dyno Vanier, Québec, Canada). Des tests faits avec des gouttes de colorant ont permis de déterminer la vitesse approximative de remplacement d'eau par unité à 362 L·jour⁻¹. En plus de l'oxygénation continue de l'eau, de sa filtration, ainsi que du suivi quotidien de la température, la qualité de l'eau était assurée tout au long de l'expérience, et pour tous les aquariums, par le suivi hebdomadaire de la concentration en oxygène, du pH et de la teneur en ammoniacque, et ce, au lendemain du nettoyage et du changement d'eau. Le même jour que le suivi des paramètres de la qualité de l'eau, des échantillons d'eau étaient prélevés pour le suivi de la concentration en cuivre de l'eau, une heure suivant l'alimentation des poissons. Une

fois acidifiés à 1 % (HNO₃), ces échantillons étaient conservés à 4 °C jusqu'au dosage du cuivre. Le dispositif et les conditions expérimentales ont été approuvées par le comité local de protection des animaux (protocole CIPA 0907-03). Avant l'expérience (figure 2.1), les juvéniles étaient nourris à satiété une fois par jour de proies vivantes *Lumbriculus variegatus*, alors que pendant l'expérience, ils étaient nourris exclusivement de cette proie selon un taux d'alimentation quotidien correspondant au traitement expérimental (voir à la section 2.3).

Ces vers provenant de chez *Aquatic Foods* (Fresno, Californie, É.-U.) ont minutieusement été triés à leur arrivée, afin d'éliminer la présence d'organismes nuisibles au maintien de la culture de vers, puis ont été conservés dans la même salle (figure 2.2), dans trois aquariums, et selon la même composition d'eau que pour l'expérience avec les poissons. La température de l'eau a été maintenue à 19,5 °C ; le pH à 7,7 ; et les aquariums étaient continuellement protégés de la lumière directe de même photopériode que pour le tête-de-boule. Tout au long de l'expérience, les vers ont été nourris une fois par semaine avec de la nourriture sèche microgranulée (Hagen A-6019, Animalerie Dyno Vanier, Québec, Canada). La qualité de l'eau était assurée par son oxygénation et une filtration légère en continu, par le suivi quotidien de la température, ainsi que par le suivi hebdomadaire de la concentration en oxygène, du pH et de la teneur en ammoniacque, et ce, au lendemain du changement d'eau (accompagné du nettoyage des parois de l'aquarium), soit deux jours après l'alimentation. Le même jour que le suivi des paramètres de la qualité de l'eau, des échantillons étaient prélevés pour le suivi de la concentration en cuivre de l'eau. Une fois acidifiés à 1 % (HNO₃), ces échantillons étaient conservés à 4 °C jusqu'au dosage du cuivre.

2.2 Exposition des proies

Afin d'assurer un approvisionnement quotidien en vers contaminés au cuivre pour l'exposition alimentaire des poissons attribués à ce type de régime (voir le tableau 3.1), le protocole de contamination, tel que publié dans Lapointe *et al.* (2011), était répété à chaque jour dans une série



Figure 2.1 À gauche, juvéniles de tête-de-boule (*Pimephales promelas*) en période d'acclimatation en bassin commun avant l'expérience. À droite, tête-de-boules non soumis aux conditions expérimentales. Ils ont commencé à se différencier en mâle (haut) ou en femelle (bas). Images de Audrey Moffett



Figure 2.2 Trois différentes représentations des vers oligochètes d'eau douce *Lumbriculus variegatus* dans un des bassins de culture (à gauche) ou tels que prélevés pour la période de pesée alimentaire quotidienne (au milieu et à droite). Ces vers n'ont pas été exposés au cuivre. Images de Audrey Moffett

de petits aquariums destinés exclusivement à ces étapes et individuellement oxygénés en continu. En résumé, ce protocole consistait à laisser acclimater des vers dans un aquarium d'eau propre pour une première journée. Les quatre jours suivants, les vers étaient placés dans une eau contaminée au cuivre à $100 \mu\text{g Cu}\cdot\text{L}^{-1}$ pour la contamination, alors que les quatre jours ultérieurs, ils étaient placés dans de l'eau propre pour leur période de dépuración de cuivre, et pouvaient être prélevés pour alimenter les poissons pendant les trois derniers jours de cette période de dépuración. Tout au long du protocole, les vers étaient à jeun, et l'eau propre ou contaminée de tous les bassins occupés était renouvelée chaque jour.

Ce protocole de contamination a été développé dans le but que la concentration ciblée en cuivre dans les vers demeure à l'état stationnaire, à $150 \mu\text{g Cu}\cdot\text{g}^{-1}$ tissu sec, et ce, pour les trois jours de prélèvement pour l'alimentation des poissons (Ahmed I., Lakehead University, données non publiées). Cette concentration cible est basée sur le contenu stomacal de poissons vivant en milieux contaminés (figure 2.3) ; une concentration pertinente dans l'environnement (Pyle *et al.* 2005 ; Couture *et al.* 2008 ; Rasmussen *et al.* 2008). Lors du développement de cette méthode, l'effet de la contamination des vers au cuivre aqueux avait été mesuré en suivant le taux de survie des vers ainsi que leur concentration en cuivre tout au long du protocole de contamination (Ahmed I., Lakehead University, données non publiées). Pour les différentes expositions au cuivre aqueux ayant été testées, la concentration utilisée dans le protocole de contamination de notre étude est la concentration la plus basse ($100 \mu\text{g Cu}\cdot\text{L}^{-1}$) pour laquelle un taux de survie de 100 % était observé chez *Lumbriculus variegatus*.

Un échantillon de vers était prélevé pour le suivi de la concentration en cuivre des vers contaminés à la fin de chaque pesée quotidienne destinée à l'alimentation des poissons, alors qu'un échantillon de chaque culture de vers non exposée au cuivre était prélevé deux fois par semaine (une fois au lendemain du changement d'eau, et l'autre au cours de la semaine). Tous ces échantillons ont été conservés dans des tubes propres à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ pour le dosage ultérieur de la concentration en cuivre.

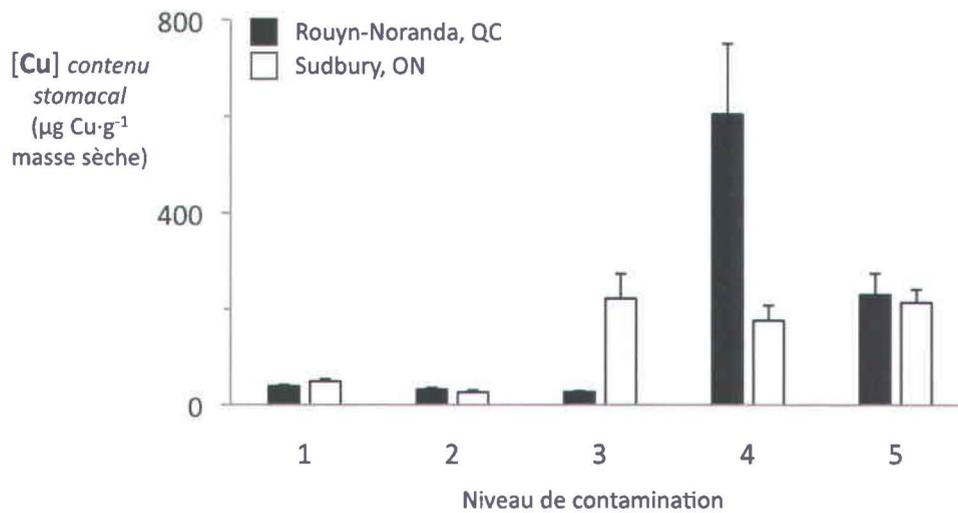


Figure 2.3 Concentrations en cuivre du contenu stomacal ([Cu] contenu stomacal) de perchaudes sauvages résidentes dans des lacs associés à deux gradients polymétalliques de régions géographiques distinctes canadiennes au cours de l'été, la première étant à Rouyn-Noranda au Québec (barres noires), la deuxième à Sudbury en Ontario (barres blanches). Le niveau de contamination globale (20 métaux) dans les deux régions est énuméré (abscisse) : référence (1,2), intermédiaire (3), et contaminé (4,5). Les barres d'erreur en y représentent les erreurs-types à la moyenne. Le nombre d'échantillons (n) se situe entre 7 et 32. Résultats non publiés ; G. Pyle, Lakehead University, On, Canada (la mise en contexte de l'étude est publiée dans Couture *et al.* 2008).



Figure 2.4 À gauche, les 10 aquariums du dispositif expérimental pour les poissons. Au milieu, représentation d'un aquarium fournissant 16 unités expérimentales bordées de filet. Les quatre traitements étaient disposés selon un design factoriel répété dans chaque aquarium. À droite, quelques unités accueillant les poissons expérimentaux. Chaque unité offrait 503 mL d'espace dans l'eau par poisson. Images de Audrey Moffett

2.3 Design expérimental

Les juvéniles (n=160) ont été assignés à un des traitements d'alimentation en proies contaminées (au cuivre ; Cu) ou en proies non contaminées (propres ; P), différant dans leur taux d'alimentation quotidien (1 ou 5% de la masse du poisson) selon un design factoriel répété. Tous les traitements possibles (n=4 ; 1P, 1Cu, 5P et 5Cu) ont été disposés selon une position aléatoire (n=16) à l'intérieur de chacun des aquariums expérimentaux (n=10), pour chaque temps d'échantillonnage prévu (n=2), et à deux reprises (deux traitements de même nature par temps d'échantillonnage). Comme une position correspondait à une unité expérimentale, s'il y avait un effet dû à l'environnement commun à ces 16 unités, il serait également réparti entre elles et entre les quatre traitements (figure 2.4). De plus, si jamais des différences étaient observées entre les traitements (sur la totalité des 10 aquariums) parmi les paramètres à l'étude et au terme de la période d'exposition (32 ou 48 jours), cela augmenterait d'autant plus notre confiance d'interprétation des résultats.

2.4 Alimentation, Croissance, Échantillonnage

Les besoins alimentaires quotidiens du tête-de-boule équivalent normalement, d'après une alimentation composée en majeure partie de jeunes artémies vivantes (nauplii) ou d'artémies congelées, à 1 à 5 % de la masse fraîche du poisson (Environnement Canada 1992). Le vers *Lumbriculus variegatus*, une proie ayant déjà été utilisée pour nourrir le tête-de-boule (Hansen *et al.* 2004 ; Mount *et al.* 2006), a été délivré une fois par jour (~13h00) aux poissons de cette étude selon une quantité équivalente à 1 ou 5 % de la masse du poisson. Afin de conserver le même pourcentage de masse de proies données en fonction de la masse du poisson, la quantité offerte de vers au cours de l'expérience a donc été ajustée aux 16 jours d'après la nouvelle masse du poisson. Par ailleurs, la quantité de proies données était toujours entièrement ingérée par tous les poissons.

Les données de croissance suivies à 0, 16, 32 et 48 jours sont la masse et la longueur (à la fourche) des poissons. Tout au long de l'expérience, les poissons ont été anesthésiés avec 70 mg·L⁻¹ d'eugénol (Sigma W246700, Canada) dans l'eau (la même que celle de l'expérience), une concentration adéquate pour le temps d'induction (1 à 1,5 minutes) comme celui du réveil (1 à 2,5 minutes) et qui permettait d'effectuer rapidement les manipulations. L'eugénol est le principal composé actif anesthésiant dans l'huile de clou de girofle et il semblait le meilleur choix d'anesthésique pour cette étude car il minimise les impacts physiologiques à court et long termes chez le tête-de-boule (Palić *et al.* 2006) par rapport aux autres composés homologués pour leur utilisation chez les poissons au Canada. La solution stock (119 g·L⁻¹) déposée dans le bassin d'eau était préparée selon une dilution 1/9 dans de l'éthanol (les deux produits étaient de qualité alimentaire). Au début de l'expérience en novembre 2009, alors que les poissons étaient assignés à leur unité expérimentale de traitement, la masse initiale des individus était de 0,46 ± 0,22 g (moyenne ± écart-type ; n=160) et elle était égale entre les traitements (tableau 3.4; excluant la mortalité ; au total, 31 poissons sont morts pendant la durée de l'expérience). L'échantillonnage des poissons a eu lieu au lendemain des 32 et 48 jours d'exposition à leur traitement (n=20 par traitement par temps d'échantillonnage ; n=160) et à la suite d'un jour de jeûne.

2.5 Taux métabolique de routine

Les poissons ont été soumis à la mesure de leur taux de consommation en oxygène à l'aide d'un respiromètre (Cameron Instrument Company OM 200, Guelph, Ontario, Canada), et ce, à raison de 15 poissons par traitement et par échantillonnage (après 32 et 48 jours d'exposition). Tout au long de ces étapes, le poisson était maintenu dans un dispositif à l'abri de stimuli externes tels que le bruit et la lumière. Ainsi, le poisson était déposé dans un petit béccher (4,2 cm de diamètre · 5,7 cm) rempli d'en moyenne 47,7 mL d'eau (la même que celle de l'expérience) pour une période d'acclimatation d'environ 30 minutes. Une fois le béccher hermétiquement fermé, l'électrode à oxygène (Loligo Systems ApS OX10700, Tjele, Danemark) enregistrait la

consommation en oxygène du poisson pour une période de 30 à 90 minutes. Au cours de cette étape, l'eau pouvait circuler en boucle (selon un débit continu de $3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) en étant entraînée dans un tube par l'action de la pompe péristaltique (Tube Tygon R-3603 ; Pompe Cole and Parmer Canada Inc. 7519-10, Montréal, Québec, Canada). La récolte des données et leur transmission à l'ordinateur depuis un appareil Vernier LabPro permettait alors de suivre l'évolution des données en temps réel à l'écran de l'ordinateur à partir du logiciel Logger Pro 3,2 (Qubit Systems, Kingston, Ontario, Canada). À la suite de ces manipulations, le poisson était sacrifié d'un coup porté à la tête, pesé et mesuré pour la longueur, puis rapidement déposé dans un tube cryogénique et préservé à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ pour les différentes mesures à effectuer ultérieurement en laboratoire.

2.6 Quantification des enzymes

Le jour d'un essai enzymatique, 12 poissons (part égale de chaque traitement ; temps d'échantillonnages confondus) sélectionnés au hasard étaient sortis du congélateur $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. À l'aide d'un microscope binoculaire, chaque poisson (fraîchement décongelé dans la glace) a soigneusement été disséqué sur glace pour la totalité du tube digestif, en préservant le plus possible le reste du poisson (d'éventuels bris pouvant être liés aux instruments) remis ensuite sur glace pour la préparation de l'homogénat de poisson. Dès la décongélation, les échantillons ont constamment été conservés sur glace. Le tube digestif a entièrement été vidé en comprimant son contenu vers les extrémités à l'aide du dos rond d'une aiguille courbe à dissection. Puis, une fois rincé trois secondes par agitation dans un bain d'eau ultra pure, le tube digestif était déposé dans un tube propre et conservé à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ pour le dosage ultérieur de la concentration en cuivre.

Le corps restant du poisson (dépourvu du tube digestif) était découpé sur glace, puis déposé dans un tube de culture $16 \times 100 \text{ mm}$ en polypropylène propre (le même que pour l'homogénéisation des tissus du corps) et pesé. À ce moment, neuf volumes de tampon d'homogénéisation à pH 7,5

(glacial) de composition 20 mM d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES, Sigma H3375, Canada), 1 mM d'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA, Sigma 03610, Canada) et 0,1 % d'éther de polyéthylèneglycol et de *tert*-octylphénol (Triton® X-100, Sigma 93418, Canada) ont été ajoutés pour obtenir une dilution 1/10 (m/v), et le tube bien agité. Le contenu de ces tubes a par la suite été homogénéisé trois fois (10 secondes, 24 000 tours/min, sur glace) intercalées de deux pauses (60 secondes, sur glace) à l'aide d'un homogénéiseur rotorstator (Janke & Kunkel Ultra-Turrax® T25, IKA-Labortechnik, Staufen, Allemagne). Des aliquots de l'homogénat ont ensuite été conservés au -80 °C pour la quantification ultérieure du cuivre (dans un tube propre) et des protéines, lipides et glucides, alors que deux surnageants provenant de centrifugations ont aussi été conservés (-80 °C) pour la quantification ultérieure de la superoxyde dismutase (SOD, 1500 x g, 5 min, 4 °C) et de la catalase (CAT, 10 000 x g, 15 min, 4 °C).

L'activité enzymatique a été quantifiée à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible muni d'un lecteur à microplaques (Cary 50, Varian Inc., Walnut Creek, Californie, É.-U.). La dilution adéquate de tissus frais (l'homogénat du corps excluant le tube digestif) était déposée (10 µL) dans les puits en quadruplicata, soit une dilution équivalente à 200 mL·g⁻¹ pour la citrate synthase (CS), la β-hydroxyacyl coenzyme-A déshydrogénase (HOAD) et la pyruvate kinase (PK), 2000 mL·g⁻¹ pour la cytochrome C oxydase (CCO), la glutathion S-transférase (GST) et la lactate déshydrogénase (LDH) et 4000 mL·g⁻¹ pour la nucléotide diphosphate kinase (NDPK). Le milieu de réaction (sans le réactif initiant la réaction) était ajouté, une première mesure du taux de changement de l'absorbance était réalisée (lecture contrôle), puis une deuxième mesure était effectuée une fois le réactif ajouté (volume final de 200 µL). La température expérimentale était maintenue lors des essais (20,5 °C) au niveau de la température ambiante du local, toutes les lectures étaient prises pendant 10 minutes, et la portion linéaire initiale de la réaction était conservée pour les calculs du taux de la réaction (portion supérieure à 6 minutes en moyenne). L'activité enzymatique a été exprimée en unités internationales (µmoles de substrat converti en produit · g⁻¹ tissus frais · min⁻¹) et était acceptée pour un échantillon seulement si la fidélité des mesures (écart entre les réplicats) respectait le seuil inférieur à 10 % de dispersion.

L'activité de la CS a été quantifiée en suivant l'apparition de couleur de la réaction colorimétrique du DTNB conjugué aux groupements sulfhydryles (de la coenzyme A), détectée à 412 nm et selon un coefficient d'extinction de 13,6 (L·mmol⁻¹·cm⁻¹). L'activité d'oxydo-réduction de la CCO a été quantifiée en suivant l'oxydation du cytochrome C (ajouté déjà réduit), dont l'hème ferreux (Fe²⁺) était oxydé en hème ferrique (Fe³⁺) conjointement à la réduction de l'oxygène, et ce, en détectant la diminution de couleur entraînée par cette réaction. Préalablement, la réduction de l'oxygène (élimination) de la solution de cytochrome C était assurée par l'ajout d'un agent réducteur (dithionite de sodium) dont l'excès était éliminé par aération de cette solution pendant 7 minutes (et validé systématiquement par différence de spectre). Les échantillons ont donc été lu à 550 nm par rapport à des contrôles déjà oxydés (ajout de cyanoferrate de potassium), et le coefficient d'extinction du cytochrome C utilisé était de 19,1 (L·mmol⁻¹·cm⁻¹). L'activité de la GST totale a été quantifiée en suivant l'apparition de couleur de la réaction colorimétrique du CDNB conjugué aux groupements thiol (du glutathion réduit ajouté) détectée à 340 nm et selon un coefficient d'extinction de 10 (L·mmol⁻¹·cm⁻¹). L'activité des autres enzymes du métabolisme (HOAD, NDPK, PK, LDH) a été quantifiée en détectant la disparition du NADH (oxydation en NAD⁺) à 340 nm selon un coefficient d'extinction de 6,22 (L·mmol⁻¹·cm⁻¹).

Les milieux de réaction des différentes enzymes étaient les suivants :

Citrate synthase (CS, E.C. 4.1.3.7) : 100 mM de tampon phosphate, pH 8,0 ; 100 mM de Tris-HCl ; 0,1 mM d'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB) ; 0,1 mM d'acétyl coenzyme A sous forme de sel de sodium (acétyl CoA) ; 0,3 mM d'acide oxaloacétique (omis pour la lecture contrôle). Pelletier *et al.* 1994 (modifications : 0,1 mM d'acétyl CoA au lieu de 0,2 ; et ajout de 100 mM de tampon phosphate) ; Lapointe *et al.* 2011.

β-hydroxyacyl coenzyme-A déshydrogénase (HOAD, E.C. 1.1.1.35) : tampon triéthanolamine (100 mM de triéthanolamine-HCl, 5 mM d'EDTA), pH 7,4 ; 0,17 mM de β-nicotinamide adénine dinucléotide sous forme de sel disodique (NADH) ; 1 mM de cyanure de potassium ; 0,0375 mM d'acétoacétyl coenzyme A sous forme de sel de sodium (AA-CoA, omis pour la lecture contrôle).

Couture & Guderley 1990 (modifications : 0,1725 mM de NADH au lieu de 0,115 mM ; et 0,0375 mM de AA-CoA au lieu de 0,05 mM).

Cytochrome C oxydase (CCO, E.C. 1.9.3.1) : 100 mM de tampon phosphate, pH 7,0 ; 0,07 mM de cytochrome C réduit; 0,33% de ferricyanure de potassium (seulement dans les puits contrôles). Pelletier *et al.* 1994 ; Gauthier *et al.* 2008 ; Lapointe *et al.* 2011.

Glutathion S-transférase (GST, E.C. 2.5.1.18) : tampon phosphate-EDTA (50 mM de phosphate, 1 mM d'EDTA), pH 6,5 ; 1 mM de chlorure de 2,4-dinitrophényle (CDNB) ; 6 mM de L-glutathion réduit (GSH, omis pour la lecture contrôle). Guderley *et al.* 2003 (modification : blancs lus en omettant seulement le GSH).

Nucléotide diphosphate kinase (NDPK, E.C. 2.7.4.6) : tampon imidazole (50 mM d'imidazole-HCl, 20 mM de MgCl₂·6H₂O, 70 mM de KCl), pH 7,5 ; 0,24 mM de NADH ; 2 mM d'adénosine-5'-triphosphate sous forme de sel disodique (ATP) ; 1,1 mM d'acide phosphoénolpyruvique sous forme de sel sodique hydratée (PEP) ; pyruvate kinase (PK) et lactate déshydrogénase (LDH) en excès (soit 1,14 UI PK·mL⁻¹ et 1,16 UI LDH·mL⁻¹) ; 0,7 mM de thymidine-5'-diphosphate sous forme de sel disodique (omis pour la lecture contrôle). Couture *et al.* 1998 (modification : pH 7,5 au lieu de 7,2 d'après la recette du muscle) ; Lapointe *et al.* 2011.

Pyruvate kinase (PK, E.C. 2.7.1.40) : tampon imidazole, pH 7,5 ; 0,16 mM de NADH ; 10 mM d'adénosine-5'-diphosphate sous forme de sel disodique (ADP) ; LDH en excès (soit 5,88 UI LDH·mL⁻¹) ; 7,5 mM de PEP (omis pour la lecture contrôle). Gauthier *et al.* 2008 (modifications : 5 mM de PEP au lieu de 500 mM ; 10 mM d'ADP au lieu de 20 mM d'ADP ; 7,5 mM de PEP au lieu de 5 mM).

Lactate déshydrogénase (LDH, E.C. 1.1.1.27) : 100 mM de tampon phosphate, pH 7,0 ; 0,16 mM de NADH ; 0,5 mM de pyruvate de sodium (omis pour la lecture contrôle). Gauthier *et al.* 2008.

L'activité de la SOD totale et de la SOD mitochondriale seule, ainsi que celle de la CAT ont été quantifiées en suivant la méthode fournie dans les trousse no. 706002 et 707002, respectivement (Cayman Chemical Company Inc., Ann Arbor, Michigan, É.-U.). Pour les SODs, la dilution de 200 mL·g⁻¹ de tissus frais (le corps excluant le tube digestif) était déposée (10 µL) dans les puits

en duplicata pour l'activité totale et pour l'activité mitochondriale (lues sur une même plaque) selon un volume final de 230 μL . Pour la CAT, la dilution de 200 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ était quant à elle déposée (20 μL) en triplicata dans les puits selon un volume final de 170 μL .

2.7 Dosage du cuivre

Afin de minimiser la présence de métaux traces (contamination), toute la vaisselle ou les récipients de laboratoire utilisés (de l'entreposage des échantillons jusqu'à leur dosage en cuivre) étaient préalablement nettoyés par trempage (24 heures) dans une solution d'acide nitrique à 15 % (HNO_3), puis rincés plusieurs fois à l'eau ultra pure et séchés sous une hotte à flux laminaire. Par ailleurs, l'acide utilisé pour la conservation et la digestion des échantillons de l'expérience provenait toujours de la même bouteille (OmniTrace® EMD Chemicals Inc. NX0407-2, Gibbstown, New Jersey, É.-U.).

Les échantillons biologiques (proies, tube digestif des poissons, corps des poissons excluant leur tube digestif) ont été lyophilisés, pesés et digérés à température ambiante pendant une semaine à l'acide HNO_3 70 %, puis pendant un jour suivant l'ajout de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 30 % (selon la méthode décrite dans Borgmann *et al.* 2001), et finalement conservés jusqu'au jour de la quantification (4° C; solutions de concentrations finales à 1,75 % en HNO_3 et 0,6 % en H_2O_2). Pour chacune des digestions effectuées, des blancs (tubes vides) et des échantillons de matériau de référence certifié pour l'analyse des métaux-trace (hépatopancréas de homard TORT-2, Conseil national de recherche du Canada, Ottawa, Ontario, Canada) ont simultanément suivi les mêmes manipulations que celles des échantillons (lyophilisation et digestion). Les limites de détection associées à la méthode de détermination de la concentration en cuivre par spectrométrie de masse à plasma inductif (ICP-MS X-7, Thermo Electron Corp., Waltham, Massachusetts, É.-U.) étaient de 0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour l'eau ; plus petite ou égale à 0,09 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour les proies ; 0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour la paroi du tube digestif des poissons ; et plus petite ou égale à 0,07 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour le

corps restant des poissons. Les valeurs de blanc étaient négligeables (inférieures aux limites de détection de la méthode), sauf pour la paroi du tube digestif des poissons (n=2), où la valeur de cuivre détectée dans le blanc de $0,11 \pm 0,05 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (moyenne \pm écart-type) a dû servir à corriger les valeurs lues (voir à la section 2.9.2). Finalement, la récupération du cuivre dans les échantillons de référence TORT-2 (n=7) était de $93,4 \pm 5,6 \%$ (moyenne \pm écart-type ; allant de 85,6 à 101,4 %).

2.8 Dosage des protéines, lipides et glucides

Les protéines ont été quantifiées selon la méthode à l'acide bicinchoninique (Smith *et al.* 1985), une méthode plus tolérante à la présence de composés étrangers (dans le tampon utilisé pour l'homogénéisation des tissus d'intérêt) dans l'échantillon que la méthode de Lowry *et al.* (1951). Les protéines contenues dans la dilution adéquate ($20 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$) des tissus frais de poisson (le corps excluant le tube digestif) et des proies sont d'abord solubilisées (dilution 1/6) avec une solution d'urée (10 M d'urée ; 2,3 % d'acide acétique glacial), de sorte de les inclure entièrement dans l'essai, même celles qui auraient pu être agrégées ou précipitées dans l'homogénat (cela purifie en même temps l'échantillon en séparant ou en dénaturant mieux d'autres macromolécules). Les échantillons (ou standards de courbe) sont déposés en duplicata ($10 \mu\text{L}$) sur la microplaque, le réactif de la méthode est ajouté (volume final de $210 \mu\text{L}$), la microplaque incubée 20 minutes à $37 \text{ }^\circ\text{C}$, puis lue à 562 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible muni d'un lecteur à microplaques (Cary 50, Varian Inc., Walnut Creek, Californie, É.-U.). Une courbe standard suivait simultanément les mêmes étapes (0 à $12 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'albumine de sérum bovin (dans le tampon d'homogénéisation) ; 9 points de courbe).

L'extraction des lipides ainsi que le protocole sur lequel la quantification des lipides totaux est basée font référence à des travaux antérieurs (Blight & Dyer 1959 ; De Coen & Janssen 2003). Pour l'extraction, un volume d'échantillon était déposé dans un tube ($450 \mu\text{L}$), puis deux volumes

de mélange chloroforme : méthanol (1 : 1) étaient ajoutés (900 μL), et le tube centrifugé 5 minutes à 1000 x g (4 °C). Une fois la couche supérieure (phase méthanol) enlevée, l'extrait de lipide (phase chloroforme) était ajusté à la dilution désirée en tissus frais (dans le chloroforme ; 20 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ pour le corps des poissons excluant le tube digestif, 10 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ pour les proies). De l'extraction à la quantification, des blancs (représentant la composition de l'homogénat sans tissu frais) ont suivi les mêmes étapes que celles simultanément suivies par les échantillons alors qu'une courbe standard (0 à 3,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de tripalmitine (dans le chloroforme) ; 11 points de courbe) était manipulée de la même manière que l'extrait lipidique. Ainsi, un volume d'extrait lipidique (ou de courbe standard) était transféré dans un tube en verre (100 μL), cinq volumes d'acide sulfurique 70 % étaient ajoutés (500 μL), puis le tube était incubé à 200 °C pendant 15 minutes. Une fois le tube refroidi à la température ambiante, 15 volumes d'eau ultra pure étaient finalement ajoutés (1,5 mL) au tube (volume final de 2,1 mL), puis l'échantillon déposé en duplicata (250 μL) sur une microplaque. Enfin, les échantillons étaient lus à 375 nm à l'aide du spectrophotomètre UV/visible muni d'un lecteur à microplaques (chaque plaque était accompagnée de trois blancs et de la courbe standard, tous en duplicata).

L'extraction des glucides ainsi que le protocole sur lequel la quantification des glucides totaux (hexoses) est basée font référence à d'autres travaux (De Coen & Janssen 2003). L'échantillon était d'abord purifié en faisant précipiter les protéines à l'acide trichloroacétique (TCA). Pour ce faire, deux volumes d'échantillon (200 μL), suivis d'un volume de TCA 15 % (100 μL), ont été déposés dans un tube. Une fois incubé à -20 °C pendant 10 minutes, le tube était centrifugé 10 minutes à 1000 x g (4 °C) puis le surnageant (extrait de glucides) transféré dans un nouveau tube. Le culot était solubilisé dans un volume de TCA 5 %, le tube incubé à -20 °C pendant 10 minutes puis centrifugé 10 minutes à 1000 x g (4 °C), de sorte que la totalité de l'extrait de glucides soit conservée à 5 % de TCA, et enfin ajustée à la dilution désirée en tissus frais (dans l'eau ; 30 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ pour le corps des poissons excluant le tube digestif, 90 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ pour les proies). De l'extraction à la quantification, des blancs (représentant la composition de l'homogénat sans tissu frais) ont suivi les mêmes étapes que celles simultanément suivies par les échantillons alors

qu'une courbe standard (0 à 1 mg·mL⁻¹ de glucose (dans l'eau), 12 points de courbe) était manipulée de la même manière que l'extrait glucidique. Cet extrait (ou échantillon de la courbe standard) était déposé sur la microplaque (50 µL), après lequel suivait l'ajout de phénol 5 % (50 µL) et de l'acide sulfurique 70 % (200 µL). À la suite d'une incubation de 30 minutes à température expérimentale (20,5 °C), les microplaques étaient enfin lues à 490 nm à l'aide du spectrophotomètre UV/visible (chaque plaque était accompagnée de trois blancs, de la courbe standard en duplicata ainsi que des échantillons en triplicata).

2.9 Paramètres calculés

2.9.1 Exposition alimentaire au cuivre

La quantité journalière de cuivre ingérée par poisson (spécifique à sa masse) a été calculée à partir du taux d'alimentation (TA) journalier (masse fraîche de vers, en grammes) ainsi que de la masse individuelle (masse fraîche du poisson, en grammes). Les concentrations en cuivre trouvées dans les proies à l'aide de la spectrométrie de masse (ICP-MS) ont dû être rapportées selon la masse fraîche étant donné que c'est sous cette forme que les vers ont été pesés vivants pour toute la durée de l'expérience (µg Cu·g⁻¹ tissus frais de proies). La masse des poissons était aussi exprimée en terme de masse entière (fraîche). Ainsi, pour chaque poisson, la charge de cuivre ingérée par jour (taux) a été rapportée par gramme de poisson selon cette équation :

$$\text{Charge journalière ingérée de cuivre} \quad \text{Cu}_{\text{ingéré}}$$

$$\left(\mu\text{g Cu} \cdot \text{g}^{-1} \text{poisson frais} \cdot \text{jour}^{-1} \right) = [\text{Cu}_{\text{proie}}] \times \text{TA}$$

2.9.2 Bioaccumulation du cuivre

La concentration de cuivre dans le corps des poissons (sans le tube digestif) a été mesurée à partir de l'aliquot d'homogénat décongelé (120 µL), lyophilisé et digéré selon la méthode décrite précédemment (voir à la section 2.7). Des blancs (n=3) d'homogénats (tout sauf le corps des

poissons, c.-à-d. le tampon d'homogénéisation) accompagnaient chaque jour de préparation des homogénats (n=11 essais enzymatiques). Comme les concentrations de cuivre contenues dans ces blancs dépassaient la limite de détection de la méthode, ces valeurs ($\leq 0,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ont dû être utilisées afin de corriger la concentration en cuivre trouvée dans le corps des poissons (homogénat frais). Les nouvelles valeurs de cuivre trouvées dans l'homogénat frais ont ensuite été ramenées jusqu'au niveau des tissus frais du corps du poisson (excluant le tube digestif qui avait été mis à l'écart lors de la dissection). Cette concentration en cuivre (en fonction de la masse fraîche du corps pesée pour le poisson) était ensuite rapportée selon la masse sèche des tissus du corps du poisson à partir du ratio de masse des tissus frais sur celle des tissus lyophilisés contenus dans l'aliquot d'homogénat (correction comprise pour la masse sèche du tampon d'homogénéisation ; $\leq 15 \text{ mg}$, n=11). Voici les équations correspondant aux concentrations de cuivre contenues dans les tissus du corps des poissons selon leur masse fraîche et leur masse sèche (excluant le tube digestif) :

$$\text{Concentration corporelle de cuivre selon les tissus frais} = \frac{\text{Charge } Cu_{\text{tissus frais pesés}}^{\text{corrigée*}}}{\text{Masse}_{\text{tissus frais pesés}}} \quad [Cu_{\text{frais}}]_{\text{Corps}}$$

($\mu\text{g Cu} \cdot \text{g}^{-1}$ tissus frais de poisson)

$$\text{Concentration corporelle de cuivre selon les tissus secs} = [Cu_{\text{frais}}]_{\text{Corps}} \times \text{Ratio de masses} \frac{\text{Aliquot}_{\text{tissus frais}}}{\text{Aliquot}_{\text{tissus secs corrigés}}} [Cu_{\text{sec}}]_{\text{Corps}}$$

($\mu\text{g Cu} \cdot \text{g}^{-1}$ tissus secs de poisson)

* La correction de la concentration en cuivre du volume de digestion consistait à en soustraire la concentration du blanc ($\leq 0,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Une fois la concentration corrigée obtenue, elle était multipliée avec le volume de digestion dans l'obtention de la charge de cuivre corrigée.

La concentration de cuivre dans la paroi du tube digestif a été mesurée à partir du tube digestif entier (une fois vidé et rincé à l'eau ultra pure pendant trois secondes). Comme la concentration en cuivre contenue dans les blancs (n=2) dépassait la limite de détection de la méthode, cette valeur ($0,11 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) a été utilisée afin de corriger la concentration en cuivre trouvée dans la paroi du tube digestif des poissons. Ainsi, les valeurs de cuivre dans la paroi du tube digestif étaient exprimées sous cette forme :

$$\text{Concentration de cuivre dans la paroi du tube digestif} = \frac{\text{Charge Cu}_{\text{tube digestif sec}}^{\text{corrigée*}}}{\text{Masse}_{\text{tube digestif sec}}} \quad [\text{Cu}_{\text{sec}}]_{\text{Tube digestif}}$$

$$(\mu\text{g Cu} \cdot \text{g}^{-1} \text{ tube digestif sec})$$

* La correction de la concentration en cuivre du volume de digestion consistait à en soustraire la concentration du blanc ($\leq 11 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Une fois la concentration corrigée obtenue, elle était multipliée avec le volume de digestion dans l'obtention de la charge de cuivre corrigée.

À partir des quantifications de métaux réalisées pour les tissus du corps et pour le tube digestif, les différences entre les poissons ayant subi un traitement aux proies contaminées (C) et ceux qui s'alimentaient de proies non contaminées (NC) ont été examinées grâce à quelques calculs. L'idée de départ était de calculer la concentration de cuivre nouvellement accumulé (CuNA), l'efficacité d'assimilation du cuivre (EACu), ainsi que le taux de prise en charge du cuivre (TPCCu) du poisson.

$$\text{Cuivre nouvellement accumulé} = [\text{Cu}_{\text{poisson C}}] - [\text{Cu}_{\text{poisson NC}}] \quad \text{CuNA}$$

$$(\mu\text{g Cu} \cdot \text{g}^{-1} \text{ masse sèche})$$

$$\text{Efficacité d'assimilation du cuivre} = \left[\frac{\text{Cu}_{\text{poisson C}} - \text{Cu}_{\text{poisson NC}}}{\text{Cu}_{\text{proie C}}} \right] \times 100 \quad \text{EACu}$$

$$(\%)$$

$$\text{Taux de prise en charge du cuivre} = \text{Cu}_{\text{ingéré}} \times \left(\frac{\text{EACu}}{100} \right) \quad \text{TPCCu}$$

$$(\mu\text{g Cu} \cdot \text{g}^{-1} \text{ poisson frais} \cdot \text{jour}^{-1})$$

Ces calculs permettraient de comprendre la plus grande concentration que les poissons ayant ingéré des proies contaminées auraient par rapport aux poissons ayant ingéré des proies non contaminées (CuNA), la part de cuivre assimilé dans le corps à partir de la nourriture contaminée des poissons (EACu), ainsi que l'entrée journalière réelle du cuivre dans le corps, peu importe ce qu'il y avait dans la nourriture contaminée puisque l'efficacité d'assimilation du cuivre serait tenue en compte (TPCCu). Comme le temps entre les prises de mesure était trop grand et que seule la voie d'exposition au cuivre par la nourriture a été considérée dans cette étude, l'utilisation des calculs proposés, en ces termes, induirait en erreur les résultats proposés dans ce mémoire ainsi que leur interprétation (l'efficacité d'assimilation du cuivre ainsi que le taux de prise en charge du cuivre seraient sous-estimés). Effectivement, pour être en mesure de quantifier

l'efficacité d'assimilation du cuivre, il aurait fallu quantifier, en plus de l'apport de cuivre par la voie alimentaire, celui associé à l'entrée du métal par la voie aqueuse (par exemple, en utilisant la concentration aqueuse de cuivre, pour estimer la prise en charge corporelle du cuivre de source aqueuse, à l'aide du taux de ventilation des branchies des poissons). Par ailleurs, comme la période de temps considérée est assez longue pour laisser la possibilité que des pertes physiologiques du cuivre soient masquées ou que des changements dans la concentration corporelle puissent être liés au taux de croissance des poissons, il aurait au moins fallu quantifier le taux d'excrétion du cuivre, afin de parvenir à quantifier son efficacité d'assimilation. Autrement, la seule vraie manière de quantifier le cuivre nouvellement accumulé, à partir de la nourriture contaminée, serait de suivre l'évolution de l'accumulation corporelle du cuivre assimilé sous la forme de radionucléide. Il est évident que trop d'inconnues étaient présentes pour permettre de présenter en ces termes les paramètres calculés à partir de la concentration alimentaire du cuivre ainsi que de la concentration corporelle de cuivre observée chez les poissons à la suite de leur exposition alimentaire au cuivre pendant 32 ou 48 jours.

À des fins pratiques, les paramètres calculés ont été renommés en fonction de ce qu'ils représentent réellement, et ainsi, de l'information qu'ils apportent à la compréhension de l'accumulation corporelle du cuivre d'origine alimentaire. En réalité, comme le CuNA représente une *différence d'accumulation du cuivre*, il est dénommé CuDA. L'EACu étant biaisée par le fait qu'elle représente plutôt une *différence de rendement alimentaire de charge du cuivre*, elle a été établie comme étant DRACu. Finalement, le TPCCu représente plutôt un *bilan journalier de rendement alimentaire de charge du cuivre*, BRACu. Voilà comment les mêmes paramètres, mieux définis, ont été employés dans ce mémoire :

$$\begin{array}{l} \text{Différence d'accumulation du cuivre} \\ (\mu\text{g Cu} \cdot \text{g}^{-1} \text{ masse sèche}) \end{array} = [\text{Cu}_{\text{poisson C}}] - [\text{Cu}_{\text{poisson NC}}] \quad \text{DACu}$$

$$\begin{array}{l} \text{Différence de rendement alimentaire} \\ \text{de charge du cuivre} \\ (\%) \end{array} = \left[\frac{\text{Cu}_{\text{poisson C}} - \text{Cu}_{\text{poisson NC}}}{\text{Cu}_{\text{proie C}}} \right] \times 100 \quad \text{DRACu}$$

Bilan journalier de rendement alimentaire
de charge du cuivre

$$= Cu_{ingéré} \times \left(\frac{DRACu}{100} \right)$$

($\mu\text{g Cu} \cdot \text{g}^{-1}$ poisson frais $\cdot \text{jour}^{-1}$)

BRACu

2.9.3 Statut énergétique

En théorie, si les protéines, les lipides et les glucides du poisson sont entièrement rendus disponibles pour le métabolisme aérobie, cette source d'énergie est aisément calculable. Tous les types de substrats énergétiques sont convertis en Joules (J) selon une constante, soit $24 \text{ J} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines, $39,5 \text{ J} \cdot \text{mg}^{-1}$ de lipides et $17,5 \text{ J} \cdot \text{mg}^{-1}$ de glucides, qui une fois additionnés, peuvent aussi être exprimés sous la forme des réserves énergétiques totales (J), puis spécifiquement rapportées à la masse des tissus frais du corps du poisson pour des fins comparatives. Avant toute chose, les différentes méthodes basées sur la lecture au spectrophotomètre ont abouti à la quantification de chacun des trois substrats énergétiques ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tissu frais). C'est ainsi qu'ils ont été convertis séparément en trois types de réserves ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$ tissus frais) puis exprimés de manière regroupée par la suite selon la formule suivante :

$$\text{Réserves totales} = 24 \cdot \left[\text{Protéines}_{\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{tissus frais}} \right] + 39,5 \cdot \left[\text{Lipides}_{\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{tissus frais}} \right] + 17,5 \cdot \left[\text{Glucides}_{\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{tissus frais}} \right]$$

($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$ tissus frais de poisson)

Le taux métabolique de routine (TMR) des poissons (une mesure indirecte de la capacité de production d'énergie) a été quantifié par la mesure du taux de consommation en oxygène des individus dans l'eau de leur béccher. Ce taux de consommation en oxygène a été calculé à partir de la pente linéaire (75 % des poissons avaient une partie linéaire d'au moins 25 minutes de prise de données ; $43 \text{ min} \pm 27$, moyenne \pm écart-type) de l'oxygène dissous suivi sur une période de temps et dans un volume d'eau donné (mesuré par poisson), puis rapporté spécifiquement à la masse du poisson (calcul standard) selon cette formule :

$$\text{Taux métabolique de routine} \quad (\text{mg O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{\text{Pente}_{\text{O}_2} \times \text{Volume}_{\text{eau}}}{\text{Masse}_{\text{poisson}}} \quad \text{TMR}$$

Enfin, la croissance des poissons a été suivie (prise de masse et longueur) afin d'évaluer ce qu'il restait d'énergie investie dans leur masse somatique à la suite des différents traitements qu'ils avaient subis (autre méthode d'observation de la capacité de production d'énergie). Quatre différents calculs ont été réalisés, soit l'efficacité de conversion de la nourriture (ECN), l'indice d'embonpoint (IE) ainsi que le taux de croissance spécifique à la masse (TCSM) ou à la longueur (TCSL) des poissons.

$$\begin{aligned} \text{Efficacité de conversion} \\ \text{de la nourriture} \\ (\%) \end{aligned} = \left[\frac{\text{Incrément de masse}_{\text{poisson}}}{\text{Masse de nourriture}_{\text{ingérée}}} \right] \times 100 \quad \text{ECN}$$

$$\text{Indice d'embonpoint} = \left[\frac{\text{Masse}_g}{\text{Longueur}_{\text{cm}}^3} \right] \times 100 \quad \text{IE}$$

$$\begin{aligned} \text{Taux de croissance} \\ \text{spécifique à la masse} \\ (\% \cdot \text{jour}^{-1}) \end{aligned} = \left[\frac{\ln(\text{masse}_2) - \ln(\text{masse}_1)}{\text{temps}_2 - \text{temps}_1} \right] \times 100 \quad \text{TCSM}$$

$$\begin{aligned} \text{Taux de croissance} \\ \text{spécifique à la longueur} \\ (\% \cdot \text{jour}^{-1}) \end{aligned} = \left[\frac{\ln(\text{longueur}_2) - \ln(\text{longueur}_1)}{\text{temps}_2 - \text{temps}_1} \right] \times 100 \quad \text{TCSL}$$

L'ECN renseigne sur le gain (ou la perte) de masse somatique du poisson par rapport à la masse de nourriture ingérée au cours de cette période. L'IE est un ratio donnant la proportionnalité de la croissance de la masse par rapport à celle de la longueur à un moment précis. Le TCSM (ou le TCSL) donne un indice de l'accroissement (ou de la diminution) de la masse somatique du poisson (ou de sa longueur) sur une période de temps donnée.

2.10 Analyse des données et statistiques

Les résultats présentés ont été obtenus à la suite de l'analyse des données des poissons ayant été suivis jusqu'au lendemain de la fin de leur exposition de 32 ou 48 jours (les analyses excluent les morts). La distribution des variables par temps d'échantillonnage a été vérifiée pour sa normalité et les données ont parfois été transformées afin de mieux respecter l'homogénéité de la variance. À cet effet, des données transformées en log ont été utilisées pour effectuer les régressions linéaires présentées dans ce mémoire (régressions effectuées afin de vérifier la relation entre une variable explicative et une variable indépendante). L'influence individuelle et l'influence combinée des deux facteurs expérimentaux ont été vérifiées pour toutes les variables examinées en déterminant l'effet du facteur d'alimentation (le taux d'alimentation), l'effet du facteur d'exposition (la présence ou l'absence de contamination par le cuivre de la nourriture), et l'effet de leur interaction, sur la variabilité de ces variables. Ainsi, l'analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée selon les deux facteurs expérimentaux (dont les combinaisons possibles se rapportent aux quatre traitements réalisés) à chaque temps d'échantillonnage. Lorsque les effets détectés étaient liés à un seul des deux facteurs, ou aux deux facteurs mais de manière indépendante, les différences entre les traitements étaient identifiables à l'observation des moyennes (aucun autre test nécessaire). Mais lorsqu'il y avait un effet lié à l'interaction des deux facteurs expérimentaux (dont l'interprétation de l'effet d'un facteur est indissociable de celui de l'autre), un test de comparaisons multiples (simultanées) des moyennes (entre les quatre traitements) était effectué (test de comparaisons multiples Tukey). Le seuil d'acceptabilité de l'erreur α était de 5 %. Ainsi, les résultats de tests obtenus avec des valeurs de p sous les 5 % ($p < 0,05$) identifient les groupes considérés comme significativement différents entre eux (les valeurs exactes ont été rapportées lorsqu'elles sont sous le seuil de 5 %) dans la section suivante des résultats, qui ont par ailleurs été obtenus avec le logiciel libre R (R Development Core Team 2011). Des informations complémentaires aux moyennes présentées dans la section des résultats sont disponibles pour toutes les variables présentées dans ce mémoire en annexe A (résultats principaux des tests ANOVA et de comparaisons multiples).



3. RÉSULTATS

3.1 Exposition alimentaire au cuivre

La combinaison des deux facteurs expérimentaux a généré les quatre traitements ciblés (tableau 3.1). Les poissons qui étaient assignés aux plus grands taux d'alimentation ingéraient cinq fois plus de nourriture que ceux assignés aux plus petits taux d'alimentation. Du même coup, les poissons assignés aux traitements contaminés ingéraient des proies de concentrations en cuivre neuf fois plus élevées que celles acheminées aux poissons de même régime alimentaire en proies non contaminées. Un compte-rendu des informations nutritionnelles, des taux d'alimentation ainsi que des concentrations en cuivre reçues par les tête-de-boules lors des 32 ou 48 jours auxquels ils ont été exposés est présenté dans le tableau 3.1. En somme, une fois les deux facteurs expérimentaux intégrés en totalité, les groupes de poissons ayant reçu la nourriture contaminée étaient effectivement neuf fois plus exposés dans leur quotidien que leurs homologues témoins. En ce sens que pour un même taux d'alimentation, la charge journalière ingérée de cuivre était neuf fois plus élevée envers les poissons des traitements contaminés qu'envers ceux des traitements non contaminés (tableau 3.1).

3.2 Bioaccumulation du cuivre

L'accumulation du cuivre (tableau 3.2) dans le corps (sans le tube digestif) des poissons ayant ingéré des proies non contaminées était significativement supérieure à celle des poissons ayant ingéré des proies contaminées après 32 et 48 jours d'exposition (effet du facteur d'exposition ; **1P et 5P** > **1Cu et 5Cu** ; $p_{32}=0,042$ et $p_{48}=0,006$). À l'inverse, l'accumulation du cuivre dans la paroi du tube digestif des poissons ayant ingéré des proies contaminées était significativement supérieure à celle des poissons ayant ingéré des proies non contaminées après 32 jours d'exposition (effet du facteur d'exposition ; **1Cu et 5Cu** > **1P et 5P** ; $p_{32}<0,001$).

Tableau 3.1 Statistiques sommaires de l'alimentation des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours

Proies	Moyenne globale	1P	1Cu	5P	5Cu
<i>Composition nutritionnelle</i>					
Protéines	104,8 ± 14,9 (5)	-	-	-	-
Lipides	61,5 ± 8,9 (5)	-	-	-	-
Glucides	15,1 ± 2,3 (5)	-	-	-	-
Eau	850,9 ± 17 (90)	-	-	-	-
Réserves	5208,9 ± 638,0 (5)	-	-	-	-
<i>Facteurs expérimentaux</i>					
Taux d'alimentation	-	1,1 ± 0,2 (26)	1,0 ± 0,2 (25)	4,9 ± 0,6 (40)	4,9 ± 0,4 (38)
Concentration en cuivre	-	16,3 ± 0,2 (26)	142,2 ± 8,5 (25)	16,4 ± 0,2 (40)	143,3 ± 9,7 (38)
<i>Exposition des poissons</i>					
Charge journalière ingérée de cuivre	-	0,025 ± 0,004 (26)	0,219 ± 0,034 (25)	0,117 ± 0,013 (40)	1,056 ± 0,106 (38)

Les protéines, lipides, glucides et l'eau sont exprimés selon des unités en mg·g⁻¹tissus frais, les réserves disponibles en J·g⁻¹tissus frais, le taux d'alimentation en %·jour⁻¹, la concentration de cuivre en µg Cu·g⁻¹tissus sec de proie, et la charge journalière ingérée de cuivre en µg Cu·g⁻¹ poisson frais·jour⁻¹. Les 4 traitements découlant de la combinaison des facteurs expérimentaux sont énumérés ci-après : 1%*nourriture propre (1P), 1%*nourriture contaminée au cuivre (1Cu), 5%*nourriture propre (5P), 5%*nourriture contaminée au cuivre (5Cu). Les données présentées dans le tableau suivent cette séquence : moyenne ± écart-type (n).

Tableau 3.2 Statistiques sommaires des concentrations de cuivre mesurées dans le corps (sans le tube digestif) ainsi que dans la paroi du tube digestif des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours

Poissons	1P	1Cu	5P	5Cu	Effets significatifs
<i>Après 32 jours d'exposition</i>					
Corps	4,7 ± 2,3 (15)	3,9 ± 1,1 (10)	11,4 ± 16,9 (15)	2,8 ± 0,7 (15)	Cu
Tube digestif	4,9 ± 1,2 (15)	7,9 ± 3,0 (10)	5,8 ± 2,2 (15)	9,1 ± 2,2 (15)	TA et Cu
<i>Après 48 jours d'exposition</i>					
Corps	5,3 ± 3,5 (6)	2,9 ± 1,0 (7)	3,7 ± 1,3 (15)	2,6 ± 0,6 (13)	Cu
Tube digestif	5,1 ± 0,7 (6) b	8,7 ± 4,2 (7) b	4,9 ± 1,4 (14) b	14,3 ± 5,7 (13) a	Cu et TA*Cu

La concentration de cuivre est exprimée selon des unités en $\mu\text{g Cu}\cdot\text{g}^{-1}$ tissus secs. Les 4 traitements découlant de la combinaison des facteurs expérimentaux sont énumérés ci-après : 1%*nourriture propre (1P), 1%*nourriture contaminée au cuivre (1Cu), 5%*nourriture propre (5P), 5%*nourriture contaminée au cuivre (5Cu). Les données présentées dans le tableau suivent cette séquence : moyenne \pm écart-type (n). Les résultats statistiques (Effets significatifs) proviennent des tests ANOVA effectués selon le facteur d'alimentation (taux d'alimentation ; TA), le facteur d'exposition (présence ou absence de contamination des proies ingérées ; Cu) et selon l'interaction des 2 facteurs expérimentaux (TA*Cu). Tous les effets présentés sont significatifs ($p < 0,05$), et les lettres indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) issues des tests de comparaisons multiples Tukey (entre les 4 traitements).

D'autre part, l'accumulation était significativement plus grande dans la paroi du tube digestif des poissons s'étant le plus alimentés également après 32 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P et 5Cu** > 1P et 1Cu ; $p_{32}=0,028$). Enfin, l'accumulation du cuivre dans cette paroi était significativement plus importante chez les poissons du groupe 5Cu que chez ceux des autres groupes après 48 jours d'exposition (effet d'interaction des deux facteurs expérimentaux ; **5Cu** > 1P, 1Cu et 5P ; $p_{48}=0,029$).

Bien qu'au premier abord l'accumulation corporelle (sans le tube digestif) semble se comporter à l'inverse de celle dans la paroi du tube digestif, toutes deux sont en partie expliquées par la charge journalière ingérée de cuivre (figure 3.1). Après 32 jours d'exposition, la régression linéaire négative de l'accumulation corporelle en fonction de la charge ingérée indique que plus les poissons ingéraient une charge journalière élevée en cuivre, plus la concentration en cuivre était faible dans leur corps ($p=0,026$; $r^2=0,07$; figure 3.1A). Bien que faible, cette relation significative s'est intensifiée après 48 jours d'exposition ($p=0,002$; $r^2=0,21$; figure 3.1B). Contrairement à cela, la régression linéaire positive de l'accumulation du cuivre dans la paroi du tube digestif en fonction de la charge ingérée montre que plus les poissons ingéraient une charge journalière élevée en cuivre, plus l'accumulation était importante dans la paroi de leur tube digestif après 32 et 48 jours d'exposition ($p_{32}<0,001$; $r^2=0,37$; figure 3.1C et $p_{48}<0,001$; $r^2=0,47$; figure 3.1D). Ainsi, une proportion de la variabilité totale de l'accumulation du cuivre dans le corps et la paroi du tube digestif des poissons peut être expliquée par la charge journalière ingérée de cuivre lors de l'expérience. En revanche, cette proportion est beaucoup plus importante dans le cas de l'accumulation du cuivre de la paroi du tube digestif.

Pour les groupes de poissons ayant reçu des proies contaminées (1Cu et 5Cu), le calcul de la différence d'accumulation du cuivre (DACu) et de la différence de rendement alimentaire de charge du cuivre (DRACu), envers leurs homologues aux proies non contaminées, ainsi que du bilan journalier de rendement alimentaire de charge du cuivre (BRACu), permet d'entrevoir l'effet du taux d'alimentation sur la concentration corporelle de cuivre ainsi que dans la paroi du

tube digestif à la suite des 32 et 48 jours d'exposition (figure 3.2). Les valeurs des moyennes présentées à la figure 3.2 sont disponibles en annexe B.

Tout d'abord, la DACu dans le corps (sans le tube digestif) des poissons s'étant le moins alimentés était significativement supérieure à celle des poissons s'étant le plus alimentés après 32 jours d'exposition ($1Cu > 5Cu$; $p_{32} < 0,001$; figure 3.2A), mais de niveau similaire entre les deux groupes après 48 jours d'exposition. Au contraire, la DACu dans la paroi du tube digestif était de niveau similaire entre les deux groupes à la suite des 32 jours d'exposition, après quoi celle des poissons s'étant le plus alimentés était significativement supérieure au DACu des poissons s'étant le moins alimentés après 48 jours d'exposition ($5Cu > 1Cu$; $p_{48} = 0,028$; figure 3.2B).

La DRACu dans le corps (sans le tube digestif) était de niveau similaire entre les deux groupes après 32 jours d'exposition, alors que celle des poissons s'étant le plus alimentés était significativement supérieure à la DRACu des poissons s'étant le moins alimentés après 48 jours d'exposition ($5Cu > 1Cu$; $p_{48} = 0,015$; figure 3.2C). La DRACu dans la paroi du tube digestif était quant à elle de niveau similaire entre les groupes à la suite des 32 et des 48 jours d'exposition.

Enfin, bien que les tendances observées au niveau de la DACu semblent différer de celles au niveau de la DRACu, le BRACu, qui intègre la DACu sous forme de charge et la DRACu (voir la section 2. Matériel et Méthodes), se comporte globalement à la manière de la DACu. D'abord, le BRACu dans le corps (sans le tube digestif) des poissons s'étant le moins alimentés était significativement supérieur à celui des poissons s'étant le plus alimentés après 32 jours d'exposition ($1Cu > 5Cu$; $p_{32} = 0,019$; figure 3.2E), mais de niveau similaire entre les groupes après 48 jours d'exposition. Inversement, le BRACu dans la paroi du tube digestif était de niveau similaire entre les groupes après 32 jours d'exposition, à la suite de quoi celui des poissons s'étant le plus alimentés était significativement supérieur au BRACu des poissons s'étant le moins alimentés après 48 jours d'exposition ($5Cu > 1Cu$; $p_{48} = 0,040$; figure 3.2F).

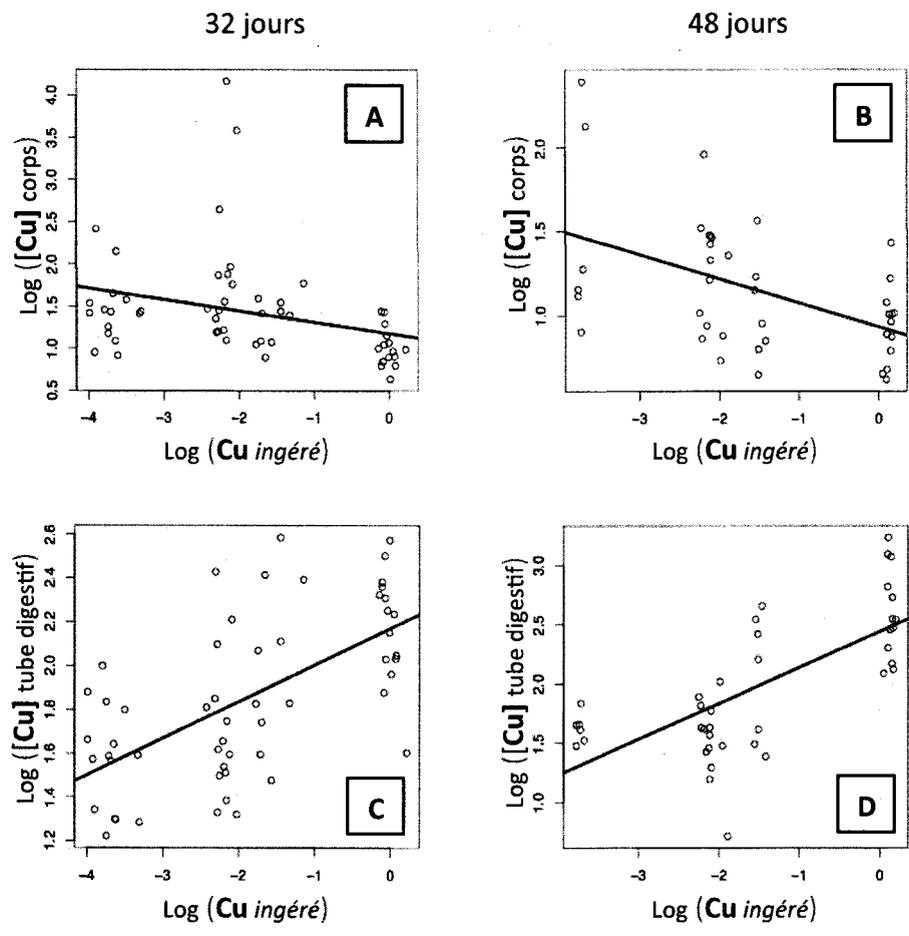


Figure 3.1 Relation entre la concentration de cuivre mesurée dans les tissus corporels ([Cu] corps) et la charge journalière ingérée de cuivre (Cu ingéré) par les poissons après 32 ou 48 jours d'exposition, en **A** et **B**, respectivement. Relation entre la concentration de cuivre mesurée dans la paroi du tube digestif ([Cu] tube digestif) et la charge journalière ingérée de cuivre par les poissons après 32 ou 48 jours d'exposition, en **C** et **D**, respectivement. Les données ont été transformées en valeurs log et utilisées pour les tests de relation présentés. Nombre d'échantillons (n) : 55 (A et B), 41 (C) et 40 (D). Toutes les relations présentées sont significatives ($p < 0,05$). Les unités des données originales étaient exprimées en $\mu\text{g Cu} \cdot \text{g}^{-1}$ masse sèche pour les concentrations et en $\mu\text{g Cu} \cdot \text{g}^{-1}$ poisson frais $\cdot \text{jour}^{-1}$ pour la charge journalière ingérée de cuivre.

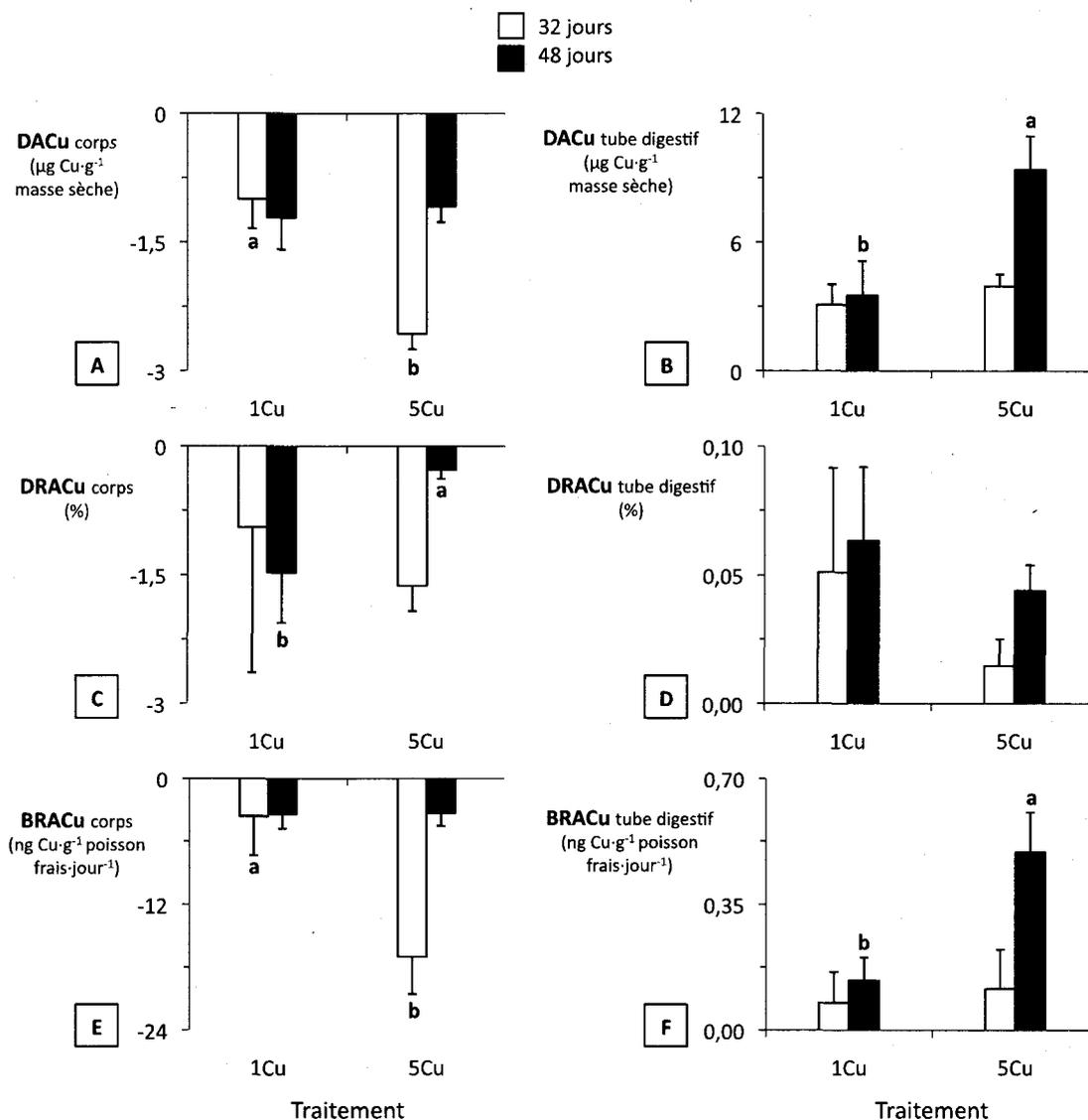


Figure 3.2 Trois paramètres de rendement alimentaire de charge du cuivre déterminés pour les deux groupes de poissons ayant ingéré des proies contaminées pendant 32 ou 48 jours, selon les barres blanches et noires, respectivement. Différence d'accumulation du cuivre (DACu) dans le corps et la paroi du tube digestif, en **A** et **B**, respectivement. Différence de rendement alimentaire de charge du cuivre (DRACu) calculée pour le corps et la paroi du tube digestif, en **C** et **D**, respectivement. Bilan journalier de rendement alimentaire de charge du cuivre (BRACu) dans le corps et la paroi du tube digestif, en **E** et **F**, respectivement. Comme les paramètres soustraient la valeur moyenne du groupe témoin de même taux d'alimentation (voir la section 2.9), seulement deux traitements découlant de la combinaison des facteurs expérimentaux sont énumérés (abscisse) : 1%*nourriture contaminée au cuivre (1Cu) et 5%*nourriture contaminée au cuivre (5Cu). Nombre d'échantillons (n) selon la séquence (abscisse) : 10 et 15 (1Cu) ; 7 et 13 (5Cu). Les barres d'erreur en y représentent les erreur-types des moyennes. Les lettres indiquent les différences significatives ($p < 0,05$) issues des tests ANOVA selon le facteur d'alimentation entre ces 2 traitements.

D'après ces observations, la DACu et le BRACu dans le corps différaient entre les groupes (**1Cu** > **5Cu**) alors que la DRACu demeurait la même après 32 jours d'exposition. Contrairement à cela, la DACu et le BRACu devenaient similaires alors qu'à l'inverse la DRACu variait (**5Cu** > **1Cu**) à la suite des 48 jours d'exposition. Les valeurs observées sont par ailleurs négatives, ce qui signifie que les poissons ayant ingéré des proies contaminées avaient accumulé, à long terme, moins de cuivre dans leur corps que les poissons ayant ingéré des proies non contaminées. Autrement, il n'y avait aucune tendance au niveau de la paroi du tube digestif après 32 jours d'exposition, après quoi la DACu et le BRACu dans la paroi du tube digestif différaient entre les groupes à l'inverse du corps, mais de manière déphasée, soit après 48 jours d'exposition (**5Cu** > **1Cu**). Les valeurs observées sont alors positives, ce qui implique que les poissons ayant ingéré des proies contaminées avaient accumulé, à long terme, plus de cuivre dans la paroi de leur tube digestif que les autres groupes de poissons. Ces résultats semblent donc démontrer que le taux d'alimentation avait une influence sur l'accumulation à long terme du cuivre chez les poissons ayant suivi un régime en proies contaminées, mais ce, selon la période de temps évaluée ainsi que le tissu cible considéré.

3.3 Statut énergétique

La concentration en protéines (tableau 3.3) mesurée dans le corps (sans le tube digestif) des poissons s'étant le plus alimentés était significativement plus élevée que celle des poissons s'étant le moins alimentés après 32 et 48 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P** et **5Cu** > **1P** et **1Cu** ; $p_{32} < 0,001$ et $p_{48} = 0,001$). De plus, la concentration en protéines était significativement plus élevée dans le corps des poissons ayant ingéré des proies contaminées que dans ceux des poissons ayant ingéré des proies non contaminées après 48 jours d'exposition seulement (effet du facteur d'exposition ; **1Cu** et **5Cu** > **1P** et **5P** ; $p_{48} = 0,032$). Pareillement aux protéines, la concentration des lipides évaluée dans le corps (sans le tube digestif) des poissons s'étant le plus alimentés était significativement supérieure à celle des poissons s'étant le moins

alimentés après 32 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P et 5Cu** > 1P et 1Cu ; $p_{32}=0,004$), après quoi, au contraire, elle était similaire entre les quatre groupes à la suite des 48 jours d'exposition. Par ailleurs, les valeurs lipidiques des poissons ayant ingéré des proies contaminées étaient analogues à celles des poissons ayant ingéré des proies non contaminées après 32 et 48 jours d'exposition. La concentration en glucides ainsi que la teneur en eau des tissus des poissons étaient de niveaux similaires entre les quatre traitements à la suite des 32 et des 48 jours d'exposition.

Enfin, les trois substrats énergétiques (protéines, lipides, glucides) étaient convertis et regroupés sous la forme globale des réserves disponibles. À la manière des concentrations en protéines, les réserves estimées dans le corps des poissons s'étant le plus alimentés étaient significativement plus importantes que celles des poissons s'étant le moins alimentés après 32 et 48 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P et 5Cu** > 1P et 1Cu ; $p_{32}<0,001$ et $p_{48}=0,040$). Par la suite, les réserves des poissons ayant ingéré des proies contaminées étaient significativement plus importantes que celles des poissons ayant ingéré des proies non contaminées, mais seulement après 48 jours d'exposition (effet du facteur d'exposition ; **1Cu et 5Cu** > 1P et 5P ; $p_{48}=0,020$).

Le taux métabolique de routine (TMR) des poissons s'étant le plus alimentés était significativement plus élevé que celui des poissons s'étant le moins alimentés après 32 et 48 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P et 5Cu** > 1P et 1Cu ; $p_{32}<0,001$ et $p_{48}=0,003$), alors que les valeurs des poissons ayant ingéré des proies contaminées étaient analogues à celles des poissons ayant ingéré des proies non contaminées après 32 et 48 jours d'exposition.

Tableau 3.3 Statistiques sommaires de la composition du corps (sans le tube digestif) et du taux métabolique de routine des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (statut énergétique)‡

Poissons	1P	1Cu	5P	5Cu	Effets significatifs
<i>Après 32 jours d'exposition</i>					
Protéines	90,5 ± 19,0 (15)	84,8 ± 23,4 (10)	115,5 ± 14,0 (15)	124,5 ± 20,1 (15)	TA
Lipides	35,9 ± 5,2 (15)	41,2 ± 13,9 (8)	48,5 ± 12,2 (15)	45,3 ± 12,2 (15)	TA
Glucides	2,1 ± 0,7 (14)	1,9 ± 0,7 (10)	2,2 ± 0,5 (15)	2,4 ± 0,6 (15)	
Eau	806,1 ± 30,8 (15)	781,8 ± 35,9 (10)	788,8 ± 53,9 (15)	782,7 ± 25,5 (15)	
Réserves	3689,4 ± 572,3 (14)	3372,9 ± 1196,9 (10)	4726,7 ± 735,2 (15)	4820,6 ± 746,1 (15)	TA
TMR	137,7 ± 57,3 (15)	128,1 ± 48,2 (10)	266,7 ± 84,5 (15)	235,2 ± 100,0 (15)	TA
<i>Après 48 jours d'exposition</i>					
Protéines	82,5 ± 12,9 (6)	91,8 ± 7,4 (7)	100,5 ± 19,1 (15)	112,3 ± 15,7 (13)	TA et Cu
Lipides	37,7 ± 4,3 (6)	43,7 ± 20,3 (7)	39,3 ± 8,9 (15)	49,4 ± 17,2 (13)	
Glucides	2,0 ± 1,0 (6)	1,6 ± 0,3 (7)	2,3 ± 0,7 (15)	2,2 ± 0,6 (13)	
Eau	794,8 ± 22,0 (6)	787,0 ± 38,1 (7)	781,3 ± 29,1 (15)	779,4 ± 18,3 (13)	
Réserves	3505,9 ± 343,7 (6)	3958,5 ± 873,2 (7)	4003,6 ± 693,4 (15)	4683,7 ± 979,9 (13)	TA et Cu
TMR	110,2 ± 25,9 (6)	143,9 ± 103,3 (7)	217,7 ± 113,4 (15)	215,8 ± 32,7 (13)	TA

Les protéines, lipides, glucides et l'eau sont exprimés selon des unités en mg·g⁻¹tissus frais, les réserves disponibles en J·g⁻¹tissus frais, et le taux métabolique de routine (TMR) en mg O₂·kg⁻¹·h⁻¹. Les 4 traitements découlant de la combinaison des facteurs expérimentaux sont énumérés ci-après : 1%*nourriture propre (1P), 1%*nourriture contaminée au cuivre (1Cu), 5%*nourriture propre (5P), 5%*nourriture contaminée au cuivre (5Cu). Les données présentées dans le tableau suivent cette séquence : moyenne ± écart-type (n). Les résultats statistiques (Effets significatifs) proviennent des tests ANOVA effectués selon le facteur d'alimentation (taux d'alimentation ; TA), le facteur d'exposition (présence ou absence de contamination des proies ingérées ; Cu) et selon l'interaction des 2 facteurs expérimentaux (TA*Cu). Tous les effets présentés sont significatifs (p<0,05).

‡ Voir le tableau 3.4 pour les résultats de croissance

Tableau 3.4 Statistiques sommaires de la croissance des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (statut énergétique)

Poissons	1P	1Cu	5P	5Cu	Effets significatifs
M0	0,49 ± 0,23 (26)	0,46 ± 0,19 (25)	0,51 ± 0,21 (40)	0,52 ± 0,22 (38)	
M16	0,48 ± 0,21 (26)	0,43 ± 0,18 (25)	0,53 ± 0,23 (40)	0,54 ± 0,21 (38)	TA
M32	0,40 ± 0,19 (26)	0,37 ± 0,16 (25)	0,50 ± 0,20 (40)	0,50 ± 0,21 (38)	TA
M48	0,29 ± 0,11 (7)	0,31 ± 0,10 (11)	0,39 ± 0,18 (20)	0,45 ± 0,20 (18)	TA
IE0	1,00 ± 0,09 (26)	1,03 ± 0,12 (25)	1,08 ± 0,13 (40)	1,04 ± 0,12 (38)	
IE16	1,02 ± 0,17 (26)	0,99 ± 0,10 (25)	1,06 ± 0,13 (40)	1,05 ± 0,12 (38)	TA
IE32	0,85 ± 0,11 (26)	0,85 ± 0,15 (25)	1,01 ± 0,10 (40)	0,98 ± 0,11 (38)	TA
IE48	0,70 ± 0,13 (7)	0,72 ± 0,09 (11)	0,87 ± 0,09 (20)	0,91 ± 0,09 (18)	TA
ECN16	-6,2 ± 91,9 (26) a	-40,1 ± 47,6 (25) b	5,4 ± 7,8 (40) a	6,4 ± 8,2 (38) a	TA et TA*Cu
ECN32	-102,8 ± 64,5 (26)	-92,6 ± 67,0 (25)	-6,0 ± 8,6 (40)	-8,0 ± 6,6 (38)	TA
ECN48	-143,5 ± 56,4 (7)	-140,1 ± 44,9 (11)	-16,4 ± 7,4 (20)	-13,2 ± 6,7 (18)	TA
TCSM16	-0,06 ± 0,64 (26) bc	-0,32 ± 0,38 (25) b	0,20 ± 0,28 (40) ac	0,26 ± 0,33 (38) a	TA et TA*Cu
TCSM32	-1,18 ± 0,87 (26)	-1,07 ± 0,85 (25)	-0,32 ± 0,46 (40)	-0,42 ± 0,35 (38)	TA
TCSM48	-1,72 ± 0,86 (7)	-1,64 ± 0,61 (11)	-0,90 ± 0,45 (20)	-0,71 ± 0,37 (18)	TA
TCSL16	-0,039 ± 0,099 (26)	-0,035 ± 0,093 (25)	0,105 ± 0,234 (40)	0,057 ± 0,136 (38)	TA
TCSL32	-0,029 ± 0,106 (26)	-0,025 ± 0,103 (25)	-0,025 ± 0,103 (40)	0,007 ± 0,086 (38)	
TCSL48	0 ± 0 (7)	-0,017 ± 0,056 (11)	-0,018 ± 0,075 (20)	-0,028 ± 0,106 (18)	

La masse (M) est exprimée selon des unités en g, l'indice d'embonpoint (IE) n'a pas d'unités, et l'efficacité de conversion de la nourriture (ECN), le taux de croissance spécifique à la masse (TCSM) ainsi que le taux de croissance spécifique à la longueur (TCSL) sont exprimés en % · jour⁻¹. Les 4 traitements découlant de la combinaison des facteurs expérimentaux sont énumérés ci-après : 1%*nourriture propre (1P), 1%*nourriture contaminée au cuivre (1Cu), 5%*nourriture propre (5P), 5%*nourriture contaminée au cuivre (5Cu). Les 4 suivis ponctuels de croissance (M et IE) sont représentés par les chiffres 0, 16, 32 et 48 pour le nombre de jours auxquels les poissons ont été exposés à leur traitement, alors que les 3 intervalles de croissance (ECN, TCSM, TCSL) compris entre ces suivis sont représentés par les chiffres correspondant à la fin de chaque intervalle de 0 à 16 jours (16), 16 à 32 jours (32) ainsi que de 32 à 48 jours (48). Les données présentées dans le tableau suivent cette séquence : moyenne ± écart-type (n). Les résultats statistiques (Effets significatifs) proviennent des tests ANOVA effectués selon le facteur d'alimentation (taux d'alimentation ; TA), le facteur d'exposition (présence ou absence de contamination des proies ingérées ; Cu) et selon l'interaction des 2 facteurs expérimentaux (TA*Cu). Tous les effets présentés sont significatifs (p<0,05), et les lettres indiquent les différences significatives (p<0,05) issues des tests de comparaisons multiples Tukey (entre les 4 traitements).

Bien que les substrats énergétiques (protéines, lipides, glucides) et les réserves (tableau 3.3) représentent la composition tissulaire du corps (sans le tube digestif), certaines de ces variables sont en partie expliquées par la bioaccumulation du cuivre contenue dans la paroi du tube digestif, alors que la bioaccumulation corporelle du cuivre n'explique pas ces variables (et qu'aucune accumulation du cuivre n'explique le taux métabolique des poissons). Après 32 jours d'exposition, il n'y avait aucune relation entre les variables énergétiques et l'accumulation du cuivre dans la paroi du tube digestif. Cependant, après 48 jours d'exposition, les régressions linéaires positives des protéines, des lipides, et des réserves, avec l'accumulation du cuivre dans la paroi du tube digestif, indiquent que les poissons ayant accumulé plus de cuivre dans la paroi de leur tube digestif avaient des concentrations plus élevées en protéines, en lipides et des réserves plus importantes dans les tissus de leur corps (PROTÉINES $p=0,007$ et $r^2=0,13$; LIPIDES $p=0,050$ et $r^2=0,07$; RÉSERVES $p=0,007$ et $r^2=0,14$). Ainsi, une proportion de la variabilité totale des teneurs en protéines, lipides et en réserves contenues dans le corps des poissons peut être expliquée par la bioaccumulation du cuivre de la paroi du tube digestif, mais seulement après 48 jours d'exposition. En revanche, cette petite proportion est plus explicative que l'absence de relation entre ces variables et la bioaccumulation de cuivre mesurés dans le corps des poissons.

L'indice d'embonpoint (IE), l'efficacité de conversion de la nourriture (ECN), le taux de croissance spécifique à la masse (TCSM) et le taux de croissance spécifique à la longueur (TCSL) sont basés sur les seules variables expérimentales (la masse et la longueur) à avoir été suivies à trois reprises (après 16, 32, et 48 jours), et ayant donné lieu à des intervalles d'observation (de 0 à 16 jours, de 16 à 32 jours, et de 32 à 48 jours) de la croissance, et ce, à partir du premier tiers des 48 jours expérimentaux (tableau 3.4). Tout d'abord, les masses (M) et les indices d'embonpoint (IE) des poissons alloués aux quatre traitements étaient similaires entre eux au temps 0 de l'expérience (tableau 3.4). Par la suite, la masse et l'indice d'embonpoint des poissons s'étant le plus alimentés étaient significativement supérieurs à ceux des poissons s'étant le moins alimentés après 16, 32 et 48 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P et**

5Cu > **1P** et **1Cu** ; MASSE $p_{16}=0,049$ $p_{32}=0,001$ et $p_{48}=0,021$; INDICE D'EMBOINPOINT $p_{16}=0,036$ $p_{32}<0,001$ et $p_{48}<0,001$).

Pour le premier tiers de l'expérience, la croissance de masse des poissons par rapport à la nourriture ingérée, en référence à l'ECN, était significativement plus faible chez les poissons du groupe **1Cu** comparativement à celle des autres groupes après l'intervalle de 0 à 16 jours d'exposition (effet d'interaction des deux facteurs expérimentaux ; **1P**, **5P** et **5Cu** > **1Cu** ; $p_{16}=0,039$). Parallèlement, la croissance de masse des poissons par rapport au temps passé, en référence au TCSM, était significativement plus importante chez les poissons du groupe **5Cu**, plus faible chez les poissons du groupe **1Cu**, et intermédiaire chez les poissons des deux autres groupes après l'intervalle de 0 à 16 jours d'exposition (effet d'interaction des deux facteurs expérimentaux ; **5Cu** > **1P** et **5P** > **1Cu** ; $p_{16}=0,027$). Enfin, la croissance en longueur des poissons par rapport au temps passé, en référence au TCSL, pour les poissons qui s'étaient le plus alimentés, était significativement supérieure à celle des poissons qui s'étaient le moins alimentés après l'intervalle de 0 à 16 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P** et **5Cu** > **1P** et **1Cu** ; $p_{16}<0,001$). De plus, contrairement à la croissance positive des poissons s'étant le plus alimentés, la croissance était négative chez les poissons qui s'étaient le moins alimentés au cours des 16 premiers jours expérimentaux (pour l'ECN, le TCSM et le TCSL).

Pour les derniers tiers de l'expérience, la croissance de masse des poissons par rapport à la nourriture ingérée (ECN) était significativement plus importante chez les poissons s'étant le plus alimentés que chez ceux s'étant le moins alimentés au cours des 16 à 32 jours et des 32 à 48 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P** et **5Cu** > **1P** et **1Cu** ; $p_{32}<0,001$ et $p_{48}<0,001$). Également, la croissance de masse des poissons par rapport au temps passé (TCSM) était significativement plus importante chez les poissons s'étant le plus alimentés que chez ceux s'étant le moins alimentés au cours des 16 à 32 jours ainsi que des 32 à 48 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P** et **5Cu** > **1P** et **1Cu** ; $p_{32}<0,001$ et $p_{48}<0,001$). Quant à elle, la croissance en longueur des poissons par rapport au temps passé (TCSL) était similaire entre les

quatre groupes au cours des 16 à 32 jours et des 32 à 48 jours d'exposition. Par ailleurs, la croissance était généralement négative pour les poissons des quatre groupes au cours de ces deux derniers intervalles de temps expérimental, à de rares exceptions près (pour l'ECN, le TCSM et le TCSL).

3.4 Voies métaboliques

L'activité des enzymes du catabolisme (PK, LDH, HOAD, CS, CCO ; tableau 3.5), rapportée en UI·g⁻¹tissus frais pour le corps (sauf le tube digestif) des poissons s'étant le plus alimentés, était significativement supérieure à celle des poissons s'étant le moins alimentés après 32 et 48 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P et 5Cu** > 1P et 1Cu ; PK p₃₂<0,001 et p₄₈=0,001 ; LDH p₃₂<0,001 et p₄₈=0,009 ; HOAD p₃₂<0,001 et p₄₈<0,001 ; CS p₃₂<0,001 et p₄₈<0,001 ; CCO p₃₂<0,001 et p₄₈<0,001). De plus, l'activité de la PK des poissons ayant ingéré des proies contaminées était significativement plus élevée que celle des poissons ayant ingéré des proies non contaminées après 48 jours d'exposition (effet du facteur d'exposition ; **1Cu et 5Cu** > 1P et 5P ; p₄₈=0,016). En complément, l'activité spécifique (AS) en UI·g⁻¹mg protéines de ces enzymes variait différemment (tableau 3.6). L'AS de la LDH des poissons s'étant le plus alimentés était significativement supérieure à celle des poissons s'étant le moins alimentés après 32 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P et 5Cu** > 1P et 1Cu ; p₃₂=0,032). Sinon, l'AS des autres enzymes du catabolisme (PK, HOAD, CS, CCO) était de niveau similaire entre les groupes après ces 32 jours d'exposition. Par contre, l'AS de ces cinq enzymes (PK, LDH, HOAD, CS, CCO) chez les poissons s'étant le plus alimentés était significativement plus élevée que chez ceux s'étant le moins alimentés après les 48 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P et 5Cu** > 1P et 1Cu ; PK p₄₈=0,015 ; LDH p₄₈=0,038 ; HOAD p₄₈=0,002 ; CS p₄₈=0,001 ; CCO p₄₈=0,003).

L'activité de l'enzyme NDPK de l'anabolisme (tableau 3.5), impliquée dans la biosynthèse des protéines contenues dans le corps des poissons s'étant le plus alimentés, était significativement plus importante, que celle des poissons s'étant le moins alimentés après 32 et 48 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P et 5Cu** > 1P et 1Cu ; $p_{32} < 0,001$ et $p_{48} < 0,001$). Parallèlement, l'AS de la NDPK (tableau 3.6) des poissons s'étant le plus alimentés était aussi significativement plus importante que celle des poissons s'étant le moins alimentés après 32 et 48 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P et 5Cu** > 1P et 1Cu ; $p_{32} = 0,002$ et $p_{48} = 0,003$).

L'activité des enzymes de défense antioxydante mesurée dans le corps des poissons différait selon l'enzyme considérée (SODT, SODM, SODCE, CAT ; tableau 3.5). L'activité de la SODT des poissons s'étant le plus alimentés était significativement supérieure à celle des poissons s'étant le moins alimentés après 32 et 48 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P et 5Cu** > 1P et 1Cu ; $p_{32} = 0,008$ et $p_{48} = 0,040$). L'activité de la SODM des poissons était similaire entre les quatre groupes après 32 et 48 jours d'exposition, par contre, l'activité de la SODCE et de la CAT des poissons s'étant le plus alimentés était significativement supérieure à celle des poissons s'étant le moins alimentés, tout comme pour la SODT, après 32 et 48 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P et 5Cu** > 1P et 1Cu ; SODCE $p_{32} = 0,010$ et $p_{48} = 0,019$; CAT $p_{32} < 0,001$ et $p_{48} < 0,001$). En parallèle, l'AS de la SODT était quant à elle similaire entre les quatre groupes après 32 et 48 jours d'exposition (tableau 3.6). Toutefois, celle de la SODM dans les poissons s'étant le moins alimentés était significativement plus importante que dans ceux s'étant le plus alimentés après 32 jours d'exposition seulement (effet du facteur d'alimentation ; **1P et 1Cu** > 5P et 5Cu ; $p_{32} = 0,021$), après quoi il n'y avait plus de tendance à la suite des 48 jours d'exposition. L'AS de la SODCE était similaire entre les quatre groupes après 32 et 48 jours d'exposition, mais, tout comme l'activité en UI·g⁻¹tissus frais de la CAT, l'AS de la CAT des poissons s'étant le plus alimentés était significativement supérieure à celle de ceux s'étant le moins alimentés après 32 et 48 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P et 5Cu** > 1P et 1Cu ; $p_{32} < 0,001$ et $p_{48} < 0,001$).

Tableau 3.5 Statistiques sommaires de l'activité enzymatique des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (voies métaboliques)

Poissons	1P	1Cu	5P	5Cu	Effets significatifs
<i>Après 32 jours d'exposition</i>					
PK	6,3 ± 1,6 (15)	7,0 ± 2,6 (10)	10,5 ± 3,5 (15)	11,5 ± 5,3 (15)	TA
LDH	74,2 ± 41,1 (15)	69,1 ± 57,1 (10)	121,3 ± 42,2 (15)	148,1 ± 87,6 (15)	TA
HOAD	0,79 ± 0,24 (15)	0,72 ± 0,23 (10)	1,09 ± 0,27 (15)	1,10 ± 0,33 (15)	TA
CS	1,68 ± 0,45 (15)	1,49 ± 0,30 (10)	2,34 ± 0,25 (15)	2,24 ± 0,33 (15)	TA
CCO	14,5 ± 3,8 (15)	13,4 ± 3,8 (10)	19,9 ± 4,0 (15)	21,5 ± 4,0 (15)	TA
NDPK	174,5 ± 85,9 (15)	139,4 ± 90,9 (10)	293,9 ± 112,6 (15)	282,3 ± 72,4 (15)	TA
SODT	459,3 ± 108,1 (15)	469,6 ± 176,0 (10)	571,9 ± 182,2 (15)	608,4 ± 198,6 (15)	TA
SODM	158,8 ± 48,5 (15)	138,0 ± 64,0 (10)	157,1 ± 57,6 (15)	155,6 ± 42,5 (15)	
SODCE	300,5 ± 76,5 (15)	331,6 ± 189,8 (10)	414,8 ± 171,7 (15)	452,8 ± 209,3 (15)	TA
CAT	820,4 ± 700,5 (15)	562,0 ± 281,6 (10)	2192,2 ± 628,6 (15)	2128,2 ± 898,6 (15)	TA
GST	13,9 ± 1,5 (15)	13,8 ± 3,0 (10)	14,3 ± 3,2 (15)	14,2 ± 1,9 (15)	
<i>Après 48 jours d'exposition</i>					
PK	4,6 ± 1,6 (6)	5,1 ± 1,7 (7)	7,2 ± 2,1 (15)	10,7 ± 5,1 (13)	TA et Cu
LDH	52,8 ± 19,1 (6)	52,1 ± 27,9 (7)	88,0 ± 45,5 (15)	79,1 ± 24,3 (13)	TA
HOAD	0,55 ± 0,29 (6)	0,58 ± 0,15 (7)	1,12 ± 0,35 (15)	0,99 ± 0,25 (13)	TA
CS	1,27 ± 0,29 (6)	1,39 ± 0,55 (7)	2,02 ± 0,42 (15)	2,24 ± 0,46 (13)	TA
CCO	11,1 ± 3,6 (6)	11,0 ± 4,5 (7)	18,0 ± 6,3 (15)	19,3 ± 4,7 (13)	TA
NDPK	91,9 ± 46,5 (6)	99,7 ± 64,5 (7)	216,1 ± 124,0 (15)	227,9 ± 104,5 (13)	TA
SODT	439,0 ± 78,8 (6)	458,7 ± 99,0 (7)	535,9 ± 141,4 (15)	529,1 ± 104,5 (13)	TA
SODM	158,4 ± 27,3 (6)	160,9 ± 47,2 (7)	149,2 ± 59,4 (15)	171,7 ± 53,1 (13)	
SODCE	280,6 ± 99,5 (6)	297,8 ± 108,5 (7)	386,7 ± 119,3 (15)	357,4 ± 70,2 (13)	TA
CAT	384,1 ± 376,8 (6)	398,6 ± 307,7 (7)	1872,8 ± 1033,4 (15)	2450,1 ± 1278,0 (13)	TA
GST	12,0 ± 3,2 (6)	12,2 ± 1,8 (7)	13,7 ± 1,8 (15)	14,7 ± 2,9 (13)	TA

Activité enzymatique en $U \cdot g^{-1}$ tissu frais de la pyruvate kinase (PK), lactate déshydrogénase (LDH), β -hydroxyacyl Co-A déshydrogénase (HOAD), citrate synthase (CS), cytochrome C oxydase (CCO), nucléotide diphosphate kinase (NDPK), superoxyde dismutase totale (SODT), mitochondriale (SODM) et cytosolique & extracellulaire (SODCE), catalase (CAT), et glutathion S-transférase (GST). Les 4 traitements découlant de la combinaison des facteurs expérimentaux sont énumérés ci-après : 1%*nourriture propre (1P), 1%*nourriture contaminée au cuivre (1Cu), 5%*nourriture propre (5P), 5%*nourriture contaminée au cuivre (5Cu). Les données présentées dans le tableau suivent cette séquence : moyenne \pm écart-type (n). Les résultats statistiques (Effets significatifs) proviennent des tests ANOVA effectués selon le facteur d'alimentation (taux d'alimentation ; TA), le facteur d'exposition (présence ou absence de contamination des proies ingérées ; Cu) et selon l'interaction des 2 facteurs expérimentaux (TA*Cu). Tous les effets présentés sont significatifs ($p < 0,05$).

Tableau 3.6 Statistiques sommaires de l'activité spécifique des enzymes des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (voies métaboliques)

Poissons	1P	1Cu	5P	5Cu	Effets significatifs
<i>Après 32 jours d'exposition</i>					
PK	0,071 ± 0,019 (15)	0,082 ± 0,020 (10)	0,090 ± 0,027 (15)	0,094 ± 0,044 (15)	
LDH	0,80 ± 0,37 (15)	0,77 ± 0,49 (10)	1,05 ± 0,36 (15)	1,24 ± 0,94 (15)	TA
HOAD	0,0087 ± 0,0019 (15)	0,0088 ± 0,0032 (10)	0,0095 ± 0,0025 (15)	0,0090 ± 0,0029 (15)	
CS	0,019 ± 0,005 (15)	0,018 ± 0,004 (10)	0,021 ± 0,003 (15)	0,018 ± 0,004 (15)	
CCO	0,16 ± 0,05 (15)	0,16 ± 0,02 (10)	0,17 ± 0,04 (15)	0,18 ± 0,04 (15)	
NDPK	1,86 ± 0,67 (15)	1,55 ± 0,76 (10)	2,55 ± 0,93 (15)	2,31 ± 0,70 (15)	TA
SODT	5,1 ± 0,9 (15)	5,5 ± 1,3 (10)	5,0 ± 1,7 (15)	4,9 ± 1,4 (15)	
SODM	1,77 ± 0,47 (15)	1,68 ± 0,83 (10)	1,41 ± 0,61 (15)	1,29 ± 0,45 (15)	TA
SODCE	3,4 ± 0,7 (15)	3,8 ± 1,9 (10)	3,6 ± 1,5 (15)	3,6 ± 1,4 (15)	
CAT	8,2 ± 5,7 (15)	6,7 ± 2,8 (10)	19,0 ± 4,8 (15)	16,7 ± 5,3 (15)	TA
GST	0,16 ± 0,04 (15)	0,17 ± 0,03 (10)	0,13 ± 0,03 (15)	0,12 ± 0,03 (15)	TA
<i>Après 48 jours d'exposition</i>					
PK	0,056 ± 0,017 (6)	0,056 ± 0,018 (7)	0,071 ± 0,016 (15)	0,097 ± 0,051 (13)	TA
LDH	0,63 ± 0,16 (6)	0,55 ± 0,25 (7)	0,87 ± 0,39 (15)	0,70 ± 0,20 (13)	TA
HOAD	0,0070 ± 0,0039 (6)	0,0064 ± 0,0017 (7)	0,0114 ± 0,0041 (15)	0,0089 ± 0,0025 (13)	TA
CS	0,016 ± 0,003 (6)	0,015 ± 0,005 (7)	0,021 ± 0,005 (15)	0,020 ± 0,004 (13)	TA
CCO	0,14 ± 0,05 (6)	0,12 ± 0,04 (7)	0,18 ± 0,05 (15)	0,17 ± 0,04 (13)	TA
NDPK	1,17 ± 0,78 (6)	1,06 ± 0,61 (7)	2,08 ± 1,02 (15)	2,00 ± 0,84 (13)	TA
SODT	5,4 ± 1,2 (6)	5,0 ± 0,9 (7)	5,4 ± 1,3 (15)	4,8 ± 1,2 (13)	
SODM	2,00 ± 0,66 (6)	1,74 ± 0,43 (7)	1,51 ± 0,65 (15)	1,54 ± 0,51 (13)	
SODCE	3,4 ± 1,1 (6)	3,2 ± 1,2 (7)	3,9 ± 1,2 (15)	3,3 ± 0,9 (13)	
CAT	4,4 ± 4,0 (6)	4,2 ± 2,9 (7)	18,1 ± 8,9 (15)	21,3 ± 10,1 (13)	TA
GST	0,15 ± 0,06 (6)	0,13 ± 0,03 (7)	0,14 ± 0,02 (15)	0,13 ± 0,03 (13)	

Activité spécifique en UI·mg⁻¹protéines de la pyruvate kinase (PK), lactate déshydrogénase (LDH), β-hydroxyacyl Co-A déshydrogénase (HOAD), citrate synthase (CS), cytochrome C oxydase (CCO), nucléotide diphosphate kinase (NDPK), superoxyde dismutase totale (SODT), mitochondriale (SODM) et cytosolique & extracellulaire (SODCE), catalase (CAT), et glutathion S-transférase (GST). Les 4 traitements découlant de la combinaison des facteurs expérimentaux sont énumérés ci-après : 1%*nourriture propre (1P), 1%*nourriture contaminée au cuivre (1Cu), 5%*nourriture propre (5P), 5%*nourriture contaminée au cuivre (5Cu). Les données présentées dans le tableau suivent cette séquence : moyenne ± écart-type (n). Les résultats statistiques (Effets significatifs) proviennent des tests ANOVA effectués selon le facteur d'alimentation (taux d'alimentation ; TA), le facteur d'exposition (présence ou absence de contamination des proies ingérées ; Cu) et selon l'interaction des 2 facteurs expérimentaux (TA*Cu). Tous les effets présentés sont significatifs (p<0,05).

Finalement, l'activité de l'enzyme de défense détoxiquante GST était de niveau similaire entre les quatre groupes après 32 jours d'exposition (tableau 3.5), cependant, l'activité de la GST des poissons s'étant le plus alimentés était significativement supérieure à celle des poissons s'étant le moins alimentés après 48 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **5P et 5Cu** > 1P et 1Cu ; $p_{48}=0,017$). Inversement, mais tout comme pour l'AS de la SODM, l'AS de la GST (tableau 3.6) des poissons s'étant le moins alimentés était significativement supérieure à celle des poissons s'étant le plus alimentés après 32 jours d'exposition (effet du facteur d'alimentation ; **1P et 1Cu** > 5P et 5Cu ; $p_{32}<0,001$), après quoi, l'AS était similaire entre les quatre groupes après 48 jours d'exposition.

4. DISCUSSION

Comme l'alimentation est la source d'énergie pouvant être entreposée ou dépensée pour l'ensemble des besoins métaboliques des poissons, la quantité et la qualité disponibles de nourriture se reflètent dans la composition biochimique de leurs tissus corporels, particulièrement dans les réserves énergétiques (protéines et lipides), et dans diverses composantes du métabolisme (dont les principales sont le métabolisme de base, la digestion, la croissance, la reproduction, la locomotion et la détoxification). Dans les milieux naturels contaminés, en plus du coût énergétique associé à la gestion de l'absorption excessive des métaux (excrétion, détoxification, réparation), les poissons subissent les effets indirects liés à la réduction de la disponibilité et de la diversité de la nourriture (Iles & Rasmussen 2005 ; Rasmussen *et al.* 2008), ce qui peut également affecter le métabolisme énergétique des poissons (Kiessling *et al.* 1990 ; Wieser *et al.* 1992 ; Martínez *et al.* 2002 ; Sherwood *et al.* 2002 ; Guderley *et al.* 2003 ; Rennie *et al.* 2005 ; Rasmussen *et al.* 2008). Cette étude examine donc simultanément les conséquences de deux agents stressants, la restriction du régime alimentaire combinée à l'exposition alimentaire au cuivre, selon une concentration représentative de la contamination des milieux naturels d'exposition chronique, sur les réserves énergétiques, le taux métabolique, les capacités métaboliques et la croissance du tête-de-boule. De plus, grâce à une alimentation individualisée des poissons, elle incorpore des informations sur l'accumulation corporelle du cuivre résultant de l'ingestion quotidienne, et ce, à long terme, de proies naturelles ayant absorbé le cuivre biologiquement selon une méthode reproductible de laboratoire. À notre connaissance, elle est la première étude de cette nature. L'approche statistique choisie a permis d'examiner individuellement les effets du taux d'alimentation et de la contamination en cuivre de la nourriture sur les paramètres présentés ci-après. Dans un premier temps, l'influence du taux d'alimentation sur le statut énergétique est explorée (concentrations en protéines et en lipides, réserves énergétiques, taux métabolique de routine, croissance ; section 4.1.1), ainsi que sur les capacités métaboliques (section 4.1.2) et la bioaccumulation du cuivre (section 4.1.3). Dans un

deuxième temps, l'influence du cuivre alimentaire est examinée en vue de ces mêmes variables (section 4.2), alors que dans la section 4.3, elles sont finalement prises en considération sous l'influence combinée des deux types de stress.

4.1 Impact du taux d'alimentation

4.1.1 Statut énergétique

Tout d'abord, tous les poissons, même ceux ayant ingéré le plus de nourriture, ont manifestement été exposés à une restriction alimentaire au cours de cette expérience. Après avoir été quotidiennement alimentés selon une quantité équivalente à 1 ou 5 % de leur masse corporelle, les poissons avaient en moyenne perdu 39 % ou 29 % de leurs réserves énergétiques initiales à la suite de l'expérience, respectivement (Annexe C).

Après 32 jours d'exposition, les concentrations en protéines, en lipides et les réserves énergétiques totales étaient supérieures respectivement de 37 %, 22 % et 35 % chez les poissons s'étant le plus alimentés (5P et 5Cu). Ces résultats indiquent que la composition du corps était rapidement affectée par le régime alimentaire, et que les protéines étaient la plus sensible des composantes tissulaires affectées. Après 48 jours, ces différences selon les deux taux d'alimentation tendaient à diminuer, car les protéines et les réserves n'étaient plus que 22 % et 16 % plus importantes chez les poissons s'étant le plus alimentés, respectivement, appuyant la conclusion que même ces derniers souffraient d'une restriction alimentaire (tableau 3.3). Comme le manque de nourriture mène à la réduction de la concentration en ARN et du nombre de ribosomes des cellules, il mène à la réduction de la capacité synthétique des protéines (Jobling 1994), ce qui pourrait expliquer la diminution de la concentration en protéines plus marquée chez les poissons ayant ingéré le moins de nourriture. Par ailleurs, la différence obtenue pour le taux métabolique de routine des poissons en fonction de leur taux d'alimentation était 2,5 fois plus importante que celle des réserves après 32 jours d'exposition (5P et 5Cu > 1P et 1Cu ; TMR 89 %

vs RÉSERVES 35 %) ainsi que 4,4 fois plus importante après 48 jours d'exposition (5P et 5Cu > 1P et 1Cu ; TMR 71 % vs RÉSERVES 16 %).

Ces résultats semblent en accord avec les observations rapportées par Jobling (1994) selon lesquelles le taux métabolique à jeun mesuré chez les animaux en croissance est supérieur chez les animaux bien nourris en comparaison avec ceux qui ont été sujets à de longues périodes de malnutrition ou de jeûne. Par ailleurs, ils indiquent que le taux métabolique des poissons est plus sensible vis-à-vis la quantité de nourriture ingérée que les réserves énergétiques des tissus corporels. En fait, la réduction de la capacité synthétique des protéines pourrait globalement aboutir à l'affaiblissement du cycle de renouvellement (entre la synthèse et la dégradation) des protéines, de sorte que l'activité métabolique diminue, mais les réserves énergétiques se maintiennent (Jobling 1994). Certes, si les activités physiologiques gérant la synthèse protéique sont réduites, les dépenses énergétiques qui y sont liées doivent être moins grandes.

Par ailleurs, les réserves énergétiques sont mobilisées en réponse à une réduction de l'apport alimentaire. Chez la morue atlantique, les lipides hépatiques sont d'abord utilisés, suivis du glycogène du foie et du muscle blanc, des protéines du muscle blanc et rouge, et du glycogène du muscle rouge, au bout de quoi après plusieurs semaines de jeûne, la morue ne repose plus que sur les protéines restantes de ses composantes tissulaires (Black & Love 1986). Dans de telles circonstances, lorsque les composantes tissulaires sont mobilisées, en d'autres termes lorsque les réserves énergétiques sont utilisées, l'implication d'enzymes lysosomales sont nécessaires (Guderley *et al.* 2003). En conséquence, lorsque les poissons sont soumis à une période de réduction de l'apport alimentaire, ils nécessitent quand même une présence de base en protéines (par exemple, une production de base en protéines pour supporter le métabolisme basal ou des activités essentielles comme les enzymes lysosomales sus-mentionnées). L'exemple précédent illustre une des raisons pour lesquelles des dépenses énergétiques se poursuivent lorsque l'apport alimentaire des poissons est restreint ou lorsque ces derniers sont en situation de jeûne. Le taux métabolique étant une mesure indirecte de la production d'énergie de l'organisme, donc à la fois

des besoins énergétiques, il supporte une abondance de besoins métaboliques, qui additionnés, doivent être comblés par cette production d'énergie. Ainsi, le taux métabolique de routine pourrait constituer un paramètre encore plus sensible que la concentration en protéines par rapport à la réduction du régime alimentaire.

Comme la croissance des poissons selon la quantité de nourriture ingérée entre 16 et 32 jours d'exposition était de 93 % plus importante chez les poissons s'étant le plus alimentés, ainsi que 90 % après 32 à 48 jours d'exposition (efficacité de conversion de la nourriture ; tableau 3.4), il semble que la croissance était affectée de manière similaire à celle du taux métabolique de routine (tel que décrit précédemment dans cette section). Ces résultats de croissance montrent qu'après 16 à 48 jours d'exposition, la croissance des poissons était affectée par le taux d'alimentation, une conclusion similaire à celle de Kamunde & Wood (2003) après 9 à 35 jours d'exposition au cuivre alimentaire chez la truite arc-en-ciel. Cependant, la croissance était négative pour tous les tête-de-boules de notre étude entre les jours 16 et 48, au contraire de l'étude de Kamunde & Wood (2003) où la réduction de croissance s'exprimait selon le taux d'alimentation des poissons tout en demeurant en croissance positive. Cette observation montre à quel point les régimes alimentaires utilisés au cours de notre expérience étaient stricts.

Globalement, les résultats de cette section démontrent l'importance que jouait la restriction du régime alimentaire sur les réserves, le taux métabolique de routine et la croissance des poissons après 32 et 48 jours d'exposition à leur traitement.

4.1.2 Voies métaboliques

La majorité des enzymes suivies avaient une réponse variant en fonction du régime alimentaire. Les poissons s'étant le moins alimentés avaient une activité ($\text{UI}\cdot\text{g}^{-1}$ tissus frais) inférieure à celle des poissons s'étant le plus alimentés, à quelques exceptions près ($\text{UI}\cdot\text{mg}^{-1}$ protéines).

Après 32 jours d'exposition, les enzymes du catabolisme des poissons ayant ingéré moins de nourriture étaient plus affectées dans leurs capacités anaérobies (**1P et 1Cu** < 5P et 5Cu ; PK₃₂ 39 % et LDH₃₂ 47 % inférieures) que dans leurs capacités aérobie par rapport aux poissons s'étant le plus alimentés (**1P et 1Cu** < 5P et 5Cu ; HOAD₃₂ 31 %, CS₃₂ 31 % et CCO₃₂ 33 % inférieures). Cette tendance était moins claire après 48 jours d'exposition (tableau 3.5). Il semble que les capacités anaérobies se comportaient différemment (**1P et 1Cu** < 5P et 5Cu ; PK₄₈ 46 % et LDH₄₈ 37 % inférieures), et que les capacités aérobie étaient plus affectées après cette période de temps (**1P et 1Cu** < 5P et 5Cu ; HOAD₄₈ 46 %, CS₄₈ 37 % et CCO₄₈ 41 % inférieures). De manière générale, la baisse des enzymes du catabolisme suggère que l'utilisation des réserves était plus faible pour les poissons s'étant le moins alimentés. Par ailleurs, comme leurs capacités biosynthétiques étaient largement réduites après 32 et 48 jours d'exposition (**1P et 1Cu** < 5P et 5Cu ; NDPK₃₂ 46 % et NDPK₄₈ 57 % inférieures), ces résultats indiquent que moins de protéines étaient synthétisées, que moins de réserves étaient utilisées dans cette voie de l'anabolisme, et conséquemment, que les voies cataboliques ainsi que la croissance des poissons ayant ingéré moins de nourriture étaient davantage réduites en comparaison à celles des poissons ayant ingéré plus de nourriture.

La SODT et SODCE des poissons s'étant le moins alimentés étaient affectées de manière similaire à la concentration en protéines après 32 jours d'exposition (**1P et 1Cu** < 5P et 5Cu ; SODT₃₂ 21 %, SODCE₃₂ 27 % et PROTÉINES₃₂ 27 % inférieures), une tendance qui se maintenait approximativement après 48 jours d'exposition (**1P et 1Cu** < 5P et 5Cu ; SODT₄₈ 16 %, SODCE₄₈ 22 % et PROTÉINES₄₈ 18 % inférieures). Par contre, l'activité de la catalase de ces poissons était intensément plus faible que celle des poissons s'étant le plus alimentés après 32 jours d'exposition, une tendance qui s'accroissait encore plus après 48 jours d'exposition (**1P et 1Cu** < 5P et 5Cu ; CAT₃₂ 68 % et CAT₄₈ 82 % inférieure). Finalement, l'activité de la GST était aussi affectée, mais seulement après 48 jours d'exposition, et ce dans une moindre mesure (**1P et 1Cu** < 5P et 5Cu ; GST₄₈ 15 % inférieure). Ces résultats indiquent que les capacités antioxydantes et de détoxification étaient généralement réduites chez les poissons s'étant le moins alimentés, ce qui pourrait s'expliquer par la baisse généralisée des fonctions de synthèse (par exemple, la NDPK),

et par la présence moins grande de radicaux libres dans leurs cellules, étant donné que leurs activités aérobies (en présence d'oxygène) étaient moins élevées (taux métabolique de routine et capacités enzymatiques précédemment mentionnées dans la section 4.1.1). Des études ont montré qu'environ 1 à 4 % de l'oxygène consommé au niveau mitochondrial est converti en radicaux libres (revu par Guderley *et al.* 2003), mais il semble qu'en plus, des radicaux soient générés au niveau nucléaire (revu dans Zorov *et al.* 1997). Suite à un jeûne prolongé, une baisse des capacités aérobies mesurées dans le muscle blanc de morues (CS et CCO) suggérait aussi une diminution du taux de production des radicaux libres (Pelletier *et al.* 1993 ; Guderley *et al.* 2003 ; Martínez *et al.* 2003). Par ailleurs, l'activité de la catalase mesurée dans les tissus du tête-de-boule était plus affectée que les autres enzymes de défense, mais aussi plus affectée que toutes les enzymes des voies métaboliques examinées dans notre étude. En plus d'avoir été énormément affectée chez les poissons ayant ingéré moins de nourriture après 32 et 48 jours d'exposition (en $\text{UI}\cdot\text{g}^{-1}$ tissus frais), l'activité spécifique ($\text{UI}\cdot\text{mg}^{-1}$ protéines) de cette enzyme en était presque autant affectée (**1P et 1Cu** < 5P et 5Cu ; CAT_{32} 58 % et CAT_{48} 78 % inférieure).

Ces résultats contrastent avec ceux obtenus dans les tissus de morues à la suite de 12 semaines de jeûne (Guderley *et al.* 2003). L'activité spécifique de la catalase était plus importante dans le foie ou maintenue dans le muscle blanc de ces morues en comparaison avec l'activité spécifique observée dans les tissus des morues ayant été alimentés à satiété. Cette étude a démontré que les capacités de la catalase étaient épargnées lors d'un stress alimentaire prolongé, et qu'en plus, l'activité de cette enzyme paraissait surpasser celle de la glutathion peroxydase, toutes deux des enzymes importantes impliquées dans la neutralisation du peroxyde d'hydrogène (cytosol, mitochondries, peroxysomes). Parmi les radicaux libres, ces sous-produits du métabolisme cellulaire, le peroxyde d'hydrogène serait potentiellement le plus destructeur de tous (Zorov *et al.* 1997). Ainsi, les capacités antioxydantes jouent un rôle primordial dans la structure et la fonction des cellules (Xiang & Shao 2003). Alors que les macromolécules sont mobilisées pendant une situation de jeûne prolongé et que les cellules sont particulièrement vulnérables aux dommages causés par les radicaux libres, l'étude de Guderley *et al.* (2003) suggérait que la catalase

maintenait son rôle protecteur contre les radicaux libres dans les tissus de la morue atlantique en situation de jeûne. Étonnamment, la baisse d'activité spécifique de la catalase dans les tissus des tête-de-boules ayant été le moins alimentés pendant les 48 jours de notre étude était plutôt similaire à celle mesurée dans les lignées cellulaires de carpes à la suite d'une exposition directe au Cd^{2+} de deux à huit heures, comparativement au groupe témoin (Xiang & Shao 2003). L'activité spécifique de la catalase avait baissé à 25 % de leur groupe témoin, alors que l'activité des tête-de-boules ayant le moins ingéré de nourriture a baissé à 22 % de celle des poissons s'étant le plus alimentés à la suite des 48 jours d'exposition de notre étude. Les auteurs de cette étude suggéraient que l'inhibition des enzymes antioxydantes mènerait à la production excessive de radicaux libres et possiblement à l'apoptose des cellules (toxicité du cadmium). Quoique notre étude présentait une réduction similaire de l'activité spécifique de la catalase, la raison n'était évidemment pas la même, et se rapprochait plus de la suggestion contraire aux résultats de Guderley *et al.* (2003), selon laquelle la catalase n'accomplirait pas son rôle protecteur contre les radicaux libres. Nos résultats ne permettent pas d'expliquer clairement, pour les tête-de-boules ayant ingéré moins de nourriture, l'importante baisse subie chez cette enzyme de défense antioxydante. Nos résultats indiquent, toutefois, une capacité de défense affaiblie ou peut-être incomplète devant un excès de radicaux libres chez ces poissons ayant ingéré moins de nourriture, ce qui suggère qu'ils soient en proie aux dommages oxydatifs, ou du moins, qu'ils soient moins aptes à se défendre contre le stress oxydant.

Ces différences marquées entre la morue atlantique et le tête-de-boule, en réponse à une situation de réduction de l'apport alimentaire, pourraient être dues à des différences interspécifiques. Comme la morue atlantique subit régulièrement de longues périodes de restriction alimentaire au cours de son cycle vital (Martínez *et al.* 1999), son métabolisme est sûrement mieux adapté à réagir face à un tel stress que ne l'est celui du tête-de-boule, par exemple en maintenant une protection adéquate contre les radicaux libres (Guderley *et al.* 2003). Au contraire, le tête-de-boule soumis à une restriction alimentaire n'était apparemment pas apte à se défendre contre le stress oxydant dans le contexte de notre étude.

Par ailleurs, la SODM et de la GST du tête-de-boule étaient les seules enzymes dont l'activité spécifique était plus importante chez les poissons s'étant le moins alimentés, mais seulement après 32 jours d'exposition (**1P et 1Cu** > 5P et 5Cu ; SODM₃₂ 27 % et GST₃₂ 34 % supérieure). Ces résultats suggèrent que les poissons ayant le moins ingéré de nourriture ont donné priorité à la synthèse de ces deux enzymes afin de maintenir leurs capacités de défense, puisque malgré la baisse de 46 % de la biosynthèse (NDPK) et de 27 % de la concentration en protéines, l'activité tissulaire de la SODM et de la GST (UI·g⁻¹ tissus frais) n'était pas affectée par le régime alimentaire.

De manière générale, l'activité des enzymes était affectée par le taux d'alimentation encore plus après 48 jours qu'après 32 jours d'exposition aux traitements, ce qui corrobore les résultats obtenus pour les réserves énergétiques, le taux métabolique et la croissance précédemment discutés, et donc avec la conclusion selon laquelle tous les poissons de notre étude ont subi une importante restriction alimentaire.

4.1.3 Bioaccumulation du cuivre

Après 32 et 48 jours d'exposition des tête-de-boules aux différents traitements, l'accumulation du cuivre dans le corps (sans le tube digestif) ne variait pas entre les traitements en fonction du taux d'alimentation (tableau 3.2). Cette conclusion rejoint celle des travaux de Kamunde & Wood (2003) lorsqu'ils exprimaient l'accumulation du cuivre, selon la charge totale, dans le corps des truites arc-en-ciel soumises à des conditions expérimentales similaires à celles de notre étude. Les concentrations de cuivre dans le corps des tête-de-boules étaient par ailleurs comparables à celles rapportées pour le muscle de perchaudes récoltées, tant dans des lacs contaminés que dans les lacs propres de Sudbury, en Ontario (Pyle *et al.* 2005). Comme la concentration de cuivre dans la paroi du tube digestif répondait en fonction du taux d'alimentation, alors que la concentration dans le corps n'était pas influencée, ces résultats suggèrent que les poissons avaient la capacité de gérer la charge de cuivre reçue de l'alimentation après 32 jours d'exposition.

Parmi les deux groupes de poissons ayant ingéré des proies contaminées pendant ces 32 jours, la différence d'accumulation du cuivre (DACu) et le bilan journalier de rendement alimentaire de charge du cuivre (BRACu) dans leur corps étaient plus élevés chez le groupe de poissons s'étant le moins alimenté (1Cu > 5Cu ; DACu₃₂ 157 % et BRACu₃₂ 372 % supérieurs ; figure 3.2). Bien que les valeurs étaient négatives et petites, ces différences significatives montrent (1) que le faible taux d'alimentation conduisait à une accumulation corporelle plus importante en lien avec l'ingestion quotidienne à long terme de proies contaminées en cuivre. Mais, puisque d'après le taux d'alimentation de ces poissons (1Cu), ils maintenaient leur concentration corporelle en cuivre similaire aux trois autres groupes de poissons (tableau 3.2), nos résultats suggèrent forcément que, pour des raisons non expliquées par les données disponibles, la différence entre les poissons ayant ingéré 1 % ou 5 % de leur masse corporelle en proies contaminées, se situerait soit (2) au niveau de l'assimilation corporelle du cuivre, soit (3) au niveau des pertes ou de l'utilisation physiologique du cuivre. Deux explications semblent plausibles. Les poissons du groupe 1Cu pourraient avoir internalisé une plus grande quantité de cuivre et en avoir à la fois perdu plus, ou avoir physiologiquement utilisé moins de cuivre qui était déjà accumulé dans leur corps. Par ailleurs, les poissons du groupe 5Cu pourraient avoir eu d'importantes pertes physiologiques de cuivre compensées à la fois par une internalisation importante, ou avoir utilisé plus de cuivre qui était déjà accumulé dans leur corps.

Pour cette même période de temps, l'influence du taux d'alimentation sur l'accumulation du cuivre dans la paroi du tube digestif des poissons différait de ce qui était observé dans leur corps, pour lequel la concentration en cuivre n'était pas influencée (tableau 3.2). À l'inverse, la concentration en cuivre était plus importante dans la paroi du tube digestif des poissons s'étant le plus alimentés (5P et 5Cu > 1P et 1Cu ; [Cu] tube digestif₃₂ 16 % supérieure). Ces résultats suggèrent que la quantité de nourriture ayant été ingérée influençait positivement l'accumulation de cuivre dans la paroi du tube digestif, sans pour autant donner d'indication en ce qui a trait à la présence ou non de cuivre en excès dans la nourriture, puisque par rapport au taux d'alimentation, encore, la DACu, DRACu et le BRACu pour la paroi du tube digestif étaient identiques entre les

poissons des groupes ayant ingéré des proies contaminées (figure 3.2). Nos résultats suggèrent ainsi que, pour des raisons non expliquées par les données disponibles, la différence dans l'accumulation tissulaire du tube digestif doit être liée, tout comme pour l'accumulation corporelle, à une variation dans l'assimilation ou l'excrétion du cuivre. Apparemment, soit cette différence n'est pas liée à la quantité de cuivre ingérée par la nourriture, soit elle l'est, mais masquée sous la capacité d'homéostasie de la paroi du tube digestif pour le cuivre. Effectivement, il est possible que le tube digestif jouait partiellement un rôle protecteur de rétention ou d'entreposage du cuivre chez les poissons ayant ingéré plus de proies contaminées (un peu plus d'accumulation dans l'épithélium intestinal versus une faible accumulation dans le corps). Il est aussi possible que chez les poissons s'étant le moins alimentés en proies contaminées (1Cu), la capacité générale d'absorption des nutriments de la nourriture à travers la paroi du tube digestif était accentuée (un peu moins d'accumulation dans l'épithélium intestinal versus une forte accumulation corporelle).

Après 48 jours d'exposition, les variables discutées se comportent différemment en fonction du taux d'alimentation considéré seul. Bien que l'accumulation corporelle était encore la même à travers les quatre groupes de poissons, à l'inverse du premier temps d'échantillonnage, la DACu et le BRACu devenaient similaires entre les poissons ayant ingéré 1 % ou 5 % de leur masse corporelle en proies contaminées. Par ailleurs, la DRACu devenait plus importante chez le groupe de poissons s'étant le plus alimenté en proies contaminées ($5Cu > 1Cu$; $DRACu_{48}$ 430 % supérieure). Ces résultats semblent donc indiquer que, tout de même, le taux d'alimentation influençait l'accumulation corporelle du cuivre à la suite de l'ingestion de proies contaminées au cuivre. Par contre, il semble que cette influence soit plus subtile, puisque la DACu et le BRACu étaient similaires entre les poissons du groupe 1Cu et 5Cu après l'expérience.

Finalement, alors qu'après 32 jours d'exposition il n'y avait aucune différence entre les poissons ayant ingéré 1 % ou 5 % de leur masse corporelle en proies contaminées, la DACu et le BRACu de la paroi du tube digestif étaient plus élevés chez les poissons ayant le plus mangé ($5Cu >$

1Cu ; DACu₄₈ 167 % et BRACu₄₈ 257 %). Ces résultats montrent une influence du régime alimentaire sur l'accumulation du cuivre alimentaire dans l'épithélium du tube digestif des poissons ayant ingéré des proies contaminées, et ils suggèrent par ailleurs, que le temps d'exposition influençait la réponse au niveau du tube digestif, étant donné que celle évaluée à la suite des 48 jours différait de la réponse obtenue après 32 jours d'exposition.

D'après les données disponibles, le taux d'alimentation n'influencait pas la bioaccumulation du corps, mais il influençait à lui seul la bioaccumulation dans la paroi du tube digestif après 32 jours d'exposition seulement. Il influençait par ailleurs, mais sans tendance générale dans le temps et à travers le corps ou le tube digestif, les patrons d'accumulation en lien avec la nourriture contaminée ingérée. La difficulté de poser des constats pourrait être liée à la nature complexe du cuivre comme étant un métal essentiel dont l'homéostasie est régulée par le tête-de-boule, et par le fait que le nombre d'échantillons était petit. En fait, il n'est pas possible de conclure à ce stade-ci de l'analyse si le cuivre provenant de l'alimentation des poissons a été internalisé ou non dans le corps.

4.2 Impact de l'exposition au cuivre

4.2.1 Statut énergétique

Après 48 jours d'exposition, la concentration en protéines et les réserves des poissons ayant ingéré des proies contaminées étaient plus élevées que celles des poissons ayant ingéré des proies non contaminées, et ce, indépendamment du régime alimentaire (1Cu et 5Cu > 1P et 5P ; PROTÉINES₄₈ 12 % et RÉSERVES₄₈ 15 % supérieures). La différence obtenue selon le régime alimentaire était plus intense pour les protéines (TAUX D'ALIMENTATION₄₈ 22 % vs EXPOSITION AU CUIVRE₄₈ 12 %), mais de niveau similaire pour les réserves globales (TAUX D'ALIMENTATION₄₈ 16 % vs EXPOSITION AU CUIVRE₄₈ 15 %). Ainsi, l'influence du cuivre ingéré par le tête-de-boule sur ses réserves corporelles semble non négligeable. De plus, il y avait une relation positive entre

l'accumulation du cuivre dans la paroi du tube digestif et les concentrations en protéines, lipides et les réserves mesurées dans le corps à la suite des 48 jours d'exposition. En fait, les poissons ayant ingéré des proies contaminées (plus de cuivre) se sont révélés avoir accumulé moins de cuivre dans leur corps, et après 48 jours d'exposition, avoir plus de protéines et de réserves dans leurs corps. Par ailleurs, les valeurs des protéines et des réserves dans leur corps étaient plus faibles après ces 48 jours que celles des valeurs initiales en annexe C (PROTÉINES 20 % et RÉSERVES 29 % inférieures), mais à la fois celles qui étaient les moins affectées par l'exposition au cuivre. Effectivement, après 48 jours d'exposition, les poissons ayant ingéré des proies non contaminées avaient des valeurs en protéines et en réserves encore plus faibles vis-à-vis les valeurs initiales (PROTÉINES 29 % et RÉSERVES 38 % inférieures). Les résultats obtenus démontrent donc qu'au moins dans le contexte expérimental de restriction alimentaire de notre étude, une faible charge journalière ingérée de cuivre pendant 48 jours (lorsque la nourriture n'était pas contaminée) induisait une plus grande réduction de la concentration en protéines et des réserves énergétiques qu'une charge journalière provenant de concentrations en cuivre similaires à celle de la nourriture des perchaudes chroniquement exposées au métaux dans l'environnement naturel (lorsque la nourriture était contaminée).

En conséquence, ces résultats suggèrent que la faible ingestion de cuivre alimentaire a entraîné à long terme une plus grande accumulation corporelle de cuivre ainsi que des dépenses énergétiques supplémentaires à celles induites par une plus grande ingestion de cuivre et par une moins grande accumulation corporelle. Inversement à nos attentes, les résultats de notre étude indiquent que dans ce contexte expérimental, les poissons ingérant des proies contaminées étaient en meilleure condition (plus de protéines tissulaires et plus de réserves pour subvenir aux dépenses énergétiques) pour gérer le cuivre (excrétion, détoxification, réparation), ce qui semble à la fois cohérent avec leur plus faible accumulation corporelle de cuivre (voir la section 4.2.3), ou au contraire, en accord avec une plus grande accumulation corporelle de cuivre (et une moins bonne capacité de gestion du cuivre) chez les poissons ayant ingéré des proies non contaminées. Effectivement, la séquestration et le transport du cuivre cellulaire requiert l'implication de

protéines comme les métallothionéines. Une plus grande concentration en protéines pourrait faciliter l'élimination tissulaire du cuivre ou la restriction de son internalisation dans le corps. Mais d'autre part, comme les dépenses énergétiques impliquées ne sont pas reflétées dans la concentration protéique (taux de synthèse et de dégradation des protéines), les poissons ayant une plus faible concentration en protéines, et de plus faibles réserves énergétiques, pourraient aussi avoir été sujets à un plus grand taux de renouvellement des protéines, ainsi qu'à une incapacité à gérer la plus grande concentration corporelle de cuivre (une incapacité à excréter le cuivre en excès). Ceci pourrait expliquer à la fois pourquoi ces poissons ont plus de cuivre dans leurs tissus corporels, moins de protéines, et moins de réserves énergétiques. Ces résultats semblent par ailleurs en désaccord avec l'hypothèse selon laquelle le cuivre ingéré par ce type de proie (oligochète) serait difficilement assimilable chez le poisson (revu par Clearwater *et al.* 2002), du moins, comme dans le contexte de notre étude, lorsqu'il était délivré selon de faibles doses journalières. Dans un contexte normal, peu de cuivre semble être entreposé dans les tissus du corps parce qu'il est relativement facilement absorbé et excrété (revu par Linder *et al.* 1998). Par contre, les jeunes poissons ont une plus haute efficacité d'absorption couplée à l'immaturité de leur système d'excrétion (revu par Kamunde *et al.* 2002b), ce qui pourrait appuyer en partie, en ce qui a trait aux poissons ayant le moins ingéré de nourriture, l'hypothèse que les poissons aient absorbé une quantité corporelle de cuivre qui leur soit nuisible.

Autrement, des études réalisées chez les mammifères suggèrent que l'absorption relative du cuivre via la nourriture ingérée varie selon les besoins, et serait une capacité adaptative (revu par Linder & Hazegh-Azam 1996). Lorsque la faible ingestion alimentaire de cuivre perdure sur des jours et des semaines, le pourcentage absorbé de cuivre disponible s'accroît, et vice versa, puisque qu'en cas de carence en cuivre, la priorité semble donnée aux provisions de cuivre des composantes cellulaires qui l'intègrent, plutôt qu'à celles qui sont liées l'excrétion du cuivre (revu par Linder *et al.* 1998). Ainsi, il n'est pas à exclure que les poissons de notre étude ayant ingéré le moins de nourriture aient été dans une situation de carence, et que leur plus forte accumulation corporelle, combinée à leurs faibles concentrations en protéines et en réserves

énergétiques, puissent être associées à cette situation supplémentaire de carence. Ces poissons ayant très peu mangé ont peut-être simplement été exposés à une condition généralisée de carences face à divers nutriments, incluant possiblement le cuivre, en tant que micronutriment essentiel. Cela aurait pu accroître leur capacité d'absorption corporelle globale à partir de la lumière intestinale, dont le cuivre d'origine alimentaire.

4.2.2 Voies métaboliques

Contrairement aux effets induits par le régime alimentaire, une seule enzyme a été affectée par l'exposition au cuivre alimentaire, et ce, seulement après 48 jours d'exposition (tableau 3.5). L'activité de la pyruvate kinase, en même temps qu'elle était inférieure de 46 % chez les poissons s'étant le moins alimentés, était indépendamment inférieure de 26 % chez les poissons ayant ingéré des proies non contaminées (tel que mentionné précédemment, ces poissons avaient accumulé plus de cuivre dans leurs tissus). Comme la présence cellulaire du cuivre en excès induit la production de radicaux libres et que le peroxyde d'hydrogène peut inhiber la glycolyse et l'activité des protéines kinases (revu par Ramasarma 1990), il semble que la plus faible activité de la pyruvate kinase, mesurée dans les tissus ayant accumulé plus de cuivre après 48 jours d'exposition des tête-de-boules (ceux ayant ingéré des proies non contaminées), pourrait avoir été entraînée par des dommages oxydatifs au niveau des tissus. Bien que nos résultats suggèrent l'hypothèse d'un affaiblissement des capacités antioxydantes en lien avec la réduction importante de l'activité de la catalase chez les poissons ayant le moins ingéré de proies (section 4.1.2), nos résultats ne permettent pas de démontrer l'effet des radicaux libres selon l'exposition au cuivre alimentaire des poissons. Cependant, ils permettent d'évoquer l'hypothèse qu'une baisse d'activité de la pyruvate kinase, une enzyme essentielle au maintien des capacités anaérobies de la cellule, puisse être liée à un stress oxydant survenu dans les tissus des poissons ayant accumulé plus de cuivre. Par ailleurs, certaines études ont rapporté des modifications de la performance anaérobie des tissus de poissons, tant dans des conditions contaminées par les métaux que dans des conditions contrôles, mais il n'y avait pas de constance dans la direction (soit l'augmentation

ou la diminution de l'activité enzymatique) de ces modifications (revu par Audet & Couture 2003 ; Taylor *et al.* 2004 ; et Calvalho & Fernandes 2008). De toute évidence, d'autres études sont requises afin de mieux documenter les effets du cuivre alimentaire sur les capacités glycolytiques et anaérobies des poissons. Du moins, dans un contexte d'importante restriction alimentaire telle que dans notre étude, la baisse des capacités de la pyruvate kinase suggère que le cuivre ingéré par une proie naturelle non contaminée altérerait les capacités anaérobies des poissons ayant à long terme accumulé plus de cuivre dans leurs tissus corporels.

La PK est l'enzyme de la glycolyse convertissant le dernier intermédiaire de cette chaîne de transformation du glucose en pyruvate. Une fois déplacé dans les mitochondries, le pyruvate participe à la production d'ATP la plus rentable de la cellule (aérobie). Malgré cette baisse d'activité de la PK, les voies aérobies suivies (taux métabolique de routine, CS, HOAD, CCO) n'ont pas été affectées par le cuivre. Ainsi, la baisse de l'activité de cette enzyme, sollicitée lors des activités de performance musculaire rapide (voie anaérobie de production d'ATP avec la LDH), pourrait affecter les performances de chasse ou de fuite qui sont essentielles aux poissons des milieux naturels.

4.2.3 Bioaccumulation du cuivre

Les résultats obtenus dans cette étude confirment l'intérêt et la pertinence d'exprimer l'exposition des poissons au cuivre alimentaire en termes d'une quantité ingérée par jour, en accord avec l'approche déjà proposée (Clearwater *et al.* 2002 ; Kamunde & Wood 2003), plutôt qu'en fonction d'une concentration, afin de caractériser la bioaccumulation corporelle du cuivre (et possible toxicité) qui y est associée. De plus, comme la croissance ou la masse des poissons varie entre ces derniers ou dans le temps, la seule manière de rendre les résultats comparables entre les variables expérimentales, les différentes espèces ou les autres études, semble par ailleurs de normaliser cette quantité par rapport à la masse du corps (Clearwater *et al.* 2002).

Après 32 et 48 jours d'exposition des poissons aux différents traitements, l'accumulation du cuivre dans le corps était plus élevée chez les poissons ayant ingéré des proies non contaminées (**1P et 5P** > 1Cu et 5Cu ; [Cu]_{corps32} 138 % et [Cu]_{corps48} 61 %), ce qui rejoint les observations de Hashemi *et al.* (2008a), et contraste avec celles de Kamunde & Wood (2003). Les résultats obtenus suggèrent que l'accumulation du cuivre dans les tissus corporels variait de façon dépendante à la présence de proies contaminées dans l'alimentation des poissons, en plus ne pas varier en fonction du régime alimentaire. De plus, les relations linéaires montrent que l'accumulation de cuivre dans les tissus du corps dépendait inversement de la charge journalière ingérée de cuivre après 32 et 48 jours d'exposition (figure 3.1). Ces résultats confirment qu'en plus de la présence de proies contaminées dans l'alimentation des poissons, l'accumulation corporelle du cuivre dépendait de la quantité quotidienne de cuivre qu'ils ingéraient, et probablement aussi de leur temps d'exposition, étant donné que la relation était encore plus forte après 48 jours d'exposition. Comme une relation a été établie entre la bioaccumulation corporelle et la charge journalière ingérée de cuivre, ces résultats démontrent bien la pertinence de regarder l'exposition des poissons au cuivre alimentaire par une quantité journalière reçue plutôt que par l'utilisation d'une simple concentration (moins informative).

Alors que les poissons ayant ingéré des proies non contaminées avaient une accumulation corporelle en cuivre supérieure à celle des poissons ayant ingéré des proies contaminées après 32 jours d'expositions (**1P et 5P** > 1Cu et 5Cu ; [Cu]_{corps32} 138 % supérieure), l'accumulation du cuivre dans la paroi de leur tube digestif était au contraire plus faible (**1P et 5P** < 1Cu et 5Cu ; [Cu]_{tube digestif32} 37 % inférieure). Ces résultats semblent correspondre à l'hypothèse que les plus faibles doses de cuivre ingéré sont plus facilement assimilables (ou les plus grandes moins assimilables), et ce, indépendamment du taux d'alimentation (revu par Kamunde & Wood 2003). À ma connaissance, notre étude est la première à appuyer cette hypothèse, en intégrant l'utilisation de proies naturelles contaminées en cuivre dans l'étude de la bioaccumulation du cuivre chez le poisson.

Puisque l'accumulation corporelle du cuivre était supérieure chez les poissons ayant le moins ingéré de cuivre (1P et 5P), mais que l'accumulation dans la paroi du tube digestif se comportait pour la même période de temps à l'inverse, il semble plausible que l'absorption intestinale ait joué une étape déterminante (Wapnir 1998) dans l'assimilation du cuivre des têtes-de-boules après 32 jours d'exposition aux traitements. Considérés séparément, les résultats relatifs au rendement alimentaire de charge du cuivre (figure 3.2) fournissent des informations sur le comportement temporel à long terme de l'accumulation corporelle du cuivre. Après 32 jours d'exposition, l'accumulation observée dans le corps des poissons des groupes 1Cu et 5Cu différait (DACu), alors qu'après 48 jours d'exposition, la DACu et le BRACu comportaient une différence pour la paroi du tube digestif de ces poissons. Il semble que la procédure par laquelle l'accumulation de cuivre demeurait plus élevée dans le corps des deux groupes de poissons ingérant moins de cuivre, vis-à-vis ceux qui en ingéraient plus, devait fluctuer temporellement.

L'étude de Kamunde & Wood (2003) a montré que dans des conditions similaires, au fur et à mesure de l'exposition alimentaire de 35 jours des truites arc-en-ciel au cuivre, les concentrations de cuivre dans le corps et dans le foie augmentaient. Pour ce qui était de toutes les sections du tube digestif analysées, les concentrations en cuivre tissulaires associées aux plus faibles taux d'alimentation augmentaient dans le temps, alors qu'après un temps de réaction de 10 à 20 jours, les fortes concentrations tissulaires observées chez les poissons ayant ingéré plus de nourriture s'abaissaient à nouveau. À la lumière de nos résultats, les mécanismes d'homéostasie du cuivre chez le tête-de-boule doivent reposer sur l'importance du tube digestif lors d'une exposition à long terme au cuivre d'origine alimentaire. Comme le cuivre est un micronutriment essentiel, il semble plausible que l'absorption intestinale du cuivre vers son internalisation soit modulable dans le temps, en fonction des besoins physiologiques des poissons qui peuvent varier selon leur cycle de vie ainsi qu'au gré de l'environnement naturel, dont la productivité fluctue à travers les saisons. Des études ont suggéré que l'absorption relative du cuivre via la nourriture ingérée serait une capacité adaptative chez les mammifères, et qu'une forte, ou une faible ingestion alimentaire

de cuivre perdurant pour des semaines, peuvent conduire à la modification des mécanismes de l'homéostasie du cuivre (revu par Linder & Hazegh-Azam 1996).

4.3 Impacts combinés du cuivre et du régime alimentaire

4.3.1 Statut énergétique

Les seuls paramètres suivis au cours de la phase initiale de l'expérience étaient relatifs à la croissance (tableau 3.4). Au terme de ces 16 jours, la croissance des poissons s'étant le moins alimentés était négative alors que pour les poissons s'étant le plus alimentés, la croissance était positive. En dehors de ces observations de base, la croissance des poissons était influencée par les effets combinés du régime alimentaire strict et de l'exposition au cuivre (dépendamment l'un de l'autre), autant dans la croissance par rapport à la quantité de nourriture ingérée (efficacité de conversion de la nourriture, ECN) que par rapport à l'intervalle de temps suivi (taux de croissance spécifique à la masse, TCSM). L'ECN des poissons du groupe 1Cu était 22 fois plus petite que celle des poissons des trois autres groupes mis ensemble (1Cu [-40,1 %] < 1P, 5P et 5Cu [+1,9 %]), alors que le TCSM des poissons du groupe 1Cu était 2,2 fois inférieur à celui des poissons du groupe 5Cu (1Cu [-0,32 %] < 5Cu [+0,26 %]), en même temps que le TCSM des deux autres groupes (1P, 5P) était intermédiaire (il y avait d'autres différences moins distinctes). Ensemble, ces résultats sont en accord avec les effets rapportés sur la réduction de croissance due au cuivre en période initiale d'exposition au cuivre aqueux (revu dans Marr *et al.* 1996 ; Hashemi *et al.* 2008b), mais ils diffèrent des résultats obtenus dans une récente étude sur le cuivre alimentaire (Kamunde & Wood 2003) qui décrivait une croissance influencée seulement par l'effet dû au taux d'alimentation. Le taux d'alimentation fourni au cours de leur expérience était suffisant pour que les poissons aient eu une croissance positive pendant 35 jours. Par ailleurs, la nourriture distribuée aux poissons était une préparation artificielle. Ainsi, le contexte de notre étude était largement différent. Une des raisons pouvant expliquer la présence d'effets combinés du cuivre et du régime alimentaire dans notre étude est que la croissance était assez affectée par

le régime alimentaire pour que des effets dus au cuivre puissent être visibles au niveau de la croissance. Mais il est aussi possible que la biodisponibilité du cuivre ingéré par l'intermédiaire d'une proie naturelle (biologiquement assimilé par la proie) soit différente de celle apportée par le biais d'une nourriture préparée (revu dans Clearwater *et al.* 2002). Notre étude serait à ma connaissance la première à montrer l'effet du cuivre sur la croissance des poissons ayant été exposés par l'ingestion de cuivre biologiquement incorporé dans une proie naturelle.

4.3.2 Voies métaboliques

Aucune enzyme n'a été affectée par l'effet combiné du cuivre et du régime alimentaire (tableaux 3.5. et 3.6). Ainsi, dans les conditions où elles ont été étudiées, ces enzymes ne semblent pas de bons indicateurs de l'effet métabolique du cuivre alimentaire étudié selon deux régimes alimentaires stricts. Par contre, il ne faut pas oublier que des effets liés au cuivre et au régime alimentaire ont été rencontrés séparément. La plupart des enzymes ont été affectées par le taux d'alimentation. La pyruvate kinase, au bout de 48 jours, était affectée par le cuivre d'origine alimentaire. D'autre part, cela pourrait signifier que la période de temps de réponse au cuivre des enzymes puisse avoir été masquée (survenue avant 32 jours), ou ne pas être encore survenue.

Le cuivre est un métal essentiel, intégré depuis des millions d'années, dans les composantes, les mécanismes et le métabolisme cellulaires. Chez les mammifères, la plupart du cuivre intracellulaire est recyclé, de sorte que les cellules puissent s'adapter à la disponibilité réduite en cuivre en réduisant sa sortie de la cellule. La plupart des cellules doivent probablement aussi absorber le cuivre de l'albumine, la transcupréine ou autres complexes, et spécialement lorsque la céruloplasmine est peu présente, ou absente. Ainsi, dans des conditions anormales où il existe, par exemple, une carence en cuivre, les tissus peuvent continuer à obtenir le cuivre nécessaire (revu par Linder *et al.* 1998). Les cellules épithéliales du tube digestif sont par ailleurs très aptes à réagir face à une exposition excessive au cuivre alimentaire en séquestrant le cuivre avec des métallothionéines (Clearwater *et al.* 2000 ; Bury *et al.* 2003 ; Kamunde & Wood 2003). Issus

d'études ayant utilisé des radionucléides de cuivre, des résultats démontraient que pour plusieurs tissus corporels, aussi bien que lorsque le corps entier était considéré, les tissus avaient une manière de retenir le cuivre qu'ils avaient déjà, en ne le relâchant pas, lorsqu'ils étaient placés face à une carence potentielle (revu par Linder *et al.* 1998). Des données fournies par l'étude de Clearwater *et al.* (2000) suggèrent, par exemple, que la répartition corporelle du cuivre chez le poisson serait comparable à celle des mammifères. En fait, plusieurs auteurs s'inspirent des données existantes chez les mammifères pour expliquer l'homéostasie du cuivre chez les poissons (Clearwater *et al.* 2000 ; Bury *et al.* 2003 ; Kamunde & Wood 2003). Comme quoi il en faudrait beaucoup aux vertébrés pour que leurs cellules puissent subir des effets liés à une anormalité dans la quantité intracellulaire de cuivre présente. Ainsi, l'homéostasie de ce métal essentiel pourrait être une des raisons pour lesquelles l'activité enzymatique cellulaire mesurée dans cette étude était très peu affectée par le cuivre. D'autres études seraient requises afin de mieux documenter les effets métaboliques dus au cuivre d'origine alimentaire.

4.3.3 Bioaccumulation du cuivre

Après 48 jours d'exposition, l'accumulation du cuivre dans la paroi du tube digestif des poissons du groupe 5Cu était 129 % plus importante que celle des poissons des trois autres groupes mis ensemble. Les poissons s'étant alimentés le plus, et ayant ingéré le plus de cuivre (5Cu), ont accumulé une concentration en cuivre plus grande, dans la paroi de leur tube digestif. De plus, cette concentration était liée à l'effet combiné des deux facteurs à l'étude. L'épithélium intestinal a dû retenir le cuivre en excès des proies contaminées ingérées (5Cu), puisque l'accumulation corporelle, seulement influencée par le facteur d'exposition au cuivre (et non par le facteur d'alimentation), était plus faible chez les poissons ayant ingéré des proies contaminées (1Cu et 5Cu) après 48 jours d'exposition. De surcroît, il existait, seulement après 48 jours d'exposition, un bilan de rendement alimentaire de charge du cuivre (BRACu) supérieur dans la paroi du tube digestif des poissons du groupe 5Cu, par rapport à ceux du groupe 1Cu (selon le taux d'alimentation seulement). Simultanément à cela, il n'y avait aucune différence entre ces deux

groupes au niveau de l'accumulation corporelle (BRACu), alors que la concentration mesurée dans le corps de ces poissons était en réalité plus faible chez les poissons ayant ingéré des proies contaminées (1Cu et 5Cu). Mis ensemble, ces résultats renforcent l'hypothèse que le cuivre accumulé dans la paroi du tube digestif chez ces poissons (5Cu) provenait de la lumière intestinale, c.-à-d. strictement de la nourriture ingérée après 48 jours d'exposition. Pour toutes les bioaccumulations vérifiées au cours de cette expérience, ceci est le seul cas où les deux facteurs à l'étude ont porté un effet lié à leur interaction combinée sur la bioaccumulation du cuivre.

Ces observations diffèrent de celles rencontrées après 32 jours d'exposition, où des effets indépendants du cuivre et du régime alimentaire étaient rencontrés parmi les résultats liés à l'accumulation du cuivre. Il semble ainsi que l'équilibre d'homéostasie du cuivre entre les tissus corporels et la paroi du tube digestif, dans le contexte de notre étude, était modifié selon divers mécanismes de régulation entre l'assimilation, l'accumulation, et probablement aussi l'excrétion du cuivre, que nos résultats ne permettent pas d'élucider.



5. CONCLUSIONS

Une expérience sur les effets métaboliques du cuivre alimentaire a été menée avec le juvénile de tête-de-boule pendant 48 jours à partir de régimes stricts en proies naturelles. Des effets individuels, liés à la présence ou à l'absence de contamination des proies, et aux deux taux alimentaires restrictifs, de même que des effets combinés relatifs aux deux stress, ont été décelés après 16, 32 ou 48 jours d'exposition des poissons selon les variables considérées. Ce mémoire montre à l'échelle expérimentale de temps choisie pour cette étude, qu'une importante restriction alimentaire affecte rapidement et abondamment le métabolisme du tête-de-boule, que le cuivre provenant de l'ingestion d'une proie naturelle (*Lumbriculus variegatus*) influence le métabolisme de cette espèce plus tardivement, mais que l'effet combiné de ces deux contraintes affecte la croissance au tout début de l'exposition, ainsi que la bioaccumulation du cuivre dans l'épithélium du tube digestif à la toute fin de l'exposition.

5.1 Résultats principaux

La restriction alimentaire a énormément affecté le statut énergétique et la majorité des capacités métaboliques étudiées dans les tissus corporels du tête-de-boule, alors que la bioaccumulation corporelle du cuivre n'était pas influencée par le taux d'alimentation au cours de notre expérience. Une importante diminution dans les réserves énergétiques, le taux métabolique de routine et la croissance était associée au plus faible taux d'alimentation reçu par les tête-de-boules. Parmi les réserves, la concentration en protéines était particulièrement affectée, mais le taux métabolique et la croissance étaient beaucoup plus sensibles à la variation de la quantité journalière de nourriture ingérée. À quelques exceptions près, les capacités enzymatiques étaient réduites par un faible taux d'alimentation (l'activité spécifique de la superoxyde dismutase mitochondriale et de la glutathion S-tranfêrase était accrue après 32 jours d'exposition seulement,

en rapport avec le faible taux d'alimentation). Après 32 jours d'exposition seulement, les capacités anaérobies semblaient plus affectées que les capacités aérobies des tissus corporels. La baisse de l'activité des enzymes du catabolisme suggérait une plus faible utilisation des réserves énergétiques chez les poissons ayant le moins ingéré de nourriture, de même que la baisse des capacités biosynthétiques suggérait la réduction de la synthèse protéique en accord avec une plus faible utilisation des réserves dans cette voie de l'anabolisme. L'activité des enzymes antioxydantes paraissait à première vue moins affectée que celle des autres enzymes. Cependant, l'énorme baisse des capacités de la catalase suggérait que les poissons s'étant alimentés le moins étaient globalement moins aptes à se protéger contre le stress oxydant. Malgré l'importante restriction alimentaire subie, la bioaccumulation corporelle du cuivre n'était pas affectée par le taux d'alimentation et demeurait similaire à celle rapportée dans le muscle de poissons exposés aux métaux en milieu naturel. Cependant, les mécanismes sous-jacents à l'homéostasie du cuivre n'étaient pas statiques ; ils fluctuaient selon le temps d'exposition des tête-de-boules à la nourriture contaminée. Effectivement, la différence d'accumulation du cuivre dans les tissus du corps s'intensifiait avec un taux d'alimentation inférieur après 32 jours d'exposition alimentaire des poissons aux proies contaminées, alors qu'elle ne variait plus selon la quantité de nourriture ingérée après 48 jours d'exposition, même si une plus grande différence de rendement alimentaire de charge du métal était détectée dans le corps des poissons ayant reçu un taux d'alimentation supérieur.

Contrairement à nos attentes, l'exposition au cuivre alimentaire portait moins atteinte aux réserves énergétiques et aux capacités glycolytiques (pyruvate kinase) des tête-de-boules, à la suite de l'expérience (après 48 jours seulement), que l'absence de contamination de leur nourriture, alors que la bioaccumulation corporelle du cuivre demeurait plus faible chez ces poissons ayant ingéré des proies contaminées. En fait, les protéines étaient la composante tissulaire du corps la plus influencée des réserves énergétiques à la fin de l'expérience. Et même si les réserves énergétiques finales étaient affaiblies par rapport aux réserves initiales, elles variaient également selon l'exposition au cuivre, et ce, indépendamment de l'effet dû au taux

d'alimentation (mais selon une différence similaire à celle obtenue selon cet effet). Par ailleurs, alors que l'activité de la pyruvate kinase était affectée dans les tissus corporels des poissons ayant ingéré de la nourriture non contaminée (là où la bioaccumulation corporelle du cuivre était plus importante), les capacités aérobies n'étaient pas altérées. La baisse des capacités glycolytiques (pyruvate kinase) pourrait affecter les capacités anaérobies aussi bien que les capacités aérobies des poissons, puisque ces deux voies de production d'énergie dépendent du pyruvate (produit final de la conversion par la pyruvate kinase du dernier intermédiaire de la glycolyse).

Curieusement, une part de la variation des réserves corporelles, surtout des protéines, était expliquée par la bioaccumulation du cuivre dans l'épithélium du tube digestif en fin d'expérience (alors qu'aucune relation n'existait vis-à-vis la bioaccumulation corporelle du cuivre). De surcroît, une forte relation était présente entre la bioaccumulation du cuivre dans l'épithélium du tube digestif et la charge journalière de cuivre ingérée après 32 et 48 jours, alors que simultanément, une relation inverse existait entre cette charge, et la bioaccumulation corporelle du cuivre. De plus, après 32 jours seulement, les résultats de bioaccumulation correspondent à l'hypothèse selon laquelle les plus faibles doses de cuivre ingéré seraient plus facilement assimilées dans les tissus corporels. Ces résultats montrent globalement que les poissons ayant ingéré des proies contaminées étaient probablement en meilleure condition (plus de protéines dans les tissus du corps et plus de réserves pour subvenir aux dépenses énergétiques) pour gérer l'ingestion de cuivre (excrétion, détoxification, réparation) et s'en défendre en retenant le cuivre dans leur épithélium digestif (cohérent avec la plus faible bioaccumulation corporelle observée). Par ailleurs, ces poissons auraient pu être davantage en mesure de retenir le cuivre dans cette barrière (entreposage), en vue de l'importer ultérieurement pour leurs besoins corporels. À l'inverse, les poissons ayant le moins ingéré de cuivre (et de nourriture par la même occasion) auraient pu se retrouver dans une situation généralisée en diverses carences, où ils auraient eu une assimilation accrue des nutriments et du cuivre alimentaire dans leur corps. Ceci concorderait aussi avec un moindre entreposage de cuivre dans leur épithélium digestif. Les résultats ont par ailleurs démontré que la bioaccumulation corporelle du cuivre variait indépendamment du taux

d'alimentation, et de manière dépendante à la présence de proies contaminées dans l'alimentation du tête-de-boule, lors d'une période d'importante restriction alimentaire, mais aussi en fonction de la charge journalière ingérée de cuivre. En résumé, le tube digestif semblerait jouer un rôle primordial dans l'homéostasie du cuivre d'origine alimentaire.

Finalement, la croissance était affectée par l'effet combiné de la restriction alimentaire et de l'exposition au cuivre alimentaire pendant la phase initiale de l'expérience, alors que la bioaccumulation du cuivre dans la paroi du tube digestif était aussi influencée par l'effet combiné des deux facteurs en phase finale de l'exposition. La croissance était initialement favorisée chez les poissons qui ingéraient le plus de nourriture, mais défavorisée, déjà, chez les poissons qui s'alimentaient le moins. Simultanément à cela, la croissance s'est avérée désavantagée chez les poissons ayant le moins ingéré de proies contaminées, mais au contraire, avantagée chez les poissons ayant le plus ingéré de proies contaminées (les deux groupes ayant ingéré des proies non contaminées avaient une croissance intermédiaire). La croissance pourrait avoir été suffisamment affectée par la restriction alimentaire, pour que des effets liés à l'exposition alimentaire au cuivre par l'ingestion du métal biologiquement incorporé dans une proie naturelle, soient perçus dans la croissance. La bioaccumulation du cuivre dans la paroi du tube digestif était plus importante chez les poissons exposés aux proies contaminées, ainsi que chez les poissons ayant ingéré plus de proies après 32 jours d'exposition (influences indépendantes des deux facteurs expérimentaux). Toutefois, elle était plus importante dans la paroi des poissons qui avaient ingéré plus de proies contaminées après 48 jours d'exposition, dû à l'effet d'interaction des deux facteurs expérimentaux. Pendant ce temps, la bioaccumulation corporelle du cuivre variait seulement selon l'exposition au cuivre, alors qu'il n'y avait pas de constance dans les observations sur le rendement alimentaire de charge du cuivre dans les tissus du corps. Certes, d'autres études sont nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes régulant la bioaccumulation corporelle du cuivre d'origine alimentaire par l'ingestion d'une proie naturelle. Mais globalement, les différents résultats de bioaccumulation du cuivre obtenus au niveau du corps et du tube digestif suggèrent que l'épithélium du tube digestif jouait un rôle protecteur de rétention du cuivre chez les poissons

qui ingéraient le plus de proies contaminées, et que les mécanismes d'homéostasie du cuivre d'origine alimentaire variaient selon le temps d'exposition.

5.2 Implications

Dans les écosystèmes de lacs d'eau douce sains en milieux tempérés, l'abondance et la diversité des régimes alimentaires disponibles dépendent de maints facteurs biotiques et abiotiques variant au gré des saisons tels que la productivité des milieux, les interactions prédateurs-proies dans le réseau trophique et la température. Contrairement à l'approche couramment rencontrée dans les études en milieux naturels contaminés par les métaux, notre design expérimental et notre approche statistique nous ont permis de discriminer les effets liés à l'entrée d'énergie des poissons (leur nourriture) de celui lié à l'entrée d'un seul métal dans le poisson par sa nourriture (le cuivre alimentaire), afin de mieux documenter les effets métaboliques du cuivre chez le poisson sous restriction alimentaire, et ce, en intégrant l'utilisation d'une proie naturelle (oligochète).

L'introduction à l'étude de ces deux types de stress combinés par l'utilisation d'une proie naturelle confirme les effets escomptés de restriction alimentaire. En général, l'augmentation de la restriction a entraîné une baisse de la croissance, des réserves énergétiques, du taux métabolique de routine, des capacités métaboliques étudiées (aérobie, anaérobie, biosynthétique, antioxydante et détoxiquante) et étonnamment, la quantité journalière de nourriture ingérée n'influçait pas la bioaccumulation corporelle du cuivre (en accord avec Kamunde & Wood 2003) entre nos quatre traitements.

Analogiquement à l'effet métabolique du cuivre aqueux (Marr *et al.* 1996), l'effet du cuivre combiné à la restriction alimentaire du tête-de-boule affectait la croissance seulement dans la phase initiale de l'exposition des poissons. Plus tardivement, alors que la concentration du cuivre

dans les poissons aurait pu parvenir à l'état stationnaire, la combinaison de ces deux stress induisait une plus grande bioaccumulation du cuivre dans l'épithélium du tube digestif des poissons ayant reçu plus de proies contaminées.

Par contre, l'exposition des poissons par l'ingestion de proies naturelles contaminées au cuivre de notre étude apporte des informations nouvelles, mais contraires à nos attentes. Indépendamment à la restriction alimentaire, les réserves énergétiques et les capacités glycolytiques (pyruvate kinase) étaient moins perturbées chez les poissons ayant ingéré des proies contaminées au cuivre. Curieusement, l'exposition alimentaire au cuivre des poissons a conduit à de faibles valeurs de bioaccumulation dans leur corps. De surcroît, une forte relation positive entre la charge journalière ingérée de cuivre par la nourriture et la bioaccumulation du cuivre au niveau du tube digestif a été établie, alors que la relation trouvée entre cette charge ingérée et la bioaccumulation corporelle en cuivre était négative. Mises ensemble, nos observations indiquent qu'indépendamment à la restriction alimentaire, l'accumulation du cuivre dans le corps des poissons était probablement favorisée par l'accroissement de l'assimilation liée à l'ingestion de faibles charges journalières de cuivre (en accord avec l'hypothèse relatée dans la revue de Kamunde & Wood 2003), qu'une faible bioaccumulation du cuivre au niveau du tube digestif (associée à de faibles charges) était liée à des réserves énergétiques plus affaiblies chez le tête-de-boule, et que le tube digestif semblait jouer un rôle important dans l'homéostasie de ce métal essentiel. Nos observations sur la bioaccumulation du cuivre chez le poisson démontrent bien l'intérêt et la pertinence d'examiner l'exposition des poissons au cuivre alimentaire par une quantité journalière reçue (normalisée par la masse individuelle) plutôt qu'en fonction d'une concentration beaucoup moins informative (Clearwater *et al.* 2002) sur les effets potentiellement toxiques du cuivre. À ma connaissance, nos observations individualisées sur la bioaccumulation du cuivre, en lien avec les effets métaboliques induits par l'exposition alimentaire des poissons au métal déjà incorporé dans une proie naturelle, constituent une première approche dont l'intérêt grandira avec les études à venir.

5.3 Perspectives

Une nouvelle étude des effets de l'exposition au cuivre alimentaire combinée à la restriction alimentaire pourrait être améliorée, ou du moins validée, en ajustant les taux d'alimentation délivrés de sorte que des poissons sous restriction alimentaire puissent être mis en comparaison avec des poissons dont la croissance aurait été clairement favorisée (positive, au contraire de cette étude dont les différents régimes alimentaires défavorisaient la croissance de tous les poissons). Du reste, nos conclusions se rapportent en premier lieu aux modèles biologiques ayant été utilisés dans cette étude et elles sont en deuxième lieu généralisées à l'égard des travaux similaires présentés. Ainsi, des considérations futures ou externes ne devraient pas omettre le contexte d'origine. D'ailleurs, l'alimentation individualisée des poissons procure une source inestimable d'information sur l'influence véritable du taux d'alimentation envers des variables d'intérêt comme la bioaccumulation du cuivre incluse dans ce mémoire. Les études en écotoxicologie gagneraient autant à incorporer l'alimentation individualisée des organismes suivis, qu'à examiner la bioaccumulation du cuivre de la paroi du tube digestif séparément de celle du reste du poisson. Mais encore, elles rencontreraient des avantages supplémentaires à évaluer aussi la bioaccumulation du foie ainsi que celle de la vésicule biliaire séparément à la bioaccumulation de la carcasse (majoritairement composée de muscle), étant donné que ces tissus renferment différents patrons d'accumulation.

D'autre part, la portée de nos conclusions est limitée par la petite taille des échantillons, en partie due à la mortalité survenue au cours de l'expérience, mais aussi aux sources présentes de variabilité dans le suivi individuel des poissons soumis aux types de stress imposés. La reproduction de notre étude gagnerait donc à inclure une plus grande taille d'échantillon. Malgré cela, l'intégration d'un design factoriel répété à travers les environnements communs a également ou aléatoirement réparti les sources de variabilité entre nos différents traitements. Notre confiance dans l'interprétation des différences observées s'est avérée d'autant plus grande.

En somme, ce mémoire est une source unique d'information sur la bioaccumulation et les effets métaboliques du cuivre chez le poisson, dans son contexte spécifique d'exposition alimentaire via une proie naturelle. Comme peu ou pas d'auteurs ont à ma connaissance eu recours à cette approche dans l'évaluation des effets dus au cuivre, notre étude ouvre le chemin à une meilleure élaboration des thèmes qui devraient être explorés dans les travaux futurs. Si je devais l'approfondir, j'examinerais l'impact métabolique du cuivre et de la restriction alimentaire sur les capacités enzymatiques, les dommages oxydatifs, la bioaccumulation du cuivre, la concentration en métallothionéines, les réserves énergétiques ainsi que l'expression génique associée à plusieurs des protéines impliquées dans ces voies, et selon divers organes d'intérêt tels que le tube digestif, le muscle et le foie (et la vésicule biliaire pour la bioaccumulation). Je m'intéresserais par ailleurs à doser les métaux dans les différents compartiments de la cellule, de même qu'à doser la métallothionéine dans les mitochondries. Par ailleurs, différentes qualités de nourriture, en plus de la quantité offerte aux poissons, devraient être incluses dans les études sur l'effet métabolique de l'alimentation reçue (de même qu'une diversité de types de proies). Finalement, il serait intéressant de réaliser des expériences d'assez longue durée (au moins 60 jours) avec des échantillonnages répétés (y compris dans la phase expérimentale initiale), et de suivre la réponse d'une espèce de poisson de laboratoire ainsi qu'une espèce du milieu naturel, dans le laboratoire et dans son milieu naturel.

Ces différentes avenues, bien que l'avenir soit beaucoup plus vaste, permettraient de mieux cibler la bioaccumulation du cuivre en lien avec de possibles effets toxiques, par ailleurs de mieux documenter le trajet cellulaire du cuivre (meilleure caractérisation de son assimilation et de son excrétion). Il est intéressant en soit de documenter les effets métaboliques du cuivre, mais bien sûr, les différents facteurs abiotiques et biotiques pouvant influencer le métabolisme (par exemple, la température, la qualité et la disponibilité de nourriture) jouent potentiellement pour beaucoup sur les réponses physiologiques ou comportementales des poissons en milieu naturel. C'est pourquoi je poursuivrais dans l'étude de plusieurs types de stress individuels et combinés parallèlement à l'exposition métallique des organismes aquatiques.

Certes, la variation des réponses métaboliques du poisson est une parcelle de la complexité des effets liés aux stress supportés par les écosystèmes aquatiques. Une vie entière passée à documenter l'impact biologique de la contamination dans le but commun de reconquérir un environnement sain n'est pas assez !



6. LISTE DES RÉFÉRENCES

- Audet D & Couture P 2003. Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **60**: 269-278
- Baker RTM, Handy RD, Davies SJ, Snooka JC 1998. Chronic dietary exposure to copper affects growth, tissue lipid peroxidation, and metal composition of the grey mullet, *Chelon labrosus*. *Marine Environmental Research* **45**: 357-365
- Black D & Love RM 1986. The sequential mobilization and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding. *Journal of Comparative Physiology B* **156**: 469-479
- Blight EG & Dyer WJ 1959 A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**: 911-917
- Borgmann U, Neron R, Norwood WP 2001. Quantification of bioavailable nickel in sediments and toxic thresholds to *Hyaella azteca*. *Environmental Pollution* **111**: 189-198
- Brooks SPJ & Storey KB 1995. Is glycolytic rate controlled by the reversible binding of enzymes to subcellular structures? (Chapter 13). Dans : Hochachka & Mommsen (éditeurs) 1995. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes no. 4*, Elsevier, N.Y., 515 pp
- Bury NR, Walker PA, Glover CN 2003. Nutritive metal uptake in teleost fish (review). *The Journal of Experimental Biology* **206**: 11-23
- Buttgereit F & Brand MD 1995. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochemical Journal* **312**: 163-167
- Campbell HA, Handy RD, Sims DW 2002. Increased metabolic cost of swimming and consequent alterations to circadian activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to dietary copper. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **59**: 768-777
- Campbell PGC & Couillard Y 2004. Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques (Chapitre 1). Dans : Pelletier E, Campbell PGC, Denizeau F 2004. *Écotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement. Presses de l'Université du Québec, Sainte-Foy (Canada)*, 462 pp
- Campbell PGC & Hare L 2009. Metal detoxification in freshwater animals : Roles of metallothioneins (Chapter 9). Dans : Sigel A, Sigel H, Sigel RKO 2009. *Metallothioneins and related chelators. Metal Ions in Life Sciences no. 5, Royal Society of Chemistry, G.B.*, 340 pp

- Campbell PGC, Chapman PM, Hale BA 2006. Risk assessment of metals in the environment (Chapter 6). Dans : Hester RE & Harrison RM 2006. Chemicals in the Environment : Assessing and Managing Risk. *Issues in Environmental Science and Technology* no. 22, Royal Society of Chemistry, G.B., 158 pp
- Campbell PGC, Hontela A, Rasmussen JB, Giguere A, Gravel A, Kraemer L, Kovescs J, Lacroix A, Levesque H, Sherwood G 2003. Differentiating between direct (physiological) and food-chain mediated (bioenergetic) effects on a fish in metal-impacted lakes. *Human and Ecological Risk Assessment* **9**: 847-866
- Carvalho CDS & Fernandes MN 2008. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **151**: 437-442
- Clearwater SJ, Baskin MJ, Wood CM, McDonald DG 2000. Gastrointestinal uptake and distribution of copper in rainbow trout. *The Journal of Experimental Biology* **203**: 2455-2466
- Clearwater SJ, Farag AM, Meyer JS 2002. Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish (review). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology and Pharmacology* **132**: 269-313
- Couture P, Busby P, Gauthier C, Rajotte JW, Pyle GG 2008. Seasonal and Regional Variations of Metal Contamination and Condition Indicators in Yellow Perch (*Perca flavescens*) along Two Polymetallic Gradients. I. Factors Influencing Tissue Metal Concentrations. *Human and Ecological Risk Assessment* **14**: 97-125
- Couture P, Dutil J-D, Guderley H 1998. Biochemical correlates of growth and condition in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) from Newfoundland. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55**: 1591-1598
- Couture P & Guderley H 1990. Metabolic organization in swimming muscle of anadromous coregonines from James and Hudson bays. *Canadian Journal of Zoology* **68**: 1552-1558
- Couture P & Kumar PR 2003. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology* **64**: 107-120
- Couture P & Pyle G 2008. Live fast and die young: Metal effects on condition and physiology of wild yellow perch from along two metal contamination gradients. *Human and Ecological Risk Assessment* **14**: 73-96
- Couture P & Rajotte JW 2003. Morphometric and metabolic indicators of metal stress in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from Sudbury, Ontario: A review. *Journal of Environmental Monitoring* **5**: 216-221
- De Coen WM & Janssen CR 2003. The missing biomarker link : relationships between effects on the energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**: 1632-1641

- Eisler R 1998. Copper hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *U.S. Geological Survey, Biological Science Report USGS/BRD/BSR--1998-0002*, **33** : 1-120
- Environnement Canada 1992. Méthode d'essai biologique : Essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule. *Série de la protection de l'environnement*, Environnement Canada (Ottawa), Rapport SPE 1/RM/22 (modifié en 1997), ISBN 0-662-97303-8, 96 pp
- Environnement Canada 2001. Rapport d'évaluation - Rejets des fonderies de cuivre de première et de deuxième fusion et des raffineries de cuivre - Rejets des fonderies de zinc de première et de deuxième fusion et des raffineries de zinc, Liste des substances d'intérêt prioritaire, *Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999)*, Environnement & Santé Canada, 171 pp. ISBN 0-662-85482-9, URL [http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/psl2-lsp2/copper_cuivre_zinc/index-fra.php]
- Farang AM, Boese CJ, Woodward DF, Bergman HL 1994. Physiological changes and tissue accumulation in rainbow trout exposed to foodborne and waterborne metals. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**: 2021-2029
- Farang AM, Suedkamp MJ, Meyer JS, Barrows R, Woodward DF 2000. Distribution of metals during digestion by cutthroat trout fed benthic invertebrates contaminated in the Clark Fork River, Montana and the Coeur d'Alene River, Idaho, U.S.A., and fed artificially contaminated *Artemia*. *Journal of Fish Biology* **56**: 173-190
- Flemming CA & Trevors JT 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, Air and Soil Pollution* **44**: 143-158
- Garceau N, Pichaud N, Couture P 2010. Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by in vitro exposure to Cd, Cu and Ni. *Aquatic Toxicology* **98** (2): 107-112
- Gauthier C, Campbell PGC, Couture P 2008. Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **151**: 526-532
- Gauthier C, Couture P, Pyle G 2006. Metal effects on fathead minnows (*Pimephales promelas*) under field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **63**: 353-364
- Giguère A, Campbell PGC, Hare L, Couture P 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* **77**: 178-189
- Green WW, Mirza RS, Wood CM, Pyle GG 2010. Copper Binding Dynamics and Olfactory Impairment in Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Science & Technology* **44** (4) : 1431-1437
- Guderley H, Lapointe D, Bedard M, Dutil J-D 2003. Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **135**: 347-356

- Gustafsson DR, Price DA, Erséus C 2009. Genetic variation in the popular lab worm *Lumbriculus variegatus* (Annelida: Clitellata: Lumbriculidae) reveals cryptic speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **51**: 182-189
- Handy RD 1996. Dietary exposure to toxic metals in fish. Dans : Taylor EW 1996. Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Cellular and Molecular Approaches. *Society for Experimental Biology - Seminar Series 57*, Cambridge University Press, G.-B., 299pp
- Handy RD, Sims DW, Giles A, Campbell HA, Musonda MM 1999. Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. *Aquatic Toxicology* **47**: 23-41
- Hansen JA, Lipton J, Welsh PG, Cacela D, MacConnell B 2004. Reduced growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a live invertebrate diet pre-exposed to metal-contaminated sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**: 1902-1911
- Hashemi S, Blust R, De Boeck G 2007. The effect of food rations on the tissue specific copper accumulation patterns of sublethal waterborne exposure in *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**: 1507-1511
- Hashemi S, Blust R, De Boeck G 2008a. The effect of starving and feeding on copper toxicity and uptake in Cu acclimated and non-acclimated carp. *Aquatic Toxicology* **86**: 142-147
- Hashemi S, Blust R, De Boeck G 2008b. Combined effects of different food rations and sublethal copper exposure on growth and energy metabolism in common carp. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **54**: 318-324
- Hoyle I, Shaw BJ, Handy RD 2007. Dietary copper exposure in the african walking catfish, *Clarias gariepinus*: Transient osmoregulatory disturbances and oxidative stress. *Aquatic Toxicology* **83**: 62-72
- Iles AC & Rasmussen JB 2005. Indirect effects of metal contamination on energetics of yellow perch (*Perca flavescens*) resulting from food web simplification. *Freshwater Biology* **50**: 976-992
- Jobling M 1994. Fish bioenergetics. *Chapman & Hall - Fish and Fisheries Series*, London, 309 pp
- Kamunde C & Wood CM 2003. The influence of ration size on copper homeostasis during sublethal dietary copper exposure in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology* **62**: 235-254
- Kamunde C, Clayton C, Wood CM 2002a. Waterborne vs dietary copper uptake in rainbow trout and the effects of previous waterborne copper exposure. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **283**: R69-R78

- Kamunde C, Grossell M, Higgs D, Wood CM 2002b. Copper metabolism in actively growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): interactions between dietary and waterborne copper uptake. *The Journal of Experimental Biology* **205**: 279-290
- Kiessling A, Johansson L, Kiessling K-H 1990. Effects of starvation on rainbow trout muscle. I. Histochemistry, metabolism, and composition of white and red muscle in mature and immature fish. *Acta Agriculturae Scandinavica* **40**: 309-324
- Kolok AS, Hartman MM, Sershan J 2002. The physiology of copper tolerance in fathead minnows: Insight from an intraspecific, correlative analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**: 1730-1735
- Lapointe D, Pierron F, Couture P 2011. Individual and combined effects of heat stress and aqueous or dietary copper exposure in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology* **104**: 80-85
- Linder MC & Hazegh-Azam M 1996. Copper biochemistry and molecular biology. *American Journal of Clinical Nutrition* **63**: 797S-811S
- Linder MC, Wooten L, Cerveza P, Cotton S, Shulze R, Lomeli N 1998. Copper transport. *American Journal of Clinical Nutrition* **67**(suppl):965S-71S
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275
- Luoma SN & Rainbow PS 2008. Metal contamination in aquatic environment: Science and lateral management. *Cambridge University Press, Cambridge*, 573 pp
- Marr JCA, Lipton J, Cacula D, Hansen JA, Bergman HL, Meyer JS, Hogstrand C 1996. Relationship between copper exposure duration, tissue copper concentration, and rainbow trout growth. *Aquatic Toxicology* **36**: 17-30
- Martínez M, Couture P, Guderley H 1999. Temporal changes in tissue metabolic capacities of wild Atlantic cod *Gadus morhua* (L.) from Newfoundland. *Fish Physiology and Biochemistry* **20**: 181-191
- Martínez M, Guderley H, Dutil J-D, Winger PD, He P, Walsh SJ 2003. Condition, prolonged swimming performance and muscle metabolic capacities of cod (*Gadus morhua*). *The Journal of Experimental Biology* **20**: 503-511
- Martínez M, Guderley H, Nelson JA, Webber D, Dutil J-D 2002. Once a fast cod, always a fast cod: maintenance of performance hierarchies despite changing food availability in cod (*Gadus morhua*). *Physiological and Biochemical Zoology* **75**: 90-100
- McGeer JC, Szebedinszky C, McDonald DG, Wood CM 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology* **50**: 231-243

- Momčilović B 2004. The Copper Group. *Elements and their Compounds in the Environment (2nd Ed)*, Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoepler M Editors **3** (8): 731-750
- Mount DR, Highland TL, Mattson VR, Dawson TD, Lott KG, Ingersoll CG 2006. Use of the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*, as a prey organism for toxicant exposure of fish through the diet. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**: 2760-2767
- Palić C, Herolt DM, Andreasen CB, Menzel BW, Roth JA 2006. Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol : Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Aquaculture* **254**: 675-685
- Pelletier D, Dutil J-D, Blier P, Guderley H 1994. Relation between growth rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **164**: 179-190
- Pelletier D, Guderley H, Dutil J-D 1993. Does the aerobic capacity of fish muscle change with growth rates? *Fish Physiology and Biochemistry* **12**: 83-93
- Pelletier E, Campbell PGC, Denizeau F 2004. Écotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement. *Presses de l'Université du Québec*, Sainte-Foy (Canada), 462 pp
- Pierron F, Bourret V, St-Cyr J, Campbell PGC, Bernarchez L, Couture P 2009. Transcriptional responses to environmental metal exposure in wild yellow perch (*Perca Flavescens*) collected in lakes with differing environmental metal concentrations (Cd, Cu, Ni). *Ecotoxicology*, **18** (5): 620-631
- Pistole DH, Peles JD, Taylor K 2008. Influence of metal concentrations, percent salinity, and length of exposure on the metabolic rate of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology and Pharmacology* **148**: 48-52
- Puxbaum H & Limbeck A 2004. Chemical Compounds in the Atmosphere. *Elements and their Compounds in the Environment (2nd Ed)*, Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoepler M Editors **1** (2) : 17-46
- Pyle GG, Rajotte JW, Couture P 2005. Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **61**: 287-312
- R Development Core Team 2011. R: A language and environment for statistical computing, Version 2.13.1. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienne, Autriche. ISBN 3-900051-07-0, URL [<http://www.R-project.org>]
- Rainbow PS 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution* **120**: 497-507

- Rajotte JW & Couture P 2002. Effects of environmental metal contamination on the conditions, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **59**: 1296-1303
- Ramasarma T 1990. H₂O₂ has a role in cellular regulation. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* **27**:269-274
- Rasmussen JB, Gunn JM, Sherwood GD, Iles A, Gagnon A, Campbell PGC, Hontela A 2008. Direct and indirect (foodweb mediated) effects of metal exposure on the growth of yellow perch (*Perca flavescens*): Implications for ecological risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment* **14**: 317-350
- Rennie MD, Collins NC, Shuter BJ, Rajotte JW, Couture P 2005. A comparison of methods for estimating activity costs of wild fish populations: more active fish observed to grow slower. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **62**: 767-780
- Scott WB & Crossman EJ 1998. Freshwater fishes of Canada. *Galt House Publications Ltd*, Canada, 966 pp
- Shaw BJ & Handy RD 2006. Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquatic Toxicology* **76**: 111-121
- Sherwood GD, Kovacs J, Hontela A, Rasmussen JB 2002. Simplified food webs lead to energetic bottlenecks in polluted lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **59**: 1-5
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**: 76-85
- Spear PA & Pierce RC 1980. Le cuivre dans l'environnement aquatique : chimie, répartition et toxicologie. *Conseil national de recherches Canada - Comité associé sur les critères scientifiques concernant l'état de l'environnement*, Ottawa 16455, 249 pp
- Stohs SJ & Bagchi D 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. *Free Radical Biology & Medicine* **18** : 321-336
- Taylor LN, McFarlane WJ, Pyle GG, Couture P, McDonald DG 2004. Use of performance indicators in evaluating chronic metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology* **67**: 371-385
- Villeneuve M 2008 [En ligne]. ©La cellule animale. Centre collégial de développement de matériel didactique, Montréal, Canada. URL [<http://www.ccdmd.qc.ca/ri/cellule>] [Consulté en septembre 2011]
- Wapnir RA 1998. Copper absorption and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **67** (suppl): 1054S-1060S

- Wieser W, Krumschnaber G, Ojwand-Ikwor JP 1992. The energetics of starvation and growth after refeeding in juveniles of three cyprinid species. *Environmental Biology of Fishes* **33**: 63-71
- Woodward Df, Farag AM, Bergman HL, DeLonay AJ, Litte EE, Smith CE, Barrows FT 1995. Metals-contaminated benthic invertebrates in the Clark Fork River, Montana: Effects on age-0 brown trout and rainbow trout. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **52**: 1994-2004
- Xiang LX & Shao JZ 2003. Role of Intracellular Ca²⁺, Reactive Oxygen Species, Mitochondria Transmembrane Potential, and Antioxidant Enzymes in Heavy Metal-Induced Apoptosis in Fish Cells. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **71**: 114-122
- Zorov DB, Krasnikov BF, Kuzminova AE, Vysokikh MY, Zorova LD 1997. Mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria. *Bioscience Reports* **17**: 507-520

7. ANNEXES



ANNEXE A

Tableau A. Statistiques sommaires des paramètres de rendement alimentaire de charge du cuivre calculés pour le corps (sans le tube digestif) et la paroi du tube digestif des poissons soumis à l'ingestion de proies contaminées pendant 32 ou 48 jours

Poissons	1P	1Cu	5P	5Cu	Effets significatifs
<i>Après 32 jours d'exposition</i>					
DACu corps	-	-0,999 ± 1,099 (10)	-	-2,567 ± 0,700 (15)	TA
DRACu corps	-	-0,948 ± 5,343 (10)	-	-1,627 ± 1,153 (15)	-
BRACu corps	-	-3,601 ± 11,916 (10)	-	-17,007 ± 13,746 (15)	TA
DACu tube digestif	-	3,065 ± 2,994 (10)	-	3,938 ± 2,195 (15)	-
DRACu tube digestif	-	0,051 ± 0,128 (10)	-	0,015 ± 0,040 (15)	-
BRACu tube digestif	-	0,076 ± 0,273 (10)	-	0,116 ± 0,421 (15)	-
<i>Après 48 jours d'exposition</i>					
DACu corps	-	-1,219 ± 0,977 (7)	-	-1,091 ± 0,643 (13)	-
DRACu corps	-	-1,475 ± 1,547 (7)	-	-0,279 ± 0,378 (13)	TA
BRACu corps	-	-3,406 ± 3,609 (7)	-	-3,300 ± 4,400 (13)	-
DACu tube digestif	-	3,525 ± 4,229 (7)	-	9,393 ± 5,662 (13)	TA
DRACu tube digestif	-	0,063 ± 0,076 (7)	-	0,044 ± 0,036 (13)	-
BRACu tube digestif	-	0,139 ± 0,169 (7)	-	0,495 ± 0,402 (13)	TA

Les différences d'accumulation du cuivre (DACu) sont exprimées selon des unités en $\mu\text{g Cu}\cdot\text{g}^{-1}$ masse sèche, les différences de rendement alimentaire de charge du cuivre (DRACu) en %, et le bilan journalier de rendement alimentaire de charge du cuivre (BRACu) en $\mu\text{g Cu}\cdot\text{g}^{-1}$ poisson frais-jour⁻¹. Les 4 traitements découlant de la combinaison des facteurs expérimentaux sont énumérés ci-après : 1%*nourriture propre (1P), 1%*nourriture contaminée au cuivre (1Cu), 5%*nourriture propre (5P), 5%*nourriture contaminée au cuivre (5Cu). Les données présentées dans le tableau suivent cette séquence : moyenne ± écart-type (n). Les résultats statistiques (Effets significatifs) proviennent des tests ANOVA effectués seulement selon le facteur d'alimentation (taux d'alimentation ; TA). Tous les effets présentés sont significatifs ($p < 0,05$).



ANNEXE B

Tableau B1.1 Statistiques sommaires des tests ANOVA et de comparaisons multiples Tukey pour les concentrations de cuivre mesurées dans le corps (sans le tube digestif) et la paroi du tube digestif des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (**Bioaccumulation du cuivre**)‡

Variable	Facteur	Analyse de la variance			Traitement	Comparaison des moyennes		Tukey TA*Cu
		DDL	Ratio F	Valeur p		TA	Cu	
<i>Après 32 jours d'exposition</i>								
[Cu] corps n=55	TA	1	1,2779	0,26358	1P	-	A	-
	Cu	1	4,372	0,04154	1Cu	-	B	-
	TA*Cu	1	2,5107	0,11926	5P 5Cu	- -	A B	- -
[Cu] tube digestif n=55	TA	1	5,1081	0,02811	1Cu	b	B	-
	Cu	1	28,692	2,05E-06	5P	b	A	-
	TA*Cu	1	0,0675	0,79612	5Cu 1P	a a	B A	- -
<i>Après 48 jours d'exposition</i>								
[Cu] corps n=41	TA	1	2,1879	0,147798	1P	-	A	-
	Cu	1	8,5194	0,006024	1Cu	-	B	-
	TA*Cu	1	1,3225	0,25776	5P 5Cu	- -	A B	- -
[Cu] tube digestif n=41	TA	1	3,3445	0,07572	1Cu	-	-	B
	Cu	1	38,8074	3,43E-07	5P	-	-	B
	TA*Cu	1	5,1665	0,02909	5Cu 1P	- -	- -	B A

Voir les moyennes, unités et autres détails dans le tableau 3.2

‡ Voir le tableau B1.2 et B1.3 pour les résultats des paramètres de rendement alimentaire de charge du cuivre

Tableau B1.2 Statistiques sommaires des tests ANOVA et de comparaisons multiples Tukey pour les paramètres de rendement alimentaire de charge du cuivre calculés pour le corps (sans le tube digestif) des poissons soumis à l'ingestion de proies contaminées pendant 32 ou 48 jours (**Bioaccumulation du cuivre**)‡

Variable	Facteur	Analyse de la variance			Traitement	Comparaison des moyennes		Tukey TA*Cu
		DDL	Ratio F	Valeur p		TA	Cu	
<i>Après 32 jours d'exposition</i>								
DACu corps n=25	TA	1	19,142	0,000221	5P	-	-	-
	Cu	-	-	-	5Cu	a	-	-
	TA*Cu	-	-	-	1P	-	-	-
		-	-	-	1Cu	b	-	-
DRACu corps n=25	TA	1	0,2307	0,6356	5Cu	-	-	-
	Cu	-	-	-	1P	-	-	-
	TA*Cu	-	-	-	1Cu	-	-	-
		-	-	-	5P	-	-	-
BRACu corps n=25	TA	1	6,3215	0,01937	1P	-	-	-
	Cu	-	-	-	1Cu	a	-	-
	TA*Cu	-	-	-	5P	-	-	-
		-	-	-	5Cu	b	-	-
<i>Après 48 jours d'exposition</i>								
DACu corps n=20	TA	1	0,1252	0,7275	5P	-	-	-
	Cu	-	-	-	5Cu	-	-	-
	TA*Cu	-	-	-	1P	-	-	-
		-	-	-	1Cu	-	-	-
DRACu corps n=20	TA	1	7,2968	0,01461	5Cu	-	-	-
	Cu	-	-	-	1P	b	-	-
	TA*Cu	-	-	-	1Cu	-	-	-
		-	-	-	5P	a	-	-
BRACu corps n=20	TA	1	0,003	0,9571	1P	-	-	-
	Cu	-	-	-	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	-	-	-	5P	-	-	-
		-	-	-	5Cu	-	-	-

Voir les moyennes, unités et autres détails dans le tableau A et la figure 3.2

‡ Voir le tableau B1.3 pour les résultats dans la paroi du tube digestif ainsi que le tableau B1.1 pour les résultats de la concentration du cuivre dans le corps (sans le tube digestif) et la paroi du tube digestif

Tableau B1.3 Statistiques sommaires des tests ANOVA et de comparaisons multiples Tukey pour les paramètres de rendement alimentaire de charge du cuivre calculés pour la paroi du tube digestif des poissons soumis à l'ingestion de proies contaminées pendant 32 ou 48 jours (**Bioaccumulation du cuivre**)‡

Variable	Facteur	Analyse de la variance			Traitement	Comparaison des moyennes		Tukey TA*Cu
		DDL	Ratio F	Valeur p		TA	Cu	
<i>Après 32 jours d'exposition</i>								
DACu tube digestif n=25	TA	1	0,7091	0,4084	1Cu	-	-	-
	Cu	-	-	-	5P	-	-	-
	TA*Cu	-	-	-	5Cu 1P	-	-	-
DRACu tube digestif n=25	TA	1	1,0771	0,3101	5P	-	-	-
	Cu	-	-	-	5Cu	-	-	-
	TA*Cu	-	-	-	1P	-	-	-
		-	-	-	1Cu	-	-	-
BRACu tube digestif n=25	TA	1	0,0673	0,7976	5Cu	-	-	-
	Cu	-	-	-	1P	-	-	-
	TA*Cu	-	-	-	1Cu 5P	-	-	-
<i>Après 48 jours d'exposition</i>								
DACu tube digestif n=20	TA	1	5,7334	0,02774	1Cu	-	-	-
	Cu	-	-	-	5P	b	-	-
	TA*Cu	-	-	-	5Cu 1P	-	-	-
DRACu tube digestif n=20	TA	1	0,6169	0,4424	5P	-	-	-
	Cu	-	-	-	5Cu	-	-	-
	TA*Cu	-	-	-	1P	-	-	-
		-	-	-	1Cu	-	-	-
BRACu tube digestif n=20	TA	1	4,9263	0,03954	5Cu	-	-	-
	Cu	-	-	-	1P	b	-	-
	TA*Cu	-	-	-	1Cu	-	-	-
		-	-	-	5P	a	-	-

Voir les moyennes, unités et autres détails dans le tableau A et la figure 3.2

‡ Voir le tableau B1.2 pour les résultats dans le corps (sans le tube digestif) ainsi que le tableau B1.1 pour les résultats de la concentration du cuivre dans le corps (sans le tube digestif) et la paroi du tube digestif

Tableau B2.1 Statistiques sommaires des tests ANOVA et de comparaisons multiples Tukey pour la première partie de la composition du corps (sans le tube digestif) des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (**Statut énergétique**)‡

Variable	Facteur	Analyse de la variance			Traitement	Comparaison des moyennes		Tukey TA*Cu
		DDL	Ratio F	Valeur p		TA	Cu	
<i>Après 32 jours d'exposition</i>								
Protéines n=55	TA	1	38,2154	1,06E-07	1P	b	-	-
	Cu	1	0,2365	0,6288	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	1,9983	0,1636	5P 5Cu	a a	- -	- -
Lipides n=53	TA	1	9,1142	0,004019	1Cu	b	-	-
	Cu	1	0,0107	0,918026	5P	b	-	-
	TA*Cu	1	1,8639	0,178406	5Cu 1P	a a	- -	- -
Glucides n=54	TA	1	2,3672	0,1302	5P	-	-	-
	Cu	1	0,0002	0,9877	5Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	1,1635	0,2859	1P 1Cu	- -	- -	- -
<i>Après 48 jours d'exposition</i>								
Protéines n=41	TA	1	12,153	0,00128	1P	b	B	-
	Cu	1	4,9816	0,03176	1Cu	b	A	-
	TA*Cu	1	0,0526	0,81981	5P 5Cu	a a	B A	- -
Lipides n=41	TA	1	0,4187	0,52157	1Cu	-	-	-
	Cu	1	4,044	0,05166	5P	-	-	-
	TA*Cu	1	0,1943	0,66193	5Cu 1P	- -	- -	- -
Glucides n=41	TA	1	3,3411	0,07564	5P	-	-	-
	Cu	1	1,1609	0,28826	5Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	0,4509	0,50608	1P 1Cu	- -	- -	- -

Voir les moyennes, unités et autres détails dans le tableau 3.3

‡ Voir le tableau B2.2 pour les résultats de la deuxième partie de la composition du corps (sans le tube digestif) et le taux métabolique de routine, ainsi que les tableaux B2.3 et B2.4 pour les résultats de croissance

Tableau B2.2 Statistiques sommaires des tests ANOVA et de comparaisons multiples Tukey pour la deuxième partie de la composition du corps (sans le tube digestif) des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (**Statut énergétique**)‡

Variable	Facteur	Analyse de la variance			Traitement	Comparaison des moyennes		Tukey TA*Cu
		DDL	Ratio F	Valeur p		TA	Cu	
<i>Après 32 jours d'exposition</i>								
Eau n=55	TA	1	1,0513	0,3101	5Cu	-	-	-
	Cu	1	1,8576	0,1789	1P	-	-	-
	TA*Cu	1	0,7494	0,3907	1Cu 5P	-	-	-
Réserves n=54	TA	1	30,3267	1,3E-06	1P	b	-	-
	Cu	1	0,1505	0,6997	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,8501	0,361	5P 5Cu	a a	-	-
TMR n=55	TA	1	31,0744	9,4E-07	1P	b	-	-
	Cu	1	1,0646	0,307	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,2667	0,6078	5P 5Cu	a a	-	-
<i>Après 48 jours d'exposition</i>								
Eau n=41	TA	1	1,2773	0,2657	5Cu	-	-	-
	Cu	1	0,1969	0,6598	1P	-	-	-
	TA*Cu	1	0,1084	0,7439	1Cu 5P	-	-	-
Réserves n=41	TA	1	4,5536	0,03954	1P	b	B	-
	Cu	1	5,9551	0,01958	1Cu	b	A	-
	TA*Cu	1	0,1804	0,67346	5P 5Cu	a a	B A	-
TMR n=41	TA	1	9,8783	0,00329	1P	b	-	-
	Cu	1	0,1275	0,72309	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,3978	0,5321	5P 5Cu	a a	-	-

Voir les moyennes, unités et autres détails dans le tableau 3.3

‡ Voir le tableau B2.1 pour les résultats de la première partie de la composition du corps (sans le tube digestif), ainsi que les tableaux B2.3 et B2.4 pour les résultats de croissance

Tableau B2.3 Statistiques sommaires des tests ANOVA et de comparaisons multiples Tukey pour la première partie de la croissance des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (**Statut énergétique**)‡

Variable	Facteur	Analyse de la variance			Traitement	Comparaison des moyennes		Tukey TA*Cu
		DDL	Ratio F	Valeur p		TA	Cu	
M0 n=129	TA	1	1,0288	0,3124	1P	-	-	-
	Cu	1	0,0121	0,9126	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	0,28	0,5977	5P 5Cu	-	-	-
M16 n=129	TA	1	3,9464	0,04916	1P	b	-	-
	Cu	1	0,1012	0,75095	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,6653	0,41625	5P 5Cu	a a	- -	- -
M32 n=129	TA	1	10,5893	0,001463	1P	b	-	-
	Cu	1	0,0307	0,861304	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,314	0,57625	5P 5Cu	a a	- -	- -
M48 n=56	TA	1	5,6752	0,0209	1P	b	-	-
	Cu	1	1,0308	0,3147	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,1888	0,6657	5P 5Cu	a a	- -	- -
IE0 n=129	TA	1	3,7603	0,05474	1P	-	-	-
	Cu	1	0,4339	0,51129	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	2,7371	0,10055	5P 5Cu	- -	- -	- -
IE16 n=129	TA	1	4,488	0,03611	1P	b	-	-
	Cu	1	0,3182	0,57368	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,3055	0,58145	5P 5Cu	a a	- -	- -
IE32 n=129	TA	1	49,8627	1,01E-10	1P	b	-	-
	Cu	1	0,9079	0,3425	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,5724	0,4507	5P 5Cu	a a	- -	- -
IE48 n=56	TA	1	41,5884	3,74E-08	1P	b	-	-
	Cu	1	1,3141	0,2569	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,1486	0,7015	5P 5Cu	a a	- -	- -

Voir les moyennes, unités et autres détails dans le tableau 3.4

‡ Voir le tableau B2.4 pour les résultats de la deuxième partie de la croissance, ainsi que les tableaux B2.1 et B2.2 pour les résultats de la composition du corps (sans le tube digestif) et du taux métabolique de routine

Tableau B2.4 Statistiques sommaires des tests ANOVA et de comparaisons multiples Tukey pour la deuxième partie de la croissance des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (**Statut énergétique**)‡

Variable	Facteur	Analyse de la variance			Traitement	Comparaison des moyennes		Tukey TA*Cu
		DDL	Ratio F	Valeur p		TA	Cu	
ECN16 n=129	TA	1	11,7522	0,000824	1P	-	-	A
	Cu	1	2,4452	0,120414	1Cu	-	-	B
	TA*Cu	1	4,3579	0,038868	5P	-	-	A
					5Cu	-	-	A
ECN32 n=129	TA	1	146,886	<2E-16	1P	b	-	-
	Cu	1	0,1502	0,699	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,6708	0,4143	5P	a	-	-
					5Cu	a	-	-
ECN48 n=56	TA	1	247,522	<2E-16	1P	b	-	-
	Cu	1	0,1816	0,6718	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,0002	0,9879	5P	a	-	-
					5Cu	a	-	-
TCSM16 n=129	TA	1	32,0211	9,88E-08	1P	-	-	BC
	Cu	1	0,7918	0,37528	1Cu	-	-	B
	TA*Cu	1	4,9885	0,02729	5P	-	-	AC
					5Cu	-	-	A
TCSM32 n=129	TA	1	44,4626	7,48E-10	1P	b	-	-
	Cu	1	0,0192	0,89	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,8823	0,3494	5P	a	-	-
					5Cu	a	-	-
TCSM48 n=56	TA	1	32,5046	5,68E-07	1P	b	-	-
	Cu	1	1,1665	0,2851	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,126	0,724	5P	a	-	-
					5Cu	a	-	-
TCSL16 n=129	TA	1	16,6062	8,12E-05	1P	b	-	-
	Cu	1	0,9021	0,344	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,8216	0,3665	5P	a	-	-
					5Cu	a	-	-
TCSL32 n=129	TA	1	0,9464	0,3325	1P	-	-	-
	Cu	1	1,4551	0,23	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	0,6692	0,4149	5P	-	-	-
					5Cu	-	-	-
TCSL48 n=56	TA	1	0,2818	0,5978	1P	-	-	-
	Cu	1	0,3342	0,5657	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	0,02	0,888	5P	-	-	-
					5Cu	-	-	-

Voir les moyennes, unités et autres détails dans le tableau 3.4

‡ Voir le tableau B2.3 pour les résultats de la première partie de la croissance, ainsi que les tableaux B2.1 et B2.2 pour les résultats de la composition du corps (sans le tube digestif) et du taux métabolique de routine

Tableau B3.1 Statistiques sommaires des tests ANOVA et de comparaisons multiples Tukey pour la première partie de l'activité enzymatique des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (Voies métaboliques)‡

Variable	Facteur	Analyse de la variance			Traitement	Comparaison des moyennes		Tukey TA*Cu
		DDL	Ratio F	Valeur p		TA	Cu	
<i>Après 32 jours d'exposition</i>								
PK n=55	TA	1	20,1156	4,16E-05	1P	b	-	-
	Cu	1	0,7349	0,3953	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,0135	0,9081	5P	a	-	-
					5Cu	a	-	-
LDH n=55	TA	1	14,693	0,000349	1P	b	-	-
	Cu	1	0,5965	0,443491	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,935	0,33813	5P	a	-	-
					5Cu	a	-	-
HOAD n=55	TA	1	20,0602	4,25E-05	1P	b	-	-
	Cu	1	0,0964	0,7575	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,2792	0,5995	5P	a	-	-
					5Cu	a	-	-
<i>Après 48 jours d'exposition</i>								
PK n=41	TA	1	12,6249	0,00106	5P	b	B	-
	Cu	1	6,3781	0,01597	5Cu	b	A	-
	TA*Cu	1	1,8334	0,18394	1P	a	B	-
LDH n=41	TA	1	7,6109	0,008965	1Cu	a	A	-
					5Cu	a	-	-
	Cu	1	0,3516	0,556792	1P	b	-	-
					5P	a	-	-
HOAD n=41	TA*Cu	1	0,1248	0,725884	1Cu	b	-	-
					5Cu	a	-	-
	TA	1	25,7548	1,12E-05	1P	b	-	-
	Cu	1	0,8405	0,3652	1Cu	b	-	-
TA*Cu	1	0,742	0,3946	5P	a	-	-	
				5Cu	a	-	-	

Voir les moyennes, unités et autres détails dans le tableau 3.5

‡ Voir les tableaux B3.2 à B3.4 pour les autres résultats d'activité enzymatique des poissons, ainsi que les tableaux B3.5 à B3.8 pour les résultats d'activité spécifique des enzymes

Tableau B3.2 Statistiques sommaires des tests ANOVA et de comparaisons multiples Tukey pour la deuxième partie de l'activité enzymatique des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (**Voies métaboliques**)‡

Variable	Facteur	Analyse de la variance			Traitement	Comparaison des moyennes		Tukey TA*Cu
		DDL	Ratio F	Valeur p		TA	Cu	
<i>Après 32 jours d'exposition</i>								
CS n=55	TA	1	54,7086	1,3E-09	1P	b	-	-
	Cu	1	2,1215	0,1514	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,2174	0,643	5P 5Cu	a a	- -	- -
CCO n=55	TA	1	39,1169	8,2E-08	1P	b	-	-
	Cu	1	0,1437	0,7062	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	1,5004	0,2262	5P 5Cu	a a	- -	- -
NDPK n=55	TA	1	26,4268	4,4E-06	1P	b	-	-
	Cu	1	0,7829	0,3804	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,2179	0,6427	5P 5Cu	a a	- -	- -
<i>Après 48 jours d'exposition</i>								
CS n=41	TA	1	27,9821	5,7E-06	1P	b	-	-
	Cu	1	1,831	0,1842	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,1013	0,7521	5P 5Cu	a a	- -	- -
CCO n=41	TA	1	18,6303	0,00011	1P	b	-	-
	Cu	1	0,2792	0,60039	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,1784	0,67523	5P 5Cu	a a	- -	- -
NDPK n=41	TA	1	13,5326	0,00074	1P	b	-	-
	Cu	1	0,1096	0,74245	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,0033	0,95453	5P 5Cu	a a	- -	- -

Voir les moyennes, unités et autres détails dans le tableau 3.5

‡ Voir les tableaux B3.1, B3.3 et B3.4 pour les autres résultats d'activité enzymatique des poissons, ainsi que les tableaux B3.5 à B3.8 pour les résultats d'activité spécifique des enzymes

Tableau B3.3 Statistiques sommaires des tests ANOVA et de comparaisons multiples Tukey pour la troisième partie de l'activité enzymatique des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (Voies métaboliques)‡

Variable	Facteur	Analyse de la variance			Traitement	Comparaison des moyennes		Tukey TA*Cu
		DDL	Ratio F	Valeur p		TA	Cu	
<i>Après 32 jours d'exposition</i>								
SODT n=55	TA	1	7,6535	0,007873	1P	b	-	-
	Cu	1	0,2923	0,591104	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,0806	0,777697	5P 5Cu	a a	- -	- -
SODM n=55	TA	1	0,1685	0,6832	1P	-	-	-
	Cu	1	0,4558	0,4846	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	0,4518	0,5045	5P 5Cu	- -	- -	- -
SODCE n=55	TA	1	7,0934	0,01033	1P	b	-	-
	Cu	1	0,5884	0,44659	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,0057	0,94037	5P 5Cu	a a	- -	- -
<i>Après 48 jours d'exposition</i>								
SODT n=41	TA	1	4,528	0,04007	1P	b	-	-
	Cu	1	0,002	0,96495	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,1143	0,73724	5P 5Cu	a a	- -	- -
SODM n=41	TA	1	0,9849	0,993	1P	-	-	-
	Cu	1	0,3262	0,3274	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	0,3262	0,5713	5P 5Cu	- -	- -	- -
SODCE n=41	TA	1	6,0133	0,01904	1P	b	-	-
	Cu	1	0,2115	0,64828	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,4662	0,49899	5P 5Cu	a a	- -	- -

Voir les moyennes, unités et autres détails dans le tableau 3.5

‡ Voir les tableaux B3.1, B3.2 et B3.4 pour les autres résultats d'activité enzymatique des poissons, ainsi que les tableaux B3.5 à B3.8 pour les résultats d'activité spécifique des enzymes

Tableau B3.4 Statistiques sommaires des tests ANOVA et de comparaisons multiples Tukey pour la quatrième partie de l'activité enzymatique des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (**Voies métaboliques**)‡

Variable	Facteur	Analyse de la variance			Traitement	Comparaison des moyennes		Tukey TA*Cu
		DDL	Ratio F	Valeur p		TA	Cu	
<i>Après 32 jours d'exposition</i>								
CAT n=55	TA	1	59,3102	4,27E-10	1P	b	-	-
	Cu	1	0,6371	0,4285	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,2631	0,6102	5P 5Cu	a a	- -	- -
GST n=55	TA	1	0,3983	0,5308	1P	-	-	-
	Cu	1	0,0271	0,8698	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	0,0007	0,9788	5P 5Cu	- -	- -	- -
<i>Après 48 jours d'exposition</i>								
CAT n=41	TA	1	28,0414	5,65E-06	1P	b	-	-
	Cu	1	1,6754	0,2036	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,722	0,401	5P 5Cu	a a	- -	- -
GST n=41	TA	1	6,2842	0,0167	1P	b	-	-
	Cu	1	1,0151	0,3202	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,2944	0,5907	5P 5Cu	a a	- -	- -

Voir les moyennes, unités et autres détails dans le tableau 3.5

‡ Voir les tableaux B3.1 à B3.3 pour les autres résultats d'activité enzymatique des poissons, ainsi que les tableaux B3.5 à B3.8 pour les résultats d'activité spécifique des enzymes

Tableau B3.5 Statistiques sommaires des tests ANOVA et de comparaisons multiples Tukey pour la première partie de l'activité spécifique des enzymes des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (**Voies métaboliques**)‡

Variable	Facteur	Analyse de la variance			Traitement	Comparaison des moyennes		Tukey TA*Cu
		DDL	Ratio F	Valeur p		TA	Cu	
<i>Après 32 jours d'exposition</i>								
PK n=55	TA	1	3,9239	0,05301	1P	-	-	-
	Cu	1	0,6817	0,41285	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	0,2129	0,64647	5P 5Cu	- -	- -	- -
LDH n=55	TA	1	4,8497	0,0322	1P	b	-	-
	Cu	1	0,313	0,5783	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,4299	0,515	5P 5Cu	a a	- -	- -
HOAD n=55	TA	1	0,6026	0,4412	1P	-	-	-
	Cu	1	0,1371	0,7127	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	0,1801	0,673	5P 5Cu	- -	- -	- -
<i>Après 48 jours d'exposition</i>								
PK n=41	TA	1	6,5034	0,01504	1P	b	-	-
	Cu	1	3,1544	0,08395	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	1,41	0,24262	5P 5Cu	a a	- -	- -
LDH n=41	TA	1	4,6115	0,03838	1P	b	-	-
	Cu	1	2,3912	0,13053	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,228	0,63585	5P 5Cu	a a	- -	- -
HOAD n=41	TA	1	10,5915	0,002431	1P	b	-	-
	Cu	1	3,3897	0,073634	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,7708	0,38565	5P 5Cu	a a	- -	- -

Voir les moyennes, unités et autres détails dans le tableau 3.6

‡ Voir les tableaux B3.6 à B3.8 pour les autres résultats d'activité spécifique des enzymes, ainsi que les tableaux B3.1 à B3.4 pour les résultats de l'activité enzymatique des poissons

Tableau B3.6 Statistiques sommaires des tests ANOVA et de comparaisons multiples Tukey pour la deuxième partie de l'activité spécifique des enzymes des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (**Voies métaboliques**)‡

Variable	Facteur	Analyse de la variance			Traitement	Comparaison des moyennes		Tukey TA*Cu
		DDL	Ratio F	Valeur p		TA	Cu	
<i>Après 32 jours d'exposition</i>								
CS n=55	TA	1	0,8551	0,3595	1P	-	-	-
	Cu	1	1,6895	0,1995	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	0,4683	0,4969	5P	-	-	-
		5Cu			-	-	-	
CCO n=55	TA	1	1,5554	0,218	1P	-	-	-
	Cu	1	0,0001	0,9941	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	0,0913	0,7637	5P	-	-	-
		5Cu			-	-	-	
NDPK n=55	TA	1	10,9772	0,0017	1P	b	-	-
	Cu	1	1,621	0,20873	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,0257	0,87316	5P	a	-	-
		5Cu			a	-	-	
<i>Après 48 jours d'exposition</i>								
CS n=41	TA	1	13,0805	0,00089	1P	b	-	-
	Cu	1	0,1828	0,67142	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,0001	0,99238	5P	a	-	-
		5Cu			a	-	-	
CCO n=41	TA	1	9,889	0,00327	1P	b	-	-
	Cu	1	0,4593	0,50217	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,2273	0,63632	5P	a	-	-
		5Cu			a	-	-	
NDPK n=41	TA	1	10,0694	0,00303	1P	b	-	-
	Cu	1	0,1136	0,73798	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,0025	0,96071	5P	a	-	-
		5Cu			a	-	-	

Voir les moyennes, unités et autres détails dans le tableau 3.6

‡ Voir les tableaux B3.5, B3.7 et B3.8 pour les autres résultats d'activité spécifique des enzymes, ainsi que les tableaux B3.1 à B3.4 pour les résultats de l'activité enzymatique des poissons

Tableau B3.7 Statistiques sommaires des tests ANOVA et de comparaisons multiples Tukey pour la troisième partie de l'activité spécifique des enzymes des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (**Voies métaboliques**)‡

Variable	Facteur	Analyse de la variance			Traitement	Comparaison des moyennes		Tukey TA*Cu
		DDL	Ratio F	Valeur p		TA	Cu	
<i>Après 32 jours d'exposition</i>								
SODT n=55	TA	1	0,6726	0,416	1P	-	-	-
	Cu	1	0,088	0,7679	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	0,4531	0,5039	5P 5Cu	-	-	-
SODM n=55	TA	1	5,6884	0,02083	1P	a	-	-
	Cu	1	0,4496	0,50554	1Cu	a	-	-
	TA*Cu	1	0,0091	0,92454	5P 5Cu	b b	-	-
SODCE n=55	TA	1	0,0398	0,8426	1P	-	-	-
	Cu	1	0,323	0,5723	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	0,3771	0,5419	5P 5Cu	-	-	-
<i>Après 48 jours d'exposition</i>								
SODT n=41	TA	1	0,0228	0,8808	1P	-	-	-
	Cu	1	2,023	0,1633	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	0,0419	0,839	5P 5Cu	-	-	-
SODM n=41	TA	1	2,9188	0,09593	1P	-	-	-
	Cu	1	0,1206	0,73031	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	0,5701	0,45499	5P 5Cu	-	-	-
SODCE n=41	TA	1	0,5405	0,4669	1P	-	-	-
	Cu	1	2,0243	0,1632	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	0,3987	0,5316	5P 5Cu	-	-	-

Voir les moyennes, unités et autres détails dans le tableau 3.6

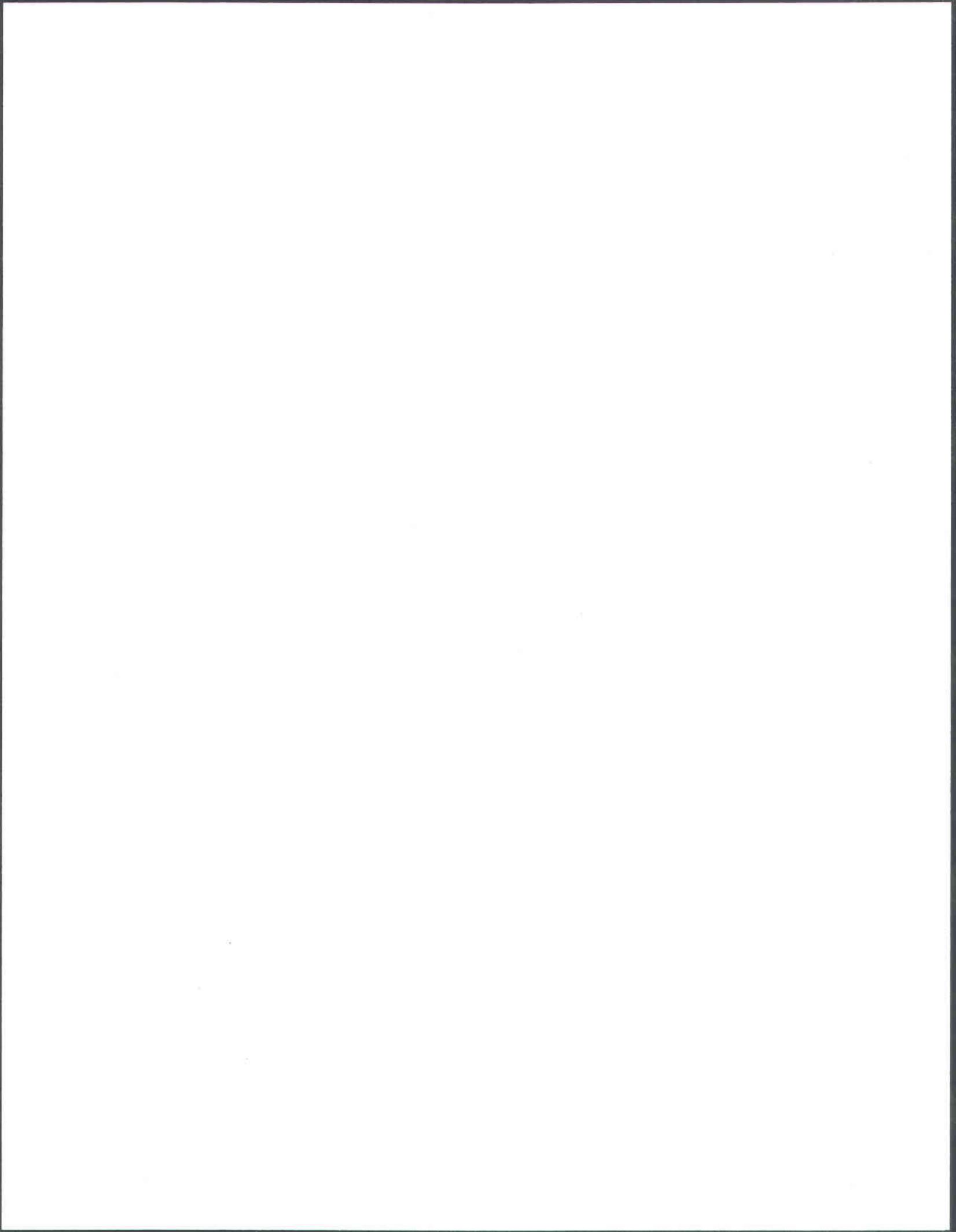
‡ Voir les tableaux B3.5, B3.6 et B3.8 pour les autres résultats d'activité spécifique des enzymes, ainsi que les tableaux B3.1 à B3.4 pour les résultats de l'activité enzymatique des poissons

Tableau B3.8 Statistiques sommaires des tests ANOVA et de comparaisons multiples Tukey pour la quatrième partie de l'activité spécifique des enzymes des poissons soumis aux conditions expérimentales pendant 32 ou 48 jours (**Voies métaboliques**)‡

Variable	Facteur	Analyse de la variance			Traitement	Comparaison des moyennes		Tukey TA*Cu
		DDL	Ratio F	Valeur p		TA	Cu	
<i>Après 32 jours d'exposition</i>								
CAT n=55	TA	1	58,3426	5,36E-10	1P	b	-	-
	Cu	1	2,0642	0,1569	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,0532	0,8184	5P 5Cu	a a	- -	- -
GST n=55	TA	1	24,6051	8,21E-06	1P	a	-	-
	Cu	1	0,0457	0,8316	1Cu	a	-	-
	TA*Cu	1	0,6773	0,4144	5P 5Cu	b b	- -	- -
<i>Après 48 jours d'exposition</i>								
CAT n=41	TA	1	31,2621	2,25E-06	1P	b	-	-
	Cu	1	0,7095	0,406	1Cu	b	-	-
	TA*Cu	1	0,3899	0,5362	5P 5Cu	a a	- -	- -
GST n=41	TA	1	0,3225	0,5735	1P	-	-	-
	Cu	1	0,9962	0,3247	1Cu	-	-	-
	TA*Cu	1	0,2851	0,5965	5P 5Cu	- -	- -	- -

Voir les moyennes, unités et autres détails dans le tableau 3.6

‡ Voir les tableaux B3.5 à B3.7 pour les autres résultats d'activité spécifique des enzymes, ainsi que les tableaux B3.1 à B3.4 pour les résultats de l'activité enzymatique des poissons



ANNEXE C

Tableau C. Statistiques sommaires des concentrations de cuivre mesurées dans le corps (sans le tube digestif) et dans la paroi du tube digestif des poissons, de la composition du corps, du taux métabolique de routine, de la croissance, de l'activité enzymatique des tissus corporels, et de l'activité spécifique des enzymes mesurées pour les poissons avant l'expérience (Groupe témoin initial)‡

Poissons	Moyenne	Poissons	Activité	Activité spécifique
[Cu] Corps	3,6 ± 1,5 (15)	PK	14,9 ± 5,2 (15)	0,115 ± 0,033 (15)
[Cu] Tube digestif	4,6 ± 0,9 (15)	LDH	98,4 ± 45,1 (15)	0,76 ± 0,33 (15)
		HOAD	1,32 ± 0,24 (15)	0,0105 ± 0,0020 (15)
Protéines	128,2 ± 19,3 (15)	CS	3,00 ± 0,50 (15)	0,024 ± 0,004 (15)
Lipides	75,0 ± 15,1 (15)	CCO	25,3 ± 4,9 (15)	0,20 ± 0,05 (15)
Glucides	3,4 ± 0,9 (15)			
Eau	758,6 ± 27,8 (15)	NDPK	319,7 ± 68,5 (15)	2,55 ± 0,74 (15)
Réserves	6101,0 ± 909,1 (15)			
		SODT	662,6 ± 140,1 (15)	5,3 ± 1,2 (15)
TMR	400,6 ± 102,2 (15)	SODM	164,3 ± 48,2 (15)	1,32 ± 0,49 (15)
		SODCE	498,3 ± 141,3 (15)	3,9 ± 1,1 (15)
MO	0,49 ± 0,21 (144)	CAT	2666,0 ± 1404,5 (15)	21,0 ± 11,1 (15)
IEO	1,04 ± 0,12 (144)	GST	15,2 ± 2,0 (15)	0,12 ± 0,03 (15)

La concentration de cuivre [Cu] est exprimée selon des unités en $\mu\text{g Cu} \cdot \text{g}^{-1}$ tissus secs, les protéines, lipides, glucides et l'eau en $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tissus frais, les réserves disponibles en $\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$ tissus frais, le taux métabolique de routine (TMR) en $\text{mg O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, la masse (M) en g, et l'indice d'embonpoint (IE) n'a pas d'unité. L'activité enzymatique est exprimée en $\text{UI} \cdot \text{g}^{-1}$ tissus frais et l'activité spécifique des enzymes en $\text{UI} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéines, pour la pyruvate kinase (PK), la lactate déshydrogénase (LDH), la β -hydroxyacyl Co-A déshydrogénase (HOAD), la citrate synthase (CS), la cytochrome C oxydase (CCO), la nucléotide diphosphate kinase (NDPK), la superoxyde dismutase totale (SODT), mitochondriale (SODM) et cytosolique & extracellulaire (SODCE), la catalase (CAT), et la glutathion S-transférase (GST). Les données présentées dans le tableau suivent cette séquence : moyenne \pm écart-type (n).

‡ La masse et l'indice d'embonpoint ont initialement été mesurés pour les poissons expérimentaux ainsi que pour le groupe témoin initial de l'expérience

