Université du Québec
INRS-Eau, Terre et Environnement

Dynamique de la prise en charge et de la détoxication de métaux (Cd, Cu, Zn) chez la perchaude (*Perca flavescens*)

Par
Lisa D. Kraemer
Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (PhD)
en Sciences de l'eau et de l'environnement

Jury d'évaluation

Examinateur externe	Jim McGeer Natural Resources Canada, Ottawa
Examinateur externe	Jack F. Klaverkamp Freshwater Institute, Winnipeg
Examinateur interne	Patrice Couture, INRS-ETE
Directeur de recherche	Peter G.C. Campbell, INRS-ETE
Codirecteur de recherche	Landis Hare, INRS-ETE

© droits réservés de Lisa Kraemer, 2006

So it is that only when we bring our focus to bear, first on the individual cells of the body, then on the minute structures within the cells, and finally on the ultimate reactions of molecules within these structures – only when we do this can we comprehend the most serious and far-reaching effects of the haphazard introduction of foreign chemicals into our internal environment.

Rachel Carson
Silent Spring, 1962

Resumé

La perchaude (*Perca flavescens*) est une espèce du poisson qui est souvent retrouvée non seulement dans des lacs de référence, mais également dans les lacs contaminés en métaux. Cette espèce de poisson représente ainsi un bon modèle pour étudier la bioaccumulation de métaux *in situ.* Les objectifs de cette thèse étaient d'examiner la dynamique d'accumulation et d'élimination de métaux (Cd, Cu et Zn) chez la perchaude sur le terrain. Cette dynamique a été suivie suite à des changements brusques du régime d'exposition (c.-à-d., par des études de transplantation) et de façon saisonnière chez les perchaudes indigènes dans leurs lacs d'origine. De plus, la bioréactivité des métaux accumulés a été examinée en suivant l'accumulation des métaux au niveau subcellulaire. On a également examiné l'importance relative de la nourriture et de l'eau ambiante comme sources de Cd pour la perchaude, en utilisant des expériences menées sur le terrain. Un modèle cinétique de bioaccumulation a été alors développé pour examiner l'accumulation de Cd chez les populations de perchaudes indigènes.

Afin d'examiner comment les concentrations en métal changeraient chez la perchaude suivant un changement brusque de leur régime d'exposition, des poissons ont été transplantés d'un lac de référence (Lac Opasatica) vers un lac contaminé (Lac Dufault) pour examiner la dynamique de la prise en charge en métal, et du Lac Dufault au Lac Opasatica pour examiner la dynamique d'élimination en métal. Les résultats de ces expériences ont suggéré que la perchaude contrôle ses concentrations internes de Cd, Cu et Zn différemment. Par exemple, les concentrations du Cd ont augmenté dans tous les organes étudiés (les branchies, le tractus gastro-intestinal, le foie et le rein) dans l'expérience de prise en charge, et pendant l'expérience d'élimination, peu de perte de ce métal s'est produite dans le foie et le rein. Par contre, il y avait peu changement des concentrations en Zn chez les poissons transplantés,

malgré des concentrations en Zn^{2+} beaucoup plus élevées dans le lac Dufault, suggérant que l'accumulation de ce métal soit fortement régulée par la perchaude. D'autre part, les concentrations en Cu ont augmenté dans le foie des poissons transplantés pendant l'expérience de la prise en charge, et elles ont rapidement diminué pendant l'expérience d'élimination, suggérant que l'élimination accrue soit une stratégie importante employée par la perchaude pour contrôler des concentrations accumulées de ce métal. Un examen des variations saisonnières de Cd et de Cu a indiqué que ces métaux ont changé de manière significative dans le foie pendant une période de quatre mois (de mai à août), mais seulement chez les poissons avec des concentrations hépatiques élevées de ces deux métaux.

Au niveau subcellulaire, les résultats des expériences de transplantation ont indiqué que la majorité du Cd et du Cu accumulés dans le foie était associée à la fraction des protéines stables à la chaleur (c.-à-d., contenant de la métallothionéine), suggérant qu'une grande partie du Cd et du Cu bioaccumulés ait été détoxiquée. Cependant, il y avait une certaine accumulation de ces métaux dans les fractions « potentiellement sensibles » aux métaux (des organelles et des protéines dénaturées à la chaleur), suggérant que la désintoxication ait été inachevée. Dans l'étude examinant les variations saisonnières, on a également observé que les concentrations en Cd et en Cu étaient plus élevées et légèrement plus variables dans les fractions « potentiellement sensibles » chez les poissons des lacs contaminés.

Afin d'examiner l'importance relative de la nourriture et de l'eau comme sources de Cd pour la perchaude, on a de nouveau utilisé une approche de transplantation. Dans cette expérience, des perchaudes provenant du lac Opasatica ont été maintenues dans des cages pendant 30 jours dans un lac de référence (Opasatica) ou un lac contaminé au Cd (Dufault), et des proies étaient offertes (zooplancton) aux poissons dans chaque lac, créant ainsi quatre

régimes d'exposition : eau de référence et nourriture de référence (référence); eau de référence et nourriture contaminée (Cd alimentaire seulement); eau contaminée, nourriture de référence (Cd aqueux seulement); et eau contaminée plus nourriture contaminée (Cd alimentaire + Cd aqueux). Les résultats de cette expérience ont montré que le foie et le tractus gastro-intestinal sont influencés par le Cd aqueux et alimentaire, tandis que le rein et les branchies ne sont influencés que par le Cd aqueux.

Dans la section finale de cette thèse, on a utilisé des données d'expériences de transplantation pour développer un modèle de bioaccumulation hépatique de Cd qui tient compte de l'accumulation du Cd à partir de l'eau et de la nourriture. Après avoir estimé les valeurs de divers paramètres du modèle, on a utilisé le modèle pour calculer l'importance relative du Cd alimentaire et du Cd aqueux comme sources du métal pour la perchaude juvénile vivant dans les lacs différant dans leurs niveaux de contamination en Cd. Dans les lacs les plus contaminés en Cd ($[Cd^{2+}] > 0,7$ nM), le modèle prédisait assez bien la concentration en Cd hépatique en ne tenant compte que de la concentration ambiante en Cd^{2+} aqueux. Cependant, dans les lacs moins contaminés, la modélisation basée uniquement sur l'eau comme source du Cd sous-estimait la concentration en Cd hépatique, suggérant que dans de tels lacs le Cd présent dans la nourriture contribue plus significativement à la bioaccumulation. Dans une perspective d'évaluation de risque, ces résultats impliquent que dans les lacs les plus contaminés, où la perchaude risque d'être davantage vulnérable, la bioaccumulation du Cd peut être prédite à partir de la concentration de Cd^{2+} dans l'eau, sans tenir compte de la contribution apportée par la nourriture.

Avant-propos

Cette thèse comporte d'abord une synthèse générale de l'ensemble du doctorat, composée de la problématique, des objectifs et hypothèses de recherche et finalement d'une discussion et d'une intégration des résultats. Le noyau de la thèse est présenté sous forme de cinq publications scientifiques acceptées pour publication, soumises, ou sur le point d'être soumise à des revues avec comités de lecture. Il y a aussi une annexe qui décrit la caractérisation de la fraction de protéines stables à la chaleur (HSP). La contribution des auteurs aux différents articles s'établit comme suit :

Caractérisation de la fraction de protéines stables à la chaleur (HSP) : une comparaison entre les métaux (Cd, Cu et Zn) accumulés dans la fraction HSP et les concentrations de métallothionéine.

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

L.D. Kraemer: Conception et réalisation du projet (échantillonnage; analyses, traitement et interprétation des données); rédaction initiale et finale de l'article.
P.G.C. Campbell: Conception et réalisation du projet (contribution au traitement et à l'interprétation des données); contribution à la rédaction finale de l'article.
L. Hare: Conception du projet; contribution à la rédaction finale de l'article.

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

L.D. Kraemer: Conception et réalisation du projet (échantillonnage; analyses, traitement et interprétation des données); rédaction initiale et finale de l'article.
P.G.C. Campbell: Conception et réalisation du projet (contribution au traitement et à l'interprétation des données); contribution à la rédaction finale de l'article.
L. Hare: Conception du projet; contribution à la rédaction finale de l'article.

3. Kraemer, L.D., P.G.C. Campbell, L. Hare, J.C. Auclair. In press. "A field study examining the relative importance of food and water as sources of Cd for juvenile yellow perch". *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*

L.D. Kraemer: Conception et réalisation du projet (échantillonnage; analyses, traitement et interprétation des données); rédaction initiale et finale de l'article.
P.G.C. Campbell: Conception et réalisation du projet (contribution au traitement et à l'interprétation des données); contribution à la rédaction finale de l'article.
L. Hare: Conception du projet; contribution à la rédaction finale de l'article.
J.C. Auclair : Contribution au traitement et à l'interprétation des données; contribution à la rédaction finale de l'article.

4. Kraemer, L.D., P.G.C. Campbell, L. Hare. In press. "Seasonal variations in hepatic Cd and Cu concentrations and in the sub-cellular distribution of these metals in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*)", *Environ. Pollut.*

L.D. Kraemer: Conception et réalisation du projet (échantillonnage; analyses, traitement et interprétation des données); rédaction initiale et finale de l'article.
P.G.C. Campbell: Conception et réalisation du projet (contribution au traitement et à l'interprétation des données); contribution à la rédaction finale de l'article.
L. Hare: Conception du projet; contribution à la rédaction finale de l'article.

5. Kraemer, L.D., P.G.C. Campbell, L. Hare. "Modeling Cd bioaccumulation in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*)", soumis à la revue *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*

L.D. Kraemer: Conception et réalisation du projet (échantillonnage; analyses, traitement et interprétation des données); rédaction initiale et finale de l'article.
P.G.C. Campbell: Conception et réalisation du projet (contribution au traitement et à l'interprétation des données); contribution à la rédaction finale de l'article.
L. Hare: Conception du projet; contribution à la rédaction finale de l'article.

Remerciements / Acknowledgements

My Ph.D. project is the culmination of a lot of hard work and support from many different people during the past 5 years. On the top of this list is my supervisor Peter Campbell who gave me the opportunity to come to INRS to do this project from which I learned a great deal on many different levels, and more importantly from which I had a lot of fun. I would also like to thank Peter for all the time and hard work he spent editing my papers and the quickness with which he responded to my many questions, despite the fact that he was on sabbatical in Australia during the last year of my thesis. As a supervisor, I learned from him that respect for other people, patience and enthusiasm are invaluable characteristics that I hope to carry forward into both my personal and professional life.

I would also thank my co-supervisor Landis Hare also for all his hard work that went into this thesis. Landis always persuaded me to think outside the box and to look at problems from different angles. His unique way of approaching science (and life!) were invaluable contributions to this thesis and my own personal development as a Ph.D. student.

This Ph.D. thesis would not have been possible without the help of many summer students. A big thank you goes to Catherine Dion, Anabel Carrier, Sophie Cooper, Amélie Cliche, Caroline Durand and Philippe Bourret for their field assistance. An equally big thank you goes to the Société de la Faune et des Parcs de l'Abitibi-Témiscamingue (Government of Québec) for their logistical help with the field study. In particular I would like to especially thank Daniel Nadeau and Jean-Pierre Hamel for giving me advice especially during my first field season when it looked like all my caged perch were going to die.

As committee members, both Alice Hontela and Patrice Couture provided input and ideas that were integral in the development of this thesis. I thank them for their interest in this project, as well as their availability. I would like to thank Jean-Christian Auclair for his statistical guidance, and Anik Giguère and Emmanuelle Bonneris for their advice regarding the application of the differential centrifugation technique. Laboratory support and guidance provided by Michelle Geoffroy-Bordeleau, Pauline Fournier, Lise Rancourt and Sébastien Duval is also greatly appreciated. Thank you also to Susie Bernier who took the time to edit my french writing during the final stages of this thesis. My time at INRS was also made enjoyable due to many of the other graduate students, especially Janick, Julie, Veronique, Anik, Annick, Anne, Emmanuelle, Sophie, Jord and Amiel, among many others. I would also like to thank the Metals in the Environment Research Network (MITE-RN) for financial support for this project.

Finally I would like to thank Chris not only for his unconditional support, but also for listening to my many 'perch problems' over the years. Your advice and comments were always greatly appreciated. My last acknowledgment goes to my mother. It was through her guidance, love and support that I learned how to be independent and to have confidence in myself. This thesis is dedicated to her memory.

Abréviations / Abbreviations

EA	Efficacité d'assimilation (%)
BLM	Le modèle du ligand biotique («Biotic Ligand Model»)
ÉRÉ	Évaluation du Risque Écologique
FCF	Le facteur de condition de Fulton
HSP	Protéines stables à la chaleur (ex. métallothionéine)
HDP	Protéines dénaturées à la chaleur (ex. enzymes)
TI	Taux d'ingestion ($g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$)
k_e	Constante de taux d'élimination (efflux) (d^{-1})
k_i	Constante de taux d'afflux (influx), ($L \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$)
k_g	Constante de taux de croissance (d^{-1})
k_u	Constante de taux de prise en charge des métaux dissous ($L \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$)
WQC	Critères de Qualité de l'Eau

Table de matières

1. Introduction 1

1.1 Évaluation du risque écotoxicologique des métaux 1

1.2 La distribution subcellulaire des métaux 6

1.3 Pertinence de la région et des expériences de transplantation 12

1.4 La perchaude comme espèce biomoniteur 15

2. Objectifs et hypothèses 19

2.1 La dynamique de l'accumulation métallique 19

2.2 La dynamique d'élimination métallique 19

2.3 L'importance relative des sources aqueuses et alimentaires pour l'accumulation de Cd chez la perchaude 20

2.4 La variation saisonnière des métaux 21

3. Méthodologie 23

3.1 Conception des cages expérimentales 23

3.1.1 Cages utilisées dans des expériences d'accumulation et d'élimination 23

3.1.2 Cages utilisées dans l'expérience examinant l'importance relative des voies alimentaires et aqueuses comme sources pour l'accumulation en Cd 24

3.2 Mesures d'exposition aqueuse 25

3.3 Mesures d'accumulation métallique 27

3.4 Répartition subcellulaire des métaux 27

4. Résultats 31

4.1 Gradient d'exposition métallique 31

4.2 Expériences de transplantation : la dynamique d'accumulation et d'élimination des métaux 31
4.2.1 Croissance 31
4.2.2 La dynamique du cadmium 33
4.2.3 Les dynamiques du Cu et du Zn 36
4.3 L'importance relative du Cd alimentaire et du Cd aqueux comme vecteurs d'exposition pour la perchaude juvénile 38
4.3.1 Concentrations en cadmium dans les organes des perchaudes mises en cage 38
4.3.2 Changements de la répartition subcellulaire du Cd résultant de différentes expositions (alimentaire *vs.* aqueuse) 39
4.4 Variation saisonnière des concentrations en Cd et en Cu 40
4.4.1 Résultats au niveau de l'organe 40
4.4.2 Résultats au niveau subcellulaire 41
4.5 Développement du modèle de bioaccumulation pour le Cd 42
4.5.1 Le modèle de bioaccumulation 42
4.5.2 La prise en charge du Cd par l'eau 43
4.5.3 Considération de la croissance 46
4.5.4 La modélisation de l'élimination du cadmium 46
4.5.5 La modélisation de l'accumulation hépatique en cadmium 49
4.5.6 La modélisation des concentrations à l'état stationnaire 50
5. Discussion et intégration des résultats 57
5.1 Accumulation en métal au niveau des organes 57

5.1.1 Dynamique de la prise en charge et de l'élimination des métaux au niveau des organes....57
5.1.2 La variation saisonnière des concentrations en Cd et en Cu au niveau des organes....60
5.1.3 Accumulation en cadmium de sources alimentaires et aqueuses....63
5.2 L'accumulation et l'élimination des métaux au niveau subcellulaire....65
5.2.1 La régulation du Cd, du Cu et du Zn hépatiques au niveau subcellulaire....66
5.2.2 Bio-réactivité des métaux accumulés....68
5.2.3 L'hypothèse de débordement cellulaire....71
5.3 Croissance....79
5.4 Le modèle de bioaccumulation....84
5.5 Conclusions et implications des résultats pour l'évaluation des risques écologiques....93
5.5.1 Une comparaison des études menées sur le terrain et des études en laboratoire....93
5.5.2 Implications des simulations du modèle....95
5.5.3 La bioréactivité des métaux....97
5.5.4 La perchaude comme biomoniteur?....98
6. Perspectives de recherche....99
7. Références....101
PARTIE II....113
8. 1er article : Dynamics of Cd, Cu and Zn accumulation in organs and sub-cellular fractions in field transplanted juvenile yellow perch (*Perca flavescens*)....115

9. 2e article : A field study examining metal elimination kinetics in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*).....131
10. 3e article : A field study examining the relative importance of food and water as sources of Cd for juvenile yellow perch.....153
11. 4e article : Seasonal variations in hepatic Cd and Cu concentrations and in the sub-cellular distribution of these metals in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*).....189
12. 5e article : Modeling Cd bioaccumulation in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) 205
13. Annexe A : Caractérisation de la fraction de protéines stables à la chaleur (HSP) : une comparaison entre les métaux (Cd, Cu et Zn) accumulés dans la fraction HSP et les concentrations de métallothionéine. 243
13.1 Objectif.....245
13.2 Méthodologie 245
13.3 Resultats 249

Liste des figures

Figure 1-1: Un modèle schématique de l'accumulation métallique au niveau subcellulaire..... 7

Figure 1-2: L'hypothèse du débordement (« spillover ») propose que la détoxication du métal est efficace dans des conditions où l'exposition n'est pas élevée, et les composantes cellulaires sensibles au métal sont ainsi protégées contre l'accumulation. Au-delà d'une concentration d'exposition seuil (ligne pointillée rouge verticale), la capacité de liaison des ligands impliqués dans la détoxication (par exemple, la métallothionéine) est débordée (ligne verte à tiret) et des métaux se déversent sur d'autres molécules physiologiquement sensibles (ligne bleue solide)..... 9

Figure 1-3: La variation spatiale de Cd dans les fractions subcellulaires du foie de la perchaude prélevée dans neuf lacs des régions de Sudbury et de Rouyn-Noranda. Les concentrations en cadmium dans (a) les fractions de protéines dénaturées à la chaleur (HDP), (b) les organites (mitochondries (cercles pleins), microsomes et lysosomes (cercles ouverts), (c) les protéines stables à la chaleur (HSP) et (d) les débris cellulaires sont comparées aux concentrations en Cd dans le foie entier. Chaque point représente des données pour les perchaudes prélevées d'un seul lac (moyen ± écart-type moyen; N = 3 échantillons composés provenant de 16 foies différents - les données sont retracées de Giguère (2003); voir Campbell et al. (2005) également..... 10

Figure 1-4: Une carte montrant la localisation des lacs utilisés dans les études de transplantation (lacs Opasatica et Dufault) et des lacs utilisés pour tester le modèle de bioaccumulation du Cd ainsi que pour évaluer la variabilité saisonnière des métaux : lacs de référence (Opasatica, Dasserat et Ollier) ; lacs

modérément contaminés (Vaudray et Héva) et lacs fortement contaminés (Osisko et Dufault)..... 13

Figure 1-5: Une carte de la région de Sudbury montrant l'emplacement des quatre lacs à l'étude utilisés pour tester le modèle de bioaccumulation du Cd..... 14

Figure 3-1: Une représentation schématique des cages utilisées dans les expériences d'accumulation et d'élimination, montrant les dimensions des cages (a) et l'arrangement des cages dans un radeau flottant (b). Pour fins de compréhension, l'image (b) montre seulement une cage, mais en réalité chaque radeau en supportait quatre..... 24

Figure 3-2: Une représentation schématique des cages utilisées dans l'expérience examinant l'importance relative de l'eau et de la nourriture comme sources d'accumulation en Cd chez la perchaude juvénile (adaptée de Munger et al., 1999). 26

Figure 4-1: Changements de longueur, de poids, et de facteur de condition pour les poissons indigènes du lac Dufault (cercles rouges), du lac Opasatica (triangles bleues) (panneaux a-c) ainsi que pour les poissons transplantés (panneaux d-f). Pour les études de transplantation, les poissons provenant du lac Dufault sont représentés par des cercles; les perchaudes transplantées au lac Opasatica (cinétique d'élimination), par des cercles pleins, et les perchaudes transplantées dans des cages dans le lac Dufault (poissons témoins) par des cercles ouverts. Les poissons provenant du lac Opasatica sont représentés par des triangles; les perchaudes transplantées au lac Dufault (cinétique de prise en charge) sont représentées par des triangles pleins, et les perchaudes transplantées au lac Opasatica (poissons témoins) par des triangles ouverts. Les poissons témoins mis en cage sont indiqués par des symboles ouverts et des lignes à tirets, tandis

que les poissons qui ont été réciproquement transplantés sont représentés par des symboles pleins et des lignes solides..... 34

Figure 4-2: Variations dans les concentrations hépatiques totales en Cd pendant les expériences d'accumulation (panneau a) et d'élimination (panneau b). Variations dans les concentrations en Cd dans les fractions subcellulaires pendant les expériences d'accumulation (panneau c) et d'élimination (panneau d). 35

Figure 4-3: Variations des concentrations hépatiques totales en Cu pendant (a) les expériences d'accumulation et (b) les expériences d'élimination. Variations des concentrations en Cu dans les fractions subcellulaires pendant (c) les expériences d'accumulation et (d) les expériences d'élimination. 37

Figure 4-4: Variations de concentrations en Cd dans le foie des perchaudes transplantées au lac Opasatica (cercles pleins). La courbe a été tracée à partir de l'équation 4-4. 48

Figure 4-5: Variations des concentrations en Cd dans le foie des perchaudes transplantées au lac Dufault (cercles pleins). La courbe modèle a été tracée à partir de l'équation (4-6). 50

Figure 4-6: Comparaison des concentrations hépatiques en Cd mesurées chez les perchaudes récoltées le long d'un gradient de concentration en Cd avec des concentrations prévues par le modèle, tenant compte seulement des concentrations aqueuses de Cd2+. La ligne à tirets représente un rapport de 1:1. Les erreurs (écarts-types) associées aux prédictions obtenues par le modèle, ont été obtenues par ré-échantillonnage paramétrique du type

bootstrap (Wehrens et al., 2000). Pour chaque cas, 500 échantillons bootstrap sont générés pour l'évaluation de la performance du modèle. 52

Figure 4-7: L'accord entre les concentrations en Cd mesurées et celles prédites dans le foie des perchaudes récoltées le long d'un gradient en concentrations métalliques, en fixant l'efficacité d'assimilation à 10 % (a) ou à 33 % (b). La ligne à tirets représente un rapport de 1:1 54

Figure 4-8: Prévisions du pourcentage de Cd provenant de sources alimentaires en fonction de la concentration en Cd2+ aqueux. La courbe représente une régression non linéaire ($r2 = 0.96$, $p \leq 0.01$) 56

Figure 5-1: Les concentrations en cadmium dans (a) les fractions de protéines dénaturées à la chaleur (HDP), (b) les organites, (c) les protéines stables à la chaleur (HSP) et (d) les débris cellulaires en fonction de la concentration hépatique totale en Cd pendant la transplantation d'accumulation. Les chiffres près de chaque point représentent la durée (jours) dans le lac hôte (lac Dufault). La ligne à tirets dans le panneau (a) représente la forme hypothétique «bâton de hockey» du modèle de débordement cellulaire. 74

Figure 5-2: Les concentrations en cadmium dans (a) les fractions de protéines dénaturées à la chaleur (HDP), (b) les organites, (c) les protéines stables à la chaleur (HSP) et (d) les débris cellulaires en fonction de la concentration hépatique totale en Cd pendant l'étude de l'importance relative du Cd aqueux et du Cd alimentaire comme sources de ce métal pour les perchaudes (Chapitre 10). Dans le panneau (a), WO-30d et FW-30d représentent des concentrations en Cd dans le HDP après une exposition de 30 j au Cd aqueux seulement (WO) et au Cd

alimentaire + aqueux (FW). La ligne à tirets dans le panneau A représente la forme hypothétique «bâton de hockey» du modèle de débordement cellulaire. 76

Figure 5-3: Concentrations en Cd dans la fraction HDP chez les perchaudes provenant du lac Opasatica et transplantées au lac Dufault pour examiner la dynamique de prise en charge (T-DU ; cercles ouverts) et les perchaudes provenant du lac Dufault et transplantées au lac Opasatica examinant la dynamique de l'élimination (T-OP; triangles pleines). Les expériences de prise en charge ont été effectuées pendant 70 j (Chapitre 8), et donc les bas niveaux hépatiques se sont produits tôt dans l'étude (c.-à-d., jour 10 ; T-DU-10d), et les concentrations hépatiques élevées se sont produites plus tard dans l'étude (c.-à-d., jour 50 ; T-DU-50d). La situation a été renversée pour les expériences d'élimination (Chapitre 9); les concentrations hépatiques totales élevées en Cd se sont produites tôt dans l'étude (c.-à-d., jour 10 ; T-OP-10d) et les basses concentrations se sont produites plus tard dans l'étude (c.-à-d., jour 75 ; T-OP-75d). Des changements de concentrations en Cd dans la fraction HDP peuvent être divisés en 3 phases : (1) basses concentrations reflétant des perchaudes du lac Opasatica ; (2) concentrations en Cd intermédiaires entre le lac Opasatica et le lac Dufault ; et (3) concentrations élevées de Cd dans la fraction HDP des perchaudes du lac Dufault..... 78

Figure 5-4: Modèles représentant la croissance compensatoire des poissons. Panneau (a) : croissance après des périodes de famine, schéma adapté d'Ali et al. (2003). Panneau (b) : modèle adapté pour la transplantation des perchaudes du lac Dufault au lac Opasatica (ligne bleu; T-OP) et du Lac Dufault au Lac Dufault représentant des témoins (ligne rouge, C-DUF) 82

Figure 5-5: Une représentation schématique de la façon dont le taux de prise en charge en métal (courbe pleine), et la constante apparente de prise en métal (ku; courbe en pointillé), changent avec des concentrations ambiantes en métal. À des niveaux de métal très élevés, le taux de prise en charge devient saturé et approche Vmax. De même, la valeur du ku diminue avec l'augmentation des concentrations en métal. La boîte rouge représente des concentrations en métal possiblement retrouvées dans l'environnement. 86

Figure 5-6: Analyse de la sensibilité du modèle de bioaccumulation de Cd, pour les perchaudes du lac Vaudray. Voir le texte pour le détail des scénarios 1→5, et le tableau 5-4 pour les données utilisées dans les diverses simulations. 92

Figure 13-1: Représentation schématique de la méthode de centrifugation différentielle. 246

Figure 13-2: Représentation schématique des échantillons utilisés pour l'analyse de saturation au mercure..... 248

Figure 13-3: Comparaison entre les concentrations de métallothionéine déterminées par l'analyse de saturation au Hg et la concentration de métaux (Cd + Cu + Zn) accumulés dans la fraction HSP..... 251

Liste des tableaux

Tableau 4-1: Les concentrations de Cd, de Cu et de Zn aqueux mesurées dans les lacs d'étude 32

Tableau 4-2: Concentrations hépatiques en cadmium (moyenne ± ET) chez la perchaude juvénile du lac de référence, et les poissons exposés pendant 30 j au Cd alimentaire seulement, au Cd aqueux seulement, et au Cd alimentaire + Cd aqueux (Chapitre 10). Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (one-way ANOVA avec des corrections de Tukey-Kramer, $P > 0,05$). 44

Tableau 4-3: Sommaire des paramètres du modèle de bioaccumulation du Cd à partir de l'eau ambiante 45

Tableau 5-1: Les constantes des taux d'élimination en métal et les demi-vies pour le Cd, le Cu et le Zn dans différents organes. 60

Tableau 5-2 : Sommaire des effets observés chez de jeunes perchaudes de l'année (âgés 0+), des juvéniles (âgés 1+) et des adultes (âgés 4+) de la région de Rouyn-Noranda. 83

Tableau 5-3: Une comparaison des constantes de taux de prise en charge (ku) pour différentes espèces des poissons exposés à différentes concentrations en Cd. 85

Tableau 5-4: Sommaire des données utilisées dans les simulations modèles du lac Vaudray. 91

Tableau 5-5: Les demi-vies d'élimination pour le Cd de diverses espèces de poissons d'eau douce. 94

1. Introduction

1.1 Évaluation du risque écotoxicologique des métaux

Les métaux sont omniprésents dans l'environnement et sont des composantes naturelles de la croûte terrestre. Dans un cycle géochimique naturel non perturbé, on peut identifier plusieurs sources naturelles de métaux : l'altération naturelle des roches présentes à la surface terrestre («weathering»); les émanations volcaniques; les fentes sous-marines hydrothermales («deep-sea vents»). À celles-ci s'ajoutent des activités humaines telles que des activités minières et de fonderies qui peuvent également affecter le cycle géochimique naturel et considérablement influencer la redistribution des métaux sur une échelle régionale et globale. Il s'ensuit que de plus grandes concentrations de métaux potentiellement toxiques peuvent être présentes dans les écosystèmes aquatiques. Cependant, ces métaux ne sont pas nécessairement biodisponibles et afin de protéger efficacement les organismes aquatiques contre la toxicité des métaux, l'évaluation du risque écologique (ÉRÉ) doit d'abord reposer sur une évaluation précise du niveau de l'exposition.

Pour évaluer l'exposition aqueuse, le modèle du ligand biotique («Biotic Ligand Model» ou BLM) a été conçu pour décrire comment les métaux dissous interagissent avec une membrane biologique et affectent par la suite les organismes aquatiques. Brièvement, ce modèle suppose que la réponse biologique obtenue par un métal dissous est une fonction de la concentration de l'ion métallique libre ([M^{z+}]) (Niyogi et al., 2004). L'approche BLM tient compte également des variables qualitatives de l'eau qui réduisent la concentration des ions métalliques libres (ex., la complexation des métaux par la matière organique dissoute), ainsi que de la compétition avec d'autres cations pour des sites de prise en charge en métaux sur la surface des branchies (ex. la compétition entre Cd^{2+} et Ca^{2+} ; Playle, 1998). Dans le contexte de l'ÉRÉ, le but du BLM est d'employer des variables comme le pH et la

concentration en matière organique dissoute, ainsi que les constantes d'équilibre empiriquement dérivées (ex. log $K_{Cu\text{-}branchie}$, log $K_{Ca\text{-}branchie}$), pour prévoir exactement la spéciation métallique dans les environnements aquatiques et pour relier cette spéciation à une dose significative pour les poissons au niveau toxicologique. Bien que le BLM ait démontré un grand taux de succès dans des études de laboratoire, l'application de ce modèle pourrait être limitée dans les situations où des poissons sont chroniquement exposés aux métaux dans les eaux naturelles.

Une limitation importante de l'approche BLM est qu'elle considère seulement la prise en charge de métaux dissous par les branchies et ignore donc la prise en charge possible via des sources alimentaires. Parce que les poissons vivant dans des lacs contaminés sont chroniquement exposés aux métaux non seulement de sources aqueuses, mais également de sources alimentaires, les modèles qui tiennent compte seulement des métaux dissous peuvent sous-estimer la dose que le poisson reçoit. Dans une étude précédente, Giguère et al. (2004) ont relié les concentrations en Cd dans le foie de perchaudes provenant de lacs le long d'un gradient de concentration métallique aux concentrations de Cd^{2+}aqueux. Quand ces chercheurs ont essayé d'améliorer ces relations en tenant compte de la compétition entre les cations (ex. Ca^{2+} et Cd^{2+}; H^{+} et Cd^{2+}), ils ont constaté que l'amélioration était marginale. Puisque ce résultat n'était pas conforme aux prédictions du modèle du ligand biotique, ces auteurs ont présumé que la perchaude accumulait son Cd hépatique au moins partiellement par voie alimentaire. En plus, le BLM pour les poissons considère la toxicité seulement aux sites des branchies, et ignore ainsi les effets toxiques possibles résultant de la prise en charge des métaux provenant de sources alimentaires. Ceci suggère que les prévisions de BLM basées seulement sur des concentrations de métaux dissous ne seront peut-être pas adéquates pour protéger les populations indigènes de poissons.

Pour évaluer exactement l'impact toxicologique de l'exposition à un métal particulier, l'ÉRÉ devrait donc considérer les voies alimentaires et aqueuses. Plusieurs chercheurs ont entrepris de déterminer l'importance relative des métaux dissous et alimentaires comme sources de métaux pour des poissons, mais les résultats démontrent un manque évident de consensus. Par exemple, quelques études ont conclu que les sources alimentaires et aqueuses sont importantes pour les poissons d'eau douce (Farag et al., 1994; Kraal et al., 1995), alors que d'autres ont conclu que l'eau est la principale voie d'exposition (Williams et Giesy, 1978), et encore d'autres proposent que les poissons reçoivent la majorité de leurs métaux de sources alimentaires (Dallinger et Kautzky, 1985; Harrison et Klaverkamp, 1989; Mount et al., 1994). L'absence de consensus parmi les chercheurs peut être expliquée, en partie, par des différences dans la conception expérimentale. La plupart des études ont été effectuées en laboratoire, où il est souvent difficile d'éviter les artéfacts expérimentaux Par exemple, il est difficile d'exposer des poissons aux métaux uniquement via la nourriture parce que le métal peut désorber de la nourriture contaminée et être ainsi disponible pour la prise en charge par voie aqueuse par les branchies. En plus, quelques chercheurs ont employé des régimes artificiels où des métaux ont été ajoutés à la nourriture (Williams et Giesy, 1978; Harrison et Klaverkamp, 1989; Handy, 1992, 1993); il n'est pas évident que les poissons assimileront de tels métaux ajoutés de la même manière que les métaux présents chez les proies contaminées naturellement.

Des modèles mathématiques peuvent également être employés dans l'ÉRÉ pour comprendre la bioaccumulation métallique. L'accumulation métallique est définie comme étant le résultat net de la prise en charge, de l'élimination et de la croissance (Reinfelder et al., 1998; Luoma et Rainbow, 2005). Donc, nous pouvons appliquer un modèle cinétique de premier ordre pour décrire la bioaccumulation métallique :

$$\frac{d[M]_{animal}}{dt} = k_i[M]_{environnement} - k_e[M]_{animal} - k_g[M]_{animal} \quad (1\text{-}1)$$

où k_i, k_e et k_g représentent des constantes de taux d'afflux (influx), de taux d'élimination (efflux) et de taux de croissance, respectivement; $[M]_{environnement}$ est la concentration du métal dans l'environnement; $[M]_{animal}$ est la concentration métallique chez l'animal. Puisque les poissons indigènes sont exposés aux métaux dissous et aussi aux métaux de sources alimentaires, l'équation 1-1 peut être développée pour inclure ces deux voies d'exposition :

$$\frac{d[M]_{animal}}{dt} = k_u\,[M]_{eau} + EA \bullet TI \bullet [M]_{nourriture} - k_e[M]_{animal} - k_g[M]_{animal} \quad (1\text{-}2)$$

où k_u est la constante pour le taux de prise en charge des métaux dissous, et les variables alimentaires EA, TI et $[M]_{nourriture}$ représentent l'efficacité d'assimilation, le taux d'ingestion et la concentration du métal dans la nourriture.

Cette approche de modéliser cinétiquement la bioaccumulation en métaux est d'intérêt potentiel pour l'ÉRÉ car cette évaluation examine des variables importantes pour la prise en charge alimentaire (ex., taux d'ingestion, efficacité d'assimilation, concentration de métaux dans la nourriture) séparément des variables importantes pour la prise en charge aqueuse (ex., la concentration métallique aqueuse). Il est donc possible de considérer ces deux voies d'exposition séparément dans le modèle afin de déterminer leur importance relative dans l'accumulation métallique chez les poissons. En plus, les paramètres du modèle et les variables environnementales impliquées dans l'exposition alimentaire ou aqueuse peuvent

être soumises à une analyse de sensibilité pour discerner quel processus influence le plus la bioaccumulation métallique.

Dans le contexte de l'ÉRÉ, l'utilité de ce type de modélisation est évidente; cependant, l'exactitude du modèle est limitée par l'exactitude des paramètres estimés. Les expériences sur la prise en charge l'élimination de métaux chez des poissons sont typiquement effectuées en laboratoire (de Conto Cinier et al., 1999; Kargin et Corgun, 1999; Kim et al., 2004), où les poissons sont souvent exposés à des conditions d'exposition artificielles (par exemple, des concentrations métallique peu réalistes, des expositions uniquement aqueuses et des études de courte durée). De plus, les études de laboratoire examinant la dynamique des métaux chez le poisson choisissent souvent des espèces qui ne sont pas typiquement retrouvées dans les lacs contaminés (Harrison et Klaverkamp, 1989; Giles, 1988). En raison de ces différences dans la conception expérimentale, l'extrapolation directe des données collectées dans le cadre de ces études de laboratoire (ex., k_u et k_e) vers la dynamique de l'accumulation et de l'élimination des métaux chez des poissons retrouvés dans des environnements contaminés est difficile, voire impossible.

Présentement, les critères de qualité de l'eau (WQC) en regard des métaux au Canada, aux États-Unis et en Europe, sont basés sur des concentrations de métaux dissous et supposent implicitement que les métaux alimentaires ont un impact négligeable sur la santé des organismes aquatiques, une supposition qui n'a pas été bien établie pour les poissons. Tel que mentionné ci-dessus, l'information incluse dans l'ÉRÉ provient traditionnellement d'études de laboratoire où les poissons ont souvent été exposés à des concentrations en métal peu réalistes. Pour protéger les populations indigènes de poissons, nous devons examiner la bioaccumulation métallique (par exemple, taux d'échange, importance des métaux alimentaires) chez : (1) une espèce de poisson (par exemple, la perchaude; *Perca flavescens*)

qui est généralement retrouvée dans des environnements contaminés par les métaux; et (2) des poissons exposés à des concentrations biodisponibles de métaux qui sont réalistes sur le plan environnemental. Avec cette information, nous devrions pouvoir mieux comprendre l'accumulation métallique dans les environnements naturels, et avec cette compréhension nous devrions être mieux équipés pour évaluer la capacité des WQCs actuels de protéger les populations indigènes de poissons.

1.2 La distribution subcellulaire des métaux

Les concentrations élevées en cadmium (Cd), en cuivre (Cu) et en zinc (Zn) sont généralement retrouvées dans les lacs affectés par des opérations d'extraction et de raffinage de métaux non précieux. Des poissons vivant dans ces environnements contaminés sont ainsi exposés à des concentrations élevées de ces métaux, une situation qui mène normalement à la bioaccumulation de ceux-ci. En plus d'examiner les taux d'échange en métal, la deuxième composante principale de ce projet de doctorat comporte l'évaluation de la bioreactivité de ces métaux une fois qu'ils sont accumulés dans les tissus de la perchaude. Le cadmium est un métal non essentiel pour les poissons, et donc son accumulation n'a aucun avantage alimentaire ou métabolique et peut être liée à la toxicité quand les concentrations excèdent un certain seuil. Le Cu et le Zn sont différents du Cd du fait qu'ils sont des métaux essentiels, et certaines concentrations biodisponibles de ces métaux doivent être maintenues pour satisfaire aux besoins cellulaires. Néanmoins, dans les environnements contaminés au Cu et au Zn, les concentrations cellulaires biodisponibles de ces métaux chez les poissons doivent être contrôlées afin d'empêcher la toxicité (figure 1-1).

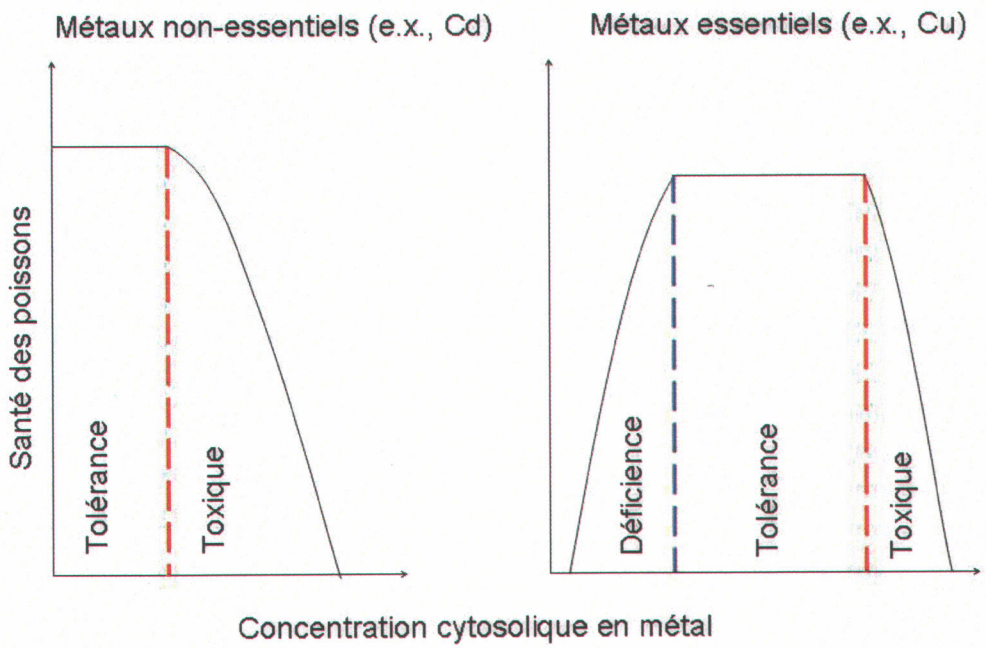


Figure 1-1: Un modèle schématique de l'accumulation métallique au niveau subcellulaire.

Si l'accumulation métallique ne peut être évitée (en réduisant les taux d'afflux, ou en augmentant le taux d'élimination), la régulation subcellulaire des métaux devient un déterminant de la toxicité. Par exemple, la séquestration des métaux par des protéines telles que la métallothionéine (MT) est importante en contrôlant la fraction biodisponible de quelques métaux dans les cellules. Les études précédentes chez les poissons ont démontré que cette protéine, dont la biosynthèse est induite par certains métaux et qui est riche en soufre, est associée à des quantités significatives de Cd, de Cu et de Zn cellulaires (Olsson et Haux, 1986; Hogstrand et al., 1991; Laflamme et al., 2000). En liant les métaux cellulaires

excessifs, la MT protège d'autres molécules plus physiologiquement sensibles (petits peptides ou enzymes) contre l'accumulation métallique, qui pourrait mener à la toxicité.

En utilisant ce modèle subcellulaire de bioaccumulation métallique, nous présumerions alors que la séquestration des métaux à l'intérieur de ces fractions détoxiquées (par exemple, avec la MT) empêcherait la toxicité. Dans les environnements où l'accumulation métallique excède la capacité de liaison de ces molécules impliquées dans la détoxication, les métaux accumulés déborderaient et pourraient se lier aux fractions physiologiquement sensibles, provoquant la toxicité (voir l'hypothèse de débordement; figure 1-2) (Mason et Jenkins, 1995). Cependant, une étude antérieure sur le terrain (Giguère, 2003) a montré que ce modèle ne s'applique pas aux perchaudes chroniquement exposées aux métaux. Dans son étude, Giguère a démontré que des métaux ont été associés aux fractions sensibles (figure 1-3), indépendamment de la concentration hépatique totale du métal (c.-à-d., l'accumulation de Cd dans les fractions physiologiquement sensibles s'est produite même à de bas niveaux d'exposition de Cd chez ces poissons chroniquement exposés). Il n'y avait aucune évidence d'une concentration d'exposition «seuil» au-dessous de laquelle des fractions sensibles en métal étaient protégées.

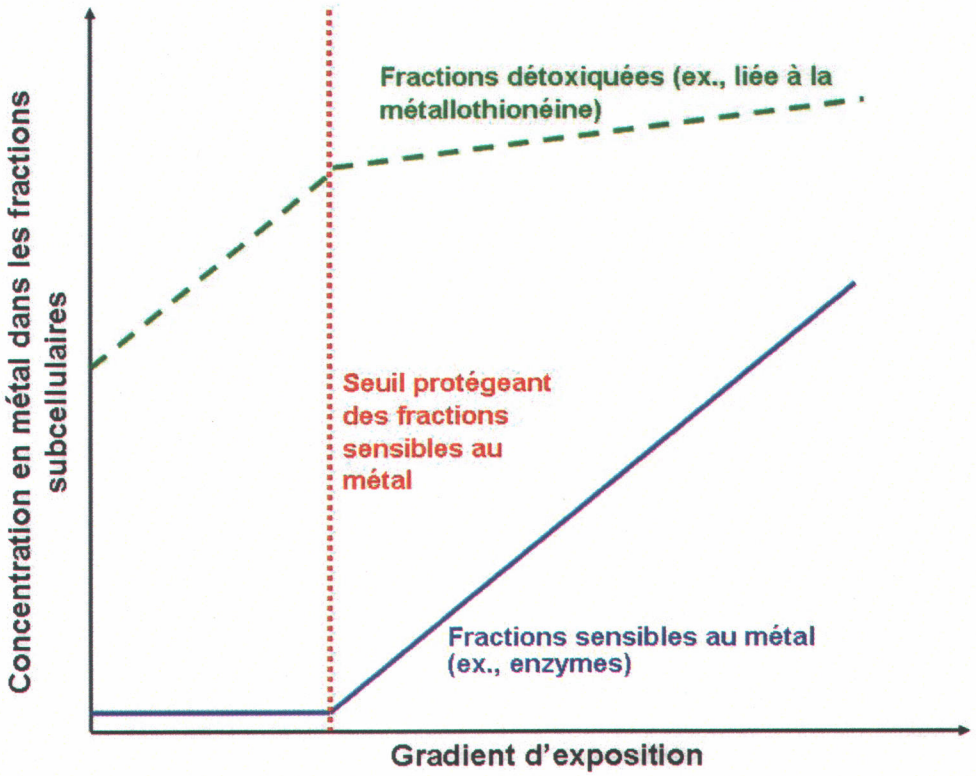


Figure 1-2: L'hypothèse du débordement (« spillover ») propose que la détoxication du métal est efficace dans des conditions où l'exposition n'est pas élevée, et les composantes cellulaires sensibles au métal sont ainsi protégées contre l'accumulation. Au-delà d'une concentration d'exposition seuil (ligne pointillée rouge verticale), la capacité de liaison des ligands impliqués dans la détoxication (par exemple, la métallothionéine) est excédée (ligne verte à tiret) et des métaux se déversent sur d'autres molécules physiologiquement sensibles (ligne bleue solide).

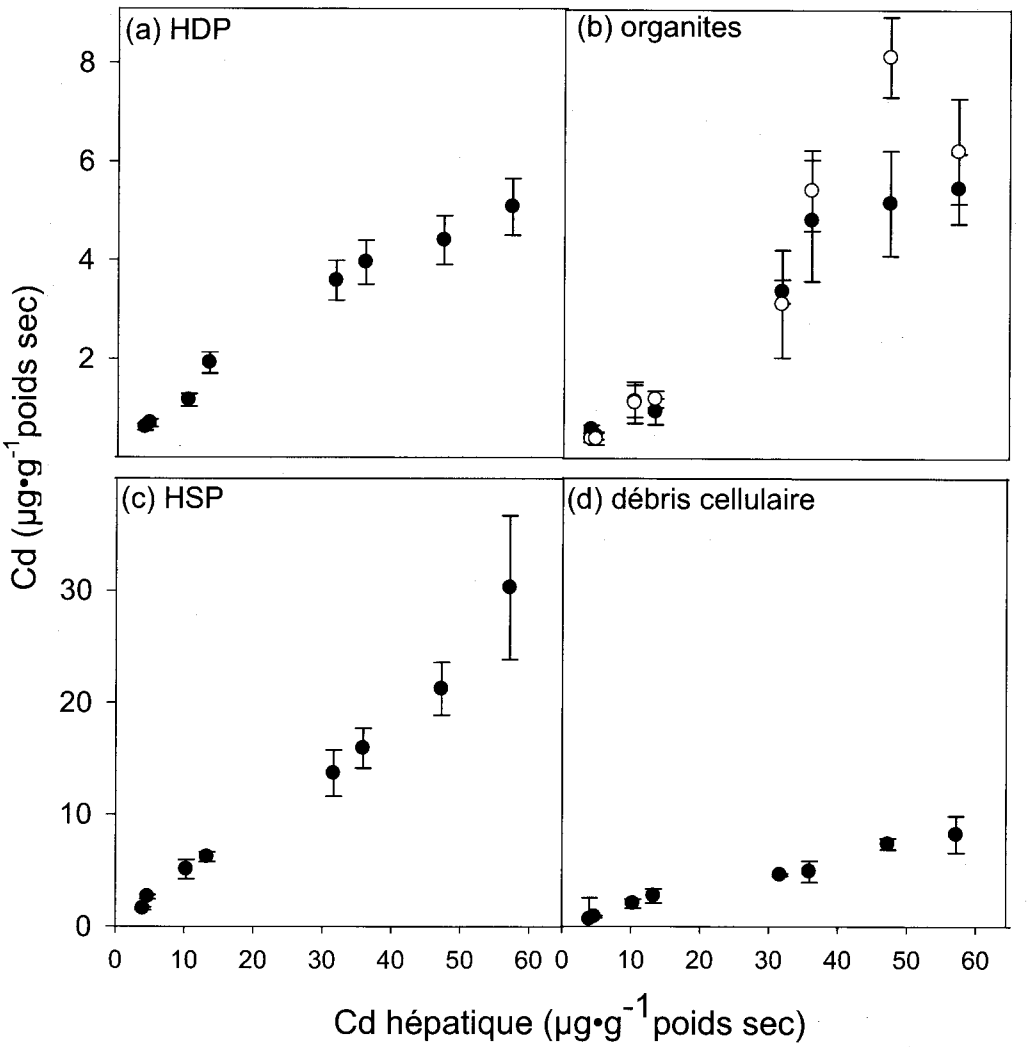


Figure 1-3: La variation spatiale de Cd dans les fractions subcellulaires du foie de la perchaude prélevée dans neuf lacs des régions de Sudbury et de Rouyn-Noranda. Les concentrations en cadmium dans (a) les fractions de protéines dénaturées à la chaleur (HDP), (b) les organites (mitochondries (cercles pleins), microsomes et lysosomes (cercles ouverts), (c) les protéines stables à la chaleur (HSP) et (d) les débris cellulaires sont comparées aux concentrations en Cd dans le foie entier. Chaque point représente des données pour les perchaudes prélevées d'un seul lac (moyenne ± écart-type moyen; N = 3 échantillons composés provenant de 16 foies différents - les données sont retracées de Giguère (2003); voir Campbell et al. (2005) également).

Trois questions clé ont récemment été mises en évidence par Chapman et al. (2003) dans leur revue de l'évaluation des risques environnementaux liés aux métaux :

1) les métaux s'accumulent-ils dans le biote au-dessus des niveaux de fond ?

2) les métaux accumulés peuvent-ils exercer une toxicité (c.-à-d., sont-ils bioréactifs)?

3) si oui, est-ce que cette bioréactivité des métaux accumulés peut être liée à des effets toxiques aux niveaux de l'individu ou de la population ?

Des études récentes sur la perchaude, menées sur le terrain, suggèrent que les métaux bioaccumulés sont en effet bioréactifs. Par exemple, au niveau cellulaire, Giguère et al. (2005) ont démontré qu'il y avait certaines indications de stress oxydatif chez les perchaudes prélevées de lacs contaminés dans les régions de Rouyn-Noranda et de Sudbury. De plus, des effets à des niveaux plus élevés d'organisation biologique, tels que des perturbations endocriniennes et métaboliques, ont également été documentés chez les perchaudes chroniquement exposées à des métaux dans les régions de Rouyn-Noranda et de Sudbury (Laflamme et al., 2000; Levesque et al., 2002, Couture et Kumar, 2003; Gravel et al., 2005). Une meilleure compréhension de la façon dont la distribution subcellulaire des métaux change en fonction du temps (par exemple, après des changements abrupts dans les régimes d'exposition, ou d'une façon saisonnière dans un même lac), et en fonction de l'exposition métallique provenant de différentes sources (de sources aqueuses ou alimentaires), devrait améliorer notre capacité de comprendre la régulation des métaux chez les poissons indigènes. Cette nouvelle information devrait également nous permettre d'évaluer la bioréactivité des métaux et de renforcer finalement les capacités prédictives de l'ÉRÉ.

1.3 Pertinence de la région et des expériences de transplantation

Les lacs utilisés dans cette étude sont situés dans la région d'Abitibi, près de la ville de Rouyn-Noranda, approximativement 600 km au nord-ouest de Montréal, Québec, Canada (figure 1-4). Une fonderie de cuivre est en fonction depuis 1927 dans la ville de Rouyn-Noranda, et bien que les émissions soient contrôlées à l'heure actuelle, les lacs situés sous le vent de cette fonderie sont contaminés par des métaux comme le Cd, le Cu et le Zn, à cause des dépôts atmosphériques accumulés avec le temps. En plus de cette source atmosphérique, quelques lacs dans cette région sont également contaminés par des sources ponctuelles comme les effluents miniers ou les effluents d'usines impliquées dans la transformation des métaux. Les lacs Opasatica (lac de référence) et Dufault (lac contaminé aux métaux) ont été employés dans les études de transplantation. Nous avons également étudié d'autres lacs de référence (Ollier et Dasserat), des lacs modérément contaminés (Vaudray et Héva) et des lacs fortement contaminés (Osisko et Dufault) de la région de Rouyn-Noranda, et aussi les lacs Laurentian, Wavy, Hannah et Raft de la région de Sudbury (figure 1-5), dans le cadre d'autres expériences (les simulations modèles et la variabilité saisonnière des métaux accumulés).

Les manipulations sur le terrain ont impliqué la transplantation réciproque de perchaudes entre un lac de référence (Opasatica) et un lac contaminé aux métaux (Dufault). Notre étude était d'importance particulière pour l'ÉRÉ du fait que nous avons utilisé la perchaude, une espèce de poisson généralement retrouvée aussi bien dans des environnements propres que dans des environnements contaminés. Notre approche a permis aux poissons mis en cage d'être exposés naturellement à la nourriture et à l'eau dans le lac «hôte», reflétant la biodisponibilité métallique que ces poissons rencontreraient naturellement.

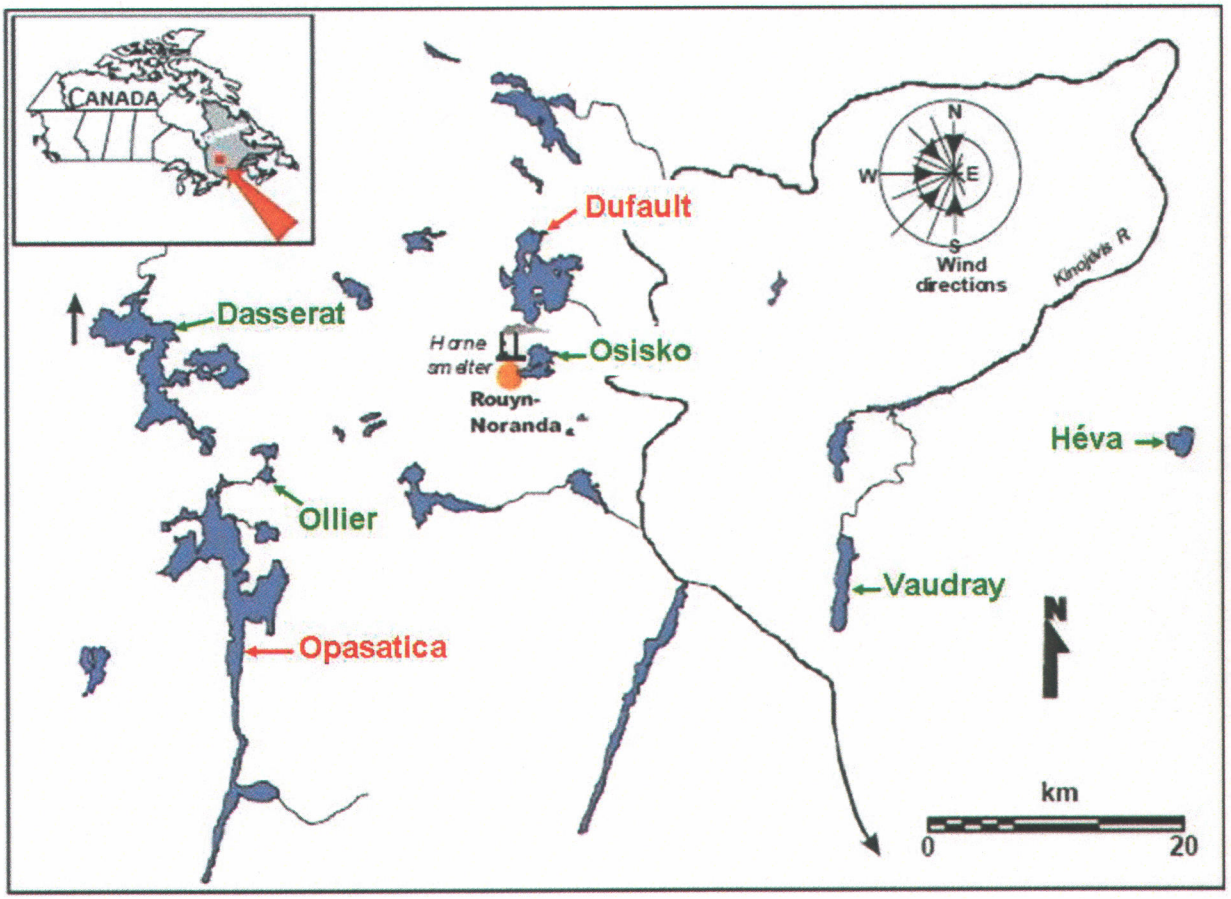


Figure 1-4: Une carte montrant la localisation des lacs utilisés dans les études de transplantation (lacs Opasatica et Dufault) et des lacs utilisés pour tester le modèle de bioaccumulation du Cd ainsi que pour évaluer la variabilité saisonnière des métaux : lacs de référence (Opasatica, Dasserat et Ollier) ; lacs modérément contaminés (Vaudray et Héva) et lacs fortement contaminés (Osisko et Dufault).

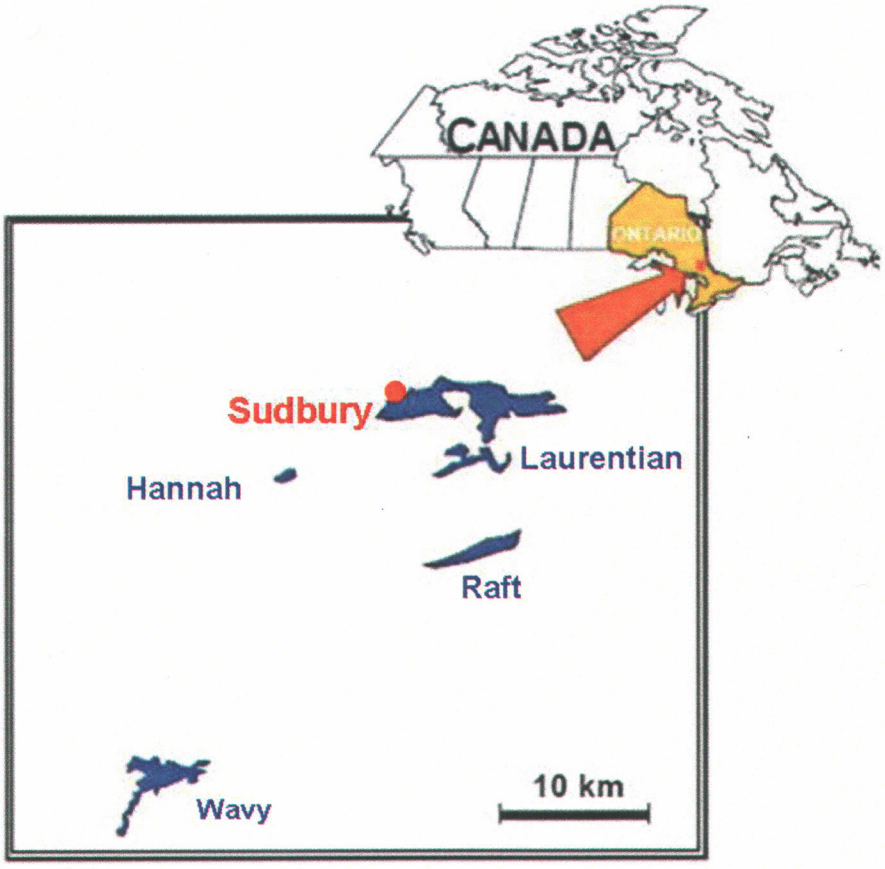


Figure 1-5: Une carte de la région de Sudbury montrant l'emplacement des quatre lacs à l'étude utilisés pour tester le modèle de bioaccumulation du Cd.

Une approche semblable de transplantation a été employée avec succès pour étudier l'accumulation métallique (Cd, Cu, Zn) et l'induction de la métallothionéine chez le bivalve d'eau douce *Pyganodon grandis* (Couillard et al., 1995a,b; Bonneris, 2004; Perceval, 2004) ainsi que l'accumulation en métal (Cd) dans les larves d'éphémère (*Hexagenia limbata*; Michaud et al., 2005). Des études semblables ont également été menées chez diverses espèces de poissons pour étudier l'accumulation métallique et l'induction de divers biomarqueurs, y compris la métallothionéine : truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*),

Roch et McCarter, 1984; barbue de rivière (*Ictalurus punctatus*), Schlenk et al., 1995; truite arc-en-ciel, Camusso et al., 1995; barbue de rivière, Martin et Black, 1998; truite brune (*Salmo trutta*), Olsvik et al., 2000. Cependant, contrairement à l'étude de terrain présentée ici, la conception expérimentale utilisée dans plusieurs de ces études sur les poissons impliquait une exposition aux contaminants aqueux seulement, et les poissons n'étaient pas alimentés pendant l'étude (Olsvik et al., 2000), ou ont été alimentés par une diète artificielle (Martin et Black, 1998; Camusso et al., 1995). Cette approche ignore l'importance potentielle des sources alimentaires en métaux. De plus, certaines de ces dernières études ont utilisé des espèces de poisson obtenues à partir d'établissements de pisciculture; de tels poissons ne représentent pas nécessairement les poissons qui sont généralement retrouvés dans les lacs contaminés (par exemple, la truite arc-en-ciel; Camusso et al., 1995).

1.4 La perchaude comme espèce biomoniteur

La perchaude est commune aux lacs et aux fleuves d'eau douce en Amérique du nord, des régions au sud comprenant la Floride, jusqu'aux régions nordiques de Québec, Canada. Cette espèce de poisson joue un rôle important dans les écosystèmes d'eau douce car elle représente une proie importante pour de plus grands poissons tels que le doré (*Stizostedion vitreum*) ou le brochet (*Esox lucius*). De plus, les perchaudes sont importantes pour l'industrie de la pêche sportive, et elles sont généralement pêchées en été aussi bien qu'en hiver.

La perchaude est potentiellement un bon choix comme espèce biomoniteur pour la contamination au métal parce que ces poissons sont abondants, faciles à attraper et ils sont généralement retrouvés aussi bien dans des environnements propres que dans les lacs contaminés. Cette espèce de poisson est également relativement sédentaire, et reflète ainsi la contamination locale (Aalto et Newsome, 1990). Il y a eu de nombreuses études sur le terrain

sur la perchaude démontrant non seulement l'accumulation métallique et la détoxication partielle (Laflamme et al., 2000; Levesque et al., 2002; Eastwood et Couture, 2002; Rajotte et Couture, 2002; Audet et Couture, 2003), mais également une dégradation physiologique comprenant le dysfonctionnement endocrinien (Laflamme et al., 2000 ; Gravel et al., 2005), des capacités physiologiques altérées (Levesque et al., 2002; Audet et Couture, 2003; Couture et Kumar, 2003) et un facteur de condition réduite (Couture et al., 2002 ; Levesque et al., 2002) chez les poissons provenant d'environnements contaminés.

Ce projet de doctorat a été conçu pour complémenter la recherche existante sur la perchaude produite par notre groupe de recherche de MITE-RN (INRS - UQAM - McGill). Les résultats de ce groupe de recherche peuvent être généralisés comme suit (pour une revue récente, voir Campbell et al., 2003) : (1) l'accumulation du Cd, du Zn et du Cu dans des organes cibles (foie, rein et branchies) se produit le long d'un gradient d'exposition métallique (Giguère et al., 2004); (2) les concentrations de métallothionéine augmentent également le long de ce gradient d'exposition métallique (Laflamme et al., 2000); (3) la perchaude des lacs contaminés montre des anomalies métaboliques (Levesque et al., 2002) et des réponses endocriniennes altérées (la sécrétion de cortisol altérée, basse concentration d'hormones thyroïdiennes) chez les perchaudes juvéniles (Gravel et al., 2005), ainsi que chez les perchaudes adultes (Laflamme et al., 2000); (4) quelques indications de stress oxydatif peuvent être détectées dans les perchaudes prélevées de lacs contaminés (Giguère et al., 2005) et (5) l'efficacité de croissance de la perchaude est inférieure dans les lacs contaminés aux métaux (Sherwood et al., 2000, 2002a, 2002b). Le travail de ce projet de doctorat a été conçu pour ajouter aux données existantes sur les tendances spatiales de l'accumulation, la détoxication et les impacts des métaux, en élucidant la dynamique avec laquelle ces changements se produisent. Les buts globaux de ce projet étaient : (1) de développer un

modèle de bioaccumulation pour la perchaude en utilisant des données rassemblées d'études de terrain et (2) d'examiner les variations temporelles de la distribution subcellulaire des métaux chez la perchaude pour mieux comprendre la bioréactivité métallique et les stratégies de régulation des métaux au niveau subcellulaire. Ces buts ont été atteints par les expériences et les projets décrits dans la section suivante.

2. Objectifs et hypothèses

2.1 La dynamique de l'accumulation métallique

L'objectif de ce sous projet était de transplanter des perchaudes d'un lac de référence (lac Opasatica) aux enclos installés dans un lac contaminé aux métaux (lac Dufault) pour déterminer les taux d'afflux métallique à deux niveaux biologiques (organe et subcellulaire). Notre hypothèse était qu'en réponse aux concentrations ambiantes élevées du Cu et du Zn, les poissons transplantés pourraient régler la bioaccumulation de ces métaux essentiels, tandis que le Cd ne serait pas soumis au même degré de régulation et les concentrations tissulaires de ce métal non essentiel augmenteraient en fonction du temps chez les poissons transplantés. Étant donné la capacité connue du Cd à induire la MT, nous avons émis l'hypothèse que la stratégie de régulation employée par les poissons en réponse à ce métal en serait principalement une de détoxication par la séquestration avec la MT.

2.2 La dynamique de l'élimination métallique

De façon semblable au sous-projet précédent, des perchaudes ont encore été transplantées, mais cette fois dans la direction inverse (du lac Dufault vers lac Opasatica) afin de mesurer le taux d'élimination des métaux. L'élimination métallique a été examinée au niveau de l'organe et aussi au niveau subcellulaire. Puisque le Cd peut être considéré comme un métal non essentiel pour les poissons, nous avons misé sur le fait qu'il ne serait pas sous le même degré de contrôle homéostatique que le Cu et le Zn, et que son taux de perte serait plus lent que ceux des métaux essentiels. Étant donné l'importance de la métallothionéine dans la séquestration et l'homéostasie du Cu (Hogstrand et al., 1991; Mason et Jenkins, 1995), nous avons émis l'hypothèse que le Cu excessif lié à cette fraction subcellulaire diminuerait pendant l'expérience d'élimination. Finalement, puisque des concentrations de Zn semblent

être fortement réglées chez la perchaude (Giguère et al., 2004), nous nous sommes attendus à ce que les concentrations en Zn chez les poissons du lac contaminé soient près des niveaux normaux, et aucune perte appréciable de ce métal n'a été prévue pendant cette transplantation.

2.3 L'importance relative des sources aqueuses et alimentaires pour l'accumulation de Cd chez la perchaude

Tel que mentionné précédemment, l'importance de l'alimentation comme source de métaux pour la perchaude est une considération importante dans le modèle de bioaccumulation. Dans ce contexte, l'objectif de ce sous projet était de déterminer comment la perchaude juvénile répondait à une concentration élevée de Cd alimentaire, et d'évaluer l'importance relative du Cd alimentaire et du Cd aqueux comme voies d'exposition pour la perchaude juvénile dans un organe cible (le foie). Dans cette expérience des perchaudes provenant du lac Opasatica ont été maintenues dans des cages pendant 30 jours dans un lac de référence (Opasatica) ou un lac contaminé au Cd (Dufault), et des proies étaient offertes (zooplancton) aux poissons dans chaque lac, créant ainsi quatre régimes d'exposition : eau de référence et nourriture de référence (référence); eau de référence et nourriture contaminée (Cd alimentaire seulement); eau contaminée, nourriture de référence (Cd aqueux seulement); et eau contaminée plus nourriture contaminée (Cd alimentaire + Cd aqueux). En employant une proie naturellement contaminée (zooplancton) et des cages permettant le libre échange de l'eau mais excluant le zooplancton naturel présent à l'extérieur des cages, cette conception expérimentale a permis à la perchaude mise en cage d'être exposée au Cd alimentaire et aqueux à des concentrations et sous des formes qui étaient représentatives de celles que ces poissons rencontrent naturellement. L'hypothèse pour cette expérience de manipulation de

régime était que l'accumulation hépatique de Cd chez la perchaude est influencée par des sources alimentaires.

2.4 La variation saisonnière des métaux

Étant donné le potentiel de la perchaude comme espèce pour le biomonitoring des métaux, nous avons également voulu savoir si des facteurs autres que la biodisponibilité métallique pourraient influencer l'accumulation des métaux. Donc, le dernier objectif de cette thèse était d'examiner les variations saisonnières des concentrations de métaux hépatiques au niveau de l'organe et aussi au niveau subcellulaire, chez la perchaude juvénile. Nous avons déterminé les concentrations hépatiques en métal quatre fois au cours de l'été chez les poissons d'un lac de référence (Opasatica), d'un lac modérément contaminé (Vaudray) et de deux lacs fortement contaminés (Osisko et Dufault). Notre hypothèse était qu'il serait plus difficile de contrôler de façon homéostatique les concentrations de métaux et la détoxication subcellulaire chez les poissons avec des concentrations hépatiques en métal plus élevées, et donc nous avons émis l'hypothèse que les concentrations en métal seraient plus variables chez la perchaude des lacs contaminés. En plus de suivre les concentrations hépatiques totales, nous avons également examiné la distribution subcellulaire de ces métaux pour déterminer si des stratégies de régulation dans la cellule changent d'une façon saisonnière.

3. Méthodologie

3.1 Conception des cages expérimentales

3.1.1 Cages utilisées dans les expériences d'accumulation et d'élimination

La méthodologie impliquait la transplantation des perchaudes juvéniles entre le lac Dufault (lac contaminé) et le lac Opasatica (lac non contaminé). Les poissons transplantés ont été maintenus dans des cages et échantillonnés en fonction du temps, afin d'évaluer non seulement la prise en charge des métaux, mais également la vitesse à laquelle ceux-ci peuvent être éliminés une fois les poissons placés dans un environnement non-contaminé. Pour ces expériences, les perchaudes juvéniles pesant moins de 5 g ont été choisies parce que cette taille de poissons s'alimente principalement de zooplancton et de petits insectes aquatiques (Gingras et Boisclair, 2000), et des cages pouvaient être conçues afin de permettre l'entrée de ces espèces de proie, permettant aux poissons mis en cage de s'alimenter *ad libitum*. Les cages mesuraient 1,7 m de profondeur et 2,5 m en diamètre (volume : 5,7 m^3 ; figure 3-1a), avec des parois en maille de polypropylène de 0,5 cm. Les cages (à suspension libre) ont été suspendues à des radeaux flottants faits de tuyaux ABS (styrène de butadiène d'acrylonitrile) (diamètre de 10 cm) et chaque radeau soutenait quatre cages (figure 3-1 b). Approximativement de 50 à 60 perchaudes ont été mises dans chaque cage.

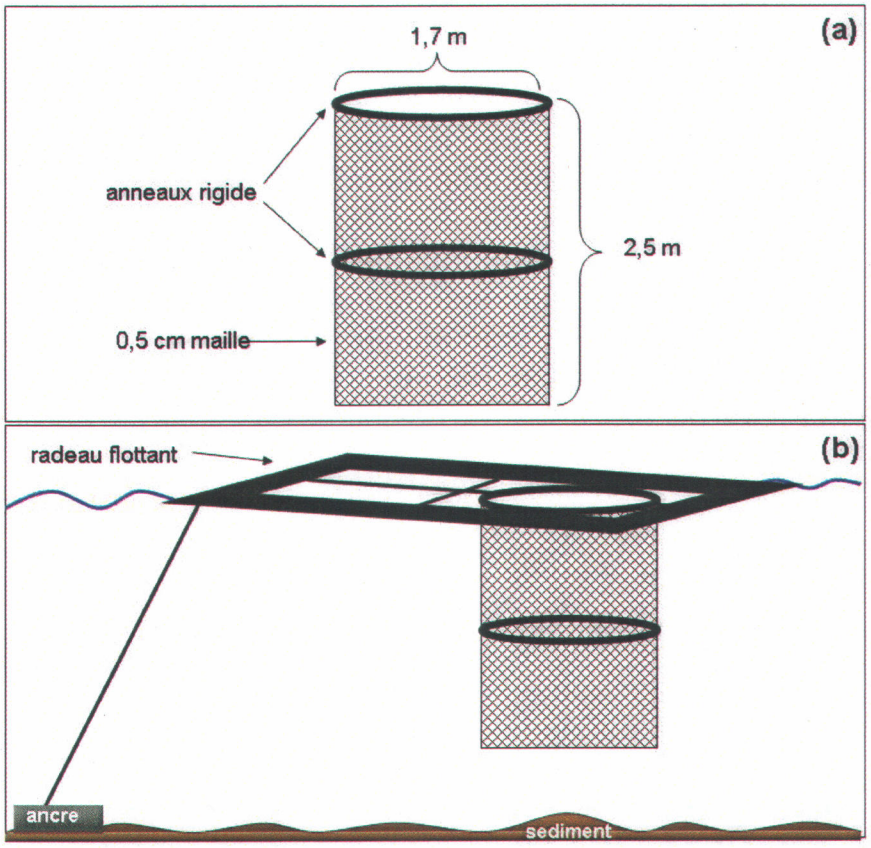


Figure 3-1: Une représentation schématique des cages utilisées dans les expériences d'accumulation et d'élimination, montrant les dimensions des cages (a) et l'arrangement des cages dans un radeau flottant (b). Pour fins de compréhension, l'image (b) montre seulement une cage, mais en réalité chaque radeau en supportait quatre.

3.1.2 Cages utilisées dans l'expérience examinant l'importance relative des voies alimentaires et aqueuses comme sources pour l'accumulation en Cd

Afin de déterminer l'importance relative de l'eau et de la nourriture comme sources de cadmium (Cd) pour la perchaude (1,5 ± 0,1 g; moyen ± erreur type), des spécimens juvéniles provenant du lac Opasatica (lac de référence) ont été mis dans des cages (10 poissons/cage) installées soit dans leur lac d'origine, soit dans un lac contaminé par le Cd (lac Dufault).

Chaque cage cylindrique (profondeur : 1,2 m, diamètre : 0,5 m) avait été fabriquée en Nitex (maille de 64 μm) complétée par des flotteurs de Styromousse et ancrée au fond du lac (figure 3-2 ; Munger et al., 1999). Les flotteurs maintenaient l'ouverture de la cage bien au-dessus de la surface de l'eau afin d'empêcher le zooplancton d'entrer par l'action de la vague.

Les poissons mis en cage dans les deux lacs ont été alimentés avec le macro-zooplancton récolté du lac Opasatica ou du lac Dufault, créant quatre traitements : témoin; exposition au Cd via l'eau seulement; exposition au Cd via la nourriture seulement; exposition au Cd via l'eau et la nourriture. La maille des cages (64 μm) était assez petite pour retenir le zooplancton fourni comme proie, tout en permettant l'échange de l'eau entre les cages et le lac environnant (Munger et al., 1999). Des poissons ont été prélevés après 15 et 30 j d'exposition et les branchies, le tractus gastro-intestinal, le rein et le foie ont été analysés pour le Cd. Les perchaudes indigènes provenant de lacs Opasatica et Dufault ont également été récoltées pour des analyses des métaux après 0, 15 et 30 j.

3.2 Mesures d'exposition aqueuse

Des échantillons d'eau ont été prélevés des lacs d'étude une ou deux fois chaque été (de juin en août) par la diffusion *in situ*. L'échantillonneur à diffusion était composé de bouteilles de 250 mL (Nalgene) couvertes d'une membrane filtre (0,2 μm polysulfone; Pall Gelman Sciences, HT-200, Ville St-Laurent, QC) ou d'un échantillonneur de conception différente composé de huit cellules de 4-mL adjacentes également maintenues à l'abri de l'eau du lac par une membrane de polysulfone (0,2 μm). Les échantillonneurs à diffusion ont été fixés à une tige en plastique approximativement 30 cm au-dessus du sédiment.

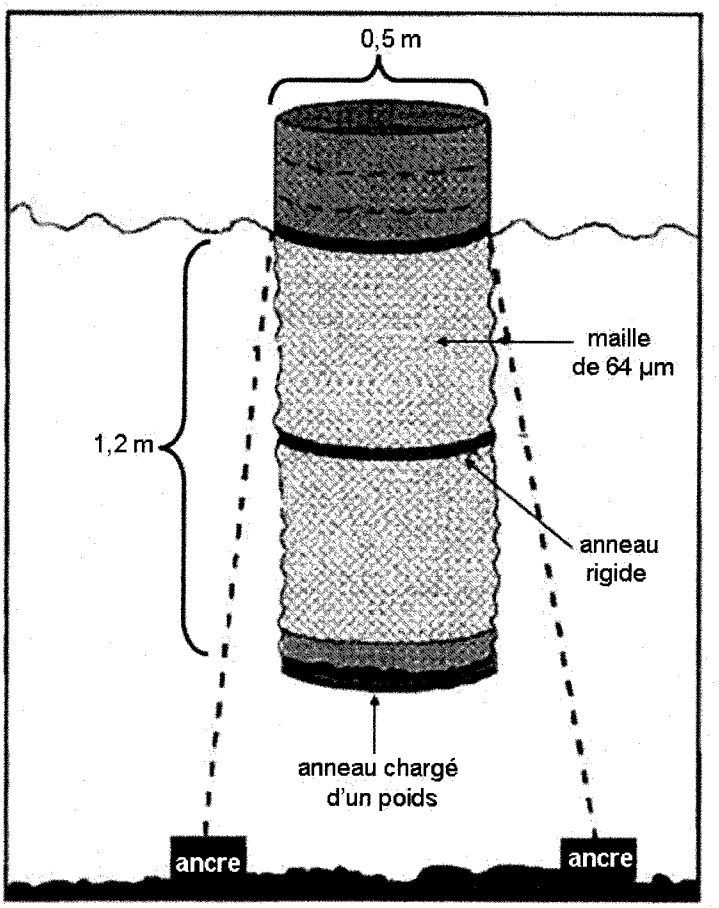


Figure 3-2: Une représentation schématique des cages utilisées dans l'expérience examinant l'importance relative de l'eau et de la nourriture comme sources d'accumulation en Cd chez la perchaude juvénile (adaptée de Munger et al., 1999).

Les échantillonneurs ont pu s'équilibrer pendant 10 j et 3 j dans le lac, respectivement, pour les échantillonneurs de la bouteille de 250 mL et les huit cellules de 4 mL. Après équilibration des échantillonneurs de diffusion avec l'eau environnante, des sous échantillons d'eau ont été prélevés pour l'analyse des principaux anions (SO_4, PO_4, NO_3, Cl), des cations (Ca, Mg, K, Na), des métaux dissous (Al, Fe, Cd, Cu, Zn) et du carbone organique et inorganique dissous. Le pH ambiant a également été mesuré dans les lacs à une profondeur de 0,5 m, près des échantillonneurs à dialyse, avec un pH-mètre (Hanna Hi 9025). Les divers

solutés ont été mesurés comme suit : cations et métaux par spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES, Varian, Vista AX) ; anions par chromatographie ionique (Dionex AutoIon, DX300); carbone inorganique par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à fil chaud (Perkin Elmer, Sigma 300) et carbone organique par un analyseur de carbone organique total (Schimadzu, TOC-5000A). Des blancs et des étalons de référence appropriés pour ces analyses étaient inclus, et les résultats analytiques étaient à l'intérieur des limites acceptables. Les résultats des analyses décrites ci-dessus ont été employés pour estimer les concentrations aqueuses des ions métalliques libres ($[M^{2+}]$), à l'aide d'un modèle d'équilibre chimique (Windermere Humic Aqueous Model, WHAM 6.0.1 : Tipping, 1998).

3.3 Mesures d'accumulation métallique

Les échantillons d'organes entiers furent lyophilisés et pesés avant leur digestion dans l'acide nitrique concentré (HNO_3 de 70%; ~3 mL d'acide par g poids sec de tissus). Des digestions ont été effectuées à l'autoclave (120-125°C; 1,1-1,3 kg cm^{-2}; 3 h). Au cours de chaque digestion, des blancs (HNO_3 et eau MilliQ) et des échantillons de référence certifiés (hépatopancréas du homard, Conseil national des Recherches du Canada, CNRC, TORT-1 et TORT-2) étaient inclus. Les échantillons digérés ont alors été analysés pour le Cd, le Cu et le Zn par ICP-AES. Pour chaque série analytique, les blancs procéduraux ont démontré une contamination négligeable et le dosage des échantillons certifiés a donné des valeurs proches des valeurs certifiées.

3.4 Répartition subcellulaire des métaux

Cinq foies furent combinés pour chacun des échantillons composites (N=3) et ces échantillons composites ont été conservés dans l'azote liquide. Au moment des analyses, les

échantillons de foie ont été enlevés de l'azote liquide, décongelés lentement et homogénéisés à la main dans deux volumes de NaCl de 0,9 % froid dans un homogénéisateur Potier-Elvehjem en verre. Les broyats de tissus ont été transférés aux tubes Eppendorf de 1,5 mL pour ensuite être centrifugés selon un protocole adapté de celui de Wallace et al. (2003) et Giguère (2003) (figure 13-1, Annexe A). Les broyats de tissus étaient centrifugés à 800 x g pendant 15 min à 4°C. Cette étape a produit un surnageant (organites et protéines) et un culot contenant des débris cellulaires. Pour séparer les organites des protéines, ce surnageant a été centrifugé à 100 000 g pendant 60 min, produisant alors un culot contenant les organites et un surnageant contenant les protéines et les peptides. Ce dernier surnageant a finalement subi un traitement à la chaleur suivi d'une centrifugation à 50 000 x g pendant 10 min pour séparer deux fractions : les protéines cytosoliques stables à la chaleur, appelée ci après fraction "HSP"; et les protéines dénaturées à la chaleur, appelée ci-après fraction "HDP".

Quatre fractions ont été obtenues par ce procédé de centrifugation : débris cellulaires; organites; HDP et HSP. Les culots ont été lyophilisés et digérés en HNO_3 à 70% pendant 5 j à la température ambiante. Après cette étape de digestion, les échantillons ont été dilués avec de l'eau ultra pure (2% HNO_3). Les surnageants ont été acidifiés à l'acide HNO_3 à 2%. Les concentrations en métaux dans les fractions subcellulaires ont été analysées par spectrométrie de masse (ICP-MS, Thermo Elemental, X Series) Les concentrations en métaux (Cd, Cu, Zn) dans chaque fraction subcellulaire ont été exprimées comme µg de métal par g de foie, ou nmol de métal par g de foie. Les blancs et les références certifiées (TORT-1) ont été digérés de la même manière. Pour chaque série analytique, les blancs procéduraux ont donné une contamination négligeable et le dosage des échantillons certifiés a donné des valeurs proches des valeurs certifiées.

Pour obtenir une mesure de la teneur complète en métaux dans le foie, un aliquote du broyat initial a été prélevé pour des analyses en métaux avant la première étape de centrifugation et a été digéré selon le même protocole que pour les autres culots subcellulaires. Cet aliquote a également été utilisé dans un calcul de bilan de masse pour vérifier la récupération globale des métaux après la séparation du foie dans les diverses fractions subcellulaires. Les récupérations moyennes des métaux étaient bonnes (90-110 %).

Les résultats des différentes expériences sont présentés dans les Chapitres 1 à 5.

4. Résultats

Les sections suivantes présentent les principaux résultats obtenus dans le cadre de cette thèse. Ces résultats, ainsi que des résultats et des figures additionnels, font aussi l'objet d'articles individuels (Chapitres 1-5).

4.1 Gradient d'exposition métallique

Les concentrations estimées de métal dissous aqueux total et de l'ion métallique libre variaient nettement de lac en lac (tableau 4-1). Le gradient métallique (défini comme le rapport de la concentration en métal la plus élevée / la concentration en métal la plus basse) pour les métaux dissous totaux suivait l'ordre : $[Zn]_d$ (205) > $[Cd]_d$ (50) > $[Cu]_d$ (12). Le gradient de l'ion métallique libre était encore plus grand, mais dans ce cas-ci le gradient suivait l'ordre : $[Cu^{2+}]$ (21,500) > $[Zn^{2+}]$ (590) > $[Cd^{2+}]$ (124). Le gradient accru du Cu^{2+} reflète les estimations extrêmement basses de $[Cu^{2+}]$ dans les lacs de référence, qui résultent de la complexation importante du Cu avec la matière organique dissoute.

4.2 Expériences de transplantation : la dynamique d'accumulation et d'élimination des métaux

4.2.1 Croissance

Les perchaudes indigènes du lac Opasatica et du lac Dufault ont grandi au cours de l'été, mais il y avait des variations de croissance chez les perchaudes transplantées, selon le lac de provenance, et le lac de transplantation (figure 4-1). Par exemple, les longueurs et les poids des poissons provenant du lac Dufault et transplantés au lac Opasatica (c.-à-d., l'expérience de la dynamique d'élimination métallique) ont augmenté pendant la période de

transplantation (cercles pleins; figure 4-1 a et b). Par contre, les poissons transplantés dans l'autre direction (c.-à-d., l'expérience de la dynamique d'accumulation métallique) ont montré des augmentations de poids et de longueur seulement lors des 20 premiers jours, après quoi leur taille est restée relativement stable pendant le reste de la période de transplantation

Tableau 4-1: Les concentrations de Cd, de Cu et de Zn aqueux mesurées dans les lacs d'étude.

Région	Lac	pH	[Cd] (nM)	[Cd^{2+}] (nM)	[Cu] (nM)	[Cu^{2+}] (nM)	[Zn] (nM)	[Zn^{2+}] (nM)
Rouyn-Noranda	Bousquet (BO)[1]	6,6	1,1	0,28	56	1,7E-2	164	55
	Dasserat (DA)[1]	7,5	0,18	0,03	32	5,1E-4	57	10,4
	Dufault (DU)	7,7	5,55	2,47	225	0,06	1015	432
	Héva (HE)[1]	6,1	0,54	0,21	35	4,5E-2	56	26,2
	Ollier (OL)	7,3	0,28	0,06	66	1,35E-3	668	15
	Opasatica (OP)	7,7	0,11	0,02	47	5,83E-4	4,96	0,73
	Osisko (OS)	7,7	1,45	0,70	89	0,01	204	88
	Vaudray (VA)	7,8	0,81	0,05	57	7,44E-4	62	5,40
Sudbury	Hannah (HA)[2]	7,0	2,4	1,0	370	0,44	50	24
	Laurentian (LA)[2]	6,4	0,6	0,26	140	0,08	30	12
	Raft (RA)[2]	6,7	1,7	0,88	130	0,09	160	80
	Wavy (WA)[2]	5,0	1,5	1,2	110	11	120	100
Ratio (max/min)			50	124	12	2,15E4	205	592

[1] Giguère et al. (2004); [2] Giguère et al. (2005)

(triangles pleins, figure 4-1 a et b). Les poids et longueurs des poissons témoins mis en cage (les symboles ouverts, les lignes tirées, figure 4-1 a et b) sont demeurés relativement constants pendant la période de transplantation. Le facteur de condition de Fulton (FCF; calculé comme (poids x longeur^{-3}) x 100) pour des poissons mis en cage était également relativement constant (0,9 – 1,1), sauf pour les poissons témoins mis en cage dans le lac Dufault (C-DUF) où le FCF était généralement inférieur et variait de 0,78 à 0,90 (figure 4-1 c).

4.2.2 La dynamique du cadmium

Chez les poissons transplantés du lac Opasatica au lac Dufault, les concentrations en Cd chez les perchaudes ont augmenté au cours de la période d'exposition de 70 j dans tous les organes examinés. L'accumulation du Cd dans les branchies et le tractus gastro-intestinal s'est produite rapidement; les concentrations en Cd dans ces organes au jour 10 de la transplantation étaient significativement plus élevées ($P \leq 0,01$) que celles chez les contrôles (Chapitre 8, figure 1). L'accumulation en cadmium était plus lente dans le rein et le foie; il y avait une période de retard de 10-20 j, après laquelle les concentrations en Cd ont augmenté progressivement pendant les derniers 50 j de la période d'exposition. Dans le foie, au niveau subcellulaire, les concentrations en Cd ont augmenté principalement dans la fraction contenant les protéines stables à la chaleur (HSP; par exemple la métallothionéine). À la fin de 70 j d'exposition, les concentrations en Cd dans les diverses fractions subcellulaires ont diminué dans l'ordre : HSP > débris cellulaire > organites > protéines dénaturées à la chaleur (HDP) (figure 4-2 c).

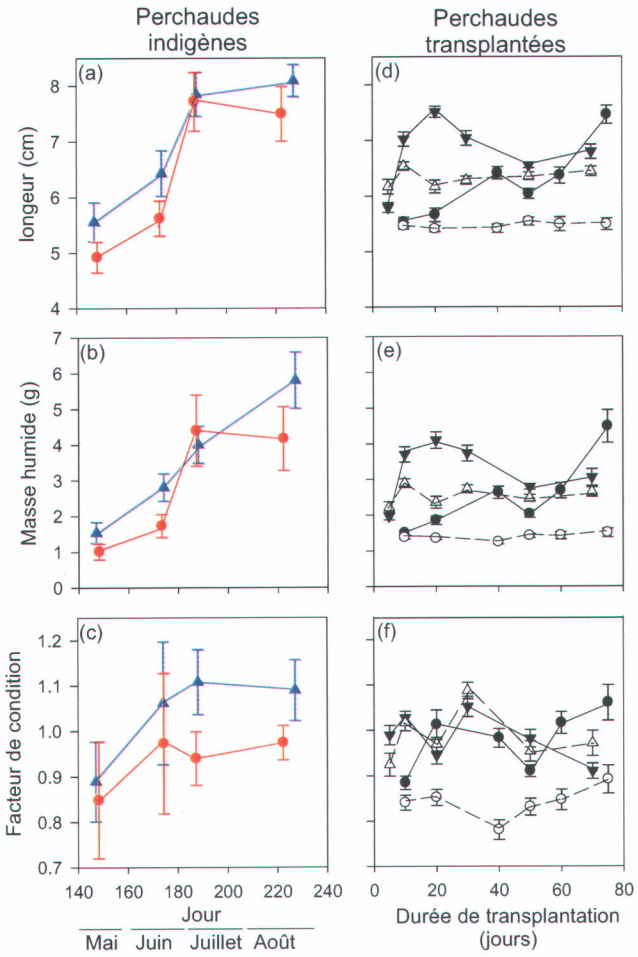


Figure 4-1: Changements de longueur, de poids, et de facteur de condition pour les poissons indigènes du lac Dufault (cercles rouges), du lac Opasatica (triangles bleues) (panneaux a-c) ainsi que pour les poissons transplantés (panneaux d-f). Pour les études de transplantation, les poissons provenant du lac Dufault sont représentés par des cercles; les perchaudes transplantées au lac Opasatica (cinétique d'élimination), par des cercles pleins, et les perchaudes transplantées dans des cages dans le lac Dufault (poissons témoins) par des cercles ouverts. Les poissons provenant du lac Opasatica sont représentés par des triangles; les perchaudes transplantées au lac Dufault (cinétique de prise en charge) sont représentées par des triangles pleins, et les perchaudes transplantées au lac Opasatica (poissons témoins) par des triangles ouverts. Les poissons témoins mis en cage sont indiqués par des symboles ouverts et des lignes à tirets, tandis que les poissons qui ont été réciproquement transplantés sont représentés par des symboles pleins et des lignes solides.

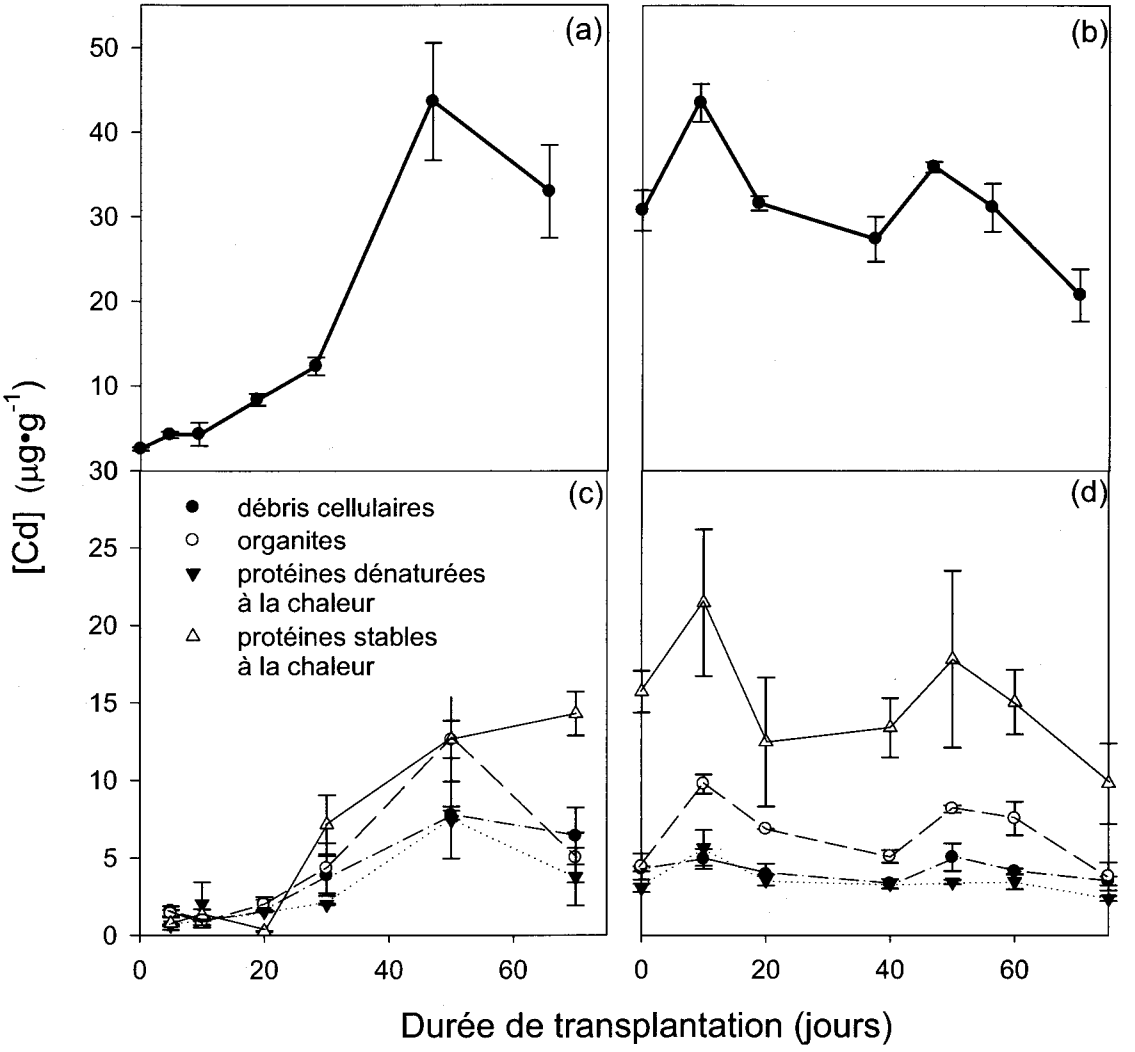


Figure 4-2: Variations dans les concentrations hépatiques totales en Cd pendant les expériences d'accumulation (panneau a) et d'élimination (panneau b). Variations dans les concentrations en Cd dans les fractions subcellulaires pendant les expériences d'accumulation (panneau c) et d'élimination (panneau d).

Pour étudier la cinétique d'élimination en métal, des perchaudes ont été transplantées du lac Dufault au lac Opasatica. Chez ces poissons, les concentrations en Cd ont diminué progressivement dans le tractus gastro-intestinal et les branchies et les concentrations à la fin de l'étude étaient significativement inférieures aux valeurs initiales ($P \leq 0,05$; Chapitre 9, figure 2). Les concentrations finales en Cd dans le rein étaient aussi significativement

inférieures ($P \leq 0,05$) à celles au début de l'expérience. Cependant, les concentrations dans le foie n'étaient pas significativement inférieures ($P \leq 0,05$) aux concentrations initiales dans cet organe. Dans le foie, les concentrations initiales en Cd étaient les plus élevées dans la fraction HSP, et les concentrations n'ont diminué significativement ($P > 0,05$) dans aucune des fractions subcellulaires pendant la période de 75 j (figure 4-2 d).

4.2.3 Les dynamiques du Cu et du Zn

Chez les poissons transplantés au lac contaminé en métaux (lac Dufault), les dynamiques du Cu et du Zn dans les branchies étaient semblables; il y avait un saut dans les concentrations au jour 5, suivi d'une diminution dans la concentration au jour 10 (Chapitre 8, figure 2). Après cette baisse, les concentrations de ces deux métaux ont augmenté encore graduellement jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint au jour 50. Dans le tractus gastro-intestinal, les concentrations en Cu étaient significativement plus élevées ($P \leq 0,05$) chez les poissons transplantés, tandis que les concentrations en Zn étaient variables, et n'ont pas différé de manière significative des contrôles mis en cage. Dans le rein, les concentrations en Cu et en Zn ont augmenté progressivement. Les concentrations en Cu ont également augmenté dans le foie des poissons transplantés, mais les concentrations en Zn n'étaient pas significativement différentes de celles chez les perchaudes de contrôle après 70 j d'exposition dans le lac Dufault. Étant donné que les concentrations en Zn dans le foie étaient variables pendant l'expérience d'accumulation et ont montré peu d'augmentation nette de concentration, les résultats subcellulaires présentés ici se concentreront seulement sur ceux pour le Cu (pour une description d'accumulation du Zn au niveau subcellulaire, voir le Chapitre 8). Chez les poissons transplantés, les concentrations en Cu ont augmenté progressivement dans la fraction HSP. Après une exposition de 70 j aux concentrations ambiantes élevées en Cu, les

concentrations dans la fraction HSP étaient approximativement 2 fois plus élevées que dans les autres fractions, suivies par les organites > débris cellulaire ≈ fraction HDP (figure 4-3 c).

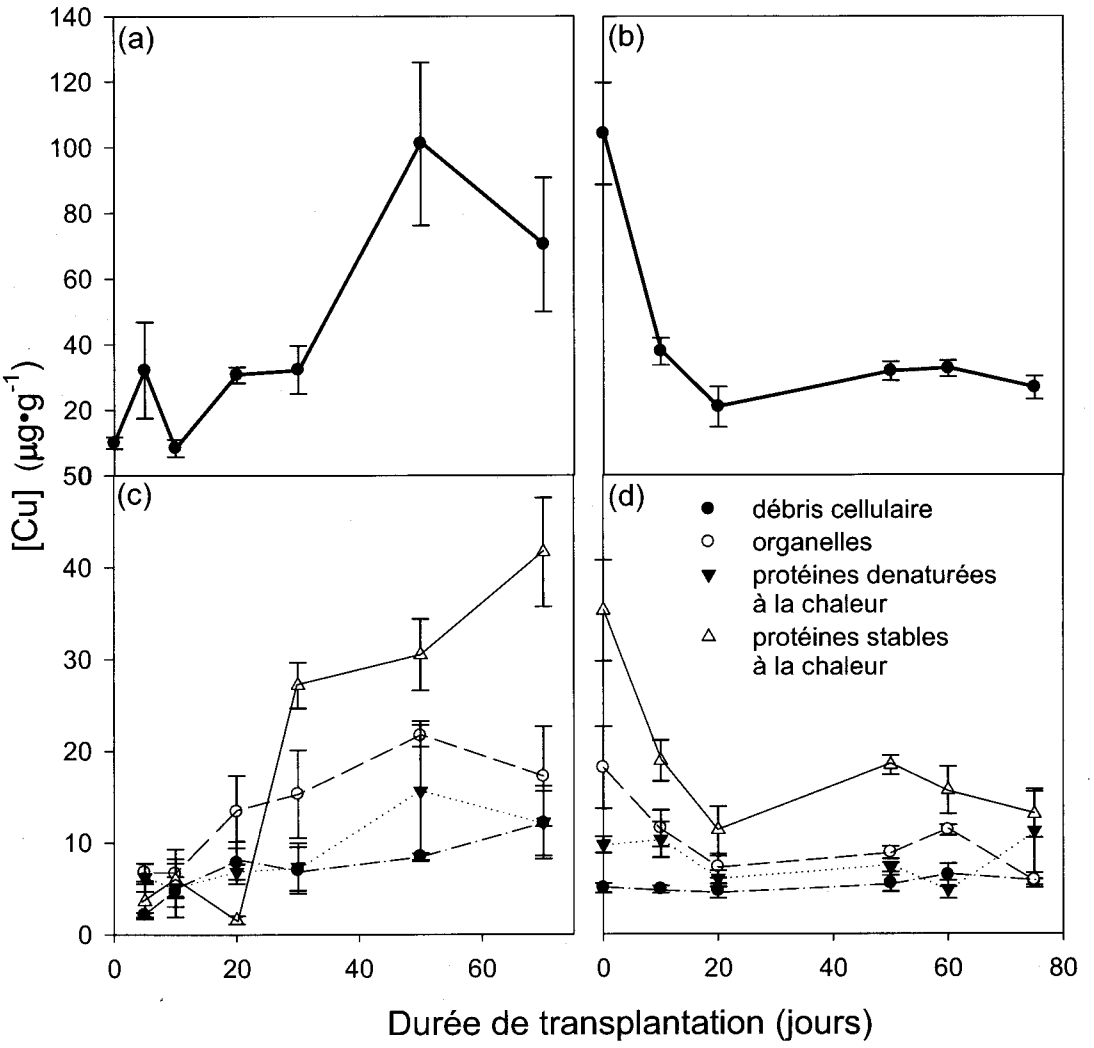


Figure 4-3: Variations des concentrations hépatiques totales en Cu pendant (a) les expériences d'accumulation et (b) les expériences d'élimination. Variations des concentrations en Cu dans les fractions subcellulaires pendant (c) les expériences d'accumulation et (d) les expériences d'élimination.

Lorsque les perchaudes ont été transplantées du lac Dufault au lac Opasatica (c.-à-d., l'expérience d'élimination), les concentrations en Cu dans le tractus gastro-intestinal et dans le foie étaient significativement ($P \leq 0,05$) inférieures aux concentrations initiales au jour 10 de la phase d'élimination (figure 4-3 b; Chapitre 9, figure 4). De plus, après 10 j (tractus gastro-intestinal) et 20 j (foie), les concentrations en Cu sont restées plus ou moins constantes dans ces organes, suggérant qu'un état stationnaire était atteint. Par contre, les concentrations en Cu dans les branchies et le rein étaient semblables à celles observées chez les poissons indigènes du lac Opasatica, suggérant que le Cu ne s'accumule pas dans ces organes chez les poissons du lac Dufault (Chapitre 9, figure 4).

Dans le foie, au niveau subcellulaire, les concentrations en Cu dans les débris cellulaires et la fraction des protéines dénaturées à la chaleur n'ont pas changé significativement ($P > 0,05$; figure 4-3 d). Les concentrations en Cu ont cependant diminué dans les organites et la fraction HSP; les concentrations étaient significativement inférieures ($P \leq 0,05$) après 20 j d'exposition dans le lac de référence.

4.3 L'importance relative du Cd alimentaire et du Cd aqueux comme vecteurs d'exposition pour la perchaude juvénile

4.3.1 Concentrations en cadmium dans les organes des perchaudes mises en cage

Les résultats de cette étude indiquent que les branchies, le tractus gastro-intestinal, le rein et le foie accumulent le Cd environnemental différemment (Chapitre 10). Par exemple, chez les poissons mis en cage, les concentrations en Cd dans le tractus gastro-intestinal et les branchies ont été fortement influencées par le Cd aqueux, tandis que le Cd alimentaire a n'a eu que peu d'effet (Chapitre 10, figure 1 a, b). Ce manque d'accumulation de Cd dans le tractus gastro-intestinal de la perchaude exposé au Cd en nourriture seulement (zooplancton)

suggère que si les perchaudes accumulent le Cd de la nourriture, elles ne le stockent pas dans leur intestin. De même, le rein a également semblé être fortement influencé par le Cd aqueux, mais pas par le Cd alimentaire (Chapitre 10, figure 2b). Contrairement aux autres organes, l'accumulation de Cd dans le foie a été influencée par le Cd alimentaire et aqueux (Chapitre 10, figure 1 d).

4.3.2 Changements de la répartition subcellulaire du Cd résultant de différentes expositions (alimentaire *vs*. aqueuse)

Pendant l'étude, les concentrations hépatiques en Cd ont augmenté dans la fraction des protéines dénaturées à la chaleur (HDP) chez des poissons exposés au Cd aqueux seulement (WO), mais en raison de la variabilité des données, ces augmentations n'étaient pas significatives ($P > 0,05$). Dans ces poissons, la $[Cd]_{HDP}$ a augmenté approximativement par 3 fois pendant la période d'exposition de 30 j (Chapitre 10, figure 2). Les concentrations en cadmium dans cette fraction ont également augmenté approximativement par 3 fois chez les poissons recevant le Cd de sources alimentaires + aqueuses (FW), tandis que chez les poissons exposés au Cd alimentaire seulement (FO), les concentrations en Cd ont peu changé pendant la période d'exposition. Dans la fraction des organites, les concentrations en Cd ont augmenté par un facteur approximativement de 2 à 3, entre les jours 0 et 30 chez tous les poissons recevant le Cd (Chapitre 10, figure 2). Cependant, en raison de la variabilité des données, aucune de ces augmentations en concentration n'était significative ($P > 0,05$). Par ailleurs, dans la fraction des protéines stables à la chaleur, on a observé des augmentations dramatiques de concentrations en Cd, les concentrations dans cette fraction au jour 30 étant approximativement 5 fois plus élevées que les valeurs initiales pour tous les poissons recevant le Cd indépendamment de la voie d'exposition (Chapitre 10, figure 2).

4.4 Variation saisonnière des concentrations en Cd et en Cu

4.4.1 Résultats au niveau de l'organe

Les concentrations ($\mu g.g^{-1}$)_en métal chez la perchaude juvénile ont changé significativement au cours de l'été (de mai en août), mais seulement chez les poissons avec les concentrations hépatiques les plus élevées en Cd (lacs Dufault et Vaudray) et en Cu (lacs Dufault et Osisko). Les concentrations hépatiques en Cd et en Cu étaient les plus basses chez les perchaudes du lac Opasatica et il n'y avait aucune variation significative des concentrations de ces métaux dans les foies des perchaudes récoltées dans ce lac au cours de l'été (Chapitre 11, figure 2). De même, les concentrations en Cd chez les perchaudes du lac Osisko n'ont pas changé significativement, mais les concentrations en Cu chez ces poissons prélevés en juin étaient significativement plus élevées ($P \leq 0,05$) que celles des poissons récoltés au courant des autres mois. Les concentrations hépatiques en Cd dans les perchaudes du lac Vaudray et du lac Dufault ont changé d'une façon semblable, les concentrations les plus basses se présentant en juillet. Les concentrations en Cu chez les perchaudes de ces deux lacs ont également montré une tendance semblable, avec la concentration la plus élevée se produisant en mai et la concentration la plus basse se produisant en juin.

La teneur en Cd (μg) dans le foie a augmenté significativement ($P \leq 0,05$) chez les poissons de tous les lacs d'étude au cours de l'été. En août, la teneur en Cd avait augmenté approximativement par 3 fois dans le foie de perchaudes des lacs Dufault et Vaudray, mais seulement par 2 fois chez les poissons des lacs Opasatica et Osisko. La teneur en Cu a augmenté significativement chez la perchaude des lacs Opasatica et Vaudray, tandis que la quantité de ce métal était variable chez les poissons des lacs Dufault et Osisko, ne montrant aucune tendance distincte au cours de l'été. Les perchaudes du lac Opasatica avaient une

teneur en Cu approximativement 4 fois plus élevée en août comparé à celle en mai, suivi par Vaudray ≈ Osisko (2 fois plus élevée) < Dufault (1,5 fois plus élevée).

4.4.2 Résultats au niveau subcellulaire

Les concentrations hépatiques en Cd étaient plus élevées dans la fraction des protéines stables à la chaleur (HSP) chez les perchaudes provenant des lacs avec des concentrations en Cd élevées (Chapitre 11, figure 5 : lacs Vaudray, Osisko et Dufault). Par contre, les concentrations hépatiques en Cd chez les perchaudes du lac Opasatica étaient semblables dans toutes les fractions, y compris la fraction HSP, bien que les concentrations aient diminué significativement ($P \leq 0,05$) dans les fractions des protéines dénaturées à la chaleur (HDP) et des organites au cours de l'été. De plus, les concentrations étaient très basses (<1,6 $\mu g \cdot g^{-1}$) dans toutes les fractions subcellulaires hépatiques chez les poissons récoltés de ce lac de référence.

Les concentrations en Cd associées à la fraction des protéines dénaturées à la chaleur (HDP) étaient semblables chez les perchaudes des lacs Vaudray et Dufault, s'étendant approximativement de 2 à 3 $\mu g \cdot g^{-1}$ sans tendance temporelle significative ($P > 0,05$) au cours de l'été. Dans le lac Osisko, il y avait plus de variation, les concentrations en Cd dans la fraction HDP diminuant de 4 à 1 $\mu g \cdot g^{-1}$ au cours de l'été. Les concentrations en Cd ont également peu changé durant l'été dans la fraction des organites chez les perchaudes du lac Vaudray (2 à 3 $\mu g \cdot g^{-1}$) et du lac Osisko (1 à 2 $\mu g \cdot g^{-1}$), tandis que les concentrations étaient plus élevées chez les perchaudes du lac Dufault (4 à 5 $\mu g \cdot g^{-1}$). La fraction de débris cellulaire avait des concentrations de 2 à 3 $\mu g \cdot g^{-1}$ chez les perchaudes des lacs Vaudray et Osisko, tandis que les concentrations étaient plus variables chez les perchaudes du lac Dufault (3 à 6 $\mu g \cdot g^{-1}$).

Semblables aux résultats pour le Cd, les concentrations en Cu étaient les plus élevées dans la fraction HSP chez les perchaudes récoltées des lacs Vaudray, Osisko et Dufault (Chapitre 11, figure 7), mais étaient basses cependant dans la fraction HSP chez les perchaudes du lac Opasatica (4 à 6 $\mu g \cdot g^{-1}$), dans la même gamme des concentrations que pour les autres fractions. Dans chacun des quatre lacs, la $[Cu]_{HSP}$ a montré une variation saisonnière considérable. Dans les deux lacs avec les plus basses concentrations aqueuses en Cu (Vaudray et Opasatica), les concentrations dans les autres fractions subcellulaires étaient semblables et s'étendaient de 3 à 4 $\mu g \cdot g^{-1}$ dans les fractions de débris cellulaires et des organites, et de 2 à 3 $\mu g \cdot g^{-1}$ dans les fractions HDP chez les perchaudes de ces deux lacs. Par contre, les concentrations en $[Cu]_{HDP}$ chez les perchaudes du Lac Dufault et $[Cu]_{organites}$ chez les perchaudes du Lac Dufault et du Lac Osisko étaient non seulement plus variables , mais également les concentrations étaient beaucoup plus élevées.

4.5 Développement du modèle de bioaccumulation pour le Cd

4.5.1 Le modèle de bioaccumulation

Nous avons choisi le foie de la perchaude pour modéliser l'accumulation de Cd parce que cet organe est relativement gros et facile à exciser; il est important comme organe de stockage de Cd chez cette espèce du poisson (Giguère et al., 2004), et il est influencé par le Cd de sources alimentaires et aqueuses (Kraemer et al., 2005b). Pour décrire l'échange du Cd dans le foie, nous avons appliqué un modèle du premier ordre (Luoma et Rainbow, 2005; Munger et al., 1999) :

$$\frac{d[Cd]_F}{dt} = k_u[Cd^{2+}] + (EA \times TI \times [Cd]_{nourriture}) - k_e[Cd]_F - k_g[Cd]_F \qquad (4\text{-}1)$$

Où $\frac{d[Cd]_F}{dt}$ est les changements du [Cd] en fonction du temps, le k_u, k_e et k_g sont des constantes du taux d'afflux de Cd à partir de l'eau ($L^{-1}\cdot g^{-1}\cdot d^{-1}$), du taux d'élimination de Cd (d^{-1}) et du taux de la croissance du foie (d^{-1}), respectivement; $[Cd^{2+}]$ est la concentration de l'ion libre de Cd dans l'eau du lac ($\mu g\cdot L^{-1}$); $[Cd]_F$ est la concentration en Cd dans le foie ($\mu g\cdot g^{-1}$ poids sec); $[Cd]_{nourriture}$ est la concentration en Cd dans la nourriture de la perchaude ($\mu g\cdot g^{-1}$ poids sec); EA est l'efficacité avec laquelle la perchaude assimile le Cd dans la nourriture (%); et TI est le débit d'ingestion de la nourriture par la perchaude ($g\cdot g^{-1}\cdot d^{-1}$).

4.5.2 La prise en charge du Cd par l'eau

D'abord, nous avons examiné si nous pouvions employer seulement des concentrations en Cd dans l'eau pour prédire les concentrations en Cd dans le foie de la perchaude, en partie parce que ceci simplifierait l'utilisation de ce poisson comme biomoniteur de Cd. Cette hypothèse nous semblait raisonnable parce que les résultats d'expériences dans lesquelles des poissons ont été exposés au Cd alimentaire seulement, au Cd aqueux seulement, ou au Cd alimentaire + Cd aqueux (Chapitre 10) suggèrent que le Cd de source aqueuse soit un vecteur d'exposition au Cd plus important que les sources alimentaires pour la perchaude juvénile

Tableau 4-2: Concentrations hépatiques en cadmium (moyenne ± ET) chez la perchaude juvénile du lac de référence, et les poissons exposés pendant 30 j au Cd alimentaire seulement, au Cd aqueux seulement, et au Cd alimentaire + Cd aqueux (Chapitre 10). Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (one-way ANOVA avec des corrections de Tukey-Kramer, $P > 0,05$).

Conditions d'exposition	Cadmium hépatique ($\mu g \cdot g^{-1}$, poids sec)
Nourriture seulement	$7,7 \pm 0,9^{b}$
Eau seulement	$10,8 \pm 0,5^{c}$
Eau + nourriture	$10,4 \pm 0,5^{bc}$
Référence (perchaudes indigènes du lac Opasatica)	$2,8 \pm 0,4^{a}$

(tableau 4-2). En conséquence, comme première approximation, nous avons ignoré les paramètres décrivant la prise en charge de Cd par la nourriture ($EA \times TI \times [Cd]_{nourriture}$).

De plus, nous avons supposé que la perte de Cd chez la perchaude était négligeable, tôt dans l'expérience d'accumulation (Chapitre 8).

Tableau 4-3: Sommaire des paramètres du modèle de bioaccumulation du Cd à partir de l'eau ambiante.

Paramètres	Symbole	Valeur estimée (± ET)	Section où le paramètre est décrit
Constante du taux de la croissance (d^{-1}):			
• transplantation d'élimination	k_g	0,007 ± 0,002	4.5.2
• moyenne utilisée dans les prévisions d'état stationnaire		0,014 ± 0,003	4.5.5
Constante du taux d'élimination (d^{-1})	k_e	0,002 ± 0,001	4.5.3
Constante du taux de la prise en charge ($L \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$)	k_u	1,82 ± 0,60	4.5.1

Finalement, parce que les changements de la masse du foie étaient négligeables pendant l'expérience d'accumulation (Chapitre 5, figure 1), nous avons ignoré la dilution de Cd due à la croissance du foie. Ainsi l'équation 4-1 devient :

$$\frac{d[\mathrm{Cd}]_F}{dt} = k_u[\mathrm{Cd}^{2+}] \qquad (4\text{-}2)$$

Nous avons estimé $\frac{d[\mathrm{Cd}]_F}{dt}$ par la pente de la phase linéaire initiale de la prise en charge du Cd lorsque les poissons étaient exposés au Cd dans l'eau, libres de s'alimenter *ad libitum* sur le zooplancton contaminé au Cd (Chapitre 8), c'est à dire, 0,48 ± 0,17 (écart-type) $\mu g \cdot g^{-1}$ foie$\cdot d^{-1}$ (r^2 = 0,99, $P \leq 0,01$; Kraemer et al., 2005a). Substituant cette valeur aussi bien que

celle pour la concentration de Cd^{2+} aqueux dans le lac Dufault pendant la période de transplantation (0,27 $\mu g \cdot L^{-1}$) dans l'équation 4-2, on obtient une valeur pour k_u de 1,8 $L \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$ (tableau 4-3).

4.5.3 Considération de la croissance

Le taux de croissance du foie peut être calculé en utilisant l'équation :

$$W = W_o e^{kgt} \qquad (4\text{-}3)$$

où W = la masse au temps t et W_o est la masse initiale. Bien que la masse du foie n'ait pas changé pendant les expériences d'accumulation, il y avait des augmentations significatives (r^2 = 0,67, P = 0,03) de la masse du foie pendant l'expérience d'élimination (Chapitre 12, figure 1). En utilisant ces données, on a estimé que le taux de croissance du foie était 0,007 ± 0,002 d^{-1}. Cette valeur a été employée dans le calcul du k_e (équation 4-4) et de la demi-vie du Cd (équation 4-5) dans le foie.

4.5.4 La modélisation de l'élimination du cadmium

Dans le lac Opasatica, bien que les concentrations ambiantes de Cd soient basses comparées à celles du lac Dufault, l'afflux de ce métal est probablement toujours en cours chez les perchaudes transplantées pendant les expériences d'élimination. Cependant, parce que les poissons ont grandi pendant l'expérience (Chapitre 5, figure 1), cet afflux a un impact minimal sur les concentrations hépatiques en Cd. En effet, les concentrations en Cd dans le foie des perchaudes indigènes du lac Opasatica n'ont pas changé de façon significative pendant la saison (Chapitre 11), soutenant la notion que l'afflux du Cd chez les perchaudes transplantées au lac Opasatica a une influence minimale sur leurs concentrations hépatiques en Cd.

Puisque le modèle de bioaccumulation emploie des concentrations, nous avons supposé que l'afflux en métal chez les perchaudes transplantées au lac Opasatica a eu une influence insignifiante sur des concentrations hépatiques en Cd. La forme intégrée de l'équation (4-1) devient alors :

$$[M]_F = [M]_F^o \bullet e^{-(k_g + k_e)t} \qquad (4\text{-}4)$$

où le k_g est la constante du taux de la croissance, $[M]_F$ est la concentration de Cd au temps (t) et $[M]_F^o$ est la concentration initiale de Cd dans le foie. En utilisant l'équation (4-4) et les données de l'élimination du Cd, nous avons estimé la constante de taux de perte (k_e) à 0,002 ± 0,001 d^{-1} pour le foie de la perchaude (tableau 4-3). Une fois la valeur de k_e estimée, l'équation (4-5) a été utilisée pour produire une courbe modèle pour les données d'élimination du Cd (figure 4-4) (pour les courbes modèles de l'élimination du Cu et du Zn, voir le Chapitre 10).

La courbe calculée pour le Cd concordait assez bien avec les données observées dans le foie (figure 4-4). Il est important de noter, cependant, qu'il y avait peu de changement dans les concentrations hépatiques en Cd pendant la transplantation, et qu'il y avait passablement d'incertitude autour de la courbe calculée (k_e = 0,002 ± 0,001; moyenne ± écart-type).

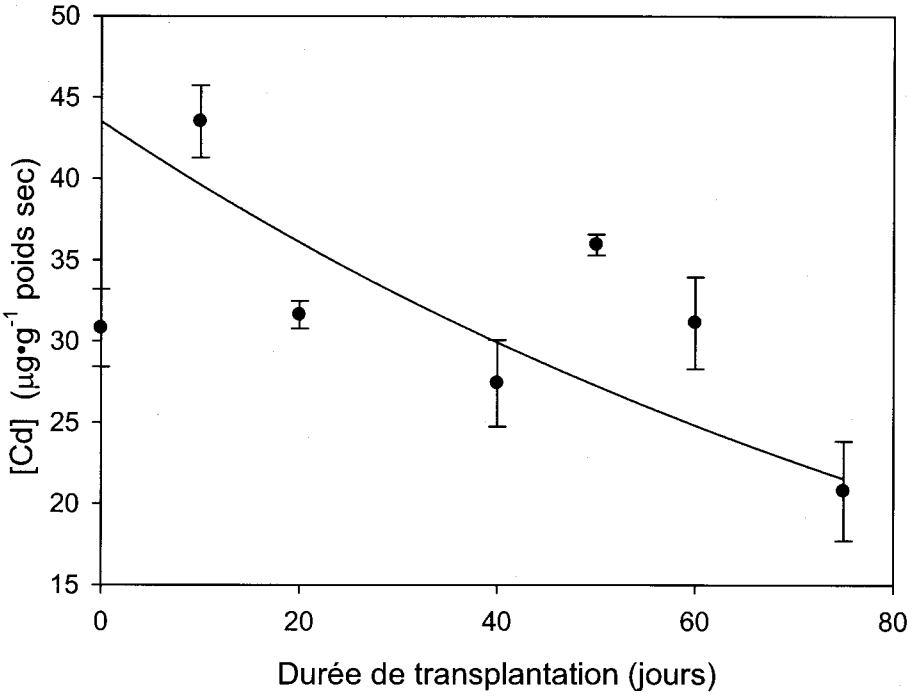


Figure 4-4: Variations de concentrations en Cd dans le foie des perchaudes transplantées au lac Opasatica (cercles pleins). La courbe a été tracée à partir de l'équation 4-4.

En utilisant les valeurs de k_e et de k_g, nous avons estimé la demi-vie biologique ($t_{½}$) pour le Cd dans le foie des perchaudes transplantées par le réarrangement de l'équation (4-4) et la solution pour le $t_{½}$ comme suit :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 0.5}{k_e + k_g} \qquad (4\text{-}5)$$

La demi-vie du Cd (moyenne ± écart-type) était la plus longue dans le foie (75 ± 22 j) suivie par le rein (52 ± 8 j) > le tractus gastro-intestinal (37 ± 12 j) > les branchies (18 ± 8 j).

4.5.5 La modélisation de l'accumulation hépatique en cadmium

Il y avait un retard dans l'accumulation en Cd pendant les 10 premiers jours de transplantation. Après cette période, les concentrations ont progressivement augmenté. En utilisant les constantes estimées du k_u et du k_e, et en ignorant la dilution de la croissance (Chapitre 5, figure 1), la dynamique d'accumulation en métal (c.-à-d., jour 10 → 70) peut également être modélisée en utilisant la forme intégrée de l'équation (4-1) :

$$[M]_F = \frac{[M]_{environnement}}{k_e[M]_F} - \left(\frac{k_u[M]_{environnement}}{k_e[M]_F} - [M]_F^o \right) e^{-k_e t} \qquad (4\text{-}6)$$

La simulation pour le Cd hépatique était raisonnablement conforme aux changements observés pendant la transplantation (figure 4-5), suggérant que les estimations des constantes k_u et k_e étaient des approximations raisonnables.

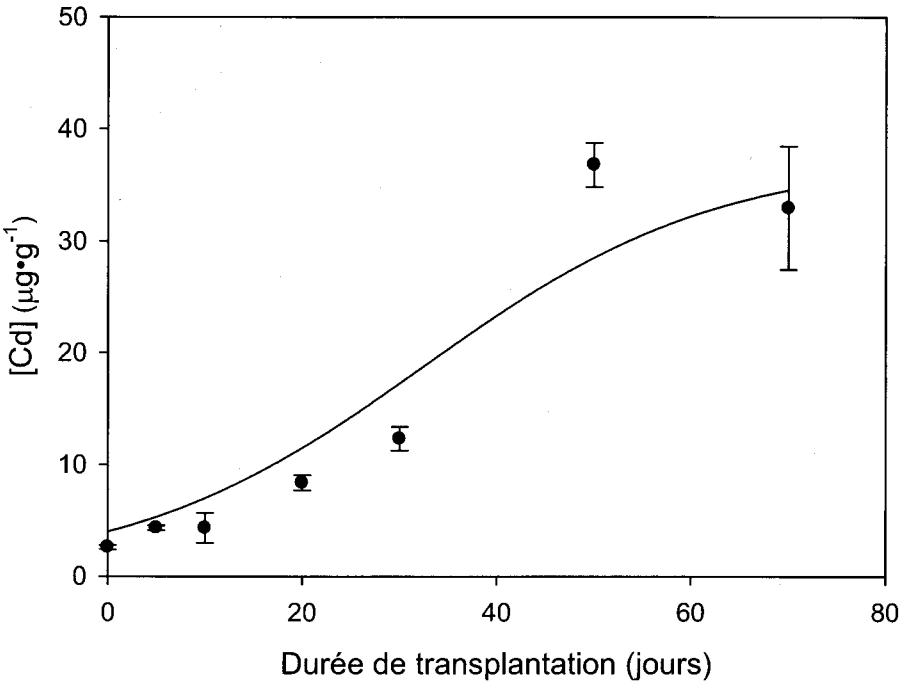


Figure 4-5: Variations des concentrations en Cd dans le foie des perchaudes transplantées au lac Dufault (cercles pleins). La courbe modèle a été tracée à partir de l'équation (4-6).

4.5.6 La modélisation des concentrations à l'état stationnaire

En utilisant les constantes pour la prise en charge du cadmium à partir de l'eau (k_u), pour l'élimination (k_e) et pour la croissance (k_g), nous pouvons maintenant procéder aux modélisations des concentrations en Cd chez les poissons qui sont à l'état stationnaire vis à vis de leur environnement. Pour examiner ce modèle, nous avons utilisé des données provenant de perchaudes récoltées d'une série de lacs affectés par le Cd. En utilisant la forme intégrée de l'équation 4-1, les concentrations en Cd à l'état stationnaire peuvent être décrites par :

$$[Cd]_{és} = \frac{k_u [Cd]_e}{k_e + k_g} \qquad (4\text{-}7)$$

où le k_g dans le modèle représente une constante de croissance moyenne (0,014 ± 0,003 d^{-1}, tableau 4-2) pour les perchaudes récoltées de quatre lacs différents pendant l'été (de mai en août, moyenne ± écart-type) : Opasatica (0,017 ± 0,002 d^{-1}), Vaudray (0,016 ± 0,003 d^{-1}), Dufault (0,013 ± 0,003 d^{-1}) et Osisko (0,011 ± 0,003 d^{-1}).

En utilisant seulement les concentrations en Cd^{2+} aqueux, il y avait une concordance raisonnablement bonne entre les concentrations mesurées et celles prédites pour des poissons des lacs Osisko et Dufault (région de Rouyn-Noranda) et des lacs Wavy et Hannah (région de Sudbury) (figure 4-6). Les prévisions du modèle étaient cependant nettement moins bonnes pour les poissons prélevés des lacs de référence ou des lacs modérément contaminés en Cd, suggérant que le Cd alimentaire puisse jouer un rôle plus important dans des lacs avec des basses concentrations en Cd.

Pour évaluer cette hypothèse, nous avons développé l'équation 4-7 pour inclure la prise en charge des sources alimentaires:

$$[Cd]_{és} = \frac{k_u [Cd]_{eau} + (EA \bullet TI \bullet [Cd]_{nourriture})}{k_e + k_g} \qquad (4\text{-}8)$$

où l'EA représente l'efficacité d'assimilation (%), TI représente le taux d'ingestion ($g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$) et $[Cd]_{nourriture}$ est la concentration ($\mu g \cdot g^{-1}$) en Cd dans la nourriture. Les concentrations en Cd dans la nourriture (zooplancton) ont été mesurées dans les lacs d'étude (Chapitre 11, tableau 2). Parce que l'EA et l'TI n'ont pas été mesurés directement dans nos expériences, les valeurs pour ces paramètres proviennent de la littérature.

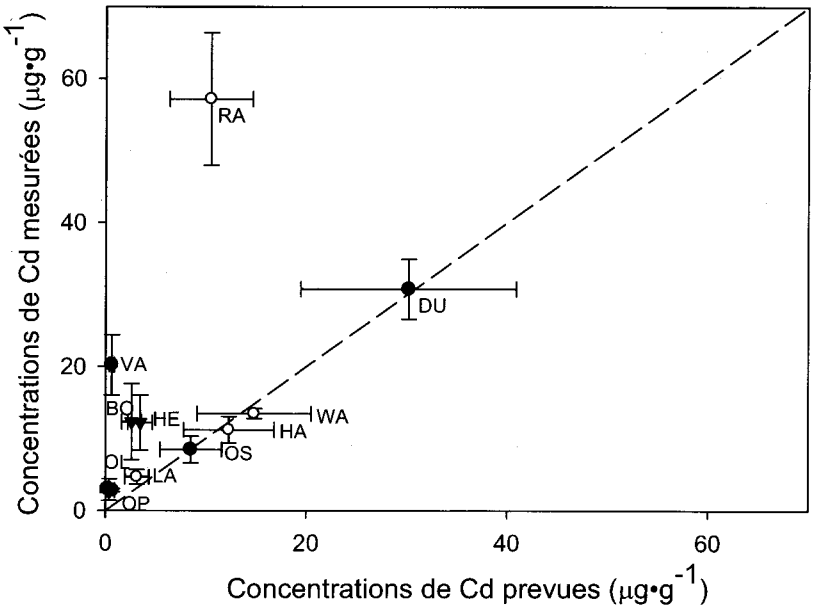


Figure 4-6: Comparaison des concentrations hépatiques en Cd mesurées chez les perchaudes récoltées le long d'un gradient de concentration en Cd avec des concentrations prévues par le modèle, tenant compte seulement des concentrations aqueuses de Cd^{2+}. Chaque point (moyenne ± ÉT) correspond aux perchaudes prélevées d'un lac différent (voir le tableau 4-1 pour les noms et les descriptions des lacs). La ligne à tirets représente un rapport de 1:1. Les erreurs (écarts-types) associées aux prédictions obtenues par le modèle, ont été obtenues par ré-échantillonnage paramétrique du type bootstrap (Wehrens et al., 2000). Pour chaque cas, 500 échantillons bootstrap sont générés pour l'évaluation de la performance du modèle.

En utilisant un modèle de bilan de masse de mercure, Trudel et al. (2000) ont estimé les taux d'ingestion des perchaudes âgées de 1 an à 0,028 $g \cdot g^{-1} d^{-1}$ pour une rivière de référence (rivière des Outaouais). En utilisant une technique de radio-traceur (^{137}Cd), Sherwood et al. (2000) ont estimé les taux d'ingestion pour les perchaudes adultes (âge 4+) récoltées des mêmes lacs que ceux étudiés dans cette thèse. Selon leurs résultats, les perchaudes des lacs contaminés avaient un taux d'ingestion semblable aux perchaudes des

lacs de référence (moyenne ± ET) : 0,0155 $g \cdot g^{-1} d^{-1}$ ± 0,0030 et 0,0175 $g \cdot g^{-1} d^{-1}$ ± 0,0019, respectivement, ce qui indique que ce paramètre n'est pas sensible à la contamination en métaux. Étant donné que le taux d'ingestion est probablement plus élevé pour des jeunes poissons, nous avons choisi une valeur de 0,028 $g \cdot g^{-1} d^{-1}$ comme celle rapportée par Trudel et al. (2000) pour les perchaudes âgées d'un an et plus dans nos simulations.

Il y a eu peu d'études de laboratoire examinant l'efficacité d'assimilation du Cd chez les poissons. Liu et al. (2002) ont estimé que le poisson-zébre (*Danio reiro*) alimenté au zooplancton (*Daphnia magna*) assimilait de 3 à 8 % du Cd présent dans leur nourriture. Ces résultats étaient comparables à la valeur de 2,7 % estimée pour des capucettes (*Menidia menidia* et *Menidia beryllina*) nourries au zooplancton (Reinfelder et Fisher, 1994). Des EAs beaucoup plus élevées de 23 %, 14-33 % et 10-26 % ont été estimées pour des bars d'Amérique juvéniles (*Morone saxatilis*), des «glassy fish» (*Ambassis urotaenia*) et des périophthalmes (*Periophthalmus cantonensis*), respectivement, tous alimentés au zooplancton contaminé au Cd (Ni et al., 2000; Baines et Fisher, 2002). Étant donné que les perchaudes mangent principalement du zooplancton, nous avons supposé que l'efficacité d'assimilation du Cd serait comparable à celles déterminées précédemment en laboratoire, et avons donc choisi 10 % comme une première estimation d'EA.

En utilisant les six lacs dans lesquels nous avons mesuré des concentrations en Cd dans la nourriture (lacs Opasatica, Ollier, Bousquet, Vaudray, Osisko et Dufault), nous avons alors calculé des concentrations hépatiques en Cd à l'état stationnaire et les avons comparées aux concentrations mesurées. Les résultats (figure 4-7 a) ont montré une bonne concordance entre les concentrations prédites et celles mesurées pour les poissons des lacs contaminés, mais les valeurs prédites étaient toujours beaucoup inférieures aux concentrations mesurées chez les poissons des lacs de référence et des lacs modérément contaminés, avec des ratios

{$[Cd]_{F(és)}$ prédite / $[Cd]_{F(és)}$mesurée} ·100) de 6 % (Vaudray), de 30 % (Bousquet), de 35 % (Ollier) et de 16 % (Opasatica).

Les efficacités d'assimilation de Cd sont variables pour les poissons exposés à de basses concentrations en Cd dans la nourriture (Douben, 1989), et il est possible que la valeur d'EA choisie pour les perchaudes fût trop basse. Si nous augmentons l'EA à la valeur maximum observée pour des poissons se nourrissant de zooplancton (33 % ; Baines et Fisher, 2002), nous observons que bien qu'il y ait un meilleur accord entre les valeurs prédites et celle mesurées, les valeurs prévues sont toujours très inférieures à celle observées pour les poissons des lacs Bousquet, Vaudray, Ollier et Opasatica (figure 4-7 b)

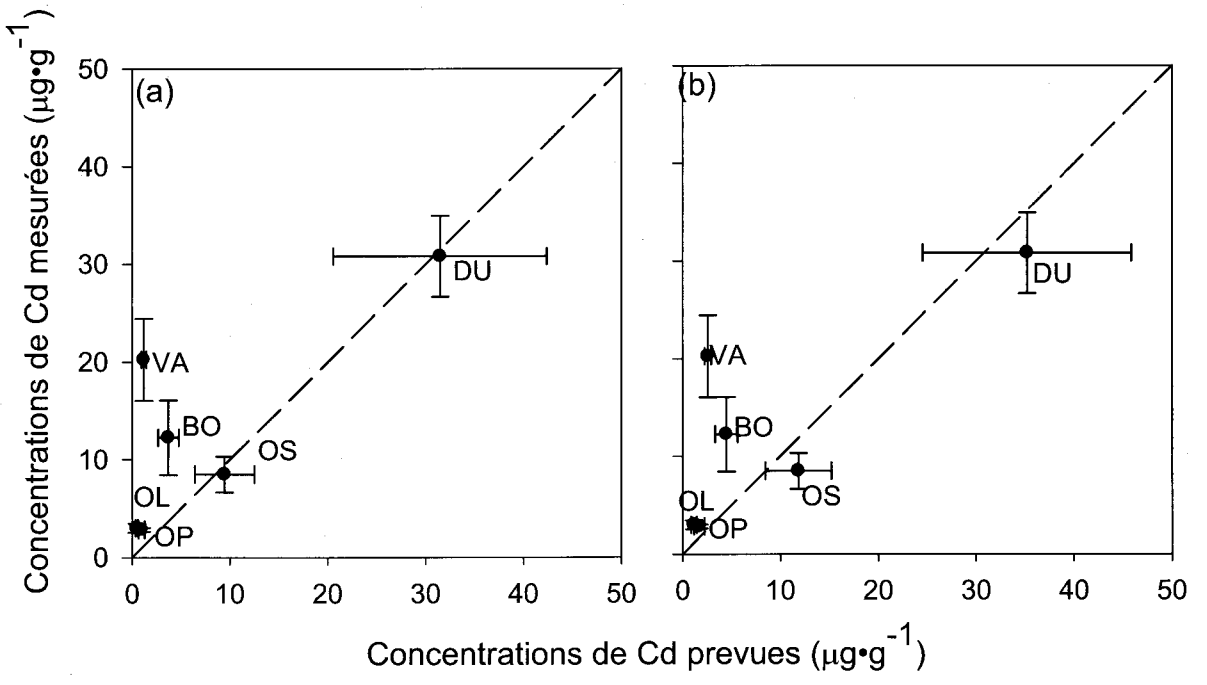


Figure 4-7: L'accord entre les concentrations en Cd mesurées et celles prédites dans le foie des perchaudes récoltées le long d'un gradient en concentrations métalliques, en fixant l'efficacité d'assimilation à 10 % (a) ou à 33 % (b). La ligne à tirets représente un rapport de 1:1.

À partir de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que le Cd de source alimentaire était plus important pour les perchaudes provenant de lacs avec des basses concentrations aqueuses en Cd^{2+}. Pour illustrer cette idée, nous avons utilisé le modèle pour prédire l'importance relative du Cd alimentaire et du Cd aqueux pour les perchaudes. Les résultats de la simulation en fonction de Cd^{2+} aqueux sont présentés dans la figure 4-8. Quand les concentrations aqueuses en Cd sont basses, la nourriture (les concentrations en Cd mesurées dans le zooplancton sont présentées au Chapitre 11, tableau 2) joue un rôle plus important comme source de Cd pour le foie. De plus, avec les résultats du modèle, nous voyons que lorsque les concentrations en Cd^{2+} augmentent, l'importance relative du Cd alimentaire diminue.

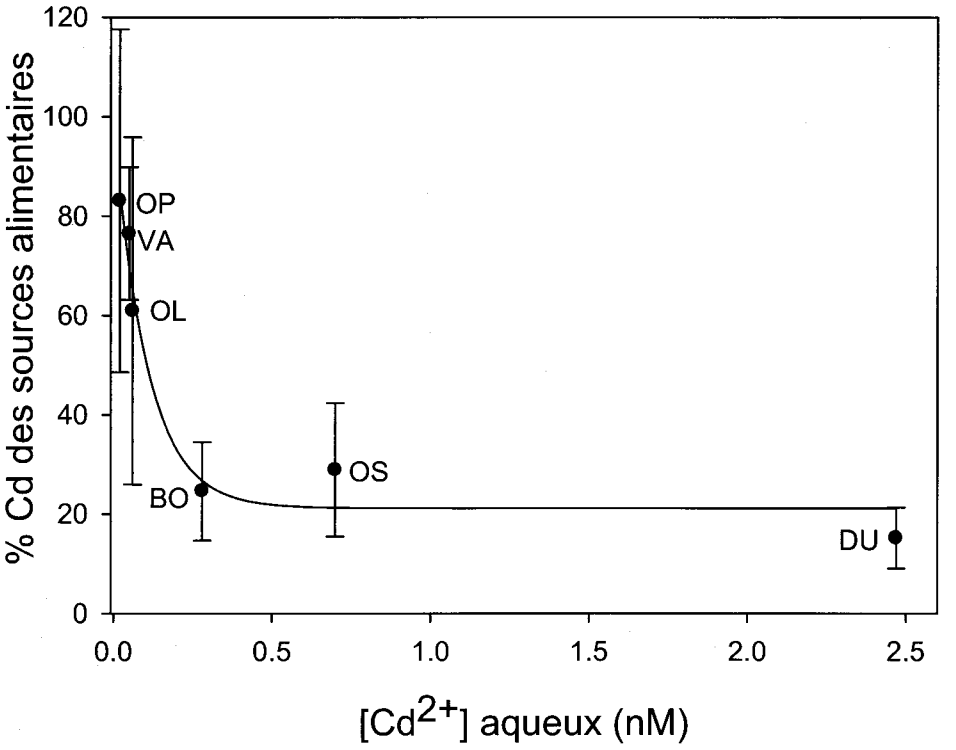


Figure 4-8: Prévisions du pourcentage de Cd provenant de sources alimentaires en fonction de la concentration en Cd^{2+} aqueux. La courbe représente une régression non linéaire ($r^2 = 0.96$, $p \leq 0.01$),

$y = 21+77e^{-9x}$

5. Discussion et intégration des résultats

Un des objectifs principaux de cette thèse était d'utiliser des études de transplantation pour mieux comprendre l'accumulation en métal et les stratégies de régulation des métaux chez les perchaudes. Parce que ces études visaient à comprendre les processus impliqués dans l'accumulation des métaux, elles contribuent collectivement à la base des données sur cette espèce de poisson et renforcent son potentiel comme biomoniteur de métaux. La discussion des résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de cette thèse est présentée dans les sections suivantes.

5.1 Accumulation en métal au niveau des organes

5.1.1 Dynamique de la prise en charge et de l'élimination des métaux au niveau des organes

Il y a trois stratégies principales qui peuvent être déployées par des poissons en réponse à des concentrations ambiantes élevées en métal, afin de prévenir la toxicité en métal : (1) empêcher ou réduire le taux de prise en charge du métal; (2) augmenter le taux d'élimination du métal; et (3) contrôler la biodisponibilité subcellulaire en métal. La capacité de la perchaude à utiliser les deux premières stratégies a été explorée en examinant des changements de concentrations en métal au niveau des organes pendant les études de transplantation, tandis que l'importance de la troisième stratégie a été examinée en suivant des changements d'accumulation en métal au niveau subcellulaire (discuté à la section 5.2).

En ce qui concerne la régulation de l'accumulation au niveau des organes, notre hypothèse était que le Cd, le Cu et le Zn se comporteraient différemment chez les poissons transplantés. Par exemple, étant donné que le Cd est un métal non essentiel, nous avons émis l'hypothèse que son accumulation ne serait pas sujette au même niveau de contrôle que celle

du Cu et du Zn, et donc nous avons prédit que les concentrations en Cd augmenteraient dans les organes pendant les expériences de prise en charge, et que son élimination serait lente pendant les expériences de transplantation vers le lac de référence (lac Opasatica). Alors que cette hypothèse était généralement vraie pour la dynamique de prise en charge du Cd dans tous les organes examinés (c.-à-d., les concentrations en Cd ont augmenté de façon significative pendant la période de transplantation), les concentrations en Cd dans les organes importants pour le stockage des métaux (ex., le foie et le rein) ont répondu tout à fait différemment des concentrations dans les organes importants pour l'échange des métaux avec l'environnement externe (ex., les branchies et le tractus gastro-intestinal) pendant les expériences d'élimination. Par exemple, les constantes pour l'élimination de Cd (k_e) étaient environ un ordre de grandeur plus élevées pour les branchies et le tractus gastro-intestinal ($0,024 \pm 0,016$ d^{-1} et $0,012 \pm 0,006$ d^{-1}, respectivement, pour ces deux organes) que pour le foie et le rein ($0,002 \pm 0,001$ d^{-1} et $0,003 \pm 0,002$ d^{-1}, respectivement, pour ces deux organes) (tableau 5-1). Ces différences dans les valeurs de k_e impliquaient une demi-vie plus courte pour le tractus gastro-intestinal et les branchies (37 j et 18 j, respectivement, pour chaque organe) que pour le foie (75 j) et le rein (52 j) (tableau 5-1). De façon générale, les résultats des deux études de transplantation montrent que les branchies et le tractus gastro-intestinal (organes importants pour l'échange en métal avec l'environnement externe) répondent relativement rapidement aux changements brusques des concentrations ambiantes en Cd. Par ailleurs, chez le foie et le rein (organes importants pour le stockage en métal) les taux d'échange de Cd sont beaucoup plus lents.

Contrairement à la situation avec le Cd, la dynamique de prise en charge et de perte de Zn est représentative d'un métal dont l'accumulation est fortement régulée par la perchaude. Les concentrations en Zn pendant les expériences de prise en charge (Chapitre 8,

figure 3) et pendant les expériences d'élimination (Chapitre 9, figure 6) ont montré peu de changement, quoique les concentrations en Zn^{2+} aient été approximativement 600 fois plus élevées dans le lac Dufault que dans le lac Opasatica (tableau 4-1). Cette observation de concentrations en Zn régulées dans les organes de la perchaude est conforme aux conclusions d'une étude spatiale passée (Giguère et al., 2004), où les concentrations en Zn dans le foie, le rein et le tractus gastro-intestinal n'ont pas répondu aux augmentations des concentrations ambiantes de Zn^{2+} chez les perchaudes juvéniles récoltées de lacs localisés le long d'un gradient de contamination en métal, également situés dans la région de Rouyn-Noranda. Dans la transplantation d'élimination, les branchies étaient le seul organe où une diminution des concentrations a semblait se produire. (Chapitre 9, figure 6 b). Cependant un examen de la teneur en Zn a indiqué que la quantité de ce métal a augmenté dans tous les organes, y compris les branchies, pendant l'expérience d'élimination. Puisque le Zn est un métal essentiel, la quantité de ce métal devrait augmenter avec la taille de l'organe. Avec ces données, nous pouvons seulement conclure qu'il n'y avait aucune perte nette en Zn au niveau des branchies, mais il y avait probablement une certaine perte initiale de ce métal suivant la transplantation des poissons au lac de référence.

Le Cu est également un métal essentiel, mais il semble être sous un contrôle homéostatique moins strict que le Zn. Utilisant le foie comme exemple, de façon similaire au Cd (métal non essentiel), les perchaudes ne pouvaient pas empêcher l'afflux du Cu dans le foie pendant la transplantation de prise en charge (Chapitre 8, figure 2). Cependant, contrairement au Cd, le Cu hépatique a été rapidement excrété du foie pendant l'expérience d'élimination. Une autre différence importante pourrait également être observée pendant les expériences d'élimination; alors que les concentrations en Cd diminuaient rapidement dans les branchies et

Tableau 5-1: Les constantes des taux d'élimination en métal et les demi-vies pour le Cd, le Cu et le Zn dans différents organes.

Métal	Organe	Constantes des taux d'élimination k_e (d^{-1})	Demi-vie ($t_{½}$, d)
Cd	Tractus gastro-intestinal	0,012 ± 0,006	37
	Branchies	0,024 ± 0,016	18
	Rein	0,003 ± 0,002	52
	Foie	0,002 ± 0,001	75
Cu	Foie	0,080 ± 0,063	8
	Tractus gastro-intestinal	0,189 ± 0,145	4
Zn	Branchies	0,043 ± 0,034	12

le tractus gastro-intestinal, les concentrations en Cu ont seulement diminué dans le tractus gastro-intestinal et le foie. La demi-vie du Cu labile dans le tractus gastro-intestinal était de 4 j, approximativement 9 fois plus courte que la demi-vie pour le Cd dans cet organe. De même, la demi-vie du Cu labile était approximativement 9 fois plus courte dans le foie que celle mesurée pour le Cd dans cet organe, illustrant le contraste entre la façon dont le foie contrôle les métaux essentiels (le Cu) et non essentiels (le Cd).

5.1.2 La variation saisonnière des concentrations en Cd et en Cu au niveau des organes

Des études précédentes sur le terrain ont soutenu l'utilisation de la perchaude comme biomoniteur de métaux, car ce poisson est largement retrouvé dans les environnements de

référence et ceux contaminés aux métaux, et les métaux accumulés (par exemple, Cd et Cu) sont en corrélation avec des expositions environnementales sur une base régionale (Giguère et al., 2004, 2005; Eastwood et Couture, 2002). Cependant, la variation saisonnière des métaux chez les perchaudes juvéniles n'a pas été examinée en profondeur (Eastwood et Couture, 2002). En accord avec l'étude précédente par Eastwood et Couture, effectuée dans la région de Sudbury, notre étude a également montré que les concentrations en métal dans le foie des perchaudes juvéniles ont changé significativement au cours de la saison de l'été (de mai en août), mais seulement chez les poissons avec les concentrations hépatiques les plus élevées en Cd (lacs Dufault et Vaudray) et en Cu (lacs Dufault et Osisko).

Ni les variations des métaux dans la nourriture ni les variations des concentrations de métaux dissous n'ont pu expliquer les variations des concentrations hépatiques en métal observées dans cette étude. Les concentrations en métal dans un organe donné seront influencées par les changements de poids occasionnés par la croissance, indépendamment des changements de la quantité de métal accumulé. Puisque les poissons dans les environnements de référence sont chroniquement exposés aux métaux ambiants, par la nourriture et par l'eau, la teneur des métaux dans un organe devra augmenter avec l'augmentation du poids de l'organe, si des changements aux taux d'afflux ou d'élimination ne se produisent pas. Par conséquent, dans ce scénario, afin que la concentration hépatique demeure relativement constante, le taux d'augmentation de la masse du foie pendant l'été devrait être proportionnel au taux d'augmentation de la teneur en métal.

L'examen séparé des changements de teneur en métal et de la croissance du foie suggère que la variation saisonnière des métaux chez les perchaudes des lacs Dufault et Osisko ait été liée à des anomalies entre la croissance du foie et l'augmentation de la teneur en métal (c.-à-d., la dilution de croissance) dans le cas du Cd, et à une incapacité des

poissons à maintenir le contrôle homéostatique dans le cas du Cu. Couture et Rajotte (2003) ont proposé que la perchaude soit incapable de contrôler homéostatiquement des concentrations hépatiques en Cu au-dessus d'un seuil de 50 $\mu g \cdot g^{-1}$. Nos résultats sont conformes à cette observation; les concentrations en Cu chez les perchaudes au-dessous du seuil de 50 $\mu g.g^{-1}$ (lacs Vaudray et Opasatica) n'ont varié que légèrement, tandis que les poissons au-dessus de ce seuil (lacs Dufault et Osisko) ont démontré une variabilité significative au niveau des concentrations hépatiques en Cu (Chapitre 11; figure 2) et en teneurs (Chapitre 11; figure 4).

Les concentrations en Cd ont également changé significativement chez les perchaudes du lac Vaudray, mais dans ce cas-ci les teneurs en Cd sont demeurées relativement constantes dans le milieu de l'été, et pendant ce temps la masse du foie a continué à augmenter (Chapitre 11; figure 3). Pendant cette constance en teneur hépatique de Cd chez des poissons du lac Vaudray, il y avait une augmentation significative des concentrations en Cd dans le zooplancton de ce lac. Le foie est influencé par le Cd alimentaire et aqueux (Chapitre 10; Kraemer et al., 2005a), où la contribution de la composante alimentaire est influencée par l'efficacité d'assimilation, le taux d'ingestion et les concentrations en Cd dans la nourriture. Étant donné que les poissons ont continué à se développer pendant l'été, suggérant qu'aucun changement dans le taux d'ingestion ne se soit produit, nous pouvons seulement spéculer que l'efficacité d'assimilation (du Cd, mais pas du C) a diminué dans le milieu de l'été lorsque les concentrations en Cd chez le zooplancton étaient les plus élevées. À l'appui de cette hypothèse, une étude précédente de Douben (1989) a noté que l'efficacité d'assimilation du Cd par les loches franches (*Noemacheilus barbatulus*) a diminué avec l'augmentation de la concentration en Cd dans la nourriture. Étant donné que les concentrations en Cd changent selon la taille du zooplancton (Croteau et al., 2003), et que les

communautés de zooplancton changent pendant la saison d'été, il est également possible que les concentrations en Cd mesurées chez le zooplancton récolté «en vrac» surestiment les concentrations en Cd chez le zooplancton sélectionné par les perchaudes.

5.1.3 Accumulation en cadmium de sources alimentaires et aqueuses

Afin de mieux comprendre, et éventuellement de prévoir l'accumulation dans un biomoniteur de métaux tel que la perchaude, nous devons comprendre l'importance relative de la nourriture et de l'eau ambiante comme sources de métal pour le biomoniteur. L'étude de manipulation de l'alimentation a été conçue pour évaluer l'hypothèse que le Cd alimentaire joue un rôle dans l'accumulation hépatique en Cd chez les perchaudes exposées aux concentrations en Cd réalistes dans l'environnement. Les résultats ont montré que le Cd aqueux et le Cd alimentaire étaient importants comme sources de Cd, selon l'organe étudié.

Les résultats pour des organes en contact avec l'environnement externe, les branchies et le tractus gastro-intestinal, montrent que ces deux organes accumulent le Cd de sources aqueuses. Puisque les branchies sont constamment irriguées par de l'eau pour la respiration et pour maintenir l'équilibre d'acide-base et la régulation ionique, les résultats pour cet organe n'étonnent pas. L'accumulation en Cd par les branchies se produit rapidement quand des poissons sont exposés à des niveaux aqueux élevés de ce métal (McGeer et al., 2000 ; DeSmet et al., 2001). En plus, Kraal et al. (1995) ont noté une augmentation semblable en Cd branchial en réponse au Cd aqueux, mais pas au Cd alimentaire, dans une étude précédente de laboratoire sur la carpe (*Cyprinus carpio*).

Bien que le Cd alimentaire ait eu une certaine influence sur des concentrations en Cd dans le tractus gastro-intestinal, l'influence beaucoup plus grande du Cd aqueux était inattendue; les poissons d'eau douce boivent peu d'eau et on pourrait normalement présumer

que l'accumulation d'un métal dans cet organe résulte de la prise en charge à partir de la nourriture. Cependant, le tractus gastro-intestinal peut également jouer un rôle dans la dépuration des métaux, et l'augmentation des concentrations en Cd dans cet organe observée chez les poissons exposés seulement au Cd aqueux pourrait refléter l'élimination par l'excrétion biliaire dans l'intestin, suivie d'une conservation du Cd excrété dans la couche muqueuse intestinale. Une autre possibilité est que le tractus intestinal peut simplement stocker le Cd accumulé par les branchies.

Comme dans le cas des branchies et du tractus gastro-intestinal, le rein a également été influencé par le Cd aqueux, tandis que le foie semblait recevoir le Cd par les deux voies d'exposition. La différence dans la façon dont ces deux organes de stockage accumulent le Cd est probablement liée à leurs rôles et à leur position physiologique dans les poissons. Par exemple, situé au niveau dorsal, le rein dans les poissons d'eau douce est alimenté par du sang artériel et veineux (Larsen et Perkins, 2001). Les poissons d'eau douce produisent une grande quantité d'urine, et un débit cardiaque élevé de sang oxygéné des branchies par le système artériel est exigé pour produire assez de pression dans les glomérules pour faire marcher le processus de filtration; cet écoulement élevé de sang expose le rein aux contaminants portés par les eaux qui ont été pris en charge par les branchies. Le foie, cependant, a un rôle à jouer dans l'homéostasie en traitant et en redistribuant les aliments pris en charge pendant la digestion. Ainsi, l'importance partagée des voies alimentaire et aqueuse pour le Cd hépatique est probablement liée à la situation unique du foie recevant non seulement du sang oxygéné de l'aorte dorsale par l'artère hépatique, mais également le drainage veineux de l'intestin par la veine portique hépatique (Hinton et al., 2001).

5.2 L'accumulation et l'élimination des métaux au niveau subcellulaire

Dans une étude précédente, Giguère (2003) a examiné des changements dans la distribution subcellulaire des métaux chez les perchaudes chroniquement exposées, récoltées à partir d'une série de lacs affectés par des métaux. L'objectif de cette section de la thèse est de compléter ces études précédentes en examinant les changements d'accumulation en métal au niveau subcellulaire temporellement (induits par des changements abrupts du régime d'exposition, ou de façon saisonnière), et aussi des changements de la distribution subcellulaire de Cd dans le foie des perchaudes exposées à ce métal par voies alimentaires ou aqueuses.

Dans un plus large contexte, les travaux subcellulaires dans cette thèse ont été conçus pour répondre à trois questions principales :

1. Comment le Cd, le Cu et le Zn sont-ils régulés au niveau subcellulaire en réponse aux changements abrupts au régime d'exposition au métal ?
2. Les changements temporels de la distribution subcellulaire des métaux, peuvent-ils être liés à la bioréactivité (c.-à-d., y a-t-il une certaine accumulation dans les fractions sensibles) ?
3. L'hypothèse de débordement s'applique-t-elle aux perchaudes transplantées ?

Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé une technique de centrifugation différentielle (Annexe, figure 13-1) pour séparer les diverses fractions subcellulaires dans les échantillons de foie. L'application de cette technique est relativement simple; cependant, il y a des artéfacts potentiels qui peuvent compliquer l'interprétation des données, tels que les organites qui brisent pendant l'étape d'homogénéisation, l'homogénéisation inachevée et le chevauchement parmi les fractions subcellulaires. En conséquent, les fractions obtenues par

cette méthode représentant les fractions sensibles (protéines dénaturées à la chaleur (HDP) et organites), la fraction détoxiquée (protéines stables à la chaleur (HSP), y compris la métallothionéine) et les débris cellulaires, sont clairement définies «opérationnellement». Malgré ces complications, l'approche nous permet de comparer les stratégies de traitement des métaux chez les perchaudes.

5.2.1 La régulation du Cd, du Cu et du Zn hépatiques au niveau subcellulaire

Comme le Cd est un métal non essentiel pour les poissons, son accumulation dans la cellule n'est liée à aucun rôle physiologique. En conséquence, les concentrations internes de ce métal doivent être contrôlées afin de minimiser ses chances de se lier à des molécules physiologiquement sensibles (par exemple des enzymes), ce qui mènerait en principe des effets délétères et à la toxicité (Mason et Jenkins, 1995). Dans le cas du Cd, des études précédentes chez les poissons ont montré qu'une protéine qui se lie au métal, la métallothionéine (la MT), est significativement corrélée avec le Cd bioaccumulé (Olsson et Haux, 1986; Hogstrand et al., 1991; Laflamme et al., 2000).

Une comparaison entre les concentrations de métallothionéine, déterminées indépendamment par l'analyse de saturation de mercure (Annexe A), et les concentrations de métaux accumulés dans la fraction de protéines stables à la chaleur, indique un rapport significatif et positif (([MT] = 1,4 (([Cd]/7 + [Cu]/12 + [Zn]/7) – 5,5; $r^2 = 0,84$, $P < 0,001$), suggérant que la MT soit la protéine «métal-liante» prédominante dans la fraction HSP. L'importance de la fraction HSP pour la liaison du Cd est soulignée dans l'étude de transplantation de prise en charge de métal où, après 70 j d'exposition dans le lac contaminé, les concentrations en Cd dans cette fraction étaient approximativement trois fois plus élevées que les concentrations dans les autres fractions (Chapitre 8, figure 5). De plus, seulement

20 % de la teneur cellulaire en Cd a été associé à la fraction HSP au jour 5, comparé à 50 % au jour 70. Tel que prévu, au début des expériences d'élimination de métal, les concentrations en Cd étaient également les plus élevées dans la fraction HSP, et ces concentrations n'ont pas changé significativement pendant l'expérience. Ces résultats, en combinaison avec l'accumulation de Cd observée au niveau des organes (voir la section 5.1.1), suggèrent que la perchaude ne peut pas empêcher la prise en charge du Cd ou augmenter le flux de sortie de ce métal; au contraire, elle contrôle la fraction biodisponible du Cd accumulé en le liant à la MT, ceci étant la stratégie employée par ce poisson pour prévenir/réduire la toxicité.

L'association du Zn avec la fraction HSP diffère nettement de celle observée pour le Cd. Alors que ~50 % de la teneur cellulaire en Cd est associé au HSP vers la fin de la transplantation de prise en charge, seulement 11 % du Zn cellulaire a été associé à cette fraction, indiquant que la MT ne lie pas de grandes proportions de Zn cellulaire. De plus, tel que mentionné dans la section 5.1.1, l'accumulation hépatique de Zn semble être fortement régulée; les concentrations au niveau d'organes entiers n'ont pas augmenté significativement pendant les transplantations de prise en charge, ni diminué significativement pendant les expériences d'élimination. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que le contrôle de l'afflux et/ou de l'élimination du Zn hépatique soit la méthode qu'emploient les perchaudes pour faire face aux augmentations brusques en Zn ambiant. Puisque le Zn ne s'accumule pas significativement dans les conditions expérimentales, le contrôle de la disponibilité biologique interne de ce métal, c'est à dire au niveau subcellulaire, n'est pas une stratégie nécessaire.

Les stratégies employées par la perchaude en réponse aux changements de concentrations ambiantes en Cu semblent combiner les deux stratégies différentes utilisées pour le Cd et le Zn. En effet, la régulation de l'accumulation nette de Cu (probablement par

une augmentation du taux d'élimination de ce métal, voir la section 5.1.1) et le contrôle de la disponibilité biologique subcellulaire du Cu sont deux moyens employés par le foie en réponse à des concentrations ambiantes élevées en Cu. Au niveau subcellulaire, pendant les expériences de prise en charge, les concentrations en Cu ont principalement augmenté dans la fraction HSP, et à la fin de l'expérience d'afflux la plus grande proportion de la teneur hépatique en Cu (~40 %) a été associée à cette fraction (Chapitre 8; figure 6). Ces résultats accentuent les différences dans la façon dont les cellules du foie répondent au Cu accumulé comparé au Zn (40 % de la teneur cellulaire du Cu lié au HSP comparé à 11 % pour le Zn), malgré la nature essentielle de ces deux métaux. La concentration plus élevée du Cu dans la fraction HSP comparé au Zn est probablement due à l'affinité plus forte de la MT pour le Cu (Stillman, 1995). On a observé une réponse semblable chez les truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) récoltées à partir des lacs de référence et des lacs contaminés de la région de la rivière Campbell en Colombie Britannique (Roch et al., 1982). Dans cette étude, le Cu et le Cd ont été retrouvés attachés à la MT, tandis que la majeure partie du Zn cellulaire a été trouvée non pas dans la fraction de la MT, mais plutôt dans la fraction de HMW («high molecular weight proteins» = enzymes) (Roch et al., 1982).

5.2.2 Bio-réactivité des métaux accumulés

En examinant la distribution subcellulaire des métaux, nous renforçons le lien entre l'évaluation de l'exposition et l'évaluation des effets, deux secteurs principaux dans l'évaluation des risques écologiques (ÉRÉ). À l'intérieur de la cellule, il est important de comprendre comment les métaux s'accumulent, en raison de l'importance de cette spéciation interne dans l'expression de la toxicité des métaux (Mason et Jenkins, 1995). Dans ce

contexte, nous avons examiné comment la distribution subcellulaire des métaux a changé temporellement :

1. après un changement brusque des concentrations ambiantes en métal (Chapitre 8);
2. en réponse à l'afflux en métal par des voies d'expositions différents : l'importance du Cd alimentaire et du Cd aqueux pendant 30 j (Chapitre 10);
3. en suivant les variations saisonnières du Cd et du Cu chez les perchaudes chroniquement exposées (Chapitre 11).

Lorsque des poissons ont été exposés à une augmentation brusque dans l'exposition aux métaux (des perchaudes du lac Opasatica transplantées au lac Dufault), la majeure partie de l'afflux du Cd et du Cu a apparemment été détoxiquée, étant donné que la fraction HSP lie la majorité de ces métaux dans la cellule. Cette détoxication semble cependant imparfaite : les concentrations en métal augmentaient dans la fraction des protéines dénaturées à la chaleur (les concentrations en Cd dans la fraction HDP étaient 6 fois plus élevées, les concentrations en Cu étaient 2 fois plus élevées au jour 70 qu'au jour 5) et dans les organites (les concentrations de Cd et de Cu étaient approximativement 3 fois plus élevées au jour 70 qu'au jour 5) (figures 4-2 et 4-3). En raison de la variabilité des données, les concentrations en Cd et en Cu dans ces fractions chez les poissons transplantés n'étaient pas significativement plus élevées que celles chez les poissons témoins (Chapitre 8; figures 5 et 6).

Chez les perchaudes mises en cage et exposées au Cd par les sources alimentaires et/ ou aqueuses, les concentrations en Cd ont augmenté considérablement dans la fraction HSP, chez tous les poissons recevant le Cd, indépendamment de la source d'exposition (Chapitre 10). Dans la fraction des protéines dénaturées à la chaleur, les concentrations en Cd avaient augmenté approximativement 3 fois après 30 j chez les poissons recevant du Cd aqueux (seul

ou avec du Cd alimentaire). Par contre, les concentrations en Cd dans la fraction HDP sont demeurées basses et relativement constantes chez les poissons recevant le Cd de source alimentaire seulement (figure 4-4). Ces résultats indiquent que la métallothionéine est induite en réponse à l'exposition de Cd, indépendamment de la voie d'exposition. Lorsque des poissons étaient exposés au Cd aqueux (seul ou avec du Cd alimentaire), l'accumulation hépatique du Cd total était beaucoup plus élevée que celle suite à l'exposition par la nourriture seulement, et la détoxication en métal était moins efficace, c.-à-d., au niveau subcellulaire il y avait accumulation appréciable dans les fractions sensibles, telle que la fraction HDP.

Pour complémenter directement l'étude spatiale précédente menée par Giguère (2003), nous étions intéressés à voir si la distribution subcellulaire des métaux changeait significativement pendant la période de l'été (de mai en août). Notre hypothèse était que chez les poissons avec des concentrations hépatiques plus élevées en métal, il serait plus difficile pour ces poissons de réguler la façon dont les métaux s'accumulent au niveau subcellulaire, et donc nous avons supposé que les concentrations subcellulaires seraient plus élevées et plus variables chez les poissons provenant des lacs contaminés. Bien que la majeure partie de la teneur cellulaire en Cd et en Cu soit associée à la fraction HSP chez les poissons avec des concentrations hépatiques élevées en métal, les concentrations en Cu et en Cd dans la fraction HDP et dans les organites étaient en effet non seulement plus élevées que les concentrations dans les poissons de référence, mais elles ont également varié significativement pendant l'été. Ces résultats suggèrent que lorsque les concentrations hépatiques en métal sont élevées, il devient plus difficile pour les poissons de contrôler la spéciation intracellulaire du Cd et du Cu. Couture et Rajotte (2003) ont proposé que la perchaude ne puisse pas exercer un contrôle homéostatique efficace sur les concentrations

hépatiques en Cu au-dessus d'un seuil hépatique de 50 $\mu g \cdot g^{-1}$ total. Nos résultats subcellulaires sont conformes à cette observation; au-dessous de ce seuil de Cu à 50 $\mu g \cdot g^{-1}$ (lacs Vaudray et Opasatica), les concentrations en Cu dans les fractions sensibles aux métaux de la perchaude étaient basses et ne variaient que légèrement, tandis que les poissons au-dessus de ce seuil (lacs Dufault et Osisko) ont montré des concentrations plus élevées et plus variables en Cu dans les fractions sensibles au métal. Une autre observation intrigante est que les concentrations en Cd ont diminué significativement dans la fraction HDP et dans les organites pendant l'été chez les perchaudes dans le lac de référence (lac Opasatica), suggérant possiblement que la capacité d'induire la synthèse de la métallothionéine et ainsi de détoxiquer les métaux s'améliore pendant que les perchaudes des environnements de référence se développent. La production accrue de métallothionéine pourrait agir pour «sauver» ces fractions sensibles au métal de l'accumulation de Cd et réduire la quantité de Cd qui s'accumule sur les composantes cellulaires physiologiquement sensibles, réduisant la toxicité.[1]

5.2.3 L'hypothèse de débordement cellulaire

L'hypothèse de débordement cellulaire prévoit que la détoxication d'un métal est efficace à de bas niveaux d'exposition, et que les composantes cellulaires sensibles au métal sont donc protégées contre l'accumulation (figure 1-2; Introduction). Au-dessus d'une concentration seuil d'exposition, la capacité de liaison des ligands responsables de la détoxication en métal (par exemple, la métallothionéine) est comble et les métaux débordent sur les fractions sensibles au métal telles que les organites et les enzymes (Mason et Jenkins,

---

[1] En anglais on parlerait d'une "rescue function" (Roesijadi et Robinson, 1994).

1995). En utilisant une technique de centrifugation différentielle semblable à celle employée ici, Giguère (2003) a examiné la distribution subcellulaire de quatre métaux (Cd, Cu, Ni, Zn) chez les perchaudes indigènes récoltées dans des lacs localisés le long d'un gradient de concentrations en métaux (figure 1-3; Introduction). Chez ces poissons, les concentrations en Cd ont augmenté dans toutes les fractions subcellulaires en fonction du Cd hépatique total, menant à la conclusion que la détoxication dans ces poissons est imparfaite, même à de basses concentrations en Cd.

En ce qui concerne la fraction des protéines dénaturées à la chaleur (c.-à-d. une fraction sensible aux métaux non-essentiels), on a observé une distinction importante entre cette dernière étude sur les perchaudes chroniquement exposées et l'étude actuelle où les perchaudes d'un lac de référence ont été transplantées dans un lac contaminé. Les concentrations en cadmium dans cette fraction du foie chez des poissons transplantés sont restées relativement constantes (de 1,5 à 2,0 $\mu g \cdot g^{-1}$) pendant les 30 premiers jours de transplantation, après quoi (au-dessus d'un seuil hépatique total de Cd de 10 à 15 $\mu g \cdot g^{-1}$) les concentrations ont commencé à augmenter dans cette fraction (figure 5-1 a). Il est intéressant de noter que ce décalage temporel n'est pas apparu dans le cas des organites (aussi une fraction potentiellement sensible au métal), où les concentrations ont augmenté en fonction du Cd hépatique total, sans évidence d'un seuil (figure 5-1 b). Pour le cuivre, de façon similaire aux résultats spatiaux précédents (Giguère, 2003), il n'y avait aucun seuil au-dessous duquel des fractions sensibles au métal ont été protégées contre l'accumulation en Cu (c.-à-d., concentrations en Cu accrues dans les fractions sensibles au métal avec augmentation du Cu hépatique), probablement un reflet du caractère essentiel de ce métal.

On a observé des résultats semblables dans l'expérience de la manipulation de la nourriture (figure 5-2), où les perchaudes ont été exposées au Cd provenant de sources

aqueuses et/ou alimentaires pendant 30 j. Ici nous voyons qu'à de basses concentrations hépatiques totales en Cd, les concentrations dans la fraction HDP étaient également basses et relativement stables (de 1 à 2 $\mu g \cdot g^{-1}$). Au-dessus d'un seuil hépatique total de Cd (~10 $\mu g \cdot g^{-1}$), semblable au seuil observé dans les expériences de prise en charge du Cd, les concentrations en Cd ont augmenté dans la fraction HDP. Les autres fractions subcellulaires répondaient de la même manière que dans l'expérience de prise en charge car les concentrations ont augmenté en fonction du Cd hépatique total, et aucun seuil n'a été observé.

Il est intéressant de noter que différemment de ce qui est présumé par le modèle de débordement, il n'y eut aucune saturation observée dans la capacité de liaison des ligands responsables de la détoxication du (la fraction des protéines stables à la chaleur); c'est-à-dire, on n'a observé aucun plateau dans l'accumulation de Cd dans cette fraction pendant les études de transplantation. Ces résultats sont conformes au modèle de détoxication décrit par Campbell et al. (2005), où les concentrations en Cd dans la fraction de métallothionéine (la fraction HSP) ne montraient pas de plateau, mais plutôt augmentaient progressivement à mesure que la concentration de métal hépatique total augmentait. Pour expliquer cette absence

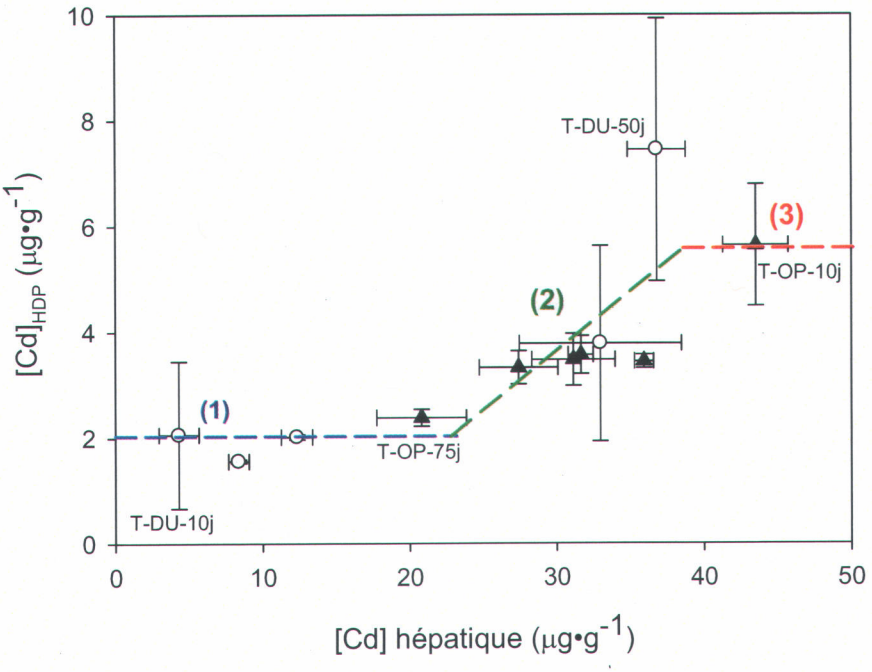


Figure 5-3: Concentrations en Cd dans la fraction HDP chez les perchaudes provenant du lac Opasatica et transplantées au lac Dufault pour examiner la dynamique de prise en charge (T-DU ; cercles ouverts) et les perchaudes provenant du lac Dufault et transplantées au lac Opasatica examinant la dynamique de l'élimination (T-OP; triangles pleines). Les expériences de prise en charge ont été effectuées pendant 70 j (Chapitre 8), et donc les bas niveaux hépatiques se sont produits tôt dans l'étude (c.-à-d., jour 10 ; T-DU-10j), et les concentrations hépatiques élevées se sont produites plus tard dans l'étude (c.-à-d., jour 50 ; T-DU-50j). La situation a été renversée pour les expériences d'élimination (Chapitre 9); les concentrations hépatiques totales élevées en Cd se sont produites tôt dans l'étude (c.-à-d., jour 10 ; T-OP-10j) et les basses concentrations se sont produites plus tard dans l'étude (c.-à-d., jour 75 ; T-OP-75j). Des changements de concentrations en Cd dans la fraction HDP peuvent être divisés en 3 phases : (1) basses concentrations reflétant des perchaudes du lac Opasatica ; (2) concentrations en Cd intermédiaires entre le lac Opasatica et le lac Dufault ; et (3) concentrations élevées de Cd dans la fraction HDP des perchaudes du lac Dufault.

de plateau dans les concentrations de métallothionéine, couplée néanmoins avec du Cd lié aux fractions sensibles au métal, Campbell et al. (2005) ont proposé que chez les animaux chroniquement exposés aux métaux il y ait un compromis («trade-off») effectué entre le «coût» de détoxication, et le «coût» de permettre à une certaine proportion du métal non-essentiel de déborder dans les fractions potentiellement sensibles au métal. Ce compromis peut être une caractéristique acquise chez les animaux adaptés (c.-à-d., génétiquement) ou entièrement acclimatés.

Tôt dans la période de transplantation (expérience d'accumulation), quand les concentrations hépatiques en Cd étaient relativement basses (4 à 12 $\mu g \cdot g^{-1}$), la capacité de la MT de protéger la fraction HDP contre davantage d'accumulation de Cd était efficace, et donc le faible coût physiologique de l'accumulation de Cd sur cette fraction sensible était donc essentiellement identique à ce que les poissons éprouveraient dans le lac de référence. Cependant, quand les concentrations hépatiques en Cd ont augmenté encore plus, la fraction HDP n'a pas été complètement protégée contre l'accumulation, malgré l'induction de la MT; la détoxication du Cd était imparfaite. De plus, lorsque les résultats des expériences de prise en charge et d'élimination sont combinés, nous voyons qu'il y a essentiellement 3 phases (figure 5-3) : (1) basses concentrations en Cd dans la fraction HDP, où la MT peut protéger cette fraction contre l'accumulation, malgré des concentrations hépatiques appréciables en Cd ; (2) les concentrations hépatiques sont si élevées que la MT ne peut pas efficacement protéger la fraction HDP, et l'accumulation dans cette fraction commence à se produire; et (3) concentrations élevées en Cd dans la fraction HDP, comme dans les perchaudes du lac Dufault.

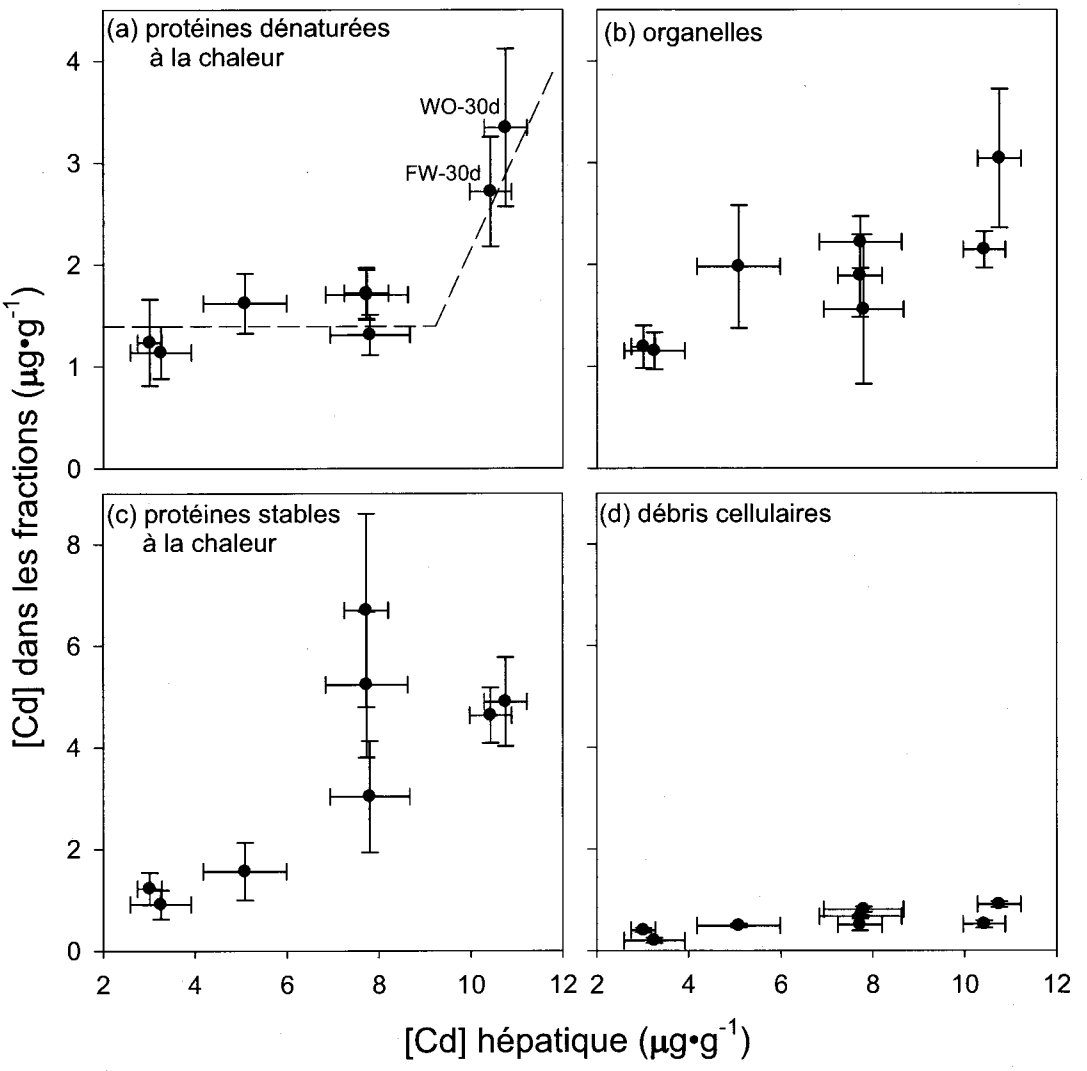


Figure 5-2: Les concentrations en cadmium dans (a) les fractions de protéines dénaturées à la chaleur (HDP), (b) les organites, (c) les protéines stables à la chaleur (HSP) et (d) les débris cellulaires en fonction de la concentration hépatique totale en Cd pendant l'étude de l'importance relative du Cd aqueux et du Cd alimentaire comme sources de ce métal pour les perchaudes (Chapitre 10). Dans le panneau (a), WO-30d et FW-30d représentent des concentrations en Cd dans le HDP après une exposition de 30 j au Cd aqueux seulement (WO) et au Cd alimentaire + aqueux (FW). La ligne à tirets dans le panneau A représente la forme hypothétique «bâton de hockey» du modèle de débordement cellulaire.

Les études sur l'accumulation en métal chez les bivalves d'eau douce (*Pyganodon grandis*) montrent quelques similitudes avec les résultats pour la perchaude, bien qu'une différence importante existe dans la façon dont les bivalves indigènes accumulent des métaux tels que le Cd. Par exemple, alors que la détoxication est inachevée chez la perchaude, la détoxication semble être raisonnablement efficace chez la bivalve dans la mesure où les concentrations de la fraction HDP n'augmentaient pas le long du gradient d'exposition en métal (Campbell et al., 2005). Cependant, de façon similaire à la perchaude, il y avait évidence que le Cd se liait aux fractions sensibles au métal chez les bivalves transplantées (Couillard et al., 1995b). Dans l'étude de Couillard et al. (1995b), des bivalves ont été transplantées d'un lac de référence (lac Opasatica) à un lac contaminé aux métaux (lac Vaudray). Après 90 j d'exposition à des concentrations en métal élevées, la MT était le ligand cellulaire le plus important pour le Cd, mais après 400 j, la plus grande partie du Cd cellulaire a été retrouvée associée à la fraction LMW («low molecular weight», incluant des enzymes), suggérant que le mécanisme de détoxication du métal a cessé de fonctionner adéquatement entre 90 et 400 j, donnant lieu au débordement de Cd vers cette fraction LMW potentiellement sensible au métal.

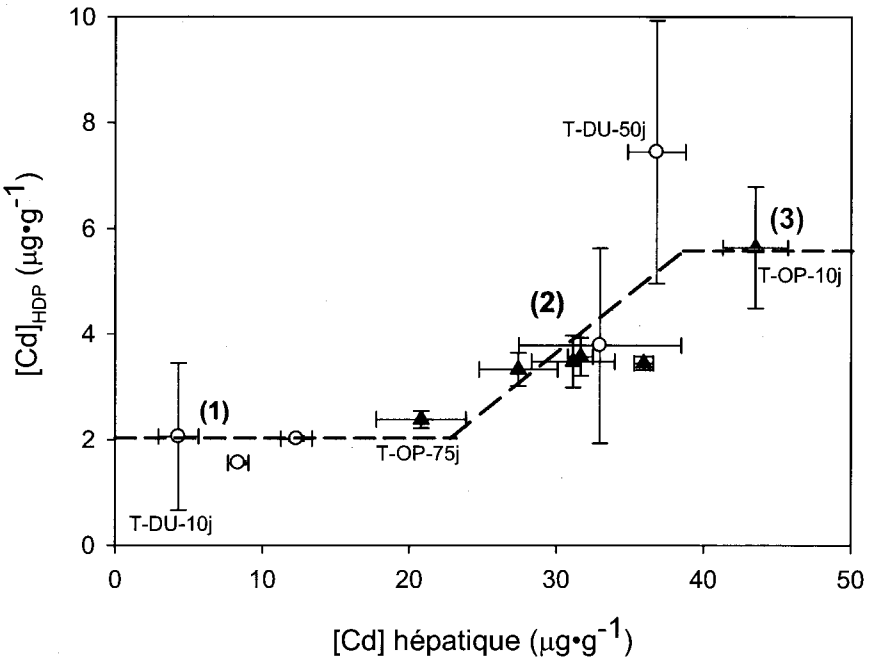


Figure 5-3: Concentrations en Cd dans la fraction HDP chez les perchaudes provenant du lac Opasatica et transplantées au lac Dufault pour examiner la dynamique de prise en charge (T-DU ; cercles ouverts) et les perchaudes provenant du lac Dufault et transplantées au lac Opasatica examinant la dynamique de l'élimination (T-OP; triangles pleines). Les expériences de prise en charge ont été effectuées pendant 70 j (Chapitre 8), et donc les bas niveaux hépatiques se sont produits tôt dans l'étude (c.-à-d., jour 10 ; T-DU-10j), et les concentrations hépatiques élevées se sont produites plus tard dans l'étude (c.-à-d., jour 50 ; T-DU-50j). La situation a été renversée pour les expériences d'élimination (Chapitre 9); les concentrations hépatiques totales élevées en Cd se sont produites tôt dans l'étude (c.-à-d., jour 10 ; T-OP-10j) et les basses concentrations se sont produites plus tard dans l'étude (c.-à-d., jour 75 ; T-OP-75j). Des changements de concentrations en Cd dans la fraction HDP peuvent être divisés en 3 phases : (1) basses concentrations reflétant des perchaudes du lac Opasatica ; (2) concentrations en Cd intermédiaires entre le lac Opasatica et le lac Dufault ; et (3) concentrations élevées de Cd dans la fraction HDP des perchaudes du lac Dufault.

5.3 Croissance

Bien que la croissance des perchaudes juvéniles indigènes soit comparable dans les lacs Opasatica et Dufault pendant la saison estivale (figure 4-1), une observation intéressante est apparue lorsque nous avons comparé la croissance des poissons mis en cage; les poissons se sont développés différemment selon l'expérience. Les seuls poissons mis en cage qui ont agrandi significativement pendant la période de transplantation étaient des poissons récoltés du lac Dufault et transplantés au lac Opasatica. Étant donné que la croissance de poissons est liée aux facteurs bioénergétiques (par exemple, efficacité de conversion) et aussi au statut endocrinien (par exemple, les niveaux d'hormones thyroïdiennes et de cortisol), nous nous sommes référés aux études précédentes examinant ces aspects chez les perchaudes de la région de Rouyn-Noranda (tableau 5-2). Nous voyons que le statut endocrinien des perchaudes âgées 0+ n'est pas affecté par l'exposition au métal, tandis qu'au bout d'un an il y a de l'évidence pour un affaiblissement au niveau du cortisol. Le cortisol est lié au métabolisme, à l'osmorégulation et à la reproduction (Laurent et Perry, 1990; Van Der Boon et al., 1991; Pankhurst et Van Der Kraak, 2000). De plus, cette hormone est importante chez les poissons, les aidant à faire face au stress aigu tel que le stress de manipulation, parce que le cortisol joue un rôle dans la régulation du glucose, au niveau du maintien de la concentration constante de glucose dans le sang pendant les périodes de stress aigu (Vijayan et al., 1996). Par conséquent, dans l'étude de transplantation, on pourrait prévoir que les perchaudes du lac Dufault répondent moins bien au stress de la capture et de mise en cage que les poissons du lac Opasatica, et par conséquent la croissance pourrait être réduite chez ces poissons. Cependant, ce n'est pas ce qui a été observé, car essentiellement aucune croissance n'a été observée dans les perchaudes du lac Opasatica mises en cage.

Des études précédentes sur des perchaudes adultes ont montré que des processus bioénergétiques sont affectés par la contamination en métal. Notamment, une étude précédente par Sherwood et al. (2000) a montré que l'efficacité de conversion de la nourriture à la croissance chez les perchaudes adultes a été réduite dans les lacs contaminés (y compris le lac Dufault). Donc, la croissance significative observée chez les perchaudes transplantées du lac Dufault au lac Opasatica pourrait représenter le rétablissement dans la façon dont ces poissons provenant d'un lac contaminé convertissent la nourriture en croissance, une fois placés dans un lac de référence; cependant, ceci n'explique pas pourquoi les perchaudes en cage du lac Opasatica dans ce même lac ne se sont pas développées à un taux comparable puisque ces poissons ont essentiellement été tenus dans les mêmes conditions.

Beaucoup de poissons grandissent plus après des périodes de privation totale ou partielle de nourriture que pendant des périodes d'alimentation constante (Ali et al., 2003). Ce phénomène se nomme «croissance compensatoire». Plusieurs facteurs contribuent au phénomène compensatoire, y compris un plus haut taux de consommation de nourriture que des poissons contrôles, une efficacité de croissance augmentée, des coûts métaboliques réduits et une dépense réduite pour la locomotion. La surcompensation se produit quand les poissons dans la période de récupération se développent plus rapidement que les poissons témoins (c.-à-d., des poissons non exposés à la privation préalable de la nourriture) (figure 5-4). De façon alternative, quelques poissons montrent une pleine compensation; après une certaine période, la croissance des poissons soumis à la privation de nourriture rattrape celle des poissons témoins. Aucune compensation ou une compensation partielle de croissance peut également se produire. Des concepts de ce modèle ont été adaptés pour formuler une hypothèse quant à la raison pour laquelle seulement les poissons du lac Dufault transplantés au lac Opasatica ont agrandi significativement pendant l'expérience (figure 5-4 b). Ici le

stress appliqué n'était pas la privation de nourriture, mais plutôt le stress de manipulation lié à la capture et au transport. Ces types des stress ont été liés aux effets négatifs de la croissance des poissons (par exemple, chez le saumon atlantique juvénile (*Salmo salar*); McCormick et al., 1998). Après une période de récupération (10 à 20 j), la masse des poissons transplantés au lac Opasatica a commencé à augmenter, alors que la masse des poissons mis en cage (contrôles) dans le lac Dufault restait la même (figure 4-1). L'hypothèse est que la croissance compensatoire se produisait chez les perchaudes transplantées au lac Opasatica en raison de la disponibilité accrue de la nourriture et la plus grande diversité des proies dans ce lac de référence comparée au lac Dufault (Kovecses et al., 2005). La transplantation des perchaudes du lac Dufault au lac Opasatica est la seule direction dans laquelle des poissons mis en cage ont été exposés à une augmentation brusque de la biomasse de nourriture (analogue à l'alimentation pendant les périodes suivant la privation de nourriture partielle, tel que présenté dans le modèle compensatoire de croissance); c'est donc la seule situation où la croissance compensatoire s'est produite.

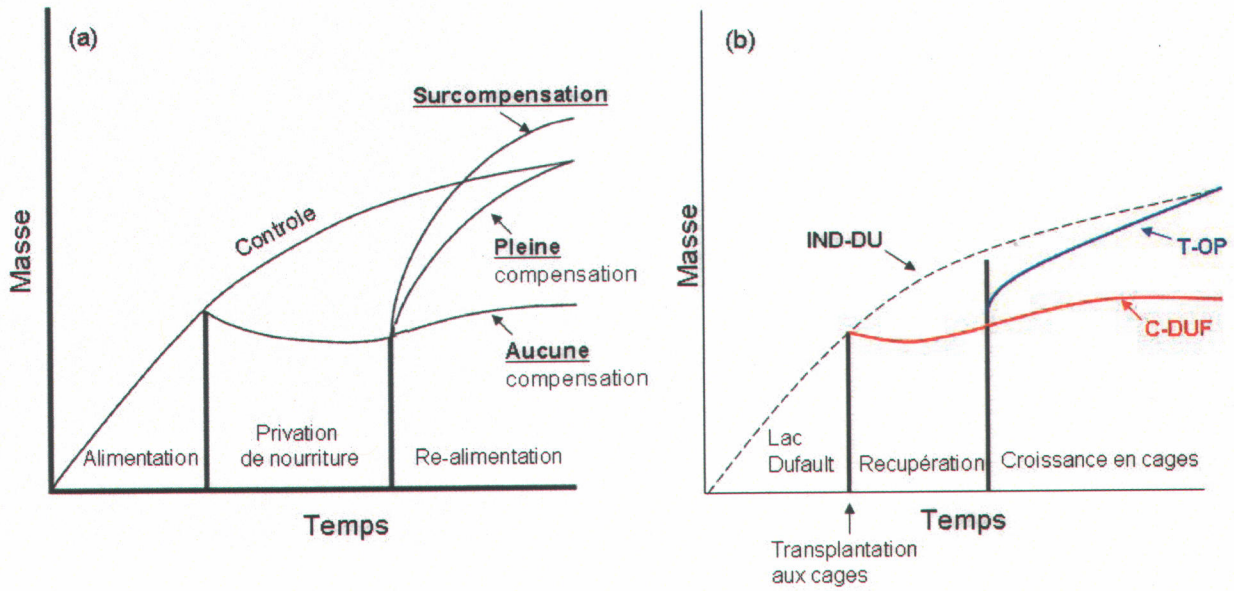


Figure 5-4: Modèles représentant la croissance compensatoire des poissons. Panneau (a) : croissance après des périodes de famine, schéma adapté d'Ali et al. (2003). Panneau (b) : modèle adapté pour la transplantation des perchaudes du lac Dufault au lac Opasatica (ligne bleu; T-OP) et du Lac Dufault au Lac Dufault représentant des témoins (ligne rouge, C-DUF)

Tableau 5-2 : Sommaire des effets observés chez de jeunes perchaudes de l'année (âgés 0+), des juvéniles (âgés 1+) et des adultes (âgés 4+) de la région de Rouyn-Noranda.

Facteur	Jeunes de l'année (âgé 0+)	Juvéniles (âgé 1+)	Adultes (âgé 4+)
Sécrétion de cortisol suivant un test de stress normalisé	Aucun effet d'exposition au métal sur la sécrétion de cortisol (Gravel et al., 2005)	Affaiblissement de la réponse de cortisol observée chez les poissons des environnements contaminés en métaux (Gravel et al., 2005)	Affaiblissement de la réponse de cortisol observée chez les poissons des environnements contaminés en métaux (Brodeur et al., 1997)
Niveaux d'hormones thyroïdiennes	Aucun effet d'exposition aux métaux sur les concentrations thyroïdiennes (Gravel et al., 2005)	Aucun effet d'exposition aux métaux sur les concentrations thyroïdiennes (Gravel et al., 2005)	Concentrations thyroïdiennes réduites observées chez les perchaudes d'environnements contaminés (Levesque et al., 2003)
Facteur de condition	Aucun effet de l'exposition aux métaux sur le facteur de condition (Gravel et al., 2005)	Aucun effet de l'exposition aux métaux sur le facteur de condition (Gravel et al., 2005)	Facteur de condition inférieur chez les perchaudes des lacs contaminés (Laflamme et al., 2000)
Métabolisme de glycogène suivant un essai de stress normalisé	Analyses non effectuées sur cette taille de poissons.	Incapacité des poissons à mobiliser des réserves de glycogène chez les perchaudes des lacs contaminés (Gravel et al., 2005)	Incapacité des poissons à mobiliser des réserves de glycogène chez les perchaudes des lacs contaminés (Levesque et al., 2002)
Efficacité de conversion (définie comme pourcentage de nourriture consommée assignée pour la croissance)	Non évalué	Non évalué	Conversion de la nourriture à la croissance réduite observée chez les perchaudes des lacs contaminés (Sherwood et al., 2000)

5.4 Le modèle de bioaccumulation

Le modèle du ligand biotique (BLM) et les modèles biodynamiques, tels que le modèle développé dans cette thèse, sont deux approches fondamentalement différentes qui sont généralement retrouvées dans la littérature d'aujourd'hui (Niyogi et Wood, 2004; Luoma et Rainbow, 2005). Le BLM suppose que la complexation des métaux par des ligands dans l'environnement externe se produise assez rapidement pour que les modèles d'équilibre chimique puissent être employés pour estimer cette spéciation en métal dans les eaux naturelles, et que cette spéciation puisse ensuite être utilisée pour prédire l'accumulation au niveau du ligand biotique. L'approche cinétique bioénergétique est basée sur des paramètres tels que des taux d'échange de métaux (ex., k_u et k_e) pour expliquer la bioaccumulation du métal. Puisque la plupart des métaux cationiques traversent les membranes biologiques par des transporteurs protéiques, c'est-à-dire, par prise en charge facilitée, on peut penser que les taux de prise en charge peuvent suivre la cinétique de Michaelis-Menten où la prise en charge en métal varie en fonction de la concentration d'exposition, i.e. un processus saturable (non linéaire) (figure 5-5).

Avec l'augmentation des concentrations ambiantes en métal, on pourrait aussi s'attendre à voir une diminution de la constante spécifique de taux de prise en charge (k_u) (figure 5-5). Dans les environnements normaux, toutefois, il est peu probable que des conditions d'exposition au métal atteignent des concentrations si élevées. Puisque les études de laboratoire emploient typiquement des concentrations élevées en métaux pour examiner la dynamique de prise en

Tableau 5-3: Une comparaison des constantes de taux de prise en charge (k_u) pour différentes espèces des poissons exposés à différentes concentrations en Cd.

Espèce de poisson	**Concentration**	**k_u ($L \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$)**	**Référence**
Perchaude (*Perca flavescens*)	5,5 nM Cd totale 2,5 nM Cd^{2+}	1,8	Cette thèse, Chapitre 12
Truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)	32 or 57 nM	0,01	Giles, 1988
Carpe (*Cyprinus carpio*)	500 or 2500 nM	0,1	De Smet et al., 2001
Carpe (*Cyprinus carpio*)	4000 nM	0,003	De Conto Cinier et al. 1997

charge du métal, au niveau d'organes cibles comme le foie, nous avons voulu comparer la valeur de k_u estimée pour le Cd dans ces études avec la valeur de k_u estimée pour les perchaudes transplantées au lac Dufault.

De toute évidence, nos valeurs de k_u pour le foie des perchaudes sont considérablement plus élevées (10-1000x) que celles observées pour cet organe chez d'autres espèces de poissons. Il est important de noter, cependant, que nous avons estimé les valeurs de k_u dans ces études précédentes en prenant la concentration totale en Cd aqueux rapportée dans ces articles, et non la concentration de l'ion libre Cd^{2+} comme utilisé dans notre étude. Néanmoins, en comparant les concentrations totales en Cd aqueux, nous voyons que les concentrations étaient de 6 à 700 fois plus élevées dans les études de laboratoire que celles

observées dans le lac le plus contaminé en Cd dans notre région d'étude. Par conséquent, il semble raisonnable de spéculer que les concentrations en Cd dans les environnements naturels sont probablement suffisamment faibles que le taux de prise en charge n'est pas près du point de saturation et par conséquent la constante apparente de prise en charge, k_u, est relativement élevée (voir la boîte rouge, figure 5-5).

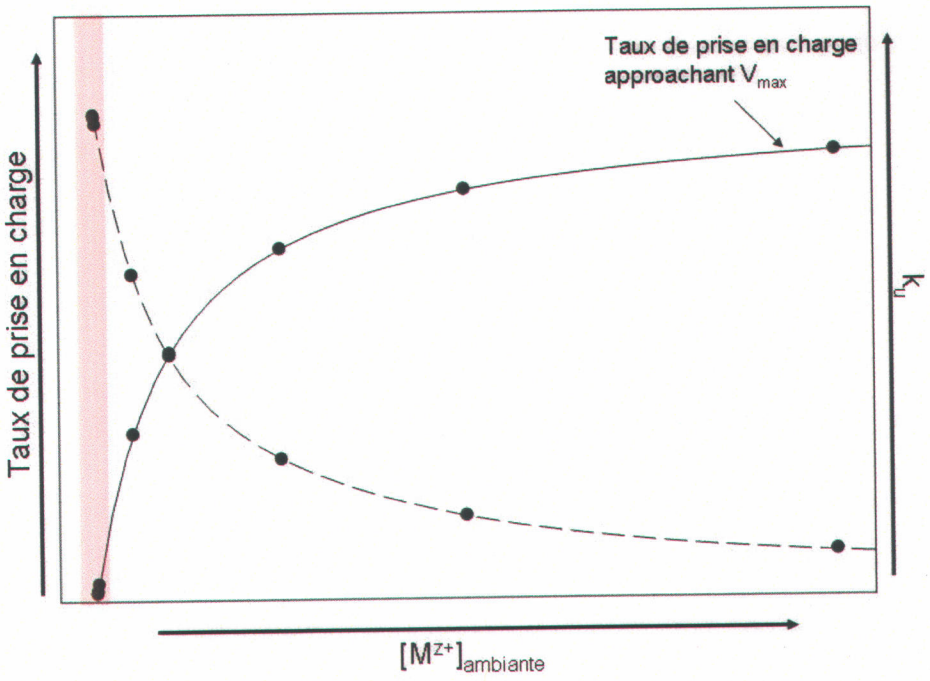


Figure 5-5: Une représentation schématique de la façon dont le taux de prise en charge en métal (courbe pleine), et la constante apparente de prise en métal (k_u; courbe en pointillé), changent avec des concentrations ambiantes en métal. À des niveaux de métal très élevés, le taux de prise en charge devient saturé et approche V_{max}. De même, la valeur du k_u diminue avec l'augmentation des concentrations en métal. La boîte rouge représente des concentrations en métal possiblement retrouvées dans l'environnement.

Le modèle biodynamique est de valeur ici, car il tient compte des métaux provenant des sources alimentaires et aqueuses. En développant un modèle pour l'accumulation

hépatique du Cd dans les perchaudes, et ensuite en faisant l'essai du modèle sur les perchaudes vivant dans une série de lacs affectés par des métaux, nous avons montré qu'en tenant compte seulement des concentrations aqueuses de Cd^{2+}, les concentrations hépatiques en Cd prédites par le modèle étaient relativement précises pour des poissons vivant dans les lacs avec des concentrations en Cd^{2+} aqueux les plus élevées. Cependant, les prévisions basées uniquement sur des concentrations aqueuses en Cd^{2+} étaient moins bonnes pour le foie des perchaudes provenant de lacs ayant de basses concentrations de Cd^{2+}, en partie parce que l'importance relative du Cd alimentaire a augmenté avec la diminution du Cd^{2+} aqueux.

L'incapacité du modèle à prédire exactement les concentrations en Cd dans les poissons des lacs de référence ou des lacs modérément contaminés est illustrée par nos tentatives de modéliser les concentrations en Cd dans les foies des perchaudes du lac Vaudray, où il y avait un très mauvais accord entre les valeurs prédites et celles mesurées. Nous avons réalisé une série d'analyses de sensibilité pour essayer de comprendre ce faible accord entre les concentrations prévues et celles mesurées dans cette population de perchaudes (tableau 5-4; figure 5-6). Les simulations représentées dans la figure 5-6 récapitulent cinq scénarios différents, où différentes hypothèses ont été examinées :

1. Le scénario 1 représente les données originales récoltées pour le lac Vaudray dans le cadre de cette thèse.

Dans cette simulation le [Cd] a été estimé dans le lac Vaudray par les échantillonneurs à diffusion *in situ* et la concentration de l'ion libre de Cd^{2+} a été calculée avec le modèle d'équilibre chimique WHAM. Les valeurs pour l'efficacité d'assimilation (EA) et le taux

d'ingestion (TI) proviennent de la littérature et la concentration en Cd dans la nourriture, $[Cd]_{nourriture}$, a été mesurée dans le zooplancton de ce lac (Chapitre 12).

2. Le scénario 2 évalue l'hypothèse que les perchaudes peuvent choisir du zooplancton de plus grande masse, qui peut varier au niveau des concentrations en Cd, de sorte que les concentrations de zooplancton en vrac puissent ne pas être le choix le plus approprié pour $[Cd]_{nourriture}$.

Puisque les perchaudes juvéniles doivent se développer rapidement, il est probable qu'elles recherchent les plus grandes espèces de zooplancton disponibles. Croteau et al. (2003) ont montré que les concentrations en Cd dans différentes tailles de zooplancton différaient de celles mesurées sur l'échantillon en vrac (récolté avec un filet à maille de 64 µm) pour quelques lacs. En nous inspirant des données de cette étude, nous avons utilisé la concentration en Cd (4,2 $\mu g \cdot g^{-1}$) trouvée dans la plus grande fraction (de 500 à 1000 µm) de zooplancton du Lac Vaudray dans nos simulations. Notez dans cet exemple que les concentrations en Cd retrouvées dans la fraction du zooplancton de plus grande taille étaient semblables aux concentrations mesurées dans le zooplancton global dans leur étude (moyen ± ET; 3,0 ± 0,5 $\mu g \cdot g^{-1}$) et l'étude courante (moyen ± ET; 3,6 ± 0,4 $\mu g \cdot g^{-1}$). Tel qu'attendu, en raison de ces petites différences dans les concentrations en Cd dans la nourriture, les simulations ne se sont pas beaucoup améliorées avec ce scénario (figure 5-6, comparez les points 1 et 2).

3. Le scénario 3 teste l'hypothèse que l'efficacité d'assimilation (EA) utilisée dans les simulations soit trop basse.

Une des limites des simulations présentées dans cette thèse est que l'efficacité d'assimilation pour le Cd n'a pas été mesurée pour les perchaudes assimilant le Cd dans des conditions naturelles. Les études précédentes sur des espèces invertébrées ont montré que l'EA et l'TI sont inversement reliés (c.-à-d., un taux élevé d'ingestion a un effet négatif sur la valeur d'EA) (Munger et al., 1999; Munger et Hare, 2000). Cependant, on en sait peu au sujet du mécanisme par lequel les poissons assimilent le Cd alimentaire. On croit que la prise en charge du Cd alimentaire implique la prise en charge non sélective par des systèmes de prise en charge du Ca dans l'intestin (Handy, 1996). Des études sur des mammifères ont montré que la composition alimentaire influence la prise en charge de Cd; des concentrations élevées de zinc, de fer et de calcium réduisent tous la prise en charge de Cd de sources alimentaires, suggérant une compétition parmi ces cations pour des sites de prise en charge (Reeves et Chaney, 2002; Ryu et al., 2004). Dans le cas actuel, s'il y avait de basses concentrations des cations de compétition dans la nourriture des perchaudes du lac Vaudray, cela pourrait conduire à une augmentation de la valeur d'EA, indépendamment des changements du taux d'ingestion (TI). Donc, dans cette simulation nous avons examiné comment une augmentation de l'EA affecterait les prévisions du modèle. Les simulations montrent que lorsqu'on augmente l'EA par un facteur de 2, les prédictions augmentent également par un facteur d'environ 2 (figure 5-6, comparez les points 1 et 3).

4. Le scénario 4 évalue l'hypothèse que la concentration en Cd^{2+}estimée par WHAM soit une sous-estimation de la vraie concentration en Cd^{2+}dans les lacs.

Les prédiction du modèle se fondent sur une évaluation précise de l'exposition aqueuse au Cd aqueux ($[Cd^{2+}]$). Dans les simulations originales, la valeur de $[Cd^{2+}]$ a été estimée par le modèle WHAM sur la base de la chimie ambiante de l'eau du lac et de la valeur mesurée

pour le Cd dissous. Étant donné que le modèle WHAM a été calibré non pas sur des échantillons d'eau naturelle, mais plutôt sur des échantillons dans lesquels la matière organique dissoute avaient été isolée et purifiée, il est possible que la valeur calculée pour la concentration en Cd^{2+} ne reflète pas la vraie concentration en Cd^{2+} dans le lac Vaudray. Donc, nous avons mené des simulations modèles en utilisant la valeur moyenne pour $[Cd^{2+}]$, telle que mesurée dans ce lac par échange ionique à l'équilibre en 1998 par Claude Fortin (INRS-ETE, Fortin et al., manuscrit en préparation). La première observation est que les concentrations de Cd^{2+} mesurées étaient approximativement 9 fois plus élevées que les estimations de Cd^{2+} faites par WHAM (notez que l'accord entre les concentrations de Cd^{2+} mesurées et estimées était meilleur pour les lacs avec des concentrations élevées en Cd, par exemple, le lac Dufault - C. Fortin, communication personnelle). Néanmoins, en employant la concentration de Cd^{2+} mesurée de 0,44 nM, nous voyons que les simulations demeurent toujours de beaucoup inférieures aux valeurs mesurées (figure 5-6, point 4), suggérant que bien que l'utilisation de la concentration en Cd^{2+} mesurée améliore l'accord, la sous-estimation de Cd^{2+} n'est pas le seul facteur derrière les prévisions imprécises.

5. Le cas 5 représente le pire scénario pour le cadmium.

Dans cette simulation nous avons employé la concentration totale en Cd aqueux, au lieu de la concentration de l'ion Cd^{2+} libre, une valeur d'EA = 100 %, et une valeur pour $[Cd]_{nourriture}$ (4,2 $\mu g \cdot g^{-1}$) qui correspond à la valeur maximum observée sur le terrain chez le zooplancton. Cette simulation était essentiellement un scénario biologiquement impossible, mais elle a été incluse pour montrer que même lorsque le pire scénario de Cd a été simulé, les prévisions du modèle sont toujours légèrement plus faibles que les valeurs mesurées (figure 5-6, point 5).

Tableau 5-4: Sommaire des données utilisées dans les simulations modèles du lac Vaudray.

Simulation modèle	$[Cd^{2+}]$ ($nmol \cdot L^{-1}$)	EA (%)	TI	$[Cd]_{nourriture}$ ($\mu g \cdot g^{-1}$)
1. Simulation originale du lac Vaudray	0,05	33	0,028	3,6
2. Le zooplancton en masse est-il un choix approprié pour $[Cd]_{nourriture}$?	0,05	33	0,028	4,2*
3. L'efficacité d'assimilation est-elle trop basse?	0,05	66	0,028	3,6
4. Les estimations de $[Cd^{2+}]$ par WHAM étaient-elles un choix approprié?	0,44**	33	0,028	3,6
5. Le pire scénario de Cd	0,09	100	0,028	4,2

* Données de Croteau et al. (2003).

** Données de Claude Fortin, non publiées

Les résultats de ces simulations montrent que la prédiction des concentrations hépatiques de Cd chez les poissons des lacs modérément contaminés, tels que le lac Vaudray, est difficile, probablement parce que les métaux présents dans la nourriture jouent un plus grand rôle dans tels lacs, et parce que le mécanisme par lequel les poissons absorbent le Cd alimentaire n'a pas été étudié à fond. Dans ce domaine, des études récentes sur la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) ont montré que les augmentations de la concentration en calcium dans la nourriture réduisaient la prise en charge et l'accumulation du Cd aqueux dans les branchies, le rein et le foie (Zohouri et al., 2001; Baldisserotto et al., 2004a, 2004b, 2005), démontrant que les interactions entre les métaux alimentaire et aqueux compliqueraient

également les prévisions. Finalement, le rôle de l'adaptation (c.-à-d., modifications génétiques) en réponse à l'exposition chronique en métal ne peut pas être escompté. Par exemple, le modèle suppose que les taux d'afflux et d'élimination sont relativement semblables pour toutes les perchaudes de tous les lacs, mais si la perchaude du lac Vaudray a développé des mécanismes pour stocker le Cd excessif au lieu de l'éliminer, les concentrations alors mesurées seront beaucoup plus élevées que celles prévues.

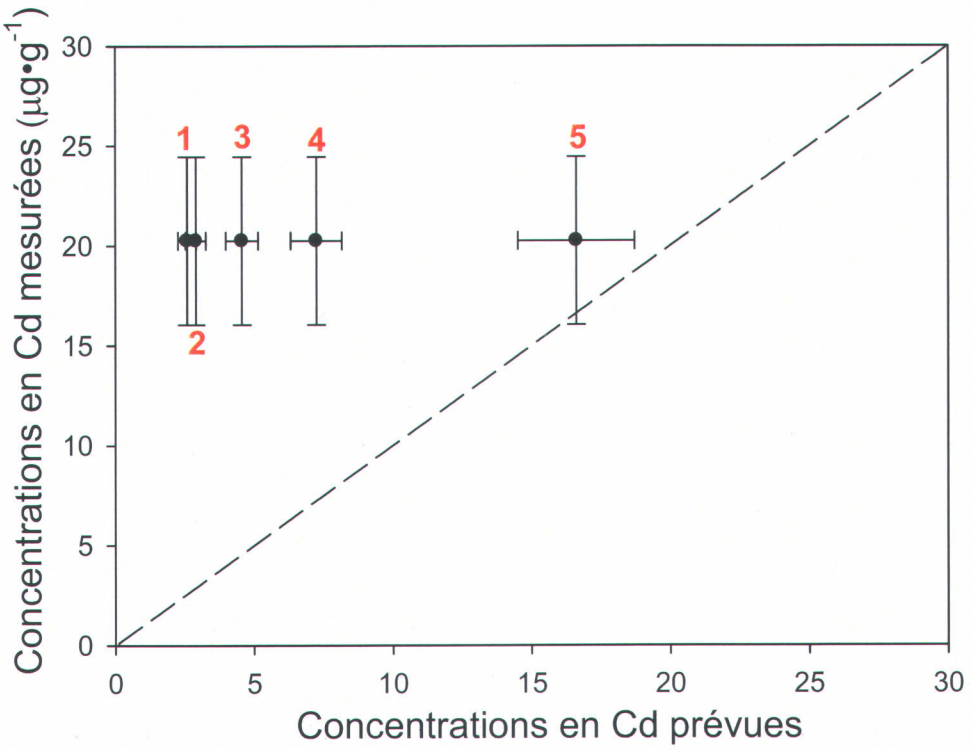


Figure 5-6: Analyse de la sensibilité du modèle de bioaccumulation de Cd, pour les perchaudes du lac Vaudray. Voir le texte pour le détail des scénarios 1→5, et le tableau 5-4 pour les données utilisées dans les diverses simulations.

5.5 Conclusions et implications des résultats pour l'évaluation des risques écologiques

5.5.1 Une comparaison des études menées sur le terrain et des études en laboratoire

Jusqu'ici, la grande majorité des études d'accumulation en métal et de toxicité qui appuient les critères de qualité de l'eau (WQC), et qui servent à l'évaluation des risques écologiques (ÉRÉ), ont été effectuées en laboratoire. Alors que ces études sont assurément utiles, parce que les conditions peuvent être contrôlées et les mécanismes de bioaccumulation et de toxicité peuvent être examinés clairement, elles ne reflètent pas nécessairement la bioaccumulation et la toxicité chronique que l'on retrouve dans les environnements naturels. Donc pour compléter ces études de laboratoire, des études examinant la bioaccumulation de métaux dans les environnements naturels sont également nécessaires pour comprendre la bioaccumulation et la toxicité de métaux dans les populations indigènes de poissons.

Les approches de transplantation utilisées dans cette thèse sont particulièrement pertinentes pour l'ÉRÉ parce que, à la différence de beaucoup d'études de laboratoire, nous avons utilisé une espèce de poisson qui se retrouve généralement dans des lacs contaminés par des métaux pour examiner la dynamique de la bioaccumulation des métaux. Les résultats de ces expériences montrent quelques différences dans la façon dont les perchaudes répondent aux changements abrupts de concentrations ambiantes en métal comparées aux résultats du laboratoire. Par exemple, le tableau 5-5 montre la demi-vie d'élimination pour le Cd estimée à partir de différentes études sur des poissons d'eau douce. Chez les perchaudes la demi-vie du Cd dans les branchies était plus courte que dans tous les autres organes examinés. Des études semblables sur le vairon européen ont également montré une demi-vie du Cd qui était plus courte dans les branchies que dans les autres parties examinées (corps entier et la tête et la peau). Cependant, la valeur estimée pour le vairon européen (7 j) était

approximativement 3 fois plus courte que notre valeur estimée pour ce même organe chez la perchaude (18 j), montrant des différences dans la façon dont les branchies de ces deux poissons éliminent les métaux.

Tableau 5-5: Les demi-vies d'élimination pour le Cd de diverses espèces de poissons d'eau douce.

Métal	Espèce de poisson	Genre d'exposition	Organe/ corps	Demi-vie d'élimination ($t_{½}$, j)	Référence
Cd	Perchaude (*Perca flavescens*)	Étude de terrain – aqueux et alimentaire	Intestin	37	Cette thèse
		Étude de terrain – aqueux et alimentaire	Branchies	18	Cette thèse
		Étude de terrain – aqueux et alimentaire	Reins	52	Cette thèse
		Étude de terrain – aqueux et alimentaire	foie	75	Cette thèse
Cd	Varion européen (*Phoxinus phoxinus*)	Laboratoire - aqueux	Branchies	7	Glynn et Olsson, 1991
		Laboratoire – aqueux	Corps entier	9	Glynn et Olsson, 1991
		Laboratoire – aqueux	Tête et peau	9	Glynn et Olsson, 1991
Cd	Truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)	Laboratoire – aqueux	Corps entier	63	Harrison et Klaverkamp, 1989
		Laboratoire – alimentaire	Corps entier	27	Harrison et Klaverkamp, 1989
	Grand corégone (*Coregonus clupeaformis*)	Laboratoire – aqueux	Corps entier	25	Harrison et Klaverkamp, 1989
		Laboratoire – alimentaire	Corps entier	24	Harrison et Klaverkamp, 1989

Les données de demi-vie d'élimination résumées dans le tableau 5-5 suggèrent également que les différentes espèces de poissons contrôlent le Cd différemment. Par exemple, la demi-vie pour le corps entier des vairons européens (9 j) était considérable plus courte que celle mesurée pour le corps entier de la truite arc-en-ciel (de 27 à 63 j) et du grand corégone (25 j), suggérant qu'une augmentation des taux d'élimination soit une stratégie potentielle employée par le vairon européen pour réguler l'accumulation de Cd. Tel qu'observé dans les invertébrés (Wang et Fisher, 1997), il est également possible que cette grande différence dans les taux d'élimination puisse être liée à la plus petite taille des vairons européens (0,5 à 1,5 g poids humide) comparé à la truite arc-en-ciel (46,2 ± ÉT 14,6 g) et au grand corégone (26.6 ± ÉT 14.4 g) utilisés dans ces études. Par contre, la demi-vie d'élimination estimée pour le foie (75 j) et le rein (52 j) des perchaudes est relativement longue, et nos résultats montrent que le contrôle de la disponibilité biologique subcellulaire de ce métal, au moins dans le foie, est une stratégie importante employée par ce poisson en réponse à une exposition accrue au Cd.

5.5.2 Implications des simulations du modèle

Des évaluations de risque pour les milieux aquatiques sont souvent faites sur la base des expositions aiguës des animaux aux métaux dissous, mais plusieurs études suggèrent que la bioaccumulation en métal (Dallinger et Kautzky, 1985; Harrison et Klaverkamp, 1989; Farag et al., 1994; Mount et al., 1994; Kraal et al., 1995) et les effets (Woodward et al., 1994, 1995; Farag et al., 1999) chez certaines espèces de poissons puissent être fortement influencés par les métaux alimentaires. Une question clé pour les régulateurs

environnementaux est donc de décider si les critères de qualité de l'eau exprimés seulement en termes de métaux aqueux sont suffisamment protecteurs.

En employant des études en cage pour examiner l'importance relative du Cd aqueux et du Cd alimentaire, nous avons créé des conditions expérimentales qui reflétaient la biodisponibilité du Cd que les perchaudes rencontreraient naturellement. Les résultats de notre étude suggèrent que les sources aqueuses et alimentaires jouent un rôle dans l'accumulation de Cd et toutes les deux devraient être incluses comme facteurs dans les modèles prédictifs pour des écosystèmes contaminés en métaux. En tenant compte de la concentration en Cd^{2+} aqueux seulement, nous avons montré que le modèle de bioaccumulation en métal pouvait prédire les concentrations hépatiques de Cd chez les perchaudes vivant dans des lacs avec une concentration ambiante en $Cd^{2+} > 0,7$ nM. Les anomalies plus grandes entre les concentrations mesurées chez les perchaudes et celles prédites par le modèle, qui se sont montrées dans les lacs avec des concentrations de Cd inférieures, sont probablement attribuables, au moins en partie, à une contribution plus forte de Cd alimentaire dans ces lacs. De la perspective de l'évaluation des risques, ces résultats impliquent que les concentrations libres de Cd^{2+} dans l'eau du lac pourraient être employées toutes seules pour prédire la bioaccumulation de Cd par les perchaudes vivant dans les lacs fortement contaminés, où les populations de ces poissons sont effectivement les plus susceptibles d'être en danger. La prévision des concentrations en Cd chez les poissons dans les lacs de référence et les lacs modérément contaminés s'avère difficile, comme la nourriture joue un plus grand rôle en déterminant des concentrations en Cd dans le foie des perchaudes et parce qu'il y a un manque d'information sur la prise en charge alimentaire des métaux par des poissons indigènes.

5.5.3 La bioréactivité des métaux

Deux composantes clés de l'ÉRÉ sont l'évaluation de l'exposition et l'évaluation des effets. En suivant les changements de la distribution subcellulaire des métaux en fonction du temps (ex., l'accumulation dans les fractions potentiellement sensibles au métal), nous examinions essentiellement le lien entre ces deux composantes clés de l'ÉRÉ. En utilisant des expériences de transplantation pour examiner comment la distribution subcellulaire des métaux change suivant une augmentation abrupte de l'exposition en métaux, nous avons observé que les concentrations ont presque toujours augmenté dans toutes les fractions avec l'augmentation des concentrations hépatiques totales, à l'exception de la fraction des protéines dénaturées à la chaleur, où au-dessous d'une concentration seuil cette fraction a été protégée contre l'accumulation. Donc, de façon similaire aux études spatiales sur les perchaudes (Giguère 2003), la dynamique de l'accumulation des métaux au niveau subcellulaire a montré que la détoxication en métal est imparfaite chez cette espèce de poisson.

En suivant la variation saisonnière des concentrations hépatiques en Cd et en Cu aux niveaux subcellulaires, nous avons vu qu'il était plus difficile pour les perchaudes avec des concentrations hépatiques en métal élevées d'empêcher l'accumulation de métaux dans les fractions sensibles, telles que la fraction de protéines dénaturées à la chaleur et les organites. Bien qu'aucun effet toxicologique n'ait été directement mesuré dans cette étude, nous pouvons spéculer que l'accumulation de métaux dans ces fractions potentiellement sensibles serait liée à la toxicité. En effet, des études précédentes sur les perchaudes ont montré un dysfonctionnement au niveau du foie chez les poissons récoltés de lacs contaminés (Sherwood et al., 2000; Levesque et al., 2002, Couture et Rajotte, 2003; Gravel et al., 2005).

5.5.4 La perchaude comme biomoniteur?

La perchaude montre un grand potentiel comme biomoniteur de métaux, étant donné que ce poisson est généralement retrouvé dans les lacs de référence et dans des lacs contaminés en métaux. Il y a une grande quantité de données de terrain en constante croissance sur cette espèce (pour une revue récente, voir Campbell et al., 2003). Dans le contexte de développer la perchaude comme biomoniteur de métaux, les résultats de cette thèse suggèrent que non seulement les concentrations en métal changent d'une façon saisonnière, mais également que ces changements sont davantage significatifs chez les poissons de lacs contaminés. Puisque les programmes de surveillance sont souvent particulièrement intéressés par les changements dans la disponibilité biologique de métaux dans de tels lacs contaminés, ces résultats ont des implications directes sur l'interprétation des données de terrain. On a observé une variation saisonnière semblable des métaux chez les perchaudes (âgée 2 à 3 ans) dans la région de Sudbury, suggérant que ce phénomène ne soit pas spécifique à une région (Eastwood et Couture, 2002). Une manière possible de masquer l'effet de la variation saisonnière dans le foie serait de mesurer les concentrations en métal dans les poissons entiers. Parce que les effets induits par les métaux semblent augmenter avec l'âge de la perchaude (tableau 5-2), la perchaude juvénile pourrait être un meilleur choix comme moniteur des concentrations ambiantes en métal puisque ces poissons tendent à être en meilleure condition que les perchaudes adultes. Par contre, les perchaudes adultes pourraient être un meilleur choix comme biomoniteur d'effets car les effets sont plus évidents à cet âge.

6. Perspectives de recherche

Bien que les résultats de cette thèse aient avancé la compréhension de l'accumulation en métal chez les populations indigènes des perchaudes, la recherche a également soulevé quelques questions intéressantes. À partir des résultats de la modélisation, nous avons émis l'hypothèse que le Cd alimentaire joue un rôle plus important dans la détermination des concentrations en Cd dans le foie des poissons vivant dans des lacs avec de faibles niveaux aqueux de Cd^{2+}. Il serait intéressant de valider cette hypothèse sur le terrain en utilisant une expérience semblable à celle décrite dans cette thèse pour examiner l'importance relative du Cd alimentaire et aqueux, mais cette fois en choisissant un lac modérément contaminé en Cd^{2+} (par exemple, le lac Vaudray). De plus, il n'existe actuellement que peu d'informations sur la prise en charge alimentaire des métaux chez les poissons. Pourtant, des résultats d'études chez les mammifères suggèrent que la composition alimentaire joue un rôle important. Les interactions entre différents métaux aqueux à la surface des branchies sont déjà prises en considération dans le modèle du ligand biotique; une approche analogue à la compétition entre différents composants alimentaires et des métaux ingérés améliorerait les capacités prédictives des modèles biodynamiques.

L'étude saisonnière des concentrations hépatiques de Cd et de Cu a mis en évidence des variations importantes chez les poissons vivant dans les lacs fortement contaminés, et cela pendant une période de quatre mois. Ces données suggèrent que la variation saisonnière de ces métaux puisse être liée à un affaiblissement physiologique. Pour avancer la compréhension des variations saisonnières des concentrations en métal et évaluer cette hypothèse d'affaiblissement physiologique, il serait intéressant d'examiner les changements de la distribution subcellulaire des métaux et de relier ces changements à un biomarqueur

d'effets. Étant donné que le Cd et le Cu sont impliqués dans le stress oxydant, un choix évident pourrait être le malondialdéhyde (MDA).

Finalement, les concentrations en Cd chez certaines populations de perchaudes (ex. : celles du lac Vaudray) sont mal prédites dans les simulations avec le modèle de bioaccumulation, même lorsque la composante alimentaire du modèle est surestimée. Nous ne pouvons pas escompter la possibilité que ces poissons se soient adaptés à l'exposition chronique en métal et aient développé des mécanismes pour faire face à la contamination en métal. Puisque l'adaptation implique des changements dans la structure génétique, des études examinant la structure génétique des populations de perchaudes dans des lacs de référence et des lacs contaminés offrent une approche puissante pour évaluer cette hypothèse, en précisant les changements au niveau moléculaire résultant de l'exposition aux métaux (Belfiore et Anderson, 2001). Avec cette information, notre compréhension des processus d'adaptation, qui sont à la base de l'accumulation des métaux, serait encore améliorée.

7. Références

Aalto, S.K. and G.E. Newsome. 1990. Additional evidence supporting demic behaviour of a yellow perch (*Perca flavescens*) population. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **47**: 1959-1962.

Ali, M., A. Nicieza, and R.J. Wootton. 2003. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. Fish and Fisheries **4**: 147-190.

Audet, D. and P. Couture. 2003. Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **60**: 269-278.

Baines, S.B. and N.S. Fisher. 2002. Assimilation and retention of selenium and other trace elements from crustacean food by juvenile striped bass (*Morone saxatilis*). Limnol. Oceangr. **47**: 646-655.

Baldisserotto, B., C. Kamunde, A. Matsuo, and C.M. Wood. 2004a. Acute waterborne cadmium uptake in rainbow trout is reduced by dietary carbonate. Comp. Biochem. Physiol. C **137**: 363-372.

Baldisserotto, B., C. Kamunde, A. Matsuo, and C.M. Wood 2004b. A protective effect of dietary calcium against acute waterborne cadmium uptake in rainbow trout. Aquat. Toxicol. **67**: 57-63.

Baldisserotto, B., M.J. Chowdhury, and C.M. Wood. 2005. Effects of dietary calcium and cadmium on cadmium accumulation, calcium and cadmium uptake from the water, and their interactions in juvenile rainbow trout. Aquat. Toxicol. **72**: 99-117.

Belfiore, N.M. and S. L. Anderson. 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. Mut. Res. **489**: 97-122.

Bonneris, E. 2004. Étude de l'implication de différents ligands cellulaires dans la séquestration du cadmium, du cuivre, et du zinc chez des Mollusques bivalves d'eau douce exposés à une contamination environnementale. Thèse de doctorat, École

Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

Brodeur, J.C., G. Sherwood, J.B. Rasmussen, and A. Hontela. 1997. Impaired cortisol secretion in yellow perch (*Perca flavescens*) from lakes contaminated by heavy metals: in vivo and in vitro assessment. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **54**: 2752-2758.

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

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

Camusso, M., L. Vigano, and R. Balestrini. 1995. Bioconcentration of trace metals in rainbow trout: A field study. Ecotoxicol. Environ. Saf. **31**: 133-141.

Chapman, P.M., F. Wang, C.R. Janssen, R. R. Goulet, and C.N. Kamunde. 2003. Conducting ecological risk assessments of inorganic metals and metalloids: current status. Human Ecol. Risk Assess. **9**: 641-697.

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

Couillard, Y., P.G.C. Campbell, J. Pellerin-Massicotte and J.C. Auclair. 1995b. Field transplantations of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. II. Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence for cytotoxicity, and links to effects at higher levels of biological organization. Can. J. Fish. Aquat. Sci **52**: 703-715.

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

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

Croteau, M.-N., L. Hare, and A. Tessier. 2003. Difficulties in relating Cd concentrations in the predatory insect *Chaoborus* to those of its prey in nature. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **60**: 800-808.

Dallinger, R. and H. Kautzky. 1985. The importance of contaminated food for the uptake of heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*): a field study. Oecologia **67**: 82-89.

de Conto Cinier, C., Petit-Ramel, M., Faure, R., Garin, D., and Bouvet, Y. 1999. Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp *Cyprinus carpio* tissues. Comp. Biochem. Physiol. **C122**: 345-352.

De Smet, H., B. De Wachter, R. Lobinski, and R. Blust. Dynamics of (Cd, Zn)-metallothionein in gills, liver and kidney of common carp Cyprinus carpio during cadmium exposure. Aquat. Toxicol. 52, 269-281. 2001.

Douben, P.E.T. 1989. Metabolic rate and uptake and loss of cadmium from food by the fish *Noemacheilus barbatulus* L. (Stone Loach). Environ. Pollut. **59**: 177-202.

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

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

Farag, A.M., D.F. Woodward, W. Brumbaugh, J.N. Goldstein, E. MacConnell, C. Hogstrand, and F.T. Barrows. 1999. Dietary Effects of Metals-Contaminated Invertebrates from the Coeur d'Alene River, Idaho, on Cutthroat Trout. Trans. Am. Fish. Soc. **128**: 578-592.

Giguère, A. 2003. Accumulation et répartition subcellulaire des métaux (Cd, Cu, Zn, Ni) chez deux organismes aquatiques exposés a un gradient métallique en milieu naturel: liens avec le stress oxydant. Thèse de doctorat, Université du Québec, INRS-ETE, Université du Québec, Québec, QC, Canada.

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

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

Giles, M.A. 1988. Accumulation of cadmium by rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during extended exposure. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **45**: 1045-1053.

Gingras, J. and D. Boisclair. 2000. Comparison between consumption rates of yellow perch (*Perca flavescens*) estimated with a digestive tract model and with a radioisotope approach. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **57**: 2547-2557.

Glynn, A.W. and P-E. Olsson. 1991. Cadmium turnover in minnows (*Phoxinus phoxinus*) preexposed to waterborne cadmium. Environ. Tox. Chem. **10**: 383-394.

Gravel, A., P.G.C. Campbell, and A. Hontela. 2005. Disruption of the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in 1+ yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the environment. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **62**: 982-990.

Handy, R. D. 1996. Dietary exposure to toxic metals in fish. *In* Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Molecular and Cellular Approaches. *Edited by* Taylor, E. W.

Society of Experimental Biology Seminar Series, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 29-60.

Handy, R.D. 1992. The assessment of episodic metal pollution. II. The effects of cadmium and copper enriched diets on tissue contaminant analysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. **22**: 82-87.

Handy, R.D. 1993. The effect of acute exposure to dietary Cd and Cu on organ toxicant concentrations in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquat. Toxicol. **27**: 1-14.

Harrison S.E. and J.F. Klaverkamp. 1989. Uptake, elimination and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). Environ. Toxicol. Chem. **8**: 87-97.

Hinton, D.E., H. Segner and T, Braunbeck. 2001. Toxic responses of the liver. *In* Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts: Volume 1 - organs. *Edited by* D. Schlenk and W.H. Benson, Talyor and Francis, New York, NY, USA, pp. 91-150.

Hogstrand, C., G. Lithner and C. Haux. 1991. The importance of metallothionein for the accumulation of copper, zinc and cadmium in environmentally exposed perch, *Perca fluviatilis*. Pharm. Toxicol. **68**: 492-501.

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

Kim, S.-G., J.-H. Jee, and J.-C. Kang. 2004. Cadmium accumulation and elimination in tissues of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, after sub-chronic cadmium exposure. Environ. Pollut. **127**: 117-123.

Klaverkamp, J.F., Wautier, K., and Baron, C.L. 2000. A modified mercury saturation assay for measuring metallothionein. Aquat. Toxicol. **50**: 13-25.

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

Kraal., M.H., M.H.S. Kraak, C.J. De Groot, and C. Davids. 1995. Uptake and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by carp (*Cyprinus carpio*). Exotoxicol. Environ. Saf. **31**: 179-183.

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

Kraemer, L.D., P.G.C. Campbell, and L. Hare. 2005b. A field study examining the relative importance of food and water as sources of Cd for juvenile yellow perch. Can. J. Fish. Aquat. Sci. (in review).

Laflamme, J.-S., Y. Couillard, P.G.C. Campbell, and A. Hontela. 2000. Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **57**: 1692-1700.

Larsen, B.K. and Perkins Jr., E.J. 2001. Target organ toxicity in the kidney. *In* Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts: Volume 1 - organs. *Edited by* D. Schlenk and W.H. Benson, Talyor and Francis, New York, NY, USA pp. 91-150.

Laurent, P. and S.F. Perry. 1990. Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. Cell. Tissue Res. **259**: 429-442.

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

Liu, X.-J., I.-H. Ni, and W.-X. Wang. 2002. Trophic transfer of heavy metals from freshwater zooplankton *Daphnia magna* to zebrafish *Danio reiro*. Water Res. **36**: 4563-4569.

Luoma, S.N. and P.S. Rainbow. 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. Environ. Sci. Technol. **39**: 1921-1931.

Martin Jr., L.K. and M.C. Black.1998. Biomarker assessment of the effects of coal strip-mine contamination on channel catfish. Ecotoxicol. Environ. Saf. **41**: 307-320.

Mason A.Z. and K.D. Jenkins. 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. *In* Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. *Edited by* A. Tessier and D.R. Turner, John Wiley and Sons Ltd., New York, NY, USA, pp. 478-608.

McCormick, S.D., J.M. Shrimpton, J.B. Carey, M.F. O'Dea, K.E. Sloan, S. Moriyama, and B. Th. Bjornsson. 1998. Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol. Aquaculture **168**: 221-235.

McGeer, J.C., C. Szebedinsky, D.G. McDonald and C.M. Wood. 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. Aquat. Toxicol. **50**: 245-256.

Michaud, A., L. Hare, and P.G.C. Campbell. 2005. Exchange rates of cadmium between a burrowing mayfly and its surroundings in nature. Limnol. Oceangr. (in press).

Mount, D.R., A.K. Barth, T.D. Garrison, K.A. Barten, and J.R. Hockett 1994. Dietary and waterborne exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to copper, cadmium, lead and zinc using a live diet. Environ. Toxicol. Chem. **13**: 2031-2041.

Munger, C. and L. Hare. 2000. Influence of ingestion rate and food types on cadmium accumulation by the aquatic insect *Chaoborus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **57**: 327-332.

Munger, C., L. Hare, and A. Tessier. 1999. Cadmium sources and exchange rates for *Chaoborus* larvae in nature. Limnol Oceangr. **44**: 1763-1771.

Ni, I-H., W-X. Wang, and Y.K. Tam. 2000. Transfer of Cd, Cr and Zn from zooplankton prey to mudskipper *Periophthalmus cantonensis* and glassy *Ambassis urotaenia* fishes. Mar. Ecol. Prog. Ser. **194**: 203-210.

Niyogi, S. and C.M. Wood 2004. Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. Environ. Sci. Technol. **38**: 6177-6192.

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

Olsvik, P.A., P. Gundersen, R.A. Andersen, and Zachariassen, K.E. 2000. Metal accumulation and metallothionein in two populations of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments during a run-off episode. Aquat. Toxicol. **50**: 301-316.

Pankhurst, N.W. and G. Van Der Kraak. 2000. Evidence that acute stress inhibits ovarian steroidogensesis in rainbow trout in vivo, through the action of cortisol. Gen. Comp. Endocrinol. **117**: 225-237.

Perceval, O. 2005. Évaluation de la métallothionéine comme marqueur d'effets toxiques chez le bivalve d'eau douce *Pyganodon grandis* dans un environnement aquatique contaminé par les métaux traces. Thèse de doctorat, Département des Sciences biologiques, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

Playle, R.C. 1998. Modelling metal interactions at fish gills. Sci. Tot. Environ. **219**: 147-163.

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

Reeves, P.G. and R.L. Chaney. 2002. Nutritional status affects the absorption and whole-body and organ retention of cadmium in rats fed rice-based diets. Environ. Sci. Technol. **36**: 2684-2692.

Reinfelder J.R. and N.S. Fisher. 1994. Retention of elements absorbed by juvenile fish (*Menidia menidia, Menidia beryllina)* from zooplankton prey. Limnol. Oceanogr. **39**: 1783-1789.

Reinfelder, J.R., N.S. Fisher, S.N. Luoma, J.W. Nichols, and W.-X Wang. 1998. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: A critique of the kinetic model approach. Sci. Tot. Environ. **219**: 117-135.

Roch, M. and J.A. McCarter. 1984. Hepatic metallothionein production and resistance to heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) - II. Held in a series of contaminated lakes. Comp. Biochem. Physiol. **77C**: 77-82.

Roch, M., J.A. McCarter, A.T. Matheson, M.J.R. Clark and R.W. Olafson. 1982. Hepatic metallothionein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as an indicator of metal pollution in the Campbell river system. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **39**: 1596-1601.

Roesijadi, G. and W.E. Robinson. 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation, and release. *In* Aquatic Toxicology. Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. *Edited by* D.C. Malins and G.K. Ostrander, Lewis Publishers, Boca Raton, Fl, USA, pp 387-420.

Ryu, D.-Y., S-J. Lee, D.W. Park, B-S. Choi, C.D. Klaassen, and J-D. Park. 2004. Dietary iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats. Toxicol. Lett. **152**: 19-25.

Schlenk, D., Y.S. Zhang, and J. Nix.1995. Expression of hepatic metallothionein messenger RNA in feral and caged fish species correlates with muscle mercury levels. Ecotox. Environ. Saf. 31: 282-286.

Sherwood, G.D., J. Kovecses, A.H., and J.B. Rasmussen. 2002a. Simplified food webs lead to energetic bottlenecks in polluted lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **59**: 1-5.

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

Sherwood, G.D., J.B. Rasmussen, D.J. Rowan, J.C. Brodeur, and A. Hontela. 2000. Bioenergetic costs of heavy metal exposure in yellow perch (*Perca flavescens*): in situ estimates with a radiotracer (^{137} Cs) technique). Can. J. Fish. Aquat. Sci. **57**: 441-450.

Stillman, M.J. 1995. Metallothioneins. Coord. Chem. Rev. **144**: 461-511.

Tipping, E. 1998. Humic ion-binding Model VI: an improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances. Aquat. Geochem. **4**: 3-48.

Trudel, M., A. Tremblay, R. Schetagne, and J.B. Rasmussen. 2000. Estimating food consumption rates of fish using a mercury mass balance model. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **57**: 414-428.

Van De Boon, J., E.J.M. Guido, E.J.M. Van Den Thillart, and A.D.F. Addink. 1991. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol. **100**: 47-53.

Vijayan, M.M., T.P. Mommsen, G.C. Glemet, and T.W. Moon. 1996. Metabolic effects of cortisol treatments in a marine teleost, the sea raven. J. Exp. Biol. **199**: 1509-1514.

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

Wang, W.X. and N.S. Fisher. 1997. Modeling the influence of body size on trace element accumulation in the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. **161:** 103-115é

Wehrens, R., H. Putter, and L.M.C. Buydens. 2000. The bootstrap: a tutorial. Chem. Intell. Lab. Syst. **54**: 35-52.

Williams, D.R. and J.P. Giesy Jr. 1978. Relative importance of food and water sources to cadmium uptake by *Gambusia affinis* (Poeciliidae). Environ. Res. **16**: 326-332.

Woodward, D.F., A.M. Farag, H.L. Bergman, A.J. DeLonay, E.E Little, C.E. Smith, and F.T. Barrows. 1995. Metals-contaminated benthic invertebrates in the Clark Fork River, Montana: effect on age-0 brown trout and rainbow trout. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **52**: 1994-2004.

Woodward, D.F., W.G. Brumbaugh, A.J. DeLonay, E.E. Little, and C.E. Smith. 1994. Effect of rainbow trout fry of a metals-contaminated diet of benthic invertebrates from the Clark Fork River, Montana. Trans. Am. Fish. Soc. **123**: 51-62.

Zohouri, M.A., G.G. Pyle, and C.M. Wood. 2001. Dietary Ca inhibits waterborne Cd uptake in Cd-exposed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comp. Biochem. Physiol. **130C**: 347-356.

PARTIE II

Articles scientifiques

8. 1er article : Dynamics of Cd, Cu and Zn accumulation in organs and sub-cellular fractions in field transplanted juvenile yellow perch (*Perca flavescens*)

Lisa D. Kraemer, Peter G.C. Campbell*, Landis Hare

INRS-Eau, Terre et Environnement, Université du Québec, 490 de la Couronne, Québec, QC, Canada G1K 9A9

Environmental Pollution, 2005 **138 :** 324-337

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
ELSEVIER
Environmental Pollution 138 (2005) 324–337
ENVIRONMENTAL POLLUTION
www.elsevier.com/locate/envpol

Dynamics of Cd, Cu and Zn accumulation in organs and sub-cellular fractions in field transplanted juvenile yellow perch (*Perca flavescens*)☆

Lisa D. Kraemer, Peter G.C. Campbell*, Landis Hare

INRS-Eau, Terre et Environnement, Université du Québec, 490 de la Couronne, Québec, QC, Canada G1K 9A9

Received 2 November 2004; accepted 17 March 2005

Field transplanted yellow perch respond differently to increased ambient concentrations of Cd, Cu and Zn.

Abstract

Juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) were caught in a reference lake and transplanted to cages held within a lake impacted by mining activities, with elevated levels of aqueous bioavailable copper (Cu^{2+}), zinc (Zn^{2+}) and cadmium (Cd^{2+}). Fish were sampled from the cages over 70 d and changes in metal concentrations were followed over time in the gills, gut, liver and kidney. In addition, the hepatic sub-cellular partitioning of the three metals was determined by differential centrifugation of liver samples, yielding the following fractions: cellular debris; organelles; heat-denaturable proteins (HDP); and heat-stable proteins (HSP) (including metallothionein). In transplanted fish, Cd concentrations increased in all the organs sampled, whereas Cu mainly increased in the gills, gut and liver but not the kidney; some slight accumulation of Zn occurred in the kidneys and gills of the transplanted fish. The sub-cellular partitioning results demonstrated that metal-handling strategies in juvenile yellow perch differed among metals. Cellular sequestration in the HSP fraction was an important strategy used by these fish in response to increased ambient Cd. Accumulation of Zn was not seen in the organs examined, indicating that transplanted perch were able to either reduce influx, or increase efflux rates of this metal. The response of yellow perch to elevated ambient Cu appeared to combine the strategies used for Cd and Zn, as both cellular sequestration and reduced accumulation were observed in transplanted fish.
© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Metals; Bioaccumulation dynamics; Sub-cellular partitioning; Detoxification; Fish

1. Introduction

Fish living in lakes and rivers near mines, smelters and metal-finishing industries are often chronically exposed to elevated levels of metals such as cadmium (Cd), copper (Cu) and zinc (Zn). Accumulation of these metals by fish increases the risk of toxicity such as physiological impairment (Laflamme et al., 2000; Rajotte and Couture, 2002; Couture and Kumar, 2003) and lipid peroxidation (Farag et al., 1995). Metal accumulation by fish in natural systems depends on many factors including water chemistry, temperature (Köck et al., 1996; Greenfield et al., 2001) and the relative importance of food and water as uptake routes.

In addition to these extrinsic environmental factors that control bioavailability, factors intrinsic to the fish also play an important role in determining how the metal is handled once assimilated. The association of metals with different cellular ligands could influence their

☆ Contribution No. 44 from the Metals in the Environment Research Network (http://www.mite-rn.org).

* Corresponding author. Tel.: +1 418 654 2538; fax: +1 418 654 2600.

E-mail address: peter.campbell@ete.inrs.ca (P.G.C. Campbell).

0269-7491/$ - see front matter © 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.envpol.2005.03.006

bioavailability within the cell. For example, metals sequestered by cytosolic proteins such as metallothionein (MT) (Olsson and Haux, 1986; Hogstrand et al., 1991; Laflamme et al., 2000) or metals stored within lysosomes or metal-rich granules (Weis et al., 1986; Bunton et al., 1987; Lanno et al., 1987; Wallace et al., 2003) are considered detoxified, and thus are not bioavailable to more sensitive cellular fractions.

An examination of the dynamics of metal accumulation as well as the quantification of changes in the subcellular partitioning of metals over time could afford insight into potential mechanisms of toxicity and detoxification at the cellular level. Most toxicokinetic studies on fish have been conducted in the laboratory (Giles, 1988; de Conto Cinier et al., 1997, 1999; De Smet et al., 2001; McGeer et al., 2000). The relevance of data from fish exposed to metals in the laboratory is often compromised by the use of environmentally unrealistic metal concentrations, exposure to metals by only one route (usually water) and a lack of control over metal speciation in water and food.

In the present study we measured metal uptake in the field by yellow perch (*Perca flavescens*). This species shows potential as a metal biosentinel because yellow perch are abundant, easy to catch and are commonly found in both pristine and metal-contaminated environments. There have been numerous field studies with yellow perch demonstrating not only metal bioaccumulation and partial detoxification (Laflamme et al., 2000; Levesque et al., 2002; Rajotte and Couture, 2002), but also physiological impairment including endocrine dysfunction (Laflamme et al., 2000), altered physiological capacities (Levesque et al., 2002; Couture and Kumar, 2003) and lower condition (Levesque et al., 2002) in fish living in metal-contaminated environments.

This current body of field data for yellow perch has focused on spatial trends in metal accumulation, detoxification and impacts where steady state is assumed to have been reached in chronically exposed fish, whereas kinetic aspects have been left unexplored. The objective of our study was to examine metal accumulation dynamics at two biological levels (i.e., organ and sub-cellular) by transplanting juvenile yellow perch from a reference lake to enclosures held within a lake that had been previously impacted by mining activities, and thus contained elevated concentrations of Cd, Cu and Zn. We hypothesized that in response to increased ambient concentrations of Cu and Zn, transplanted fish would regulate bioaccumulation of these essential metals, whereas Cd would not be subjected to the same degree of metabolic control and tissue concentrations of this non-essential metal would increase over time in the transplanted fish. Given the known capacity of Cd to induce MT(s), we further hypothesized that the regulatory strategy used by the fish would be mainly one of detoxification by the sequestration of this metal with MT.

2. Materials and methods

2.1. The study area and experimental design

The study lakes are located in the Abitibi region, centered around the city of Rouyn-Noranda, approximately 600 km north-west of Montréal, Québec, Canada. A copper smelter has been in operation since 1927 in the city of Rouyn-Noranda, and although emissions are currently controlled, lakes located downwind from this smelter are contaminated with metals such as Cd, Cu and Zn due to historical atmospheric deposition (Couillard et al., 2004). In addition to these direct inputs from the smelter, some lakes in this region are also contaminated by runoff from mine tailings and mineralized outcrops.

Juvenile yellow perch (less than 5 g) were collected from a reference lake (Opasatica) at the end of May 2001 (water temperature 11 °C) and kept within cages in a metal-contaminated lake (Dufault) for up to 70 d (water temperature at the end of the study 20 °C). Because this size class of perch feeds mainly on zooplankton and small aquatic insects (Gingras and Boisclair, 2000), we designed enclosures to allow these prey to enter freely thereby exposing perch to both contaminated food and contaminated water. The enclosures measured 2.5 m deep and 1.7 m in diameter (volume 5.7 m^3) and were made of a 0.5 cm mesh aperture polypropylene netting. They were suspended from floating rafts made of plastic (acrylonitrile butadiene styrene) tubing (10 cm diameter) and each raft supported four cages. Fish were either transplanted from the reference lake to cages in the contaminated lake or were caged within the reference lake (caged control fish). Each cage initially contained 30–40 fish.

2.2. Labware

To minimize trace metal contamination, all plastic labware used for sample collection and storage was acid-washed prior to use by soaking in 15% nitric acid for 24 h, followed by rinsing repeatedly in high purity water (>18 MΩ cm). After rinsing, the labware was placed to dry under a laminar flow hood.

2.3. Sampling and fish metal analyses

The fish in individual cages were sacrificed after 5, 10, 20, 30, 50 and 70 d of exposure. In addition to caged fish, indigenous perch were also collected from both lakes by seining at the beginning of the experiment and at 2–3 additional times over the summer ($N=7-11$ fish at each sampling time). Fish were transported live back to a nearby laboratory (<2 h) where they were killed by a blow to the head after which they were immediately dissected and the gills, gastrointestinal tract (gut) and

kidney were collected for metal analyses. The liver was also removed and pooled into groups of five individual livers and stored in liquid nitrogen for sub-cellular analyses (see description below).

For metal analyses, the organs were first lyophilized, weighed and then digested in 70% HNO_3 (approximately 3 mL acid per g dry weight of tissue). Digestions were carried out in an autoclave (120–125 °C, 1.1–1.3 kg/cm^2, 3 h). During each digestion run, both blanks (HNO_3 and MilliQ water) and certified reference samples (lobster hepatopancreas, National Research Council of Canada, NRCC, TORT-1 and TORT-2) were included. The digested samples were then analyzed for Cd, Cu and Zn by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES, Vista AX). Low to negligible contamination was detected in the digestion blanks ($N=7$): Cd <0.33 μg/L; Cu <0.61 μg/L; Zn <0.30 μg/L. Certified samples were quantitatively recovered ($N=7$): Cd (96±SE 2%); Cu (90±SE 3%). Zinc recoveries were somewhat lower at 80±SE 3%.

2.4. Water chemistry

Water samples were collected in June from both study lakes by in situ dialysis. The dialysis sampler consisted of 250 mL jars (Nalgene) covered with a filter membrane (0.2 μm polysulfone; Pall Gelman Sciences, HT-200, Ville St-Laurent, QC). The dialysis samplers ($N=3$) were fixed to a plastic rod approximately 30 cm above the sediment. The samplers were allowed to equilibrate for 10 d in each lake, as previous work had shown that this period was sufficient to achieve equilibrium with the ambient lake water (C. Fortin, INRS-ETE, personal communication). After equilibration with the surrounding waters, the samplers were recovered, carefully sealed and sent on ice to a laboratory in Québec City within 24 h of retrieval from the lakes. At the time of retrieval, the ambient pH was also measured in both lakes at a depth of 0.5 m, near the dialysis samplers with a pH meter (Hanna Hi 9025). Sub-samples of water were removed from the samplers for analysis of major anions (SO_4, PO_4, NO_3, Cl), cations (Ca, Mg, K, Na), total dissolved trace metals (Al, Fe, Cd, Cu, Zn) and dissolved organic and inorganic carbon. These solutes were measured as follows: major cations by ICP-AES (Varian, Vista AX); anions by ion chromatography (Dionex AutoIon, DX300); inorganic carbon by a hot wire detector (HWD) gas chromatograph (Perkin Elmer, Sigma 300) and organic carbon by a total organic carbon analyzer (Schimadzu, TOC-5000A). Blanks and appropriate standard reference materials for these analyses were included and the analytical results were within the expected range. Using the above lake water analyses, the aqueous free ion metal concentrations were estimated for the two study lakes using the Windermere Humic Aqueous Model (WHAM 6.0.1; Tipping, 1998).

2.5. Hepatic sub-cellular partitioning of metals

For sub-cellular analyses, liver samples were removed from liquid nitrogen, gently thawed and homogenized by hand in two volumes of cold 0.9% NaCl in a glass Potter-Elvehjem homogenizer. Following homogenization, the tissue homogenates were transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes and were subjected to a differential centrifugation protocol adapted from Wallace et al. (2003). The homogenized tissue was first subjected to an $800\times g$ centrifugation for 15 min at 4 °C. This step produced a supernatant containing organelles and proteins, and a pellet containing cellular debris. The supernatant from this first homogenization was then subjected to an ultracentrifugation at 100 000$\times g$ for 60 min at 4 °C. Following this centrifugation, a pellet containing organelles was obtained. The supernatant obtained from this centrifugation contained cytostolic macromolecules such as proteins and low molecular weight peptides. This supernatant then underwent a heat denaturation step (80 °C for 10 min), followed by placement on ice for 1 h. Following this denaturation step, the supernatant was centrifuged at 50 000$\times g$ for 10 min at 4 °C. This step produced a pellet containing heat-denaturable proteins (HDP), such as enzymes, and a supernatant containing heat-stable proteins and peptides (HSP), such as metallothionein, glutathione and metallothionein-like proteins.

Four fractions were obtained by this centrifugation procedure: cellular debris; organelles; HDP and HSP. The pellets were lyophilized and the dry weight was recorded. Pellets were then digested in 70% HNO_3 for 5 d at room temperature, after which they were diluted to 2% HNO_3 with ultrapure water. Supernatants were not lyophilized, but rather were acidified to 2% HNO_3. Metal concentrations in the sub-cellular fractions were analyzed by ICP-MS (Thermo Elemental, X Series) and results were expressed as concentrations (μg/g dry weight liver). Blanks and a certified reference material (TORT-1) were digested in the same manner. Blanks indicated negligible contamination (Cd <0.013 μg/L, Cu <0.57 μg/L, Zn 3.1 μg/L), and the recoveries of TORT-1 reference samples ($N=4$) were: Cd (96±SE 8%); Cu (101±SE 11%) and Zn (89±SE 12%).

2.6. Differential centrifugation quality control

To obtain a measure of the total metal content of the livers, an aliquot of the initial homogenate was taken for metal analyses before the first centrifugation step and was digested according to the same protocol as the other sub-cellular pellets. This aliquot was also used in a mass balance calculation to verify the recovery of metals in

the various sub-cellular fractions. Average ($N=9$) metal mass balance recoveries ((sum of metal burdens in the 5 fractions/metal burden in the aliquot)×100) were: Cd (92±SE 4%); Cu (90±SE 7%) and Zn (97±SE 5%).

2.7. Statistical analyses

All data points are presented as means±SE of the mean. The Student's t-test was used to evaluate the differences between metal concentrations in indigenous yellow perch from Lake Dufault and Lake Opasatica as well as differences between transplanted and caged control fish. Changes in the sub-cellular burden (expressed as percent metal burden) in transplanted fish were compared temporally with a one-way analysis of variance (ANOVA) using a Tukey–Kramer honest significant difference (HSD) post-hoc test ($P\leq 0.05$).

3. Results

3.1. Water chemistry and indigenous yellow perch metal concentrations

Analysis of water samples showed higher concentrations of metals (Cd, Cu, and Zn) in Lake Dufault compared to Lake Opasatica both for total dissolved metal levels and free ion concentrations (Table 1). For total dissolved metals, the greatest difference between the two lakes (expressed as the ratio $[M]_{Dufault}/[M]_{Opasatica}$) was observed for Zn, followed by Cd and then Cu. For free metal ion concentrations, the ratios of $[M^{z+}]_{Dufault}/[M^{z+}]_{Opasatica}$ were considerably higher, reflecting greater metal complexation in lake Opasatica; they decreased in the order: Cu>Zn>Cd (Table 1). These results are similar to those reported in a previous study on the same lakes (Giguère et al., 2004).

In response to the higher levels of ambient Cd in Lake Dufault, concentrations of this metal in the gills, gut, liver and kidney of indigenous yellow perch from this lake were significantly higher ($P\leq 0.001$) than in fish from Lake Opasatica (Table 2). In both lakes the highest accumulated Cd concentrations were observed in the liver and the kidney. Copper and Zn concentrations were also significantly higher ($P\leq 0.01$) in the gills and liver of perch from Lake Dufault than in those from Lake Opasatica, and the highest Cu and Zn levels were seen in the liver and kidney, respectively (Table 2).

3.2. Metal accumulation dynamics

3.2.1. Cadmium

Cadmium concentrations in transplanted yellow perch increased over the 70 d exposure period in all the organs examined. Accumulation of Cd in the gills and gut occurred rapidly; Cd concentrations present in these organs by day 10 of the transplantation were significantly higher ($P\leq 0.01$) than those in caged controls. The accumulation patterns in the gills and the gut seemed to vary over the transplantation period. In the gills, uptake increased to a peak value on day 30, then dropped on days 50 and 70 (Fig. 1A). Levels of Cd in the gut increased until day 30, then decreased on day 50, followed by an increase again by day 70 (Fig. 1B). In contrast to the gills and gut, for the kidney and liver there was a lag period of 10–20 d, after which levels of Cd increased progressively over the 70 d exposure period (Fig. 1C,D, respectively). However, at the end of 70 d of exposure, the concentrations of Cd in liver (33±5.5 μg/g) and kidney (40±3.4 μg/g) in transplanted fish were still less than those in these organs in fish living naturally in Lake Dufault (73±5.5 μg/g and 59±4.9 μg/g, respectively, for the liver and kidney; see Table 2).

3.2.2. Copper and zinc

The dynamics of branchial Cu and Zn were similar; there was an initial jump in concentrations by day 5, followed by a drop in concentration on day 10. Following this drop, concentrations of both metals began to rise again gradually until a plateau was reached by day 50 (Figs. 2A and 3A). In the gut, Cu concentrations were significantly elevated ($P\leq 0.05$) in transplanted fish, whereas Zn concentrations were variable over time but did not differ significantly from the caged controls (Figs. 2B and 3B). The results for Cu accumulation in the gut displayed a pattern similar to the results seen for Cd in this organ, increasing to a peak on day 30, dropping in concentration on day 50 and increasing again on day 70. In the kidney, Cu and Zn concentrations increased progressively (Figs. 2C and 3C). Copper concentrations also increased in the liver of transplanted fish, but the results for Zn were more variable in this organ (Figs. 2D and 3D). By the end of

Table 1
Aqueous metal concentrations for Lake Opasatica and Lake Dufault[a]

Lake	Location	pH	[Cd] (nM)	$[Cd^{2+}]$ (nM)	[Cu] (nM)	$[Cu^{2+}]$ (nM)	[Zn] (nM)	$[Zn^{2+}]$ (nM)	$[Ca^{2+}]$ (μM)
Opasatica (Op)	48°5′ N, 79°20′ W	8.1	0.21	0.01	39	7.3×10^{-5}	18	1.2	369
Dufault (Du)	48°20′ N, 79°0′ W	7.3	1.7	0.66	136	1.7×10^{-2}	330	120	155
Ratio (Du/Op)			8	46	4	230	18	100	0.4

[a] Free Ca^{2+}, Cd^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} concentrations were estimated using the Windermere Humic Aqueous Model (WHAM 6.0.1; Tipping, 1998).

Table 2
Concentrations of Cd, Cu and Zn in indigenous yellow perch collected from Lake Opasatica and Lake Dufault (mean of four sampling times over the summer ± SE; $N=7-11$)

Organ	Metal	Opasatica	Dufault
Gills	Cd	0.31 ± 0.02	4.1 ± 0.31***
	Cu	4.9 ± 0.18	8.3 ± 0.91**
	Zn	99 ± 2.5	132 ± 1.7***
Gut	Cd	0.91 ± 0.06	6.1 ± 0.47***
	Cu	7.8 ± 0.57	7.4 ± 0.46
	Zn	101 ± 5.4	103 ± 3.2
Kidney	Cd	5.7 ± 0.78	59 ± 4.9***
	Cu	14 ± 1.4[a]	19 ± 1.9[a]
	Zn	605 ± 73	563 ± 47
Liver	Cd	3.1 ± 0.17	73 ± 5.5***
	Cu	14 ± 2.1	75 ± 8.4***
	Zn	90.5 ± 3.5	130 ± 5.3***

Significant differences in perch metal concentrations between lakes are represented by $^{**}P<0.01$ and $^{***}P<0.001$.
[a] Results taken from 2001 ($N=12$, 6 fish sampled at twice over the summer), whereas all the other fish were collected in 2002.

70 d exposure, Cu and Zn concentrations in the liver and kidney of transplanted fish were approximately equal to those in indigenous fish living in Lake Dufault (Table 2), suggesting that a steady-state was attained for these essential metals in the transplanted fish.

3.3. Hepatic sub-cellular metal partitioning dynamics

3.3.1. Cadmium

Cadmium associated with the HSP fraction increased significantly ($P\leq0.05$) from approximately 20% of the cellular burden at time 0 to approximately 50% at the end of the study (Fig. 4C). Cadmium concentrations also increased progressively in this fraction (Fig. 5C) and concentrations in transplanted fish were significantly higher than those in controls on days 10, 50 and 70 ($P\leq0.05$). At the end of 70 d of transplantation, Cd concentrations decreased in the order: HSP > cellular debris > organelles > HDP (Fig. 5A–D).

3.3.2. Copper and zinc

Most of the Cu burden was also associated with the HSP fraction (≈40%) and this distribution did not change significantly ($P>0.05$) during the exposure period (Fig. 4C). Copper concentrations increased progressively in the HSP fraction (Fig. 6C), and concentrations were significantly higher than control concentrations on both day 50 and day 70 ($P\leq0.01$). At the end of the transplantation, Cu concentrations were highest in the HSP fraction, followed by the organelles > cellular debris ≈ HDP fraction.

As expected from the total hepatic Zn results, the sub-cellular partitioning of this metal was similar between transplanted and caged fish (with the exception of day 50 in the HSP fraction; Fig. 7C). Unlike the sub-cellular results for Cd and Cu, the majority of Zn was not associated with the HSP fraction, but rather followed the order: organelles > HDP > cellular debris > HSP (Fig. 7A–D).

4. Discussion

4.1. Metal accumulation dynamics

4.1.1. Cadmium

Concentrations of Cd, a non-essential metal, were not regulated at the organ level, as shown by significantly ($P\leq0.001$) higher concentrations of this metal in all organs from indigenous Lake Dufault fish compared to those from Lake Opasatica (Table 2). In the transplanted fish, Cd accumulated quickly in the gills and gut, and concentrations in transplanted fish were similar to those in indigenous Lake Dufault fish by day 10 (compare Table 2 and Fig. 1A,B). A similar quick response of these organs to aqueous Cd was reported in laboratory studies on rainbow trout (Giles, 1988; McGeer et al., 2000). In the current study, Cd concentrations in the gills and gut of transplanted fish appeared to peak on day 30, followed by a slight decrease in concentrations on day 50. Since the gills and the gut are in direct contact with the ambient water and ingested food, these organs would be expected to respond quickly to changes in Cd exposure. The observed variations in Cd concentrations in these organs in the transplanted fish could thus be a result of slight changes in ambient Cd concentrations.

It is interesting to note that Cd concentrations appeared to peak on day 30 in the gills and gut, whereas there appeared to be little change in Cd concentrations in the kidney and almost no change in hepatic Cd during the first 10–20 d of the transplantation (Fig. 1C,D). This 10–20 d lag period shows that accumulation of Cd in these two organs does not occur instantaneously with exposure of perch to a Cd-contaminated environment. The length of this lag period differs from that observed in a previous laboratory study where hepatic and renal Cd concentrations were significantly higher in exposed rainbow trout within the first few days of exposure (McGeer et al., 2000). However, in a subsequent study from the same laboratory, longer lag periods were seen in exposed rainbow trout, with renal and hepatic Cd concentrations only exceeding control values after 30 and 10 d of exposure to aqueous Cd, respectively, for these two organs (Hollis et al., 2001). It should be noted, however, that these previous studies considered different species of fish and the metal exposures (waterborne only) were approximately 15 times higher than those in the current study (compare 27 nM total aqueous Cd in the laboratory studies to 1.7 nM in the current study).

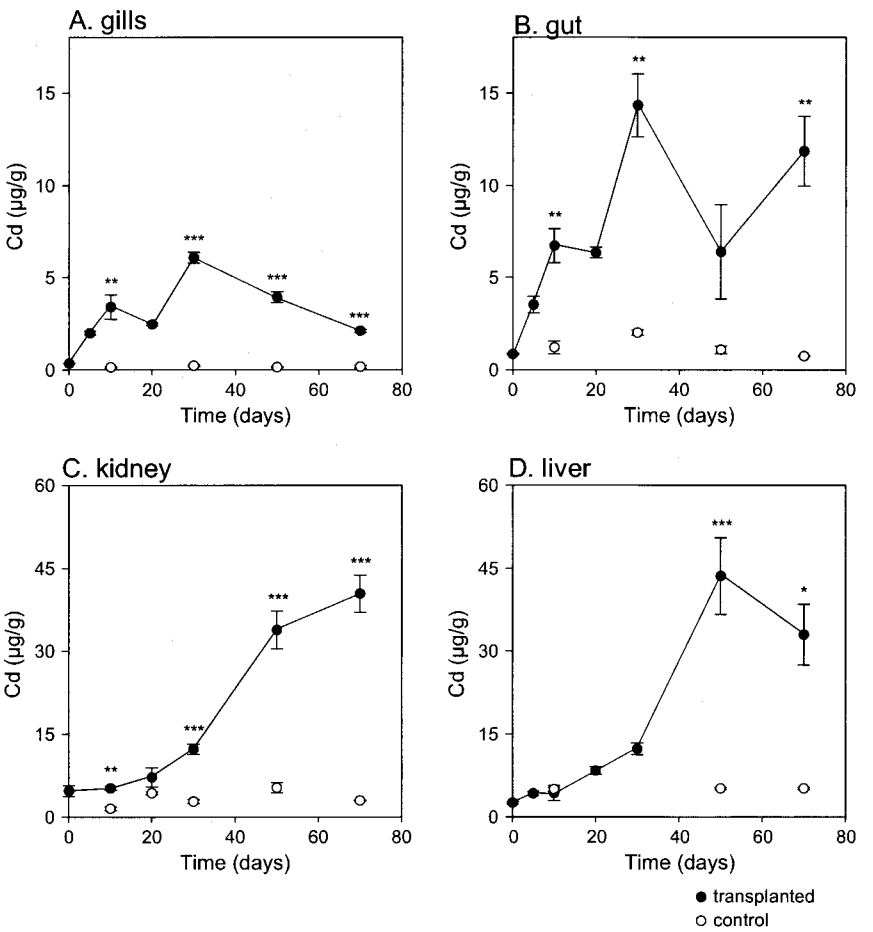


Fig. 1. Cadmium accumulation in yellow perch following transplantation from a reference lake to a metal-contaminated lake. Solid circles represent means±SE ($N=3$ replicates of five animals) for yellow perch transplanted from Lake Opasatica (reference lake) to Lake Dufault (metal-contaminated lake). Open circles represent means for fish from Lake Opasatica, which were caged within Lake Opasatica, thus representing caged controls. $*P\leq0.05$; $**P\leq0.01$; $***P\leq0.001$.

4.1.2. Copper and zinc

The uptake of aqueous metals via the gills represents an important route of exposure for Cu and Zn (Spry et al., 1988; Kamunde et al., 2002). In the current study, a peak in branchial Cu accumulation occurred around day 5, where Cu concentrations in transplanted yellow perch were approximately five times higher than controls (Fig. 2A); a similar but less pronounced trend was also seen for Zn (Fig. 3A). These initial increases in gill metal concentrations were likely caused by the binding of these metals to branchial mucus. The mucus discharge rate has been shown to increase in response to cortisol, a hormone that responds quickly to handling stress (Barton et al., 1998; van der Salm et al., 2002). Thus, the decrease in branchial Cu by day 10 may well reflect a reduction in mucus discharge as the fish recovered from the stress of capture and transplantation. This gill mucus layer likely acted as a transitory barrier preventing accumulation of these metals by gill tissue, but after 10 d it no longer afforded protection to the underlying gill tissue. A similar response was seen in Al-exposed Atlantic salmon where the gill mucus layer was reported to slow Al transport from solution to the gills surface, thereby delaying uptake of this metal (Wilkinson and Campbell, 1993). In the present study, gill Cu and Zn increased after day 10, with steady state occurring after approximately 40 d of exposure for both metals (Figs. 2A and 3A). A similar response was seen in a previous study of similar duration (100 d) where the gills of exposed rainbow trout appeared to reach steady state following 20–30 d of Cu exposure (McGeer et al., 2000).

Uptake of aqueous Cu and Zn is not the only way these metals can enter fish, as dietary uptake via the gut can also play a role (Spry et al., 1988; Kamunde et al., 2002). There were significant ($P\leq0.05$) increases in Cu concentrations in the gut of transplanted fish by 5–10 d of exposure (Fig. 2B), and these elevated concentrations were maintained thereafter. Kamunde et al. (2002) observed a similar result as Cu concentrations increased

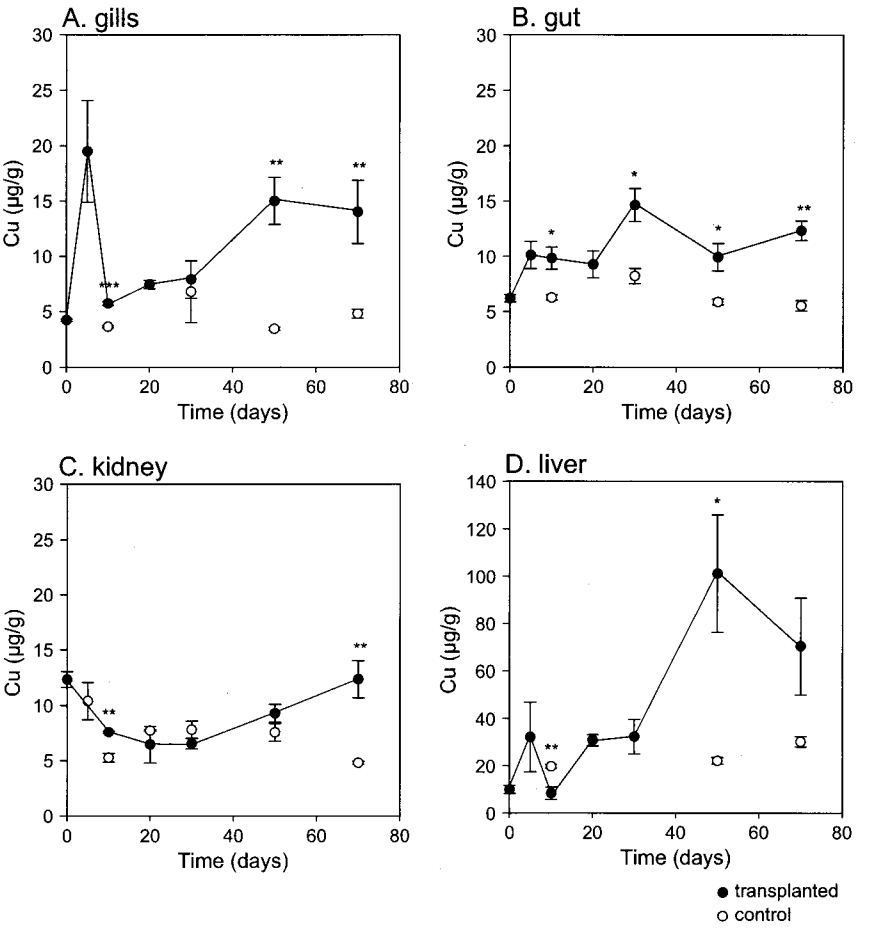


Fig. 2. Copper accumulation in yellow perch following transplantation from a reference lake to a metal-contaminated lake. Solid circles represent means±SE ($N=3$ replicates of five animals) for yellow perch transplanted from Lake Opasatica (reference lake) to Lake Dufault (metal-contaminated lake). Open circles represent means for fish from Lake Opasatica, which were caged within Lake Opasatica, thus representing caged controls. $^{*}P\leq0.05$; $^{**}P\leq0.01$; $^{***}P\leq0.001$.

significantly in gut tissues of rainbow trout exposed to elevated dietary Cu during an 8-week exposure period. These authors suggested that prolonged exposure to dietary Cu stimulated clearance from the gut (by internalization to the liver or other organs, or loss through mucosal exfoliation of the gut lining), or a decrease in dietary absorption (Kamunde et al., 2002). Since Cu concentrations in the gut of uncaged indigenous perch living chronically in a Cu-contaminated environment in the current study were not different from those in the reference environment (Table 2), the significant increases in Cu concentrations seen in the gut of transplanted fish were likely transitory; as the fish acclimated to elevated Cu concentrations in the new lake, these levels would likely decrease over time to levels similar to those in the control fish.

Similar to gut Cu, concentrations of Zn in the gut were never significantly higher in indigenous fish from Lake Dufault than in fish from Lake Opasatica (Table 2). However, unlike the results for Cu, Zn concentrations in the transplanted fish were also never significantly higher than in control fish (Fig. 3B). These results demonstrate that concentrations of this metal are regulated in the gut of perch, which is consistent with the essential nature of this metal. In further support of this conclusion, there was also a lack of Zn accumulation reported in the intestines of several native fish species collected from a Zn-contaminated river in France (Andres et al., 2000).

The liver and kidney are typically important for metal accumulation and storage in fish, especially in metal-contaminated environments (Giguère et al., 2004). Consistent with this role, Cu concentrations were significantly higher in the liver of indigenous yellow perch from Lake Dufault, but renal Cu concentrations were similar in these two fish populations (Table 2). In transplanted fish, the importance of the liver as a Cu storage organ was also apparent, as Cu concentrations were approximately seven times higher in the liver than the kidney after 70 d of exposure (Fig. 2). Similar results

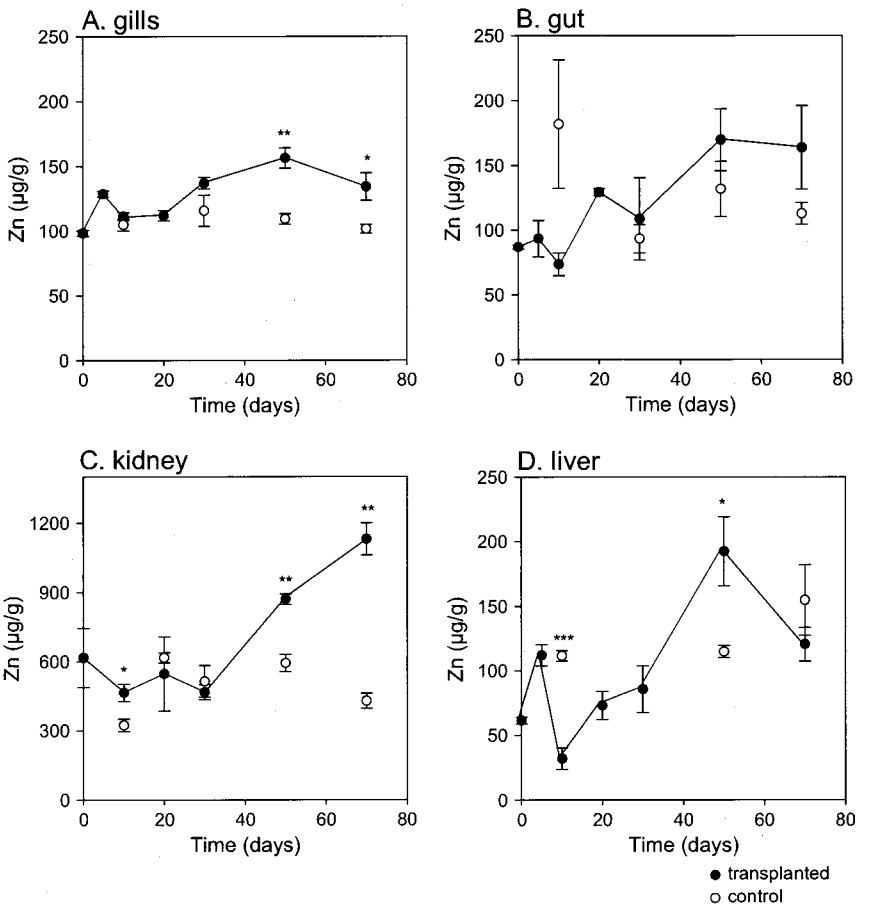


Fig. 3. Zinc accumulation in yellow perch following transplantation from a reference lake to a metal-contaminated lake. Solid circles represent means± SE ($N=3$ replicates of five animals) for yellow perch transplanted from Lake Opasatica (reference lake) to Lake Dufault (metal-contaminated lake). Open circles represent means ±SE for fish from Lake Opasatica, which were caged within Lake Opasatica, thus representing caged controls. $^{*}P\leq0.05$; $^{**}P\leq0.01$; $^{***}P\leq0.001$.

were observed in rainbow trout exposed to radioactive Cu by intestinal infusion, where the liver was also shown to be the major target organ but the kidney was less important for copper accumulation (Clearwater et al., 2000). The liver not only accumulates new Cu, but it also plays an important role in Cu homeostasis (Grosell et al., 1997).

Zinc concentrations are also under homeostatic control in the liver and kidney of fish, often to a greater degree than Cu (Andres et al., 2000; McGeer et al., 2000). In the current study, a 100-fold higher concentration of bioavailable Zn (Zn^{2+}) in the contaminated lake compared to the reference lake resulted in only a 1.5-fold increase in hepatic Zn concentrations in the indigenous fish, whereas renal Zn concentrations were not significantly higher in fish from the contaminated lake (Table 2). Considering the indigenous perch results, we were surprised to see higher concentrations of Zn in the kidneys of transplanted fish relative to controls, but not in the liver (Fig. 3C,D). The transplanted fish were from a reference population of perch, and thus it is possible that these fish are attempting to acclimate to elevated concentrations of Zn in Lake Dufault by increasing the biliary excretion rate of Zn. A recent study on rainbow trout by Chowdhury et al. (2003) demonstrated that Zn concentrations increased in the bile of rainbow trout following an injection with radio-labelled Zn, suggesting that biliary excretion plays an important role in maintaining Zn homeostasis.

4.2. Hepatic sub-cellular metal partitioning dynamics

4.2.1. Cadmium

The heat-stable protein (HSP) fraction became increasingly important for cellular Cd as approximately 20% of the cellular burden was located in this fraction on day 5 compared to almost 50% of the burden on day 70 (Fig. 4C). Cadmium concentrations were also approximately three times higher in this fraction at the end of the exposure when compared to the other fractions (Fig. 5). The HSP fraction contains a variety of cellular ligands including amino acids, low molecular

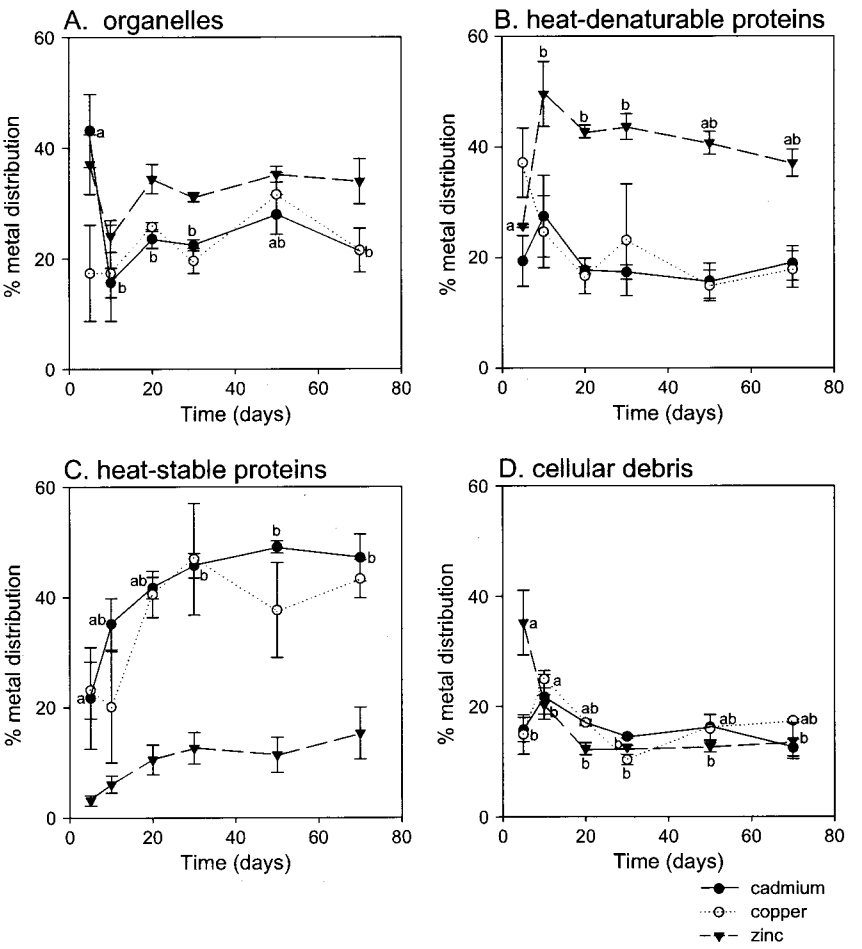


Fig. 4. Changes in the percent distribution (means ± SE) of Cd, Cu and Zn in the various sub-cellular fractions. Symbols with the same letter for each metal and sub-cellular fraction are not significantly different (ANOVA, $P \leq 0.05$). Where no significant differences in metal distribution were observed for a given sub-cellular fraction during the entire exposure period, letters were omitted. Filled circles, solid line = Cd; open circles, dotted line = Cu; inverted triangles, dashed line = Zn.

weight peptides such as glutathione, and metallothionein (MT). The role of MT in the sequestration and detoxification of certain metals, such as Cd, has been well documented in fish (Hogstrand et al., 1991; Olsvik et al., 2000, 2001; De Smet et al., 2001; Hollis et al., 2001). Olsson and Hogstrand (1987) exposed rainbow trout to waterborne Cd and used a differential centrifugation procedure similar to that employed in the current study, in addition to liquid chromatography, to demonstrate that the percentage of Cd associated with MT increased with exposure duration, whereas the proportion of Cd in the low molecular weight fraction, containing glutathione, did not change. Field studies on yellow perch collected along a spatial contamination gradient revealed increases in hepatic and renal MT concentrations in fish collected from the Rouyn-Noranda area (Laflamme et al., 2000). Subsequent studies on the sub-cellular partitioning of Cd in yellow perch liver, using fish collected from lakes along a similar gradient, also showed that Cd was most concentrated in the HSP fraction (Anik Giguère, INRS-ETE, personal communication), i.e., the fraction containing MT.

Approximately 25% of the cellular Cd burden was found in the organelle fraction (Fig. 4A), and with the exception of day 50, there were no significant differences in concentration between transplanted and control fish (Fig. 5A). A similar proportion of cellular Cd (≈20%) was associated with the heat-denaturable protein fraction (HDP); concentrations in transplanted fish showed a tendency to increase (Fig. 5B) but were not significantly different from caged values during the exposure period. Accumulation of Cd in these potentially metal-sensitive fractions has been noted in previous fish studies (Hamilton et al., 1987; Brown et al., 1990; De Smet et al., 2001). Although no toxicity endpoints were measured in the current study, the presence of Cd in these fractions would be expected to be associated with some biological impairment, especially if concentrations were to increase beyond 70 d (Wallace et al., 2000). Endocrine and metabolic perturbations have indeed been

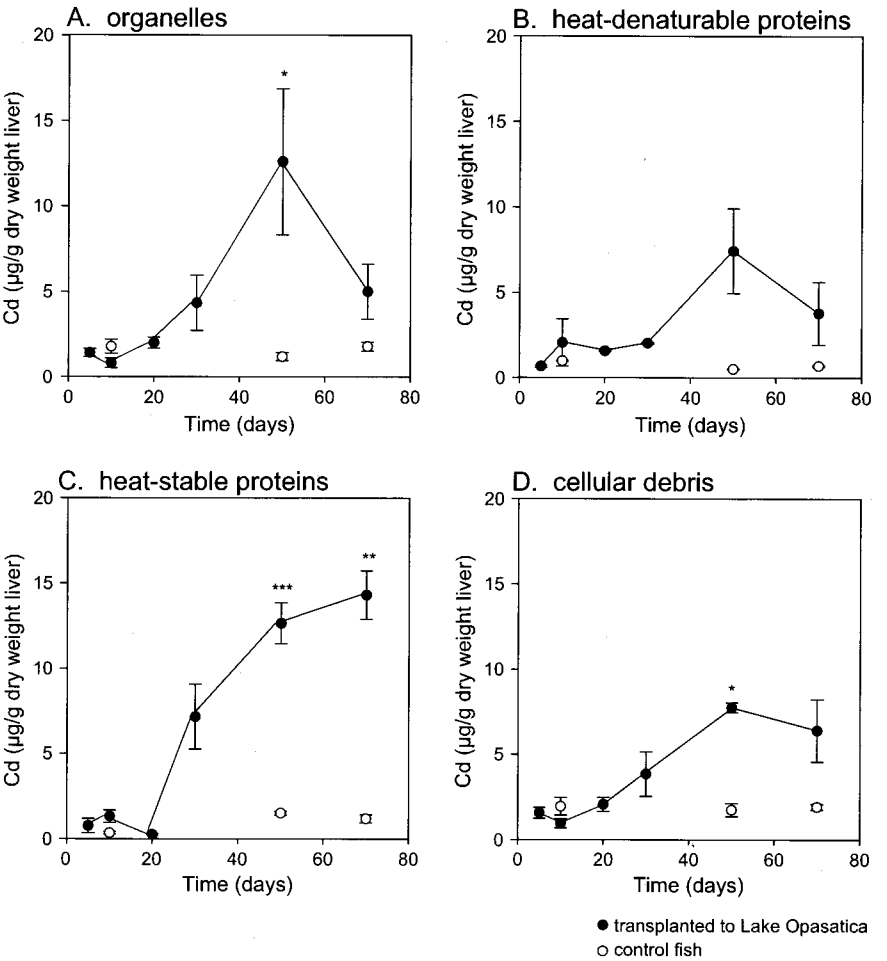


Fig. 5. Changes in sub-cellular partitioning of Cd in the liver of transplanted fish. Solid circles represent means ±SE for yellow perch transplanted from Lake Opasatica (reference lake) to Lake Dufault (metal-contaminated lake). Open circles represent means±SE for fish from Lake Opasatica, which were caged within Lake Opasatica, thus representing caged controls. $*P \leq 0.05$; $**P \leq 0.01$; $***P \leq 0.001$.

documented in chronically exposed yellow perch from the Rouyn-Noranda area (Laflamme et al., 2000; Levesque et al., 2002). Cadmium concentrations also increased in the cellular debris fraction (Fig. 5D) and during the exposure approximately 15% of the Cd burden was associated with this fraction. However, the biological significance of this accumulation is unclear, since the cellular debris pellet contains a heterogeneous mixture of tissue fragments, cell membranes and unbroken cells (Wallace et al., 2003).

4.2.2. Copper and zinc

At the end of the exposure period most of the Cu burden (≈40%) was found associated with the HSP fraction, whereas only 11% of the Zn burden was found in this fraction after 70 d of exposure (Fig. 4C). The higher proportion of cellular Cu associated with the HSP fraction compared to Zn is likely due to the stronger affinity of MT for binding Cu (Hamilton et al., 1987). In their study of perch (*Perca fluviatilis*), Hogstrand et al. (1991) also observed that hepatic MT was associated more with Cu than Zn. Furthermore, the relative proportion of cellular Cu bound to MT increased in metal-exposed fish, demonstrating the importance of MT in Cu regulation, especially in Cu-contaminated environments (Hogstrand et al., 1991). A similar response was also observed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) collected from reference and metal-contaminated sites in the Campbell River system in British Columbia (Roch et al., 1982); Cu and Cd were found bound to MT, whereas most of the cellular Zn was found not in the MT fraction, but rather in the high molecular weight protein fraction.

Concentrations of Cu and Zn were slightly elevated in the HDP fraction of transplanted fish, but the concentrations were not significantly different from control fish (Figs. 6B and 7B). In addition, the relative cellular Cu and Zn burdens in this fraction did not increase with time, remaining approximately at 20% and 40%, respectively, for Cu and Zn (Fig. 4).

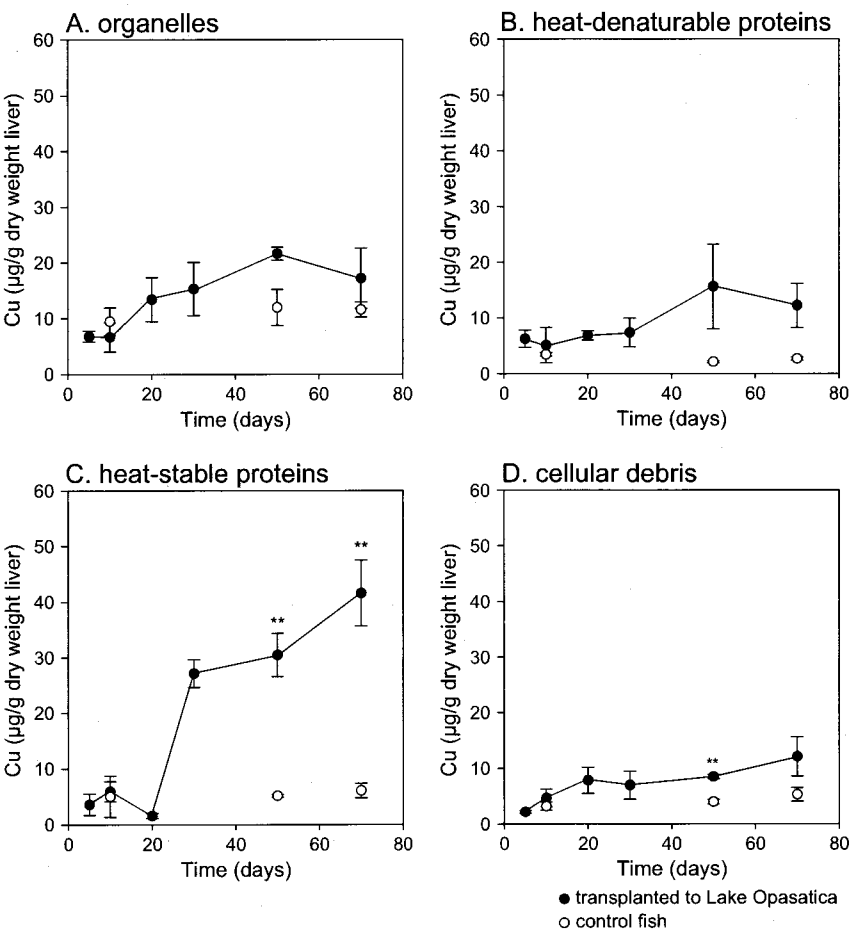


Fig. 6. Changes in sub-cellular partitioning of Cu (means±SE) in the liver of transplanted fish. Solid circles represent means±SE for yellow perch transplanted from Lake Opasatica (reference lake) to Lake Dufault (metal-contaminated lake). Open circles represent means±SE for fish from Lake Opasatica, which were caged within Lake Opasatica, thus representing caged controls. $^{**}P \leq 0.01$.

The occurrence of these metals in the HDP fraction presumably reflects the presence of metalloenzymes that require Cu and Zn as cofactors. Since no significant increase in Cu or Zn concentrations was observed in this fraction, we conclude that movement of excess Cu or Zn into this potentially metal-sensitive fraction did not occur in the time frame of our study.

Lack of increased Zn accumulation in the organelle and cellular debris fractions suggests that concentrations of this metal are regulated. Throughout our study, ≈35% of the cellular Zn burden was associated with the organelle fraction, likely a result of the essential nature of this metal for various cellular functions. Approximately 20% of cellular Cu was associated with both the organelle and cellular debris fractions throughout the study. The association of Cu with these two fractions could be the result of the metabolically essential nature of Cu, or it could be the result of storage of excess cellular Cu in secondary and tertiary lysosomes. Using differential centrifugation, Bunton et al. (1987) demonstrated that 90% of hepatic Cu was found in the pellet containing nuclei/cellular debris, which was thought to contain tertiary lysosomes in Cu-exposed white perch (*Morone americana*). Furthermore, previous studies on various species of Cu-exposed fish have shown that secondary and tertiary lysosomes are important for storing this metal (Lanno et al., 1987; Weis et al., 1987). These Cu-rich granules also contained large amounts of sulfur, perhaps due to large amounts of partially degraded sulfur-rich proteins, such as metallothionein (Lanno et al., 1987). Lanno et al. (1987) proposed that the storage of Cu within these granules might be important in the elimination of excess cellular Cu via bile.

5. Conclusions

This study showed that field transplanted yellow perch responded to increased ambient concentrations of Cd, Cu and Zn differently. Concentrations of Cd increased over time in the organs examined, suggesting that little regulation at the levels of uptake/elimination

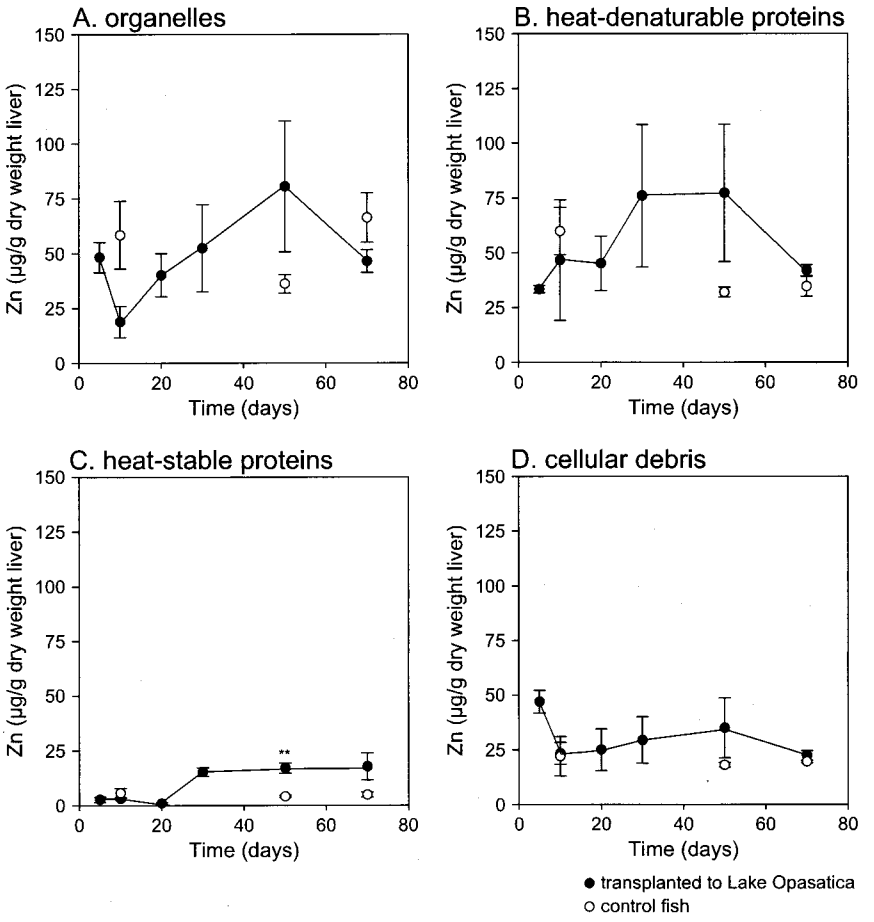


Fig. 7. Changes in sub-cellular partitioning of Zn (means ± SE) in the liver of transplanted fish. Solid circles represent means ± SE for yellow perch transplanted from Lake Opasatica (reference lake) to Lake Dufault (metal-contaminated lake). Open circles represent means ± SE for fish from Lake Opasatica, which were caged within Lake Opasatica, thus representing caged controls. $*P \leq 0.05$; $**P \leq 0.01$; $***P \leq 0.001$.

of this metal occurred. Instead, sub-cellular regulation of this metal played a more important role as the fraction containing metallothionein became an increasingly important sink for hepatic Cd over time.

Concentrations of Zn increased slightly in the gills and kidney over time, but despite a 100-fold higher concentration of bioavailable Zn (Zn^{2+}) in the contaminated lake, Zn concentrations did not increase significantly in the gut or liver. There was little Zn associated with the MT-containing fraction of the liver. Thus, in contrast to Cd, regulation of the uptake and/or elimination of Zn appeared to be the main regulatory mechanism used in response to increased ambient Zn concentrations.

The regulation of Cu appeared to involve a combination of the two strategies used for Cd and Zn. Some Cu did accumulate in the organs examined, albeit to a lesser extent than Cd. At the sub-cellular level, hepatic Cu accumulated mainly in the fraction containing MT. These observations suggest that regulation at the level of Cu uptake/elimination, together with sub-cellular sequestration by MT, work to maintain Cu homeostasis in juvenile yellow perch exposed to increases in ambient concentrations of this metal.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Metals in the Environment Research Network (MITE-RN). We would like to thank the Société de la Faune et des Parcs de l'Abitibi-Témiscamingue (Government of Québec) for their logistical help with the field study. Also, we would like to thank Amélie Cliche, Sophie Cooper, Anabel Carrier and Philipe Bourret for their field assistance and Michelle Geoffroy-Bordeleau, Pauline Fournier and Sébastien Duval for their help in the laboratory. Anik Giguère and Emmanuelle Bonneris provided advice regarding the application of the differential centrifugation procedure. Constructive comments from the reviewers are gratefully acknowledged. P.G.C. Campbell is supported by the Canada Research Chair programme.

References

Andres, S., Ribeyre, F., Tourencq, J.-N., Boudou, A., 2000. Interspecific comparison of cadmium and zinc contamination in the organs of four fish species along a polymetallic pollution gradient (Lot River, France). Sci. Tot. Environ. 248, 11–25.

Barton, B.A., Rahn, A.B., Feist, G., Bollig, H., Schreck, C.B., 1998. Physiological stress responses of the freshwater chondrostean paddlefish (*Polyodon spathula*) to acute physical disturbances. Comp. Biochem. Physiol. A 120, 355–363.

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

Bunton, T.E., Baksi, S.M., George, S.G., Frazier, J.M., 1987. Abnormal hepatic copper storage in a teleost fish (*Morone americana*). Vet. Pathol. 24, 515–524.

Chowdhury, M.J., Grosell, M., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2003. Plasma clearance of cadmium and zinc in non-acclimated and metal-acclimated trout. Aquat. Toxicol. 64, 259–275.

Clearwater, S.J., Baskin, S.J., Wood, C.M., McDonald, D.G., 2000. Gastrointestinal uptake and distribution of copper in rainbow trout. J. Exp. Biol. 203, 2455–2466.

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

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

De Conto Cinier, C., Petit-Ramel, M., Faure, R., Garin, D., 1997. Cadmium bioaccumulation in carp (*Cyprinus carpio*) tissues during long-term high exposure: analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry. Ecotoxicol. Environ. Saf. 38, 137–143.

De Conto Cinier, C., Petit-Ramel, M., Faure, R., Garin, D., Bouvet, Y., 1999. Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp *Cyprinus carpio* tissues. Comp. Biochem. Physiol. C 122, 345–352.

De Smet, H., De Wachter, B., Lobinski, R., Blust, R., 2001. Dynamics of (Cd, Zn)-metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. Aquat. Toxicol. 5, 269–281.

Farag, A.M., Stansbury, M.A., Hogstrand, C., MacConnell, E., Bergman, H.L., 1995. The physiological impairment of free-ranging brown trout exposed to metals in the Clark Fork River, Montana. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52, 2038–2050.

Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., McDonald, D.G., Rasmussen, J.B., 2004. Influence of lake chemistry and fish age on Cd, Cu and Zn concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 61, 1702–1716.

Giles, M.A., 1988. Accumulation of cadmium by rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during extended exposure. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45, 1045–1053.

Gingras, J., Boisclair, D., 2000. Comparison between consumption rates of yellow perch (*Perca flavescens*) estimated with a digestive tract model and with a radioisotope approach. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57, 2547–2557.

Greenfield, B.K., Hrabik, T.R., Harvey, C.J., Carpenter, S.R., 2001. Predicting mercury levels in yellow perch: use of water chemistry, trophic ecology, and spatial traits. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 58, 1419–1429.

Grosell, M.H., Hogstrand, C., Wood, C.M., 1997. Cu uptake and turnover in both Cu-acclimated and non-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 38, 257–276.

Hamilton, S.J., Merhle, P.M., Jones, J.R., 1987. Evaluation of metallothionein measurement as a biological indicator of stress from cadmium in brook trout. Trans. Am. Fish. Soc. 116, 551–560.

Hogstrand, C., Lithner, G., Haux, C., 1991. The importance of metallothionein for the accumulation of copper, zinc and cadmium in environmentally exposed perch, *Perca fluviatilis*. Pharmacol. Toxicol. 68, 492–501.

Hollis, L., Hogstrand, C., Wood, C.M., 2001. Tissue-specific cadmium accumulation, metallothionein induction, tissue zinc and copper levels during chronic sublethal cadmium exposure in juvenile rainbow trout. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41, 468–474.

Kamunde, C., Grosell, M., Higgs, D., Wood, C.M., 2002. Copper metabolism in actively growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): interactions between dietary and waterborne copper uptake. J. Exp. Biol. 205, 279–290.

Köck, G., Triendl, M., Hofer, R., 1996. Seasonal patterns of metal accumulation in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from an oligotrophic Alpine lake related to temperature. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53, 780–786.

Laflamme, J.-S., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Hontela, A., 2000. Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57, 1692–1700.

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

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

McGeer, J.C., Szebedinsky, C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. Aquat. Toxicol. 50, 245–256.

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

Olsson, P.-E., Hogstrand, C., 1987. Subcellular distribution and binding of cadmium to metallothionein in tissues of rainbow trout after exposure to Cd in water. Environ. Toxicol. Chem. 6, 867–874.

Olsvik, P.A., Gundersen, P., Andersen, R.A., Zachariassen, K.E., 2000. Metal accumulation and metallothionein in two populations of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments during a run-off episode. Aquat. Toxicol. 50, 301–316.

Olsvik, P.A., Gundersen, R., Andersen, R.A., Zachariassen, K.E., 2001. Metal accumulation and metallothionein in brown trout, *Salmo trutta*, from two Norwegian rivers differently contaminated with Cd, Cu and Zn. Comp. Biochem. Physiol. C 128, 189–201.

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

Roch, M., McCarter, J.A., Matheson, A.T., Clark, M.J.R., Olafson, R.W., 1982. Hepatic metallothionein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as an indicator of metal pollution in the Campbell River system. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39, 1596–1601.

Spry, D.J., Hodson, P.V., Wood, C.M., 1988. Relative contributions of dietary and waterborne zinc in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45, 32–41.

Tipping, E., 1998. Humic ion-binding Model VI: an improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances. Aquat. Geochem. 4, 3–48.

Van der Salm, A.L., Nolan, D.T., Wendelaar Bonga, S.E., 2002. In vitro evidence that cortisol directly modulates stress-related

responses in the skin epidermis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Fish Physiol. Biochem. 27, 9–18.

Wallace, W.G., Brouwer, T.M.H., Lopez, G.R., 2000. Alterations in prey capture and induction of metallothioneins in grass shrimp fed cadmium-contaminated prey. Environ. Toxicol. Chem. 19, 962–971.

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

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

Wilkinson, K.J., Campbell, P.G.C., 1993. Aluminum bioconcentration at the gill surface of juvenile Atlantic salmon in acidic media. Environ. Toxicol. Chem. 12, 2083–2095.

9. 2e article : A field study examining metal elimination kinetics in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*)

Lisa D. Kraemer, Peter G.C. Campbell *, Landis Hare

INRS-Eau, Terre et Environnement, Université du Québec, 490 de la Couronne, Québec City, Que., Canada G1K 9A9

Aquatic Toxicology, 2005 **75**: 108–126

ELSEVIER

Aquatic Toxicology 75 (2005) 108–126

AQUATIC TOXICOLOGY

www.elsevier.com/locate/aquatox

A field study examining metal elimination kinetics in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*)☆

Lisa D. Kraemer, Peter G.C. Campbell*, Landis Hare

INRS-Eau, Terre et Environnement, Université du Québec, 490 de la Couronne, Québec City, Que., Canada G1K 9A9

Received 18 April 2005; received in revised form 24 June 2005; accepted 2 July 2005

Abstract

Currently little is known about how and at what rate fish eliminate metals in natural environments. To address this knowledge gap we examined metal elimination kinetics in the field using juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) that were caught in a metal-contaminated lake (elevated levels of Cd, Cu and Zn) and transplanted to cages held within a reference lake. Fish were sampled from the cages over 75 d and changes in metal concentrations were measured in the gills, gut, liver and kidney. In transplanted fish, Cd concentrations decreased most rapidly in the gills and gut, i.e. from organs in contact with the ambient water and food; biological half lives ($t_{1/2}$) were 18 and 37 d, respectively, for each organ. Longer half-lives were observed in the liver (75 d) and kidney (52 d) for this metal. Elimination of excess Cu by the liver and gut occurred much more rapidly, with estimated half-lives of labile Cu being 8 and 4 d, respectively, for these two organs. In contrast to Cd and Cu, there was little Zn elimination. To compare how the liver handles different metals during elimination, we used a differential centrifugation approach to examine changes in metal concentrations (Cd and Cu) at the sub-cellular level. Consistent with the long half-life observed for Cd at the whole organ level, there was no significant loss of Cd from any of the sub-cellular fractions. Copper, on the other hand, was lost from both the organelle and cellular debris fractions. As these fractions likely contain structures such as lysosomes, we suggest that Cu is depurated from the liver by direct elimination of these sub-cellular vesicles. These field results clearly demonstrate how the liver handles essential (Cu, Zn) and non-essential metals (Cd) differently during depuration.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Metal dynamics; Sub-cellular partitioning; Fish; Cd; Cu; Zn

1. Introduction

Concentrations of cadmium (Cd), copper (Cu) and zinc (Zn) often exceed background levels in lakes impacted by mining and smelting operations, and fish living in these contaminated environments are thus exposed to elevated concentrations of these metals. Cadmium is a non-essential metal, and consequently

☆ Contribution No. 46 from the Metals in the Environment Research Network (www.mite-rn.org).

* Corresponding author. Tel.: +1 418 654 2538; fax: +1 418 654 2600.
E-mail address: peter.campbell@ete.inrs.ca (P.G.C. Campbell).

0166-445X/$ – see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.aquatox.2005.07.007

accumulation of this metal by fish has no nutritional or metabolic benefit and can be linked to toxicity. Copper and Zn differ from Cd in that they are essential metals, and thus certain bioavailable levels of these metals must be maintained to satisfy cellular needs. Nevertheless, in Cu- and Zn-contaminated environments, bioavailable concentrations of these metals within the fish must be controlled to prevent toxicity.

An understanding of the dynamics of metal uptake and elimination in fish in natural environments is critical if we are to be able to predict metal accumulation and effects in indigenous fish populations. Typically metal uptake and depuration studies are carried out in a laboratory setting (de Conto Cinier et al., 1999; Kargin and Cogun, 1999; Kim et al., 2004), where fish are often exposed to unnatural exposure conditions (e.g., environmentally unrealistic metal concentrations, aqueous exposures only and studies of short duration). Furthermore, laboratory studies examining metal dynamics in fish often use a species that is typically not found in metal-contaminated lakes (Harrison and Klaverkamp, 1989; Giles, 1988). Due to these differences in experimental design, extrapolation of the results from laboratory studies to fish found in contaminated field environments is difficult, if not impossible.

The goal of our study was to address this knowledge gap by studying metal dynamics in yellow perch (*Perca flavescens*), a species of fish that is typically found in both pristine and metal-contaminated lakes (Sherwood et al., 2000; Giguère et al., 2004). The current study was designed to examine metal elimination kinetics in perch transplanted from a metal-contaminated lake to cages held within a reference lake. This study complements a previous field study where the transfer was performed in the opposite direction and metal accumulation dynamics were examined in this same species (Kraemer et al., 2005). In addition to examining elimination kinetics in individual organs, we also examined how the sub-cellular partitioning of metals changed in the liver during the depuration phase. Since Cd can be considered a non-essential element, we expected that it would not be under the same degree of homeostatic control as Cu and Zn, and that its rate of loss would be slower than for the essential metals. Given the importance of metallothionein in the sequestration and homeostasis of Cu (Hogstrand et al., 1991; Mason and Jenkins, 1995; Kraemer et al., 2005), we hypothesized that excess Cu associated with this sub-cellular fraction would decrease during the depuration phase. Finally, since Zn concentrations appear to be tightly regulated in yellow perch (Giguère et al., 2004; Kraemer et al., 2005), we expected Zn concentrations in the fish from the contaminated lake to be close to normal levels, and thus no appreciable loss of this metal was anticipated to occur during the transplantation.

2. Materials and methods

2.1. Yellow perch as a sentinel species

In field studies, yellow perch (*P. flavescens*) show potential as a sentinel fish species for metals as they are commonly found in both reference and metal-contaminated lakes (Sherwood et al., 2000; Giguère et al., 2004). There have been numerous field studies with yellow perch demonstrating not only metal bioaccumulation and partial detoxification (Laflamme et al., 2000; Levesque et al., 2002; Rajotte and Couture, 2002; Giguère et al., 2004; Kraemer et al., 2005), but also physiological impairment including endocrine dysfunction (Laflamme et al., 2000), altered physiological capacities (Levesque et al., 2002; Couture and Kumar, 2003) and lower condition (Levesque et al., 2002) in perch living in metal-contaminated environments.

2.2. The study area and experimental design

The two study lakes (Opasatica and Dufault) are located in the Abitibi region, centred around the city of Rouyn-Noranda, approximately 600 km northwest of Montreal, Que., Canada. A copper smelter has been in operation since 1927 in the city of Rouyn-Noranda, and although emissions are currently controlled, lakes located downwind from this smelter are contaminated with metals such as Cd, Cu and Zn due to past atmospheric deposition (Couillard et al., 2004). In addition to these direct inputs from the smelter, some lakes in this region also receive runoff from mine tailings and mineralized outcrops present in their watersheds. Lake Dufault, the metal-contaminated lake used in this study, is located directly beside the smelter and downwind from the stack; Lake Opasatica, the chosen reference lake, is located about 40 km upwind from the smelter.

A transplantation experiment was used to study metal elimination dynamics in the field. Juvenile yellow perch weighing less than 5 g were chosen because it is known that this size class of fish feeds mainly on zooplankton and small aquatic insects (Gingras and Boisclair, 2000), and thus enclosures could be designed to permit the entry of zooplankton, allowing the caged fish to feed ad libitum. The enclosures were 2.5 m deep and 1.7 m in diameter (volume: 5.7 m^3), with walls made of a 0.5 cm polypropylene mesh. The free hanging cages were suspended from floating rafts made of ABS (Acrylonitrile Butadiene Styrene) tubing (10 cm diameter) and each raft supported four cages.

Juvenile yellow perch were collected by seining from Lake Dufault at the end of May (water temperature: 11 °C) and then were transferred to Lake Opasatica and kept in cages there for up to 75 d (water temperature at the end of the study: 20 °C). Each cage initially contained 50–60 fish.

2.3. Labware

To minimize trace metal contamination, all plastic labware used for sample collection and storage was acid washed prior to use by soaking in 15% nitric acid for 24 h, followed by rinsing repeatedly in high purity water (>17 MΩ cm). After rinsing, the labware was dried under a laminar flow hood.

2.4. Sampling and tissue metal analyses

Individual cages were sampled after 10, 20, 40, 50, 60 and 75 d. In addition to caged fish, indigenous perch were also collected from both lakes by seining at the beginning of the experiment (27–28 May, 2003) and at two additional times in Lake Opasatica (7 and 25 July, 2003) (N = 11–15 fish); these specimens were analyzed to give a measure of metal concentrations in the fish living naturally in each lake. Fish were transported live back to a nearby laboratory (<2 h) where they were killed by a blow to the head, after which they were immediately dissected and the gills, gastrointestinal tract (gut) and kidney were collected for metal analyses. The liver was also dissected, pooled into groups of 2–5 individual livers and stored in liquid nitrogen for sub-cellular analyses (see description below).

For metal analyses, the organs were first lyophilized, weighed and then digested in 70% HNO_3 (approximately 3 mL acid per g dry weight of tissue). Digestions were carried out in an autoclave (120–125 °C, 1.1–1.3 kg cm^{-2}, 3 h). During each digestion run, both blanks (HNO_3 and MilliQ water) and certified reference samples (lobster hepatopancreas TORT-1 and TORT-2, National Research Council of Canada, NRCC, Ottawa, Ont., Canada) were included. The samples were then analyzed for Cd, Cu and Zn by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES, Vista AX, Varian Inc., Mulgrave, Vic., Australia). Low to negligible contamination was detected in the digestion blanks (N = 17): Cd < 2.9 nmol L^{-1}; Cu < 19 nmol L^{-1}; Zn < 31 nmol L^{-1}. The certified samples were quantitatively recovered (N = 16; mean ± S.E.): Cd (113 ± 0.9%); Cu (106 ± 3%); and Zn (116 ± 6%).

2.5. Water chemistry

Water samples were collected from both study lakes by in situ dialysis, a technique that has proved to be a reliable means of collecting the truly dissolved fraction of trace metals in natural waters (Benes and Steinnes, 1974). The Plexiglas dialysis samplers consisted of 10 adjacent 4-mL cells separated from the lake water by a polysulfone membrane (0.2 μm) (Pall Gelman Sciences, HT-200, Ville St-Laurent, Que., Canada). In June, a single dialysis sampler was deployed in each lake at approximately 1 m above the lake bottom. The samplers were allowed to equilibrate for 3 d, after which time they were recovered and four sub-samples were taken from each sampler for analysis of trace metals and major cations (Ca, Mg, K, Na; Cd, Cu and Zn). Two additional sub-samples were taken from each sampler for major anions (SO_4, PO_4, NO_3, Cl), dissolved organic carbon and dissolved inorganic carbon. At the time of retrieval, ambient pH was also measured in both lakes at a depth of 0.5 m, near the dialysis samplers. The water quality variables were measured as follows: major cations by ICP-AES (Varian Vista AX); anions by ion chromatography (Dionex AutoIon, DX300, Sunnyvale, CA, USA); inorganic carbon by a hot wire detector gas chromatograph (Perkin-Elmer, Sigma 300, Uberlingen, Germany) and organic carbon with a total organic carbon analyzer (Shimadzu, TOC-5000A, Kyoto, Japan). Blanks and appropriate standard reference materials for these analyses were included and were consistently within the acceptance range. Using the above lake water analyses, free ion

concentrations were estimated for metals in the two study lakes using the Windermere Humic Aqueous Model (WHAM 6.0.1: **Tipping, 1998**).

2.6. Hepatic sub-cellular partitioning of Cd and Cu

For sub-cellular analyses, liver samples were removed from liquid nitrogen and gently thawed and homogenized by hand in two volumes of cold 0.9% NaCl in a glass Potter–Elvehjem homogenizer. The tissue homogenates were transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes and were subjected to a differential centrifugation protocol adapted from that of **Wallace et al. (1998)**. The homogenized tissue was first subjected to centrifugation ($800 \times g$) for 15 min at 4 °C. This step produced a supernatant containing organelles and proteins, and a pellet containing cellular debris. The supernatant from this first homogenization was then subjected to ultracentrifugation at $100{,}000 \times g$ for 60 min at 4 °C, which yielded a pellet containing organelles. The supernatant obtained from this centrifugation contained cytosolic macromolecules such as proteins and low molecular weight peptides. This supernatant then underwent a heat denaturation step (80 °C for 10 min), followed by treatment on ice for 1 h. Following this denaturation step, the supernatant was centrifuged at $50{,}000 \times g$ for 10 min at 4 °C. This step produced a pellet containing heat-denatured proteins (HDP), such as enzymes, and a supernatant containing heat-stable proteins and peptides (HSP), such as glutathione, metallothionein, and metallothionein-like proteins.

The fractions obtained by this centrifugation procedure were: cellular debris; organelles; heat-denatured proteins and heat-stable proteins + peptides. The pellets were lyophilized and digested in 70% HNO_3 for 5 d at room temperature, after which they were diluted to 2% HNO_3 with ultrapure water. Supernatants were acidified to 2% HNO_3. Metal concentrations in the sub-cellular fractions were analyzed for Cd and Cu by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS; Thermo Elemental, Model X7, UK). Blanks and a certified reference material (TORT-1) were digested in the same manner. Blanks indicated negligible contamination (Cd < 0.09 nmol L^{-1}, Cu < 28 nmol L^{-1}), and the recoveries of TORT-1 reference samples ($N = 5$; mean ± S.E.) were: Cd (90 ± 2%) and Cu (94 ± 12%).

To obtain a measure of the total metal content of the livers, an aliquot of the initial homogenate was taken for metal analyses before the first centrifugation step and was digested according to the same protocol as used for the sub-cellular pellets. This aliquot was also used in a mass balance calculation to verify the recovery of metals in the different sub-cellular fractions. Average metal mass balance recoveries ($N = 9$; mean ± S.E.; {sum of metal burdens in the five fractions/metal burden in the aliquot} × 100) were: Cd (94 ± 4%) and Cu (110 ± 10%).

2.7. Statistical analyses

All data points in figures are presented as mean ± S.E. of the mean. Changes in organ masses over time were examined initially with a scatterplot, and a simple linear regression model was then tested by calculating determination coefficients (r^2). Metal concentrations in perch from Lakes Opasatica and Dufault (corresponding to day 0 of the transplantation) were compared using the Student's t-test ($p \leq 0.05$). Linear regression models and determination coefficients were also used to examine changes in metal burden in the various organs over time. Lastly, changes in metal concentrations at both the organ and sub-cellular level as well as in sub-cellular metal burdens in transplanted fish were compared temporally with a one-way analysis of variance (ANOVA) using a Tukey–Kramer Honest Significant Difference (HSD) post hoc test ($p \leq 0.05$).

3. Results

3.1. Lake chemistry and growth of caged perch

Consistent with data from previous studies on the two study lakes (**Giguère et al., 2004**; **Kraemer et al., 2005**), aqueous concentrations of Cd, Cu and Zn were higher in Lake Dufault than in Lake Opasatica (Table 1). Similarly, concentrations of Cd (all organs) and Cu (gut and liver), and Zn (gills and gut), were significantly higher ($p \leq 0.01$) in yellow perch from Lake Dufault than in fish from the reference lake (Table 2).

The transplanted fish grew appreciably during the experiment and thus the possibility of growth dilution must be considered in any comparison of internal

Table 1
Aqueous metal concentrations (mean ± S.E.) in Lake Opasatica and Lake Dufault as well as their geographical coordinates and pH

Lake	Location	pH	[Cd][a] (nM)	[Cd^{2+}][b] (nM)	[Cu][a] (nM)	[Cu^{2+}][b] (nM)	[Zn][a] (nM)	[Zn^{2+}][b] (nM)
Opasatica	48°5′N 79°20′W	7.66	0.11 ± 0.02	0.02	47 ± 1.4	5.8×10^{-4}	5 ± 1	0.73
Dufault	48°20′N 79°0′W	7.65	5.5 ± 0.03	2.47	225 ± 5	0.06	1015 ± 4	432
Ratio Du/Op			50	124	5	103	203	592

[a] Dissolved metal concentration, as determined on samples obtained by in situ dialysis (see Section 2): $N=4$ sub-samples obtained from different cells in a single dialysis sampler.
[b] Free-metal ion (Cd^{2+}, Cu^{2+} and Zn^{2+}) concentrations were estimated using the Windermere Humic Aqueous Model (WHAM 6.0.1: **Tipping, 1998**).

metal concentrations. Changes in the mass of all organs during the transplantation period are shown in Fig. 1. Significant increases in organ mass occurred in the gut ($p \leq 0.05$), gills ($p \leq 0.01$), kidney ($p \leq 0.05$) and liver ($p \leq 0.05$) of transplanted fish.

3.2. Metal elimination dynamics at the organ level

3.2.1. Cadmium

Cadmium concentrations decreased progressively in the gut and gills of transplanted fish and concentrations at the end of the study were significantly lower than initial values ($p \leq 0.05$; solid circles in Fig. 2A and B). In addition, Cd concentrations in these two organs at the end of the depuration period were no longer significantly different from concentrations in indigenous Lake Opasatica perch ($p > 0.05$; open triangles in Fig. 2A and B). Likewise, final Cd concentrations in the kidney were significantly lower ($p \leq 0.05$) than those at the beginning of the experiment (Fig. 2C), but final renal Cd concentrations remained significantly higher ($p \leq 0.001$) than those measured in indigenous Lake Opasatica perch (Fig. 2C). In the liver, final Cd concentrations were not significantly lower ($p > 0.05$) than initial concentrations in this organ (Fig. 2D).

Cadmium burdens (i.e., total quantities in each organ) decreased significantly in the gut and gills ($p \leq 0.01$; Fig. 3A and B, respectively), but increased significantly in the kidneys and livers of transplanted fish (Fig. 3C and D; $p \leq 0.01$).

Table 2
Initial concentrations of Cd (nmol g^{-1}), Cu and Zn (μmol g^{-1}) in the various organs of yellow perch collected from lakes Dufault and Opasatica at the beginning of the transplant experiment (mean ± S.E.)

Organ	Metal	Opasatica	Dufault
Gills	Cd	2.0 ± 0.2	18 ± 2.0***
	Cu	0.08 ± 0.005	0.10 ± 0.005
	Zn	2.36 ± 0.07	3.10 ± 0.09***
Gut	Cd	9.6 ± 1.0	40 ± 2.8***
	Cu	0.10 ± 0.05	0.15 ± 0.04***
	Zn	2.35 ± 0.07	1.96 ± 0.05**
Kidney	Cd	56 ± 8.5	516 ± 59***
	Cu	0.40 ± 0.04	0.49 ± 0.04
	Zn	16.7 ± 1.9	21.6 ± 2.2
Liver	Cd	27 ± 2.3	274 ± 21***
	Cu	0.26 ± 0.05	1.6 ± 0.24**
	Zn	1.86 ± 0.13	2.56 ± 0.27

** Significant statistical differences between fish sampled from the two lakes: $p \leq 0.01$ for each metal within each organ.
*** Significant statistical differences between fish sampled from the two lakes: $p \leq 0.001$ for each metal within each organ.

3.2.2. Copper

Copper concentrations in the gut and liver decreased immediately after transplantation (Fig. 4A and D) and were significantly ($p \leq 0.05$) lower than initial concentrations 10 d into our elimination experiment; after 10 d, however, Cu concentrations remained more or less constant in these organs. Gill Cu concentrations varied little in transplanted fish (Fig. 4B). At the end of the elimination period, Cu concentrations in the gills, gut and liver of transplanted fish were not significantly ($p > 0.05$) different from those in indigenous Lake Opasatica perch. During the transplant experiment, Cu concentrations in the kidneys of transplanted fish were similar to those observed in indigenous Lake Opasatica fish collected on days 0, 35 and 53 (Fig. 4C),

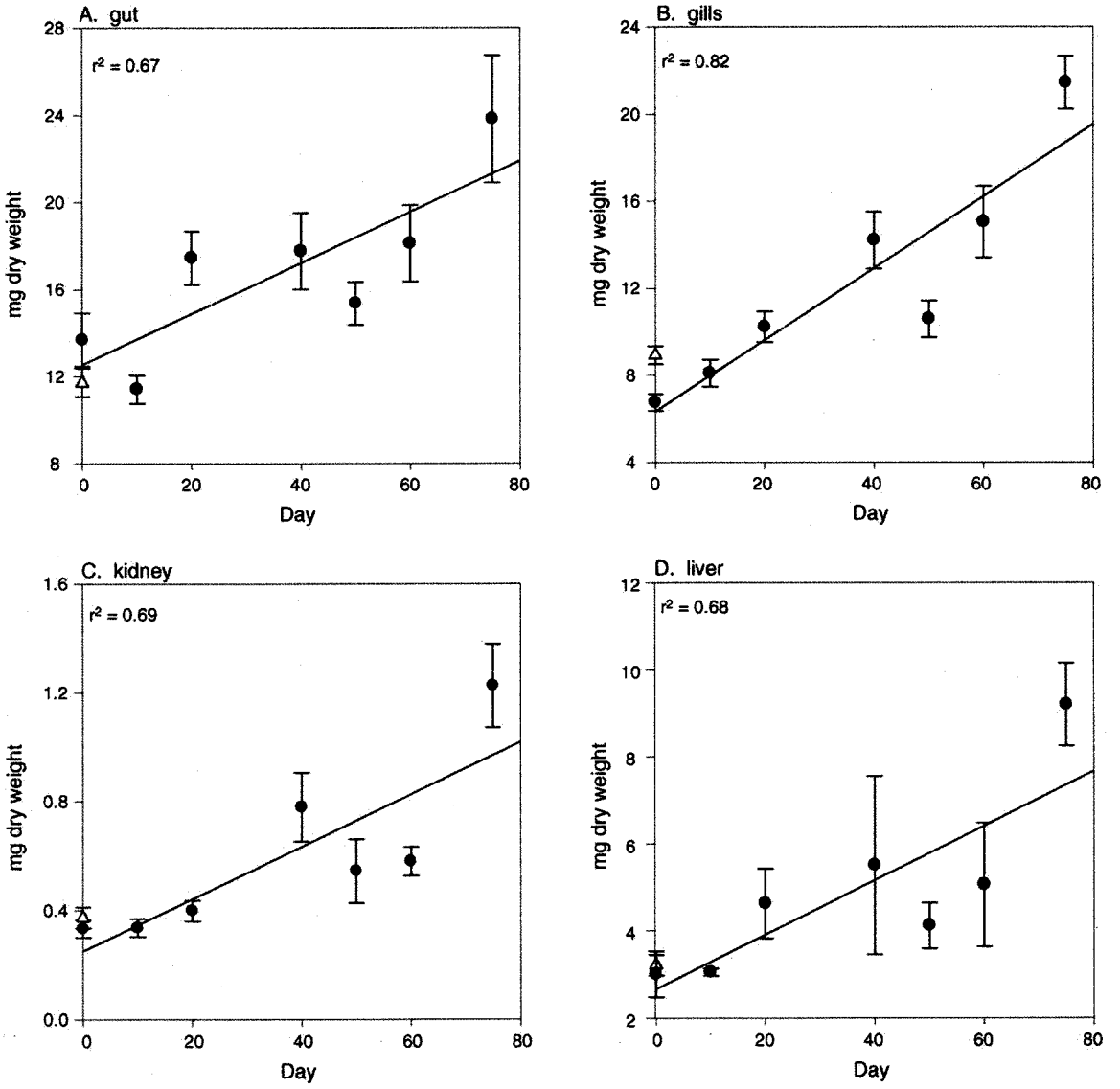


Fig. 1. Changes in the mass of organs taken from perch transplanted to Lake Opasatica (solid circles) as well as from uncaged perch from Lake Opasatica (open triangles). Data are represented by mean ± S.E. ($N = 13$–15 for gut, gills and kidney, $N = 3$ replicates of 2–5 animals for liver). Linear regressions were fitted to the temporal data ($p \leq 0.05$) for the transplanted fish and determination coefficients (r^2) are reported in the graphs.

but final renal Cu concentrations were significantly lower ($p \leq 0.05$) in transplanted fish than in fish sampled at time 0. The quantity of Cu in the gills increased slightly during the experiment (Fig. 5B; $p \leq 0.05$), whereas in the gut the Cu burden decreased over the first 10 d, then progressively increased (Fig. 5A). The Cu burden in the liver also showed a marked decrease during the first 20 d of the transplantation period (Fig. 5D).

3.2.3. Zinc

The response of internal zinc concentrations to the change in ambient Zn concentrations was much less dramatic than for the other metals. Only branchial Zn

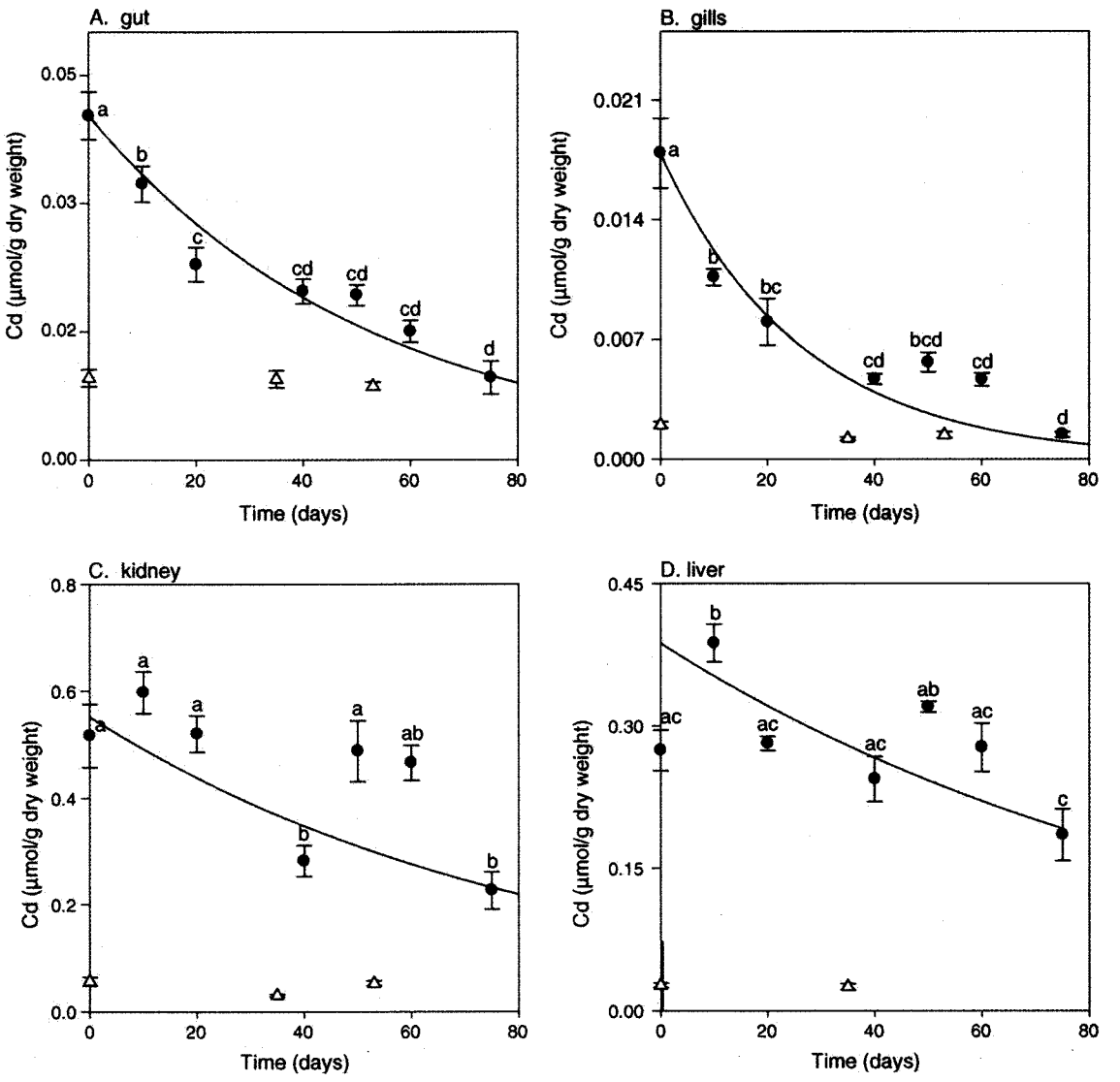


Fig. 2. Changes in Cd concentrations in organs of perch transplanted to Lake Opasatica (solid circles) as well as in uncaged Lake Opasatica fish (open triangles). Data are represented by mean ± S.E. (N = 13–15 for gut, gills and kidney, N = 3 replicates of 2–5 animals for liver). Model curves were fitted in each panel using Eq. (3).

decreased with time (Fig. 6B); Zn concentrations were significantly lower on day 75 than on day 0. Branchial Zn concentrations in transplanted fish at the end of the depuration period were not significantly different from those observed in the gills of uncaged Lake Opasatica perch collected on days 35 and 53. The Zn burden significantly increased in the kidney ($p \leq 0.01$), liver ($p \leq 0.05$), gut ($p \leq 0.05$) and gills ($p \leq 0.05$) (Fig. 7).

3.3. Metal elimination dynamics at the sub-cellular level (liver)

To compare how the liver handled metals during the elimination experiment, we followed changes in metal sub-cellular partitioning over time. Since hepatic Zn concentrations did not decrease significantly during transplantation, we only considered

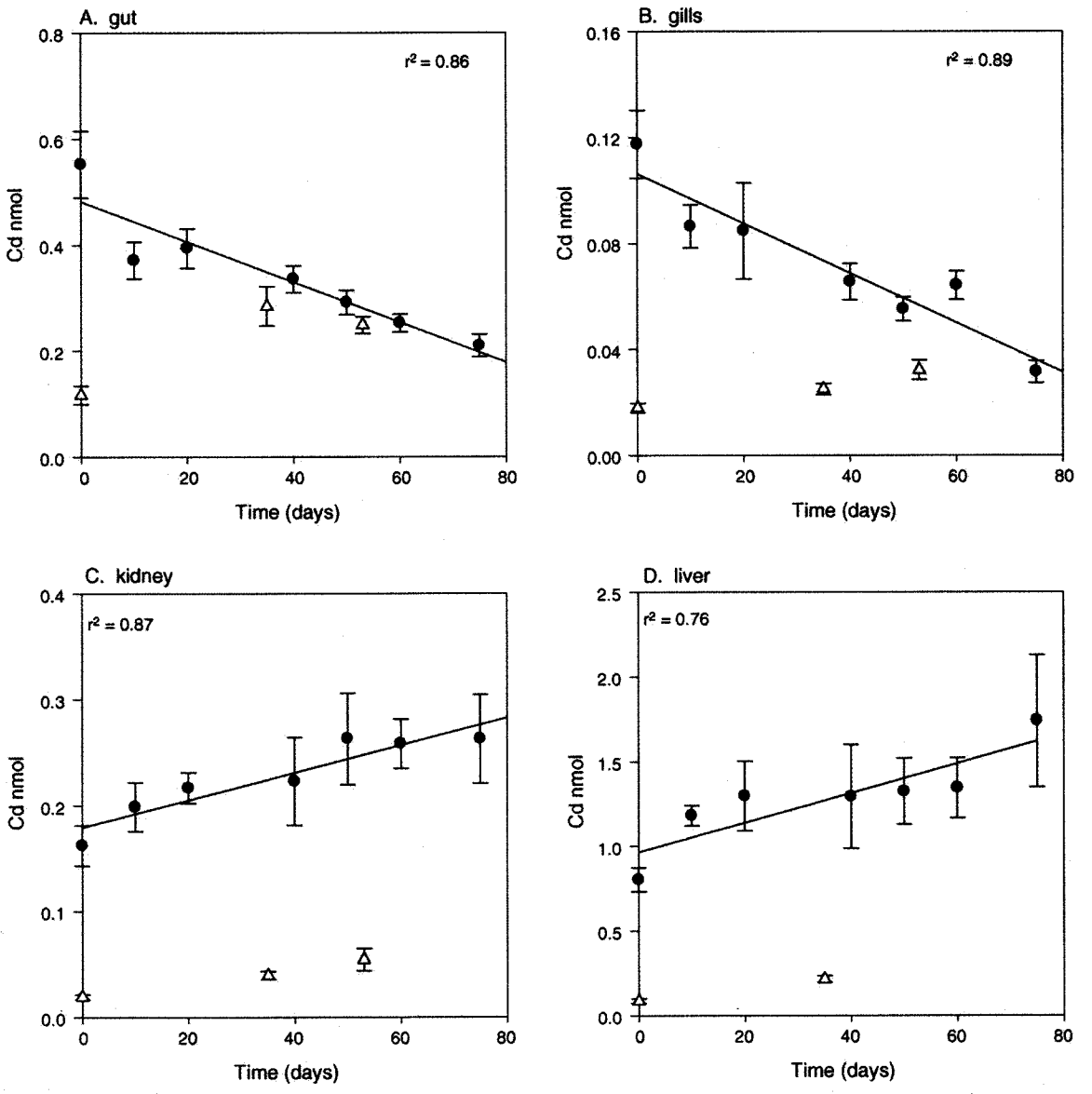


Fig. 3. Changes in the Cd burden in organs of perch transplanted to Lake Opasatica (solid circles) as well as in uncaged Lake Opasatica fish (open triangles). Data are represented by mean ± S.E. (N = 13–15 for gut, gills and kidney, N = 3 replicates of 2–5 animals for liver). Linear regressions were fitted in panels A, B, C and D ($p \leq 0.05$) and determination coefficients (r^2) are reported in the graphs.

sub-cellular results for the essential metal Cu (open circles in Figs. 8 and 9), and compared these results to those for the non-essential metal, Cd (solid circles in Figs. 8 and 9). The concentrations of Cu were consistently higher than those for Cd in all the sub-cellular fractions (Fig. 8). During the depuration period, there was no net loss of Cd from any of the sub-cellular fractions (Fig. 9) and accordingly the distribution of the hepatic Cd burden among the sub-cellular fractions also remained reasonably constant over the 75 d depuration period (Fig. 10A). Throughout the depuration period, most of the hepatic Cd burden was associated with the HSP fraction (45 ± 2%) and the other fractions followed the order

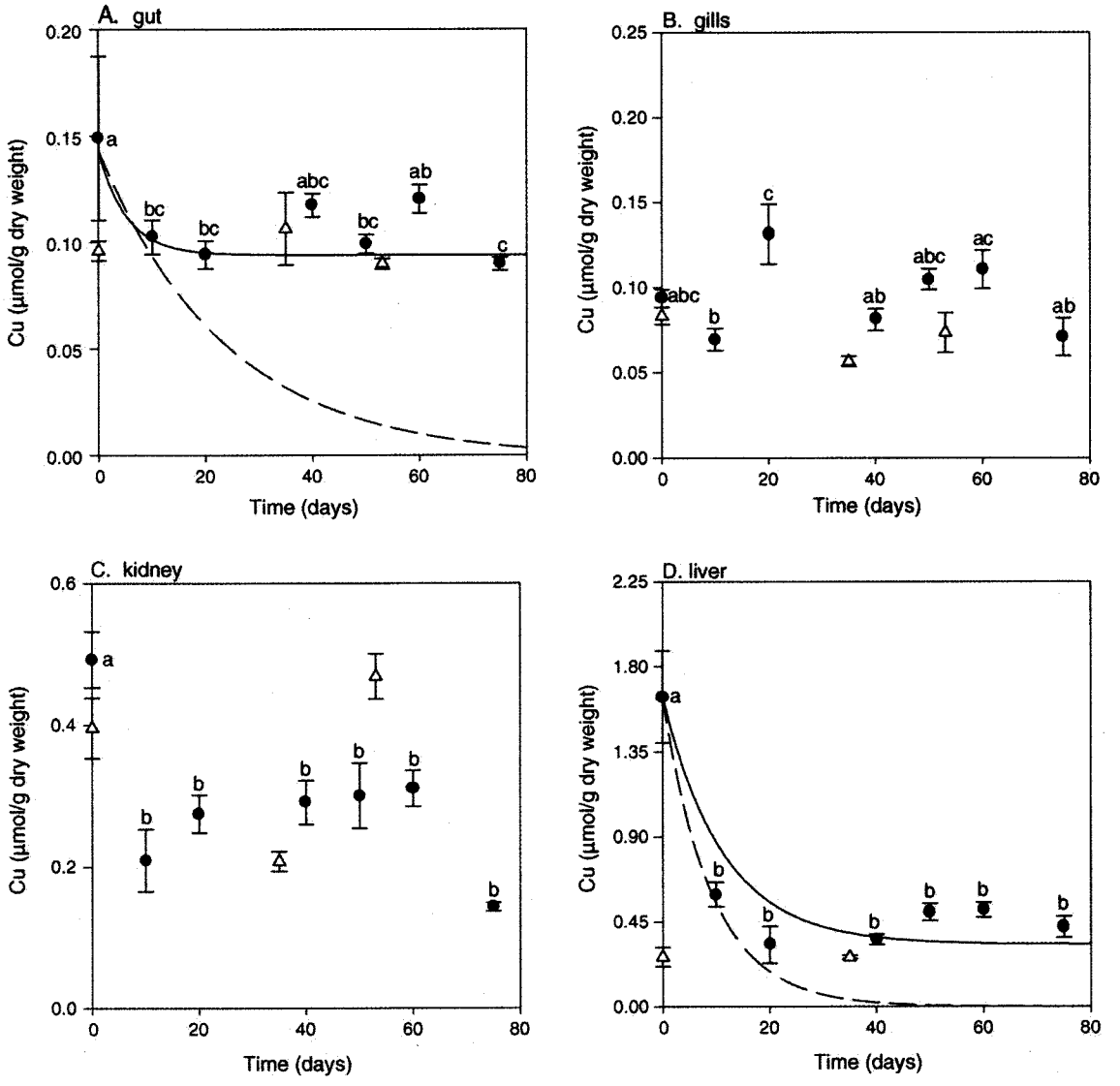


Fig. 4. Changes in Cu concentrations in organs of perch transplanted to Lake Opasatica (solid circles) as well as in uncaged Lake Opasatica fish (open triangles). Data are represented by mean ± S.E. (N = 13–15 for gut, gills and kidney, N = 3 replicates of 2–5 animals for liver). For the gut and the liver (panels A and D), first-order loss of the labile Cu pool was calculated, as described in Section 4.2 (solid curves). For comparison, the same loss rate was applied to the total Cu pool (dashed curves).

(mean ± S.E., N = 3) organelles (24 ± 1%) > cellular debris (18 ± 1%) > HDP (14 ± 1%).

Similar to the Cd results, Cu concentrations in the cellular debris and heat-denaturable protein fractions did not change significantly ($p > 0.05$; Fig. 8). Copper concentrations did, however, decrease in the organelle and HSP fractions; concentrations were significantly lower ($p \leq 0.05$) after 20 d of depuration and at the end of the experiment compared to those at time 0. Early in the elimination period (0–20 d) the Cu burdens decreased significantly in the organelle and cellular debris fractions (Fig. 9), but from day 20 onwards the burdens in all fractions tended to increase, presumably reflecting liver growth. Most of the Cu burden was

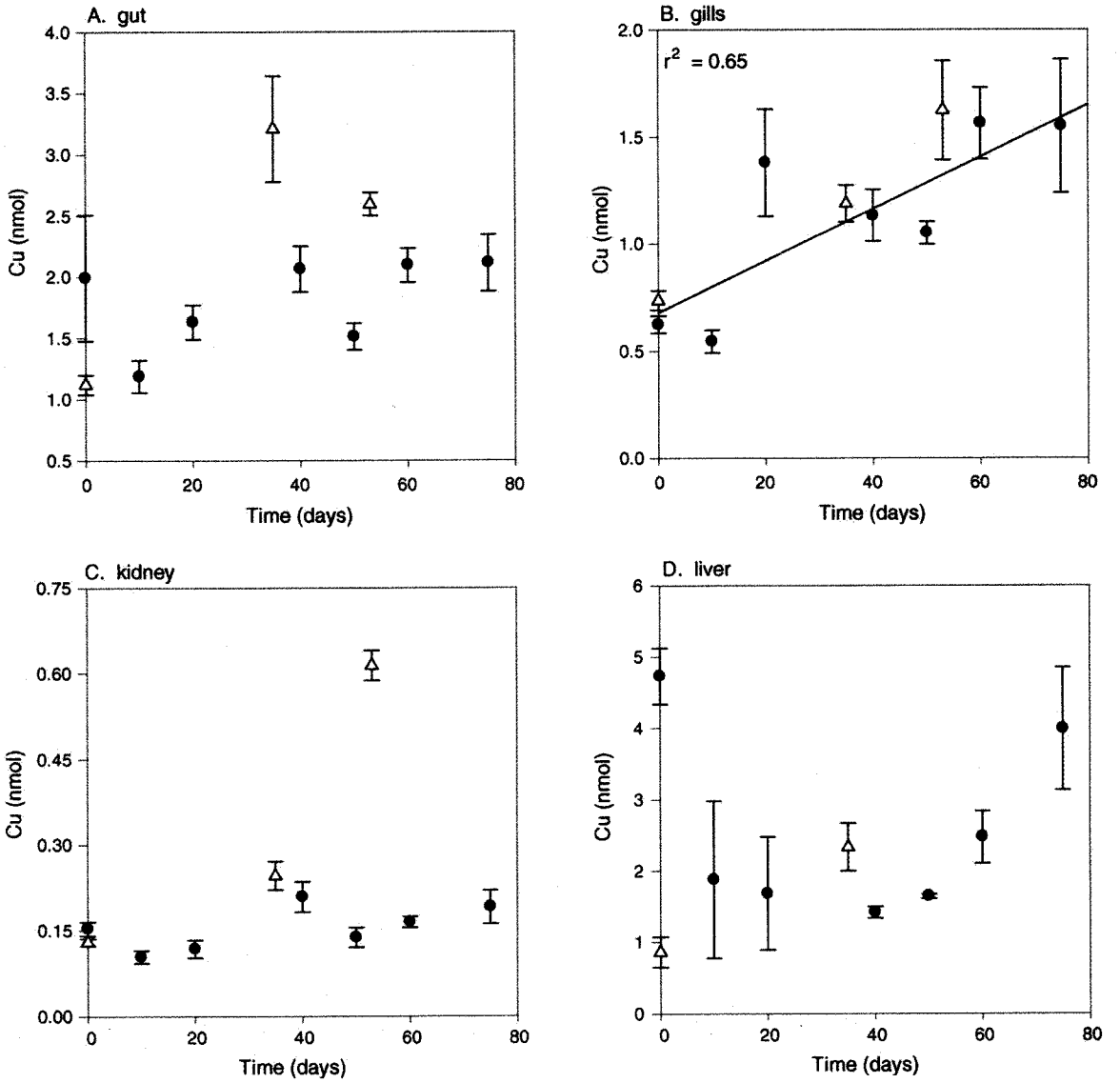


Fig. 5. Changes in the Cu burden in organs of perch transplanted to Lake Opasatica (solid circles) as well as in uncaged Lake Opasatica fish (open triangles). Data are represented by mean ± S.E. (N = 13–15 for gut, gills and kidney, N = 3 replicates of 2–5 animals for liver). A linear regression was fitted in panel B ($p \leq 0.05$) and the determination coefficient (r^2) is reported in the graph.

associated with the HSP (38 ± 2%), with the remainder distributed among the other fractions in the following order (mean ± S.E., N = 3): HDP (24 ± 4%) ≈ organelles (22 ± 1%) > cellular debris (16 ± 1%) (Fig. 10B).

4. Discussion

Changes over time in the concentration of a metal (M) in an animal can be described by considering metal uptake from water and food, physiological metal

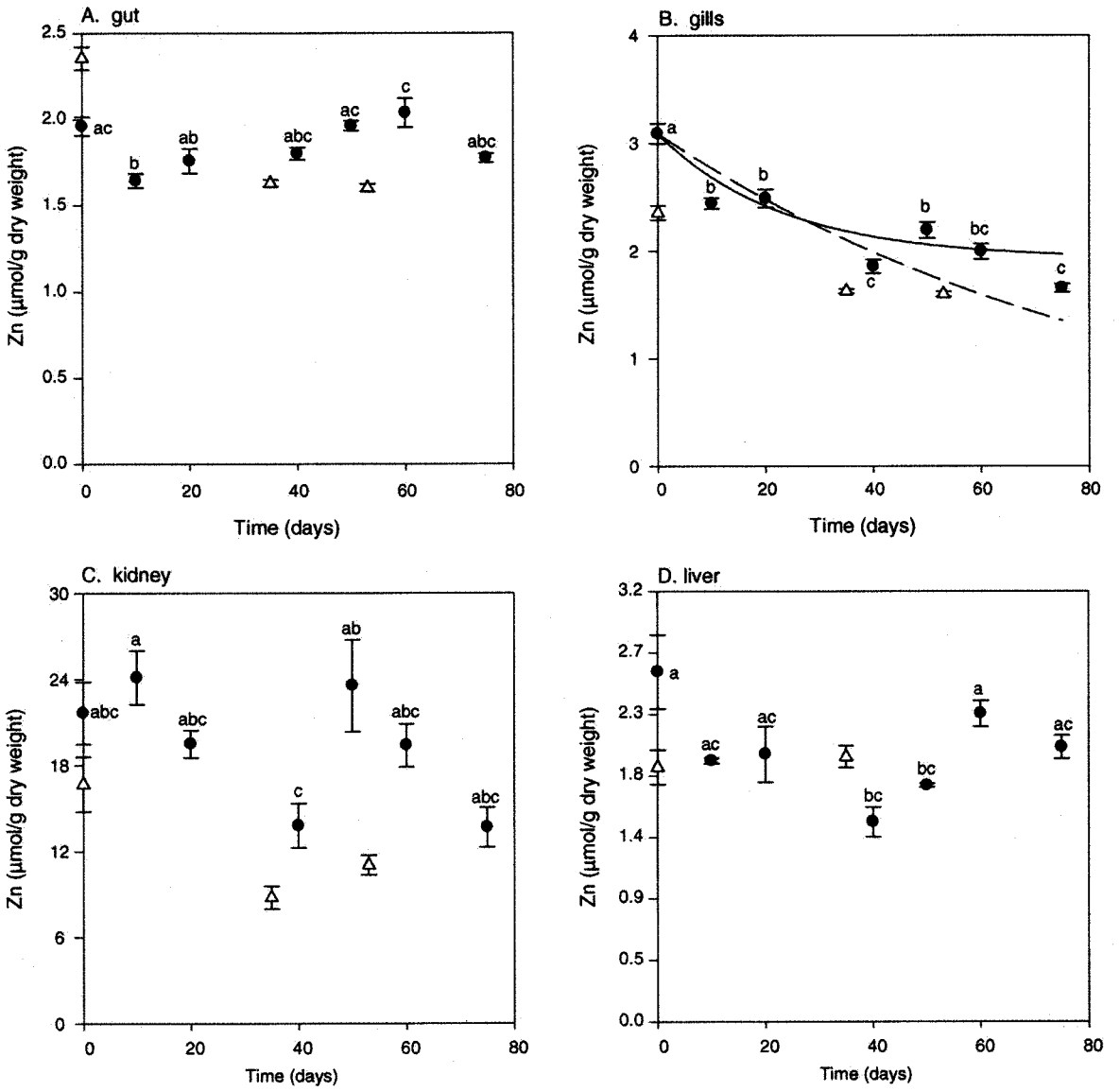


Fig. 6. Changes in Zn concentrations in organs of perch transplanted to Lake Opasatica (solid circles) as well as in uncaged Lake Opasatica fish (open triangles). Data are represented by mean ± S.E. (N = 13–15 for gut, gills and kidney, N = 3 replicates of 2–5 animals for liver). For the gills (panels B), first-order loss of the labile Zn pool was calculated, as described in Section 5 (solid curve). For comparison, the same loss rate was applied to the total branchial Zn (dashed curve).

loss and metal dilution due to animal growth, that is,

$$\frac{d[M]_{animal}}{dt} = k_u[M]_{water} + AE \cdot IR \cdot [M]_{food} - k_e[M]_{animal} - k_g[M]_{animal} \quad (1)$$

where $[M]_{animal}$, $[M]_{water}$, and $[M]_{food}$ are metal concentrations in the animal (µmol/g), water (µmol/L) and its food (µmol/g), respectively, k_u is the rate constant for metal uptake from water ($L\,g^{-1}\,d^{-1}$), AE is the assimilation efficiency (%), IR is the ingestion rate ($g\,g^{-1}\,d^{-1}$) and k_e and k_g are rate constants (d^{-1}) for

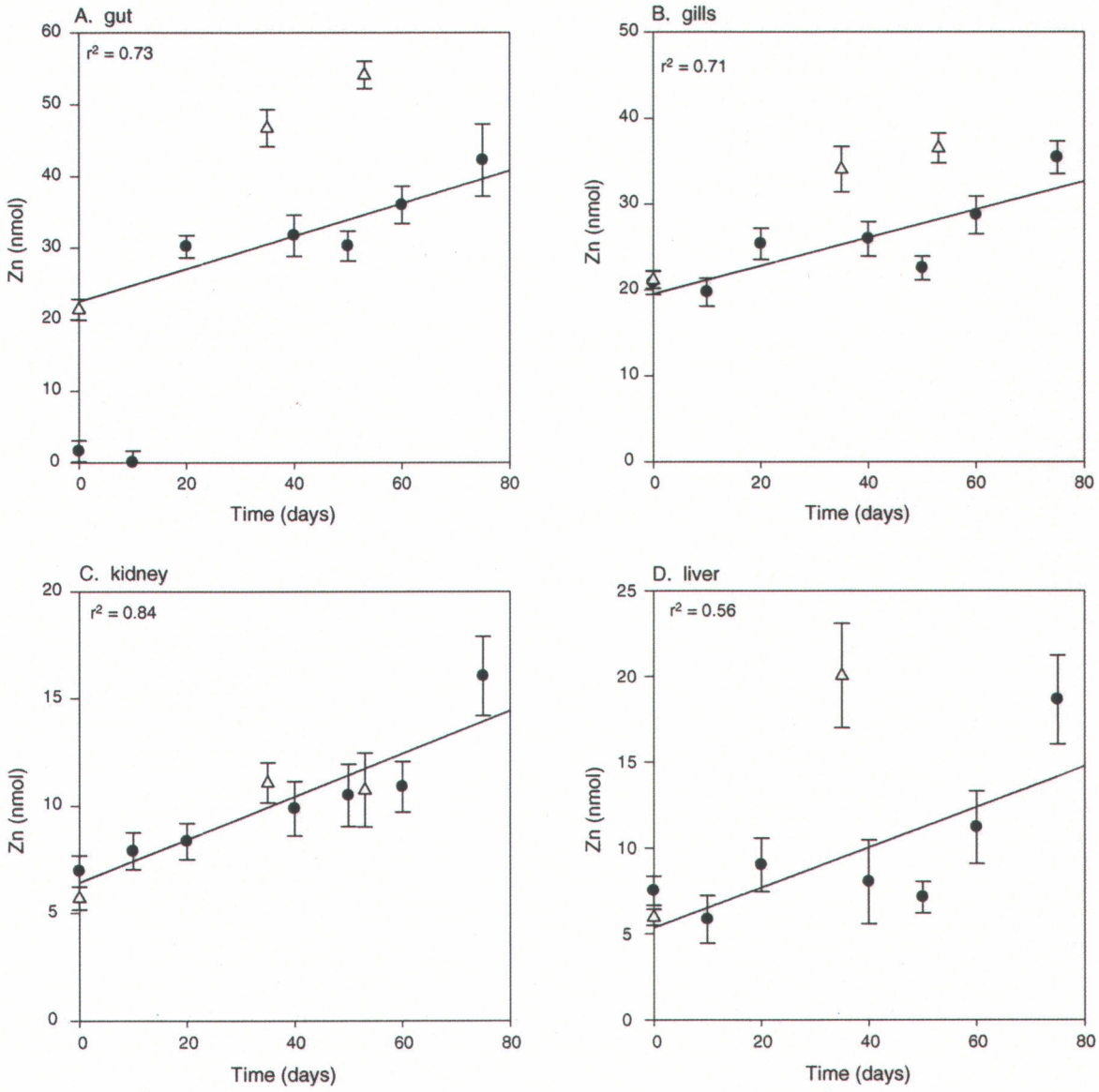


Fig. 7. Changes in the Zn burden in organs of perch transplanted to Lake Opasatica (solid circles) as well as in uncaged Lake Opasatica fish (open triangles). Data are represented by mean ± S.E. (N = 13–15 for gut, gills and kidney, N = 3 replicates of 2–5 animals for liver). Linear regressions were fitted in panels A, B, C and D ($p \leq 0.05$) and determination coefficients (r^2) are reported in the graphs.

metal elimination and growth, respectively (Munger et al., 1999).

Because we transplanted metal-contaminated perch to a lake with low ambient metal concentrations, we assumed that metal uptake during the elimination period had a negligible effect on tissue metal concentrations. In Lake Opasatica, although ambient metal concentrations are low compared to Lake Dufault, some influx of this metal is likely still occurring in the transplanted perch. However, since the fish grew during the experiment (Fig. 1), this influx had little impact on metal concentrations. Indeed, metal concentrations

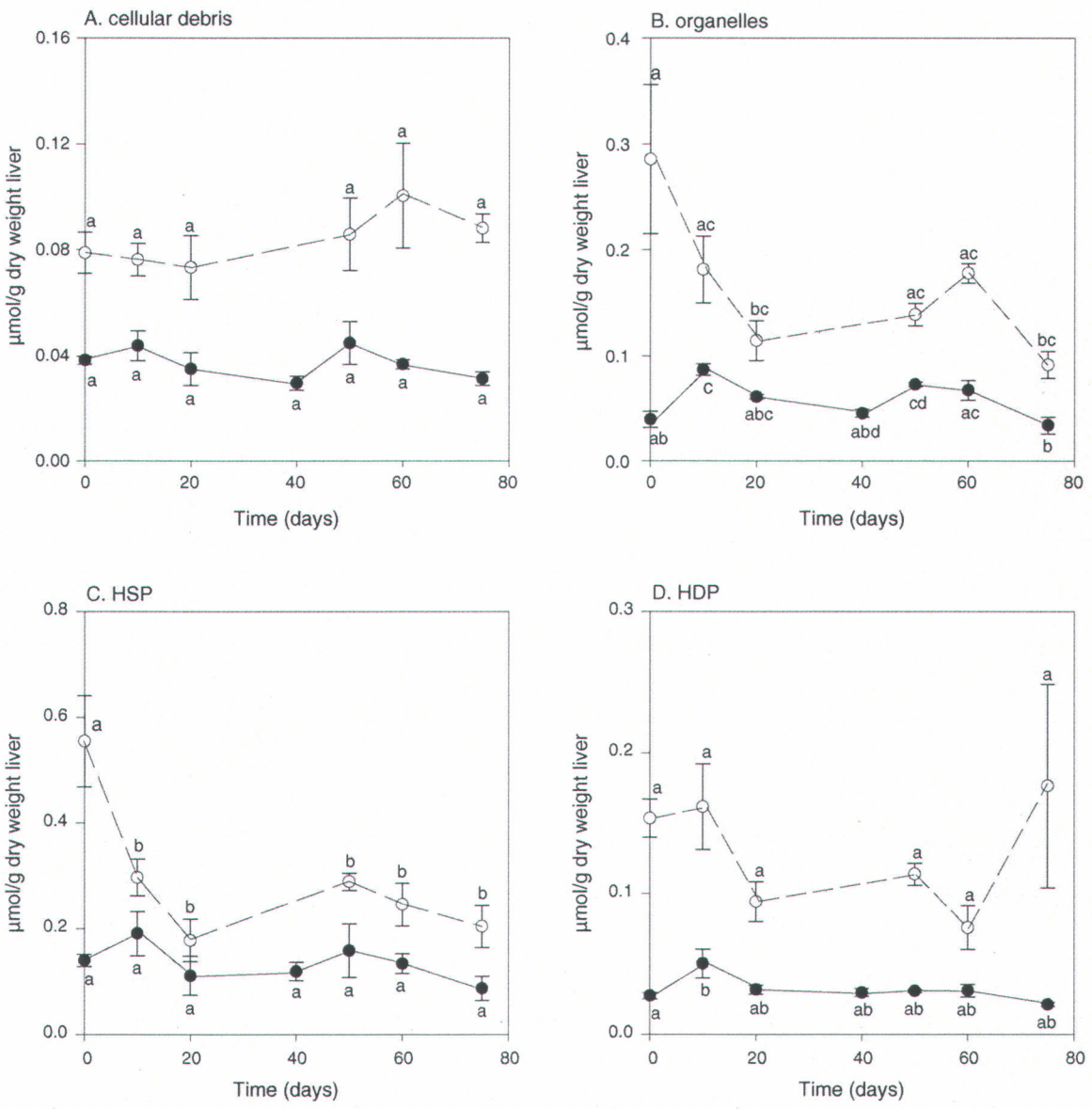


Fig. 8. Changes in the concentrations of hepatic Cd (solid circles, solid line) and Cu (open circles, dashed line) in the cellular debris (A), organelles (B), heat-stable proteins + peptides (C) and heat-denaturable proteins (D) fractions of transplanted fish. Temporal changes in metal concentrations of transplanted fish were analyzed using a one-way ANOVA, and means with the same letter are not significantly different (Tukey–Kramer, $p \leq 0.05$).

in the liver of indigenous Lake Opasatica perch did not vary significantly during a 4-month period (May to August, unpublished data), supporting the notion that Cd influx in perch transplanted to Lake Opasatica had a minimal influence on hepatic Cd concentrations. We therefore ignored the metal uptake terms in Eq. (1) and describe metal elimination kinetics in a given fish organ $[M]_{\text{organ}}$, as follows

$$\frac{\mathrm{d}[M]_{\text{organ}}}{\mathrm{d}t} = -k_{\text{e}}[M]_{\text{organ}} - k_{\text{g}}[M]_{\text{organ}} \quad (2)$$

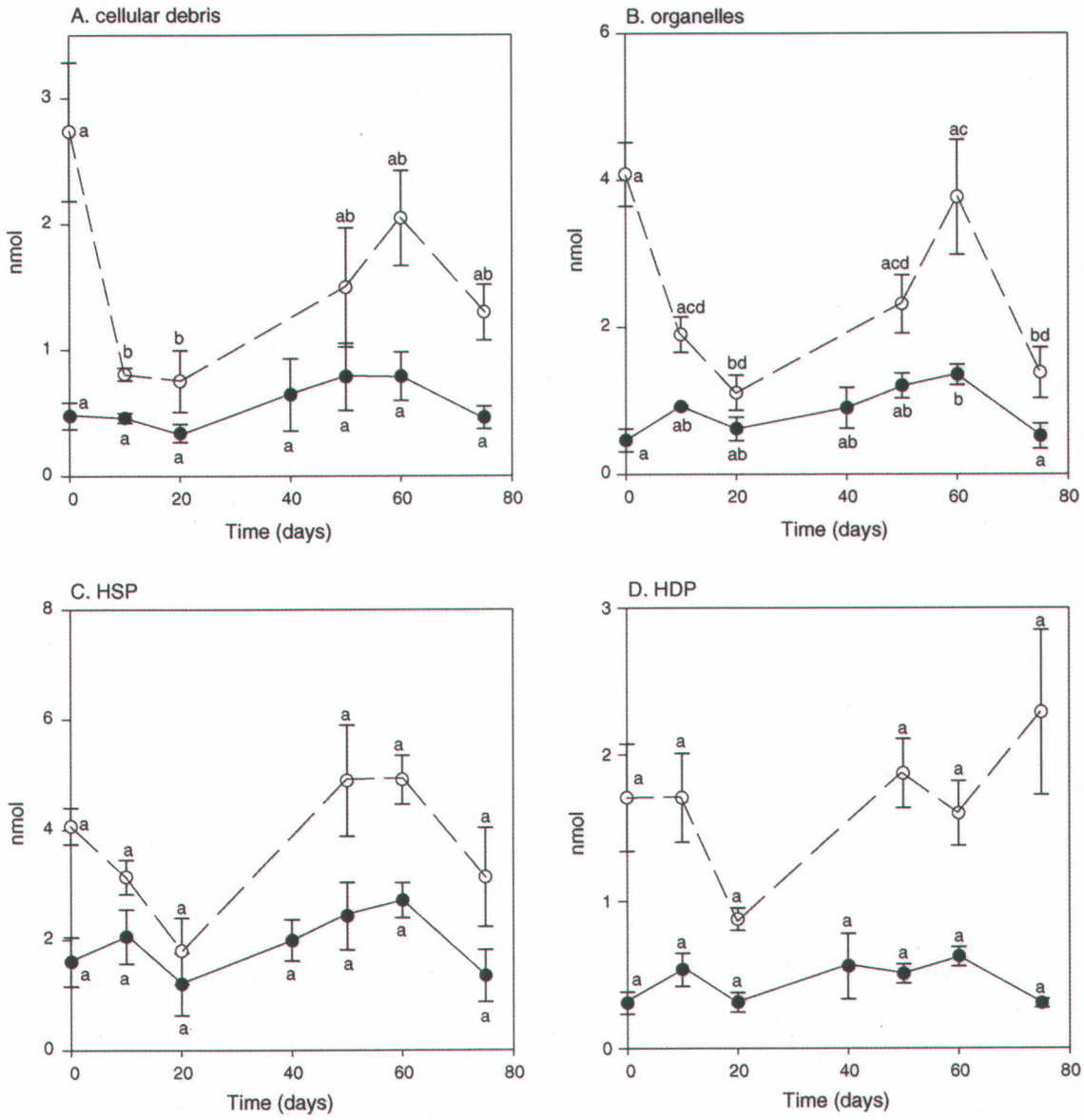


Fig. 9. Changes in the burdens of hepatic Cd (solid circles, solid line) and Cu (open circles, dashed line) in the cellular debris (A), organelles (B), heat-stable proteins + peptides (C) and heat-denaturable proteins (D) fractions of transplanted fish. Temporal changes in metal concentrations of transplanted fish were analyzed using a one-way ANOVA, and means with the same letter are not significantly different (Tukey–Kramer, $p \leq 0.05$).

We then used the integrated form of Eq. (2), that is,

$$[M]_{\text{organ}} = [M]^0_{\text{organ}}\, e^{-(k_g + k_e)t} \quad (3)$$

where $[M]^0_{\text{organ}}$ is the initial metal concentration and $[M]_{\text{organ}}$ is the concentration in the organ at time t. The growth rate constant (k_g) for the various organs was estimated using a linear regression of data from Fig. 1 using the equation:

$$W = W_0\, e^{k_g t} \quad (4)$$

where W = weight at time t and W_0 is the initial weight.

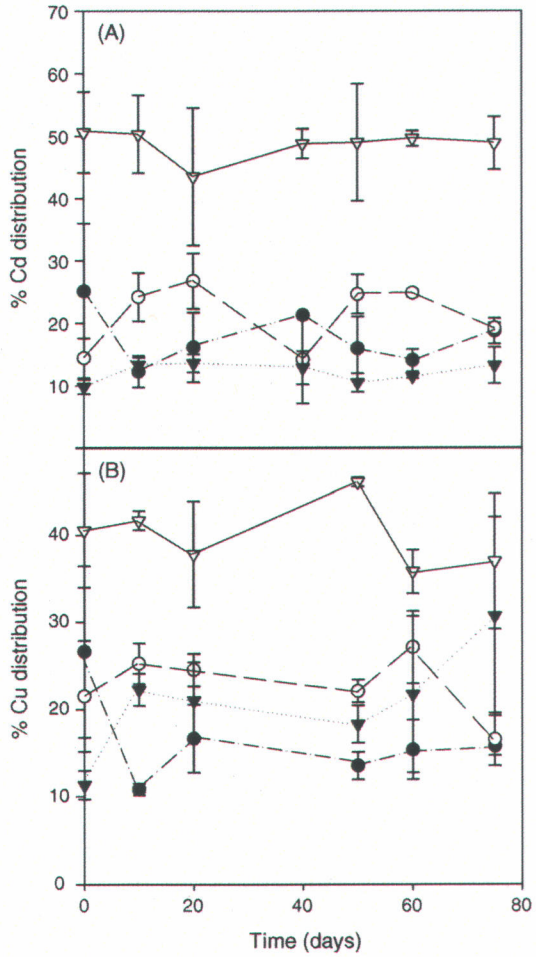


Fig. 10. Changes in the percent distribution of hepatic Cd (A) and Cu (B) in cellular debris (solid circles, dashed-dotted line), organelles (open circle, dashed line), heat-denaturable proteins (solid triangles, dotted line) and heat-stable proteins + peptides (open triangles, solid line) during the elimination period. Note: In panel (B), data for day 40 were not included due to poor Cu recovery.

Elimination rate constants (k_e) were estimated using Eq. (3) and the values of k_g estimated from Eq. (4). Data from the entire transplantation experiment (i.e., 75 d) were used to estimate k_e values for Cd, whereas only initial data were used to estimate k_e values for Cu (0–10 d for the gut and 0–20 d for the liver) and Zn (0–20 d for gills) because after these times concentrations of these metals reached a plateau (details given in Section 4.2).

Table 3
Estimated rate constants for metal loss and growth (±S.D.) for various perch organs

Metal	Organ	Elimination rate constant k_e (d^{-1})	Growth rate constant k_g (d^{-1})
Cd	Gut	0.012 ± 0.006	0.007 ± 0.002
	Gills	0.024 ± 0.016	0.014 ± 0.008
	Kidney	0.003 ± 0.002	0.010 ± 0.001
	Liver	0.002 ± 0.001	0.007 ± 0.002
Cu	Liver	0.080 ± 0.063	0.007 ± 0.002
	Gut	0.189 ± 0.145	0.007 ± 0.002
Zn	Gills	0.043 ± 0.034	0.014 ± 0.008

4.1. Cadmium

The model curves for Cd agreed reasonably well with the observed data (Fig. 2), the fit being somewhat better for the gills and gut than for the kidney and liver. The estimated k_e values were an order of magnitude higher for the gills and gut than those for the liver and kidney (Table 3). Using the k_e and k_g values, we estimated the biological half-life ($t_{1/2}$) for Cd in the organs of transplanted fish by rearranging Eq. (3) and solving for $t_{1/2}$ as follows:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 0.5}{k_e + k_g} \quad (4)$$

Reflecting the greater k_e for the gills and gut, the biological half-life of Cd was shortest in these two organs (Table 4). Harrison and Klaverkamp (1989) also noted a rapid elimination of Cd from the gills and gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and lake white fish (*Coregonus clupeaformis*) previously exposed to waterborne or diet-borne Cd. These authors did not report the biological half-lives for these individual organs, but did calculate half-lives of 27–63 and 25 d, respectively, for the entire fish (Table 4). For the European minnow (*Phoxinus phoxinus*), a biological half-life of approximately 7 d was reported for the gills of fish previously exposed to 3 nM aqueous Cd (Glynn and Olsson, 1991). This latter laboratory study offers the greatest potential for comparison to the current field study since the aqueous Cd concentrations were similar to those in our metal-contaminated lake (3 nM compared to 5.5 nM in Lake Dufault in the current study; Table 1) and similar elimination periods were examined (60 d in the latter study compared to 75 d in our study). Furthermore, similar to yellow perch, the European

Table 4
Elimination half times for Cd, Cu and Zn from various species of freshwater fish

Metal	Fish species	Type of exposure	Organ/body	Elimination half-life ($t_{1/2}$, d)	Reference
Cd	Yellow perch (*Perca flavescens*)	Field: water and food	Gut	37	This study
		Field: water and food	Gills	18	This study
		Field: water and food	Kidney	52	This study
		Field: water and food	Liver	75	This study
Cd	European minnow (*Phoxinus phoxinus*)	Lab: water	Gills	7	Glynn and Olsson (1991)
		Lab: water	Whole body	9	Glynn and Olsson (1991)
		Lab: water	Head and skin	9	Glynn and Olsson (1991)
Cd	Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)	Lab: water	Whole body	63	Harrison and Klaverkamp (1989)
		Lab: food	Whole body	27	Harrison and Klaverkamp (1989)
	Whitefish (*Coregonus clupeaformis*)	Lab: water	Whole body	25	Harrison and Klaverkamp (1989)
		Lab: food	Whole body	24	Harrison and Klaverkamp (1989)
Cu*	Yellow perch (*Perca flavescens*)	Field: water and food	Liver	8	This study
		Field: water and food	Gut	4	This study
Zn*	Yellow perch (*Perca flavescens*)	Field: water and food	Gills	12	This study

* Half-lives calculated for Cu and Zn are for the labile pool of these metals in a given organ.

minnow is also a species of fish that is considered to be relatively metal-tolerant (Sanchez-Galan et al., 1999). Nevertheless, despite these similarities, the biological half-life for gill Cd was three times longer for the yellow perch than for the European minnow (Table 4).

Since changes in metal concentrations during depuration are the result of changes in the amount of metal (i.e., metal burden), as well as changes in weight (i.e., organ growth), we examined changes in metal burdens during the elimination phase to determine if the amount of metal was decreasing over time. The amount of Cd decreased in the gills and gut (Fig. 3A and B), showing that there is indeed a net loss of Cd from these organs. These field results are similar to laboratory results reported by Harrison and Klaverkamp (1989) where decreases in gill and gut Cd burden (expressed as percent of total body Cd burden) were observed during depuration, in fish that had been previously exposed to Cd via only one exposure route (dietary or aqueous).

In contrast to the results for the gills and gut, Cd burdens increased in the kidneys and liver of transplanted perch. If Cd uptake from the external environment during the elimination period was minimal, given the low ambient Cd concentrations in Lake Opasatica, the observed increases in renal and hepatic Cd burdens can be taken to represent a re-distribution of Cd from the gills and/or gut to the liver and kidney. Alternatively, if some Cd uptake does occur despite the low exposure concentrations, the increases in renal and hepatic Cd burdens may simply reflect growth of these organs and storage of newly acquired Cd. Indeed, total loss of Cd from the gills and gut during the transplantation period (0.43 nmol) is less than the total amount of Cd gained by the kidney and liver (1.04 nmol), thus supporting the speculation that the increases in hepatic and renal Cd burdens are, at least in part, a consequence of Cd uptake from Lake Opasatica. Overall, both the kidney and the liver lose Cd more slowly that the gills or the gut (Table 3), which explains in part why both these organs tend to have high Cd concentrations in field populations of yellow perch exposed to this metal.

As was the case for total hepatic Cd concentrations, no significant decreases were observed in Cd concentrations in any of the hepatic sub-cellular fractions during the elimination period (Fig. 8). Cadmium concentrations were 2–5 times higher in the fraction containing heat-stable proteins (HSP; Fig. 8C) than in the other fractions. The HSP fraction contains a variety of cellular ligands, including amino acids, low molecular weight peptides such as glutathione, and metallothionein (MT) (Wallace et al., 1998). However, MT concentrations determined independently (Hg saturation assay) in yellow perch were closely related to the sum of the metals (Cd + Cu + Zn) accumulated in the HSP frac-

tion ([MT] = 1.4 (([Cd]/7 + [Cu]/12 + [Zn]/7) − 5.5; $r^2 = 0.84$, $p < 0.001$, concentrations expressed as nmol g^{-1} dry weight; Lisa Kraemer, INRS-ETE, Unpublished data), indicating that MT is likely the major heat-stable ligand in this fraction. Although, to our knowledge, there have been no fish studies examining how the sub-cellular partitioning of Cd changes during elimination, studies on invertebrates do exist. In one study on the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Baudrimont et al., 2003), 62% of the cellular Cd was initially associated with the cytosol, whereas by the end of a 191 d depuration period this value had decreased to 46% (the authors did not compare these percentages statistically). Similar results have also been reported by Michaud et al. (2005), who transplanted mayfly nymphs (*Hexagenia limbata*) between rivers differing in their Cd concentrations. They report that the Cd-HSP fraction decreased dramatically (~90%) over the 37 d of their Cd-loss field experiment. In our study, the lack of significant Cd loss from the HSP fraction, or from the other fractions, suggests that minimal net elimination or sub-cellular redistribution of hepatic Cd occurred during the 75 d depuration period.

4.2. Copper

Copper loss was only observed in the liver and gut. For these organs, model curves based on a one-compartment model (Eq. (3)) did not accurately describe Cu loss (Fig. 4, dashed lines). To account for this lack of fit, we assumed that there are two Cu compartments in cells; a labile fraction of excess Cu that can be lost rapidly from cells and a constitutive fraction that is not subject to elimination because it is involved as an essential metal in various biochemical processes. Hogstrand et al. (2003) used an analogous two-compartment approach to model silver elimination from tissues of the rainbow trout. To distinguish between these two pools, the Cu concentrations measured at the beginning of the plateau (i.e., days 10 and 20, respectively for the gut and liver) were used as an estimation of the constitutive pool, and this value was then subtracted from the Cu concentration on day 0 to give an estimate of the labile pool. If we assume a first-order loss rate for the labile Cu pool, reasonable agreement can be achieved between the predicted curves and the observed data (Fig. 4, solid lines). Using Eq. (4), the half-life of Cu in the labile pool of the liver was estimated at 8 d, whereas the half-life for labile Cu in the gut was 4 d (Table 4). These half-lives for labile Cu were ~8 times shorter than the half-lives of the total Cd measured in these two organs, illustrating the contrast between how cells manage essential and non-essential metals. Examination of the Cu burdens in the gut and liver confirmed that there was indeed a net loss of Cu from these organs during the first 10 d (gut) and 20 d (liver) of the depuration period (Fig. 5). Once steady-state Cu concentrations were reached (Fig. 4), Cu burdens in the gut and liver progressively increased due to the need to meet the physiological requirements of these growing organs (Fig. 1).

Although Cu concentrations in the kidney of transplanted fish appeared to decline slightly, they were similar to those measured in Lake Opasatica fish during the experiment (Fig. 4). This suggests that concentrations of this metal are regulated in the kidney and that no significant loss of Cu occurred from this organ. Giguère et al. (2004) reported similar results for juvenile yellow perch sampled from a series of metal-impacted lakes in the same region. In their study, higher ambient Cu^{2+} concentrations were linked to increased Cu concentrations in the gut and liver, but not in the kidney, again suggesting that Cu concentrations are under tight homeostatic control in this organ.

At the sub-cellular level, given the importance of metallothionein in hepatic Cu accumulation and homeostasis (Hogstrand et al., 1991; Mason and Jenkins, 1995), we hypothesized that Cu concentrations would decrease in the fraction containing MT (HSP fraction) and indeed such a decrease occurred (Fig. 8C). However, Cu concentrations and burdens also decreased in the cellular debris and organelle fractions. As these latter fractions likely contain active lysosomes (organelle fraction) as well as small dense tertiary lysosomes (cellular debris fraction), we hypothesize that lysosomes accumulate Cu in the liver and that elimination involves the exocytosis of these vesicles from liver cells. This hypothesis suggests that lysosomes may have a fundamental role in the homeostasis and detoxification of Cu within the liver of fish. In support of this hypothesis, it has also been reported that Cu accumulates in vesicle-like granules in the liver of other fish species (Bunton et al., 1987; Lanno et al., 1987). These Cu-rich granules also contain large amounts of sulphur, perhaps due to the accumulation of partially degraded sulphur-rich proteins, such as metallothionein (Lanno

et al., 1987). Lanno et al. (1987) proposed that the storage of Cu within these granules might be important in the elimination of excess cellular Cu via bile.

4.3. Zinc

Loss of Zn occurred only in the gills. As in the case of Cu in the gut and liver, a one-compartment model did not fit the observed data (Fig. 6, dashed line) and we were led to consider labile and non-labile Zn pools separately. The average Zn concentration after the initial loss phase, i.e. for days 40–75, was used as an estimate of the constitutive branchial Zn concentration, and this value was subtracted from initial Zn concentrations to estimate the labile Zn pool. Using this approach, the elimination rate constant (k_e) for the labile Zn fraction in gills ($0.043 \pm 0.034\,d^{-1}$) was slightly greater than that estimated for branchial Cd ($0.024 \pm 0.016\,d^{-1}$), and consequently the half life of Zn was shorter (12 d) that that for Cd (18 d) (Table 4).

The constancy in Zn concentrations in the gut, kidney and liver suggests that concentrations of this metal are well regulated in these organs, even in fish from Lake Dufault where ambient Zn concentrations are elevated. This observation is consistent with an earlier spatial study (Giguère et al., 2004); in juvenile yellow perch sampled from lakes along a metal contamination gradient, located in the same region as the current study, Zn concentrations in the liver, kidney and gut did not respond to increasing ambient Zn^{2+} concentrations, again indicating that this metal is well regulated. In the current study, gills were the only organ where some Zn loss appeared to occur (Fig. 6B). However an examination of the Zn burdens revealed that the amount of this metal increased in all organs, including the gills, during the transplantation study. Similar to Cu, Zn is an essential metal and therefore the amount of this metal should increase with increasing organ size (Fig. 1). With these data, we can conclude that there was no net loss of Zn from the gills, but there likely was some initial loss of this metal following the transplantation of fish to the reference lake.

5. Conclusions

The goal of our study was to address a current knowledge gap that exists in the understanding of how metals are exchanged in natural fish populations. By examining metal loss kinetics we were able to estimate, where appropriate, elimination rate constants (k_e) and the biological half-life ($t_{1/2}$) for Cd and Cu, parameters that are rarely reported in the literature for fish (Table 4), but that are nonetheless important if we are to understand metal accumulation in the field. With these estimated parameters we observed that the half-life of Cd increased in the order: gills < gut < kidney < liver. Whereas a one-compartment model was adequate to describe Cd loss, Cu and Zn loss was better described by considering labile and non-labile metal pools separately. This difference between the metals is likely a consequence of the essential role of Cu and Zn in cell metabolism as opposed to Cd, which has no known biological function in fish. Copper in the liver was lost mainly from the organelle and cellular debris fractions, suggesting that vesicles such as lysosomes were expelled from these cells.

Taken together with a previous field study examining metal uptake in yellow perch (Kraemer et al., 2005), these data on metal uptake and loss should allow us to better model metal dynamics in this key component of the communities present in many metal-contaminated Canadian lakes.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Metals in the Environment Research Network (MITE-RN). We would like to thank the Société de la Faune et des Parcs de l'Abitibi-Témiscamingue (Government of Québec) for their logistical help with the field study. Also, we would like to thank Philippe Bourret, Caroline Durand and Catherine Dion for their field assistance and Michelle Geoffroy-Bordeleau, Pauline Fournier and Sébastien Duval for their help in the laboratory. Anik Giguère and Emmanuelle Bonneris provided advice regarding the application of the differential centrifugation procedure. Helpful comments on the manuscript from the referees were also appreciated. P.G.C. Campbell is supported by the Canada Research Chair programme.

References

Baudrimont, M., Andres, S., Durrieu, G., Boudou, A., 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during

the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. Aquat. Toxicol. 63, 89–102.

Benes, P., Steinnes, E., 1974. In situ dialysis for the determination of the state of trace elements in natural waters. Water Res. 8, 947–953.

Bunton, T.E., Baksi, S.M., George, S.G., Frazier, J.M., 1987. Abnormal hepatic copper storage in a teleost fish (*Morone americana*). Vet. Pathol. 24, 515–524.

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

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

de Conto Cinier, C., Petit-Ramel, M., Faure, R., Garin, D., Bouvet, Y., 1999. Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp *Cyprinus carpio* tissues. Comp. Biochem. Physiol. Part C 122, 345–352.

Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., McDonald, D.G., Rasmussen, J.B., 2004. Influence of lake chemistry and fish age on Cd, Cu and Zn concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 61, 1702–1716.

Giles, M.A., 1988. Accumulation of cadmium by rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during extended exposure. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45, 1045–1053.

Gingras, J., Boisclair, D., 2000. Comparison between consumption rates of yellow perch (*Perca flavescens*) estimated with a digestive tract model and with a radioisotope approach. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57, 2547–2557.

Glynn, A.W., Olsson, P.E., 1991. Cadmium turnover in minnows (*Phoxinus phoxinus*) preexposed to waterborne cadmium. Environ. Toxicol. Chem. 10, 383–394.

Harrison, S.E., Klaverkamp, J.F., 1989. Uptake, elimination and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). Environ. Toxicol. Chem. 8, 87–97.

Hogstrand, C., Lithner, G., Haux, C., 1991. The importance of metallothionein for the accumulation of copper, zinc and cadmium in environmentally exposed perch, *Perca fluviatilis*. Pharmacol. Toxicol. 68, 492–501.

Hogstrand, C., Grosell, M., Woods, C.M., Hansen, H., 2003. Internal redistribution of radiolabelled silver among tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and European eel (*Anguilla anguilla*): the influence of silver speciation. Aquat. Toxicol. 63, 139–157.

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

Kim, S.-G., Jee, J.-H., Kang, J.-C., 2004. Cadmium accumulation and elimination in tissues of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* after sub-chronic cadmium exposure. Environ. Pollut. 127, 117–123.

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

Laflamme, J.-S., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Hontela, A., 2000. Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57, 1692–1700.

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

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

Mason, A.Z., Jenkins, K.D., 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. John Wiley and Sons Ltd., NY, USA, pp. 478–608.

Michaud, A., Hare, L., Campbell, P.G.C., 2005. Exchange rates of cadmium between a burrowing mayfly and its surroundings in nature. Limnol. Oceanogr. 50 (in press).

Munger, C., Hare, L., Tessier, A., 1999. Cadmium sources and exchange rates for *Chaoborus* larvae in nature. Limnol. Oceangr. 44, 1763–1771.

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

Sanchez-Galan, S., Linde, A.R., Garcia-Vazquez, E., 1999. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals. Ecotox. Environ. Saf. 43, 301–304.

Sherwood, G.D., Rasmussen, J.B., Rowan, D.J., Brodeur, J., Hontela, A., 2000. Bioenergetic costs of heavy metal exposure in yellow perch (*Perca flavescens*): in situ estimates with a radiotracer (^{137}Cs) technique). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57, 441–450.

Tipping, E., 1998. Humic ion-binding Model VI: an improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances. Aquat. Geochem. 4, 3–48.

Wallace, W.G., Lopez, G.R., Levinton, J.S., 1998. Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. Mar. Ecol. Prog. Ser. 172, 225–237.

10. 3e article : A field study examining the relative importance of food and water as sources of Cd for juvenile yellow perch

Lisa D. Kraemer, Peter G.C. Campbell, Landis Hare and Jean-Christian Auclair

INRS-Eau, Terre et Environnement, Université du Québec

490 de la Couronne, Québec, QC, Canada G1K 9A9

Sous presse Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences

A field study examining the relative importance of food and water as sources of Cd for juvenile yellow perch (*Perca flavescens*)[a]

Lisa D. Kraemer, Peter G.C. Campbell, Landis Hare and Jean-Christian Auclair

INRS-ETE, Québec, QC

INRS-Eau, Terre et Environnement, Université du Québec

490 de la Couronne, Québec, QC, Canada G1K 9A9

Corresponding author: peter.campbell@ete.inrs.ca

Tel: (418) 654-2538

Fax: (418) 654-2600

[a] Contribution No. 45 from the Metals in the Environment Research Network (www.mite-rn.org)

Abstract

To determine the relative importance of water and food as cadmium (Cd) sources for juvenile yellow perch (*Perca flavescens*, age 1+), fish were caged for up to 30 days in either a reference (Opasatica) or a Cd-contaminated (Dufault) lake and offered prey (zooplankton) from one of these lakes. We established four Cd-exposure regimes: a control; Cd-contaminated water only; Cd-contaminated food only; Cd-contaminated food and water. The 64-μm mesh cages used allowed the free exchange of water with the surrounding lake, while retaining the added zooplankton prey for the perch. Cadmium in the gills and kidney of caged perch was taken up largely from lakewater, whereas liver and gut Cd appeared to come from both dietary and aqueous sources. At the sub-cellular level (liver), the majority of the background Cd in control perch was associated with metal-sensitive fractions (organelles and heat-denatured proteins), whereas in perch exposed to waterborne or diet-borne the majority of the Cd was found in a metal-detoxified fraction (heat-stable proteins, metallothionein). For perch from all treatment levels, the higher the concentration of hepatic Cd, the greater the proportion of the Cd burden in this organ that was associated with the fraction containing metallothionein-like proteins.

Keywords:

Cd, uptake, gills, gut, kidney, liver, detoxification, sub-cellular partitioning

Résumé

Afin de déterminer l'importance relative de l'eau et de la nourriture comme sources du cadmium (Cd) pour la perchaude (*Perca flavescens*, âge 1+), des spécimens juvéniles provenant d'un lac de référence (lac Opasatica) ont été exposés pendant 30 j dans des cages installées soit dans leur lac d'origine, soit dans un lac contaminé par le Cd (lac Dufault). Nous avons établi quatre traitements : témoin; exposition au Cd via l'eau seulement; exposition au Cd via la nourriture seulement; exposition au Cd via l'eau et la nourriture. La maille des cages (64 µm) était assez petite pour retenir le zooplancton fourni comme proies, tout en permettant l'échange de l'eau entre les cages et le lac environnant. Le cadmium qui s'accumulait dans les branchies et le rein provenait essentiellement de l'eau, alors que le cadmium accumulé dans le tractus intestinal et le foie provenait à la fois de l'eau et de la nourriture. Au niveau hépatique sub-cellulaire la majorité du cadmium était associé aux fractions potentiellement sensibles au métal (organelles et protéines sensibles à la chaleur) chez les témoins non-exposés, alors qu'il se trouvait dans la fraction détoxiquée (protéines stables à la chaleur, métallothionéine) chez les poissons exposés à l'eau ou à la nourriture contaminée. Pour tous les traitements où l'eau ou la nourriture était contaminée, la proportion du Cd associé à cette fraction détoxiquée augmentait avec les teneurs hépatiques totales en Cd.

Mots clé

Cd, branchies, tractus intestinal, rein, foie, prise en charge, détoxication, répartition sub-cellulaire

Introduction

In nature, fish are exposed to trace metals through both ambient water and food. For the non-essential metal cadmium (Cd), there is a lack of consensus regarding the relative importance of these two metal sources. For example, for freshwater fish, various investigators have concluded that dietary and aqueous sources are important (Farag et al. 1994; Kraal et al. 1995), or that water is the main route of exposure (Williams and Giesy 1978), or that these animals receive the majority of their Cd from food (Dallinger and Kautzky 1985; Harrison and Klaverkamp 1989; Mount et al. 1994). This lack of agreement among researchers can be explained, in part, by differences in experimental design. Most studies have been carried out in the laboratory, where experimental artefacts are difficult to avoid. For example, it is difficult to expose fish to metals in food alone because the metal can desorb or leach from contaminated food and thus be available for uptake by the fish from water. Furthermore, some researchers have used artificial Cd-spiked diets (Williams and Giesy 1978; Harrison and Klaverkamp 1989; Handy 1993) from which fish are likely to assimilate Cd differently than they would from naturally contaminated prey.

To avoid the complications inherent in using artificially contaminated diets, other researchers have measured the importance of dietary Cd using live prey (Mount et al. 1994; Kraal et al. 1995). However, these live prey are often exposed to metals at unrealistically high concentrations, for a short period of time, in water only; in the field, metals in the prey come from the ambient water and via the trophic chain. A more realistic laboratory exposure scenario involves the use of naturally contaminated invertebrates collected from the field as food for fish (Farag et al. 1994; Woodward et al. 1995). The advantage of this latter approach is that prey have been exposed to metals in nature over their lifespan, which is important because metals in

87 the soluble fraction within prey cells tend to be more available to predators than metals
88 associated with particulate fractions (Wallace and Lopez 1996; Wallace et al. 1998).
89 In the present study we sought to avoid the artefacts associated with laboratory studies,
90 and instead conducted a field experiment to quantify the relative importance of water and food as
91 Cd sources for juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). We chose this species of fish because
92 yellow perch are found in both pristine and metal-contaminated lakes and they have been the
93 subject of several earlier field studies examining both metal accumulation and detoxification
94 (Levesque et al. 2002; Eastwood and Couture 2002; Giguère et al. 2004). We also examined the
95 hepatic sub-cellular partitioning of Cd to learn how fish cope with the influx of this non-essential
96 metal. We used a fractionation procedure to separate the Cd bound to physiologically-sensitive
97 fractions (such as enzymes and organelles) from the metal tied up with metal-binding proteins
98 such as metallothionein, which are thought to play an important role in metal detoxification.

99 Materials and Methods

100 The study area

101 Lakes Opasatica and Dufault are located approximately 600 km north of Montréal, close
102 to the city of Rouyn-Noranda in northwestern Québec, Canada. Sources of metal contamination
103 in this area include mining and smelting operations, as well as mineralized outcrops. A copper
104 smelter has been in operation within the city of Rouyn-Noranda since 1927. Lake Dufault (48°
105 20' N, 79 ° 0' W) is situated close to the smelter (distance of ~2 km) and exhibits elevated levels
106 of metals such as cadmium, copper and zinc (Giguère et al. 2004). The reference lake used in
107 our study, Lake Opasatica (48 ° 5' N, 79 ° 20' W), is located ~30 km upwind of the smelter and
108 has relatively low concentrations of these trace metals.

The enclosures

Juvenile yellow perch (1.5 ± 0.1 g; mean ± standard error, SE) were collected from Lake Opasatica on 8 June 2003 (water temperature: 11 °C) and placed in cages located in both Lake Opasatica (2 cages per treatment group) and Lake Dufault (2 cages per treatment group; water temperature: 12 °C). Each cylindrical cage (height 1.2 m, diameter 0.5 m) was made of Nitex netting (64 μm mesh-aperture) topped by Styrofoam floats and anchored to the lake bottom (Munger et al. 1999). The floats held the cage opening well above the surface to prevent zooplankton from entering by wave action. Each cage initially contained ten fish.

The cages were filled by passive entry of lakewater through the netting, which prevented the entry of macro-zooplankton. Yellow perch were allowed to acclimate to their cages for 24 h and were not fed during this time period. The caged fish in both lakes were then fed daily with macro-zooplankton collected from either the reference lake or the Cd-contaminated lake, creating four treatment regimes: reference lakewater and reference diet (REF); reference lakewater and contaminated food (FO); contaminated lakewater and reference food (WO); and contaminated lakewater and contaminated food (WF). Two individual cages were set up for each sampling time (15 and 30 d) and for each treatment (REF, FO, WO, WF) giving a total of 16 cages. To reduce stress and to minimize the effect of changes in population density, fish from these cages were not serially sampled over time. Instead, at each sampling time, two cages from each treatment were removed and all the fish from these cages were collected for analyses. Fish sampled after 15 d and 30 d of exposure were sacrificed and the gills, gastrointestinal tract (gut), kidney and liver were analyzed for Cd. Juvenile indigenous perch from both lakes were also collected for metal analyses on days 0, 15 and 30.

Zooplankton to be offered as prey for perch were collected by towing a plankton net (64 μm mesh-aperture) in the top 2 m of both study lakes. These prey were stored live in 10 L high-

density polyethylene (HDPE) bottles for < 2 d and fed to fish daily. Perch were fed a ration of approximately 10% of their body weight•d^{-1}. We estimated the volume of water (and prey) that we needed to attain this ration by determining the weight of zooplankton in a 100 mL sub-sample from one of the 10 L bottles. To reduce the quantity of Cd-contaminated water being added with contaminated prey to cages in the reference lake, zooplankton were concentrated into < 100 mL of lakewater prior to being offered to the fish. To minimize prey mortality, zooplankton offered to the fish were never exposed directly to air, but were concentrated by slowly filtering the samples through a bottomless 100 mL bottle fitted with Nitex netting (64 μm) over the opening. To get an estimate of how quickly zooplankton were consumed by perch, the cages were sub-sampled using a 5 cm diameter plastic tube the length of which was approximately equal to the depth of the cage. With this tube, water samples were collected vertically from several locations within a cage until a total of 1 L of water had been collected. Zooplankton were then counted in this 1 L sample, both immediately after feeding, up to an hour post-feeding and then again the next day before feeding. When zooplankton were added to the cages, yellow perch began feeding actively. Zooplankton samples taken within the cages revealed that the majority of the zooplankton was eaten within 1 h and that almost no zooplankton remained after 24 h.

To monitor aqueous Cd in the cages receiving Cd-contaminated prey in the reference lake, we used Plexiglas *in-situ* diffusion samplers suspended in these cages. These samplers were acid washed (15% HNO_3) and rinsed with MilliQ (> 18 Ω) water prior to use. They were then filled with MilliQ water and covered with a 0.2 μm nominal pore-size Gelman HT-200 polysulphone membrane. Once assembled, the diffusion samplers were placed in the water column on days 3, 18 and 26 where they were allowed to equilibrate for 3 d within the cages to achieve a steady state with the ambient lakewater. Plexiglas samplers were also placed outside the cages in each lake to measure ambient Cd concentrations. Free Cd^{2+} ion concentrations were

157 estimated for the two study lakes with the Windermere Humic Aqueous Model (WHAM 6.0;
158 Tipping 1998) using concentrations of total dissolved Cd, inorganic ligands (e.g., chloride,
159 sulphate and carbonates) and organic carbon as input data.

160 **Fish mortality**

161 In preliminary field trials we noted high mortality if yellow perch were caught and
162 transported during the summer months when the water was warm (~18-20 °C). To minimize
163 perch mortality, we started the experiments in early June when the water temperature was low
164 (~ 11 °C). Although we believe that cooler water did help reduce mortality, some fish still died
165 during the experiment (90 of 160 fish were recovered). When dead fish were seen in the cages,
166 they were removed and the feeding ration was adjusted accordingly. Because there was some
167 predation by birds, the exact number of surviving fish was only known with certainty at the end
168 of the experiment.

169 **Metal analyses**

170 After 15 d and 30 d of Cd exposure, perch were removed from the cages, dissected and
171 Cd was measured in the gills, gut, kidney and liver. Similarly, juvenile indigenous yellow perch
172 were collected on days 0, 15 and 30 from both Lake Dufault and Lake Opasatica. The gills and
173 gut were chosen for analysis, as they are important organs for Cd exchange between yellow
174 perch and their environment, whereas the kidney and liver were chosen because of their
175 importance as organs for Cd storage. To minimize trace metal contamination, organ samples
176 were stored in acid-washed (15% HNO_3) Eppendorf polypropylene tubes. Liver samples used
177 for sub-cellular analyses (outlined below) were stored in liquid nitrogen until homogenization.
178 The other organs were lyophilized, weighed and then digested in 70% HNO_3 (~ 3 mL acid per g
179 dry weight of organ). Digestions were carried out in screw-cap Teflon bottles in an autoclave

(120-125 °C, 1.1-1.3 kg•cm^{-2}, 3 h). During each digestion run, both blanks (HNO_3 and MilliQ water) and certified reference samples (lobster hepatopancreas, National Research Council of Canada, NRCC, TORT-2) were included. Samples were analyzed for Cd by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES, Varian Vista AX, Varian Inc., Mulgrave, Victoria, Australia). Low to negligible contamination was detected in the digestion blanks (N = 6). Certified samples were quantitatively recovered (N = 6): Cd, 93% ± 10% (mean ± SE).

Differential centrifugation

For sub-cellular analyses, liver samples were removed from liquid nitrogen and gently thawed and homogenized in two volumes of cold 0.9% NaCl in a glass Potter-Elvehjem homogenizer. Homogenates were transferred to 1.5 mL Eppendorf polypropylene tubes in which they were subjected to a differential centrifugation protocol adapted from Wallace et al. (2003). First, homogenates were centrifuged at 800 x g for 15 min at 4 °C. This step produced a supernatant containing organelles and proteins, and a pellet containing cellular debris. The supernatant from this first spin was then subjected to an ultracentrifugation at 100 000 x g for 60 min at 4 °C producing a pellet containing organelles. The resulting supernatant was then heat denatured at 80 °C for 10 min followed by placement on ice for 1 h. Following this denaturation step, the supernatant was centrifuged at 50 000 x g for 10 min at 4 °C to produce a pellet containing heat-denaturable proteins (HDP) such as enzymes, and a supernatant containing heat-stable proteins and peptides (HSP) such as glutathione and metallothionein-like proteins. Thus, four fractions were obtained from this centrifugation procedure: cellular debris; organelles; HDP and HSP.

Pellets from the centrifugation procedure were lyophilized and digested in 70% HNO_3 for 5 d at room temperature, after which they were diluted to 2% HNO_3 with ultrapure water. As the

supernatants only contained dissolved peptides and proteins with relatively little extraneous organic matter, they were not digested but rather were simply acidified to 2% HNO_3. Metal concentrations in the sub-cellular fractions were analyzed by Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (ICP-MS; Thermo Elemental, Model X-7, UK). Blanks and a certified reference material (TORT-1) were digested in the same manner. Blanks indicated negligible contamination (Cd < 0.013 $\mu g \cdot L^{-1}$), and the recoveries of Cd in TORT-1 reference samples (N = 4) were 96% ± 8% (mean ± SE).

To obtain a measure of total liver Cd, an aliquot of the homogenate was taken for analysis before the first centrifugation step. This aliquot was also used in a mass balance calculation to verify the recovery of Cd in the various sub-cellular fractions. The average recovery of Cd was 107% ± 4% (N = 13; mean ± SE).

Statistical analyses

In previous field transplant experiments (Kraemer et al. 2005), we observed that Cd accumulation in the liver and kidney was relatively slow; significant changes in hepatic and renal Cd concentrations were only detected after 10-20 d. Therefore for the current diet manipulation experiment, to evaluate the contributions of water and diet to Cd accumulation in various organs, we concentrated on the day-30 exposure dataset.

For the liver, gut and kidney datasets, the conditions of normality (examined with a Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity of variance (examined with a Levene Median test) were met. Using the day-30 dataset, we initially partitioned the variance among the organ (gut, liver and kidney) and Cd treatments (REF, FO, WO, WF) with a 2-way Analysis of Variance (ANOVA). Organ and treatment factors, and organ x treatment interactions were highly significant ($P < 0.001$). Given that organ concentrations varied differently within treatments, and

227 since we were directly interested in the effect of Cd source (treatment) on each organ, the data
228 were re-analyzed using 1-way ANOVA and *a posteriori* multiple comparisons were examined
229 with the Tukey-Kramer HSD test ($P \leq 0.05$). Due to violations in normality, the nonparametric
230 Kruskal-Wallis test was used for the gill dataset and multiple comparisons were examined with
231 Dunn's post-hoc test ($P \leq 0.05$).

232 Cadmium concentrations in the indigenous fish from lakes Opasatica and Dufault were
233 also compared at t=30 d, using a 2-way ANOVA (lake and organ as factors). Both main effects
234 and the lake x organ interaction were highly significant ($P \leq 0.001$). Since we were interested in
235 organ differences between lakes, we reanalyzed the data with the Student t test, comparing Lake
236 Opasatica to Lake Dufault for each organ.

237 For the sub-cellular analyses, we first compared Cd concentrations in the sub-cellular
238 fractions in perch that had received Cd from different sources for 30 days. Using a similar
239 approach as for the whole organ datasets, differences in Cd concentrations in the sub-cellular
240 fractions (organelles, HDP, HSP and cellular debris) resulting from Cd exposure from different
241 sources (FO, WO and FW) were examined with a 2-way ANOVA (using Cd source and sub-
242 cellular fractions as factors) for the day-30 dataset.

243 Statistical analysis was performed on all experimental data with SYSTAT 10 and
244 SigmaStat 3.11 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

245

246

246 ## Results

247 ### Cd in the reference and metal-impacted lakes

248 The contamination status of our two study lakes is confirmed by the fact that calculated
249 free Cd^{2+} ion concentrations in the metal-impacted Lake Dufault were ~130 times greater than
250 those in the less-impacted Lake Opasatica (Table 1). Likewise, Cd concentrations in
251 zooplankton from the metal-impacted lake (Dufault) were significantly higher than those in
252 zooplankton collected from the reference lake (Opasatica; see Table 2). In indigenous perch, Cd
253 concentrations were also significantly ($P \leq 0.001$) higher in all the organs examined for
254 individuals collected from metal-impacted Lake Dufault than in those from the reference lake
255 (Figures 1 and 2). Cadmium concentrations differed among organs and decreased in the order:
256 kidney > liver > gut > gills.

Tables 1,2 near here

Figs. 1,2 near here

257 Since fish receiving Cd-contaminated food also received a small volume (<100 mL) of
258 Cd-contaminated water from Lake Dufault, we tested if this addition significantly increased
259 aqueous Cd concentrations in these cages. Aqueous Cd concentrations in cages where fish
260 received Cd-contaminated food only were measured after 6, 21 and 29 days of experimentation.
261 These values were compared with ambient aqueous Cd concentrations in lakes Opasatica and
262 Dufault (one-way ANOVA, Tukey-Kramer post-hoc tests, $P \leq 0.05$). The addition of Cd-rich
263 prey collected from Lake Dufault to cages in Lake Opasatica did not lead to an appreciable
264 increase in dissolved [Cd] in the cages located in this reference lake (Table 1); the small amount
265 of contaminated water added with prey was thus insufficient to influence Cd uptake by the perch.

266 ### Cd in the organs of caged perch

267 Due to mortality, fish from replicate cages (2 cages for each sampling time and each
268 exposure treatment) were pooled in order to have enough tissue for analyses. After 30 d
269 exposure to Cd, both the gut and the liver were mainly influenced by aqueous Cd, but diet-borne

Cd also contributed to the bioaccumulation (Figures 1a, 2a). Cadmium concentrations in both the gut and the liver of perch exposed only to dietary Cd for 30 d were significantly higher than those concentrations measured in Lake Opasatica perch (Student t test; $P \leq 0.01$). By the end of the experiment, concentrations in the gut of caged fish exposed to aqueous Cd either alone or with the Cd-contaminated diet were not significantly different from those in indigenous Lake Dufault perch (Student t test, $P > 0.05$). This was not the case for the liver, as hepatic Cd concentrations in caged fish were still significantly lower than those in indigenous Lake Dufault perch, indicating that unlike the gut, steady-state had not yet been achieved in this organ ($P \leq 0.001$).

Unlike the liver and the gut, there appeared to be no significant influence of dietary Cd on bioaccumulation in the gills and kidney; after 30 d of exposure, Cd concentrations were not significantly higher in perch exposed only to diet-borne Cd compared to Lake Opasatica perch (Student t test; $P > 0.05$). Furthermore, for perch exposed only to aqueous metal, Cd concentrations in these two organs were not significantly different than those measured in perch exposed to Cd to both aqueous and dietary Cd (Figures 1b, 2b). By the end of the exposure period, Cd concentrations in the gills and the kidney of caged fish exposed to aqueous Cd either alone or with the Cd-contaminated diet were still significantly lower than those measured in indigenous Lake Dufault perch (Student t test, $P \leq 0.001$).

Sub-cellular Cd partitioning within the liver

For comparison purposes, we determined Cd sub-cellular partitioning not only in the livers of caged fish but also in perch living naturally in the two study lakes (Table 3). In indigenous fish from the reference lake (Opasatica), Cd concentrations in the heat-stable protein (HSP) fraction were slightly higher than in the other sub-cellular fractions. This difference was more marked in perch from Lake Dufault, where Cd concentrations in the HSP fraction were ~2

Table 3 near here

294 times higher than in the other sub-cellular fractions. On the other hand, within a given lake
295 hepatic Cd concentrations in the remaining fractions (organelles, heat-denaturable proteins and
296 cellular debris) did not differ significantly. During the diet manipulation study, there was no
297 significant effect of Cd source on Cd sub-cellular concentrations, nor on their relative
298 distribution after 30 d exposure. Mean Cd concentrations increased ~3-fold in the heat-
299 denaturable protein fraction (HDP) in fish exposed to aqueous Cd only (WO) from day 0 to day
300 30. Similar increases were observed in perch receiving dietary Cd only and dietary + aqueous Cd
301 (Figure 3a). In the organelle fraction, Cd concentrations increased ~2-3 times (Figure 3b)
302 between days 0 and 30 for all fish receiving Cd, but due to variability in the data none of these
303 increases were significant ($P > 0.05$). In the heat-stable protein fraction, however, dramatic
304 increases in Cd concentrations were observed; concentrations in this fraction on day 30 were
305 approximately 5 times higher than initial values for all fish receiving Cd (Figure 3c).

Fig. 3 near here

306 To better interpret the trends in the various sub-cellular fractions, we considered the
307 quantity of Cd in three metal pools in the caged fish: a detoxified metal pool (HSP), including
308 heat-stable proteins such as metallothionein; a metal-sensitive fraction (MSF), composed of
309 organelles and heat-denaturable proteins; and a pool containing cellular debris. At time 0, the
310 cellular Cd burden was low and the majority (~60%) was associated with the MSF, compared to
311 ~30% of the cellular Cd burden associated with the HSP pool. After 30 d of exposure to Cd, the
312 proportion of Cd associated with the HSP fraction had increased from 30% at time 0 to
313 approximately 50%, 40% and 46%; concurrently, the proportion of Cd associated with the MSF
314 had decreased from 60% to approximately 40%, 48% and 48% for fish exposed to food only,
315 water only, and food and water respectively (Figure 4).

Fig. 4 near here

316 ## Discussion

317 ### Metal accumulation at the organ level

318 In our study, only aqueous Cd influenced branchial Cd concentrations in caged perch.
319 Since the gills are constantly being irrigated with water for respiration and to maintain acid-base
320 balance and ionoregulation, this result is not surprising. Branchial accumulation occurs rapidly
321 when fish are exposed to elevated aqueous levels of this metal (McGeer et al. 2000; DeSmet et
322 al. 2001). In agreement with our results, Kraal et al. (1995) noticed a similar increase in
323 branchial Cd in response to aqueous, but not dietary, Cd in a previous laboratory study on carp
324 (*Cyprinus carpio*).

325 The lack of an increase in branchial Cd concentrations between 15 d and 30 d in caged
326 fish exposed to aqueous Cd (either alone, or with Cd-contaminated food) suggests that steady-
327 state had likely been reached in this organ. However, if steady-state had been reached, Cd
328 concentrations in these two treatment groups should have been statistically similar to indigenous
329 Lake Dufault perch, which was not the case as branchial Cd concentrations were still
330 significantly lower ($P \leq 0.001$) in the caged fish compared to indigenous Lake Dufault perch at
331 the end of the study. Having been chronically exposed to Cd over their lifetime, Lake Dufault
332 perch may have developed mechanisms for coping with excess Cd, such as storage in detoxified
333 forms, resulting in higher steady-state concentrations of this metal in their gills.

334 A similar dominant influence of aqueous Cd was observed for the kidneys. The relative
335 unimportance of dietary Cd for renal accumulation observed in this study is supported by results
336 from a previous field transplantation study where juvenile yellow perch were transplanted from
337 Lake Opasatica to Lake Dufault to monitor Cd accumulation dynamics (Kraemer et al. 2005). In
338 that study, fish were exposed to the same aqueous levels as in the current study, but perch were
339 allowed to feed to satiation on the indigenous zooplankton, whereas the current study used a

ration of 10% body weight•d^{-1}. After 30 d of exposure, renal Cd concentrations in the latter study (12.7 ± 0.9 μg•g^{-1}) were not statistically different ($P > 0.05$, t test) from renal concentrations in perch exposed to Cd-contaminated food and water (12.3 ± 1.3 μg•g^{-1}) or aqueous Cd only (9.8 ± 1.0 μg•g^{-1}) in the current study. In other words, these independent studies demonstrated similar renal Cd concentrations after the same exposure time, regardless of the ration quantity. The dominance of the aqueous route for renal Cd accumulation can be explained by the physiological roles and circulatory position of the kidney within the fish. Located dorsally, the kidney in freshwater fish is supplied by both arterial and venous blood (Larsen and Perkins 2001). Freshwater fish produce a large amount of urine, and a high cardiac output of oxygenated blood from the gills via the arterial system is required to produce enough pressure in the glomeruli to drive the filtration process; this high blood flow exposes the kidney to waterborne contaminants that have been taken up via the gills.

Cadmium concentrations in the gut were also strongly affected by aqueous Cd, but less so by dietary Cd. This result is somewhat surprising, since freshwater fish drink little water and accumulation in the gut might normally be assumed to result from dietary uptake. However, the gut may also have a role in metal depuration, and increases in gut Cd concentrations seen in fish exposed only to aqueous Cd could reflect elimination via biliary excretion into the gut, followed by some retention of the excreted Cd in the intestinal mucous layer. It has been shown that renal excretion of Cd in fish is low, indirectly lending support to the hypothesis that biliary excretion may play an important role in Cd elimination (Giles 1988). Another possibility is that the gut is simply able to store Cd taken up by the gills. Gut Cd concentrations in caged perch exposed to aqueous Cd (either alone or with dietary Cd) were not significantly different from those in indigenous Dufault fish, suggesting that steady-state had been reached. Unlike the situation with

363 the gills, there appears to be no difference in how the Lake Opasatica and Lake Dufault perch
364 populations accumulate Cd in this organ when exposed to the same contaminated environment.
365 Similar to the gut, the liver was also influenced by both aqueous and dietary Cd, showing
366 increases in hepatic Cd after 30 d in perch exposed to Cd, independent of the exposure route.
367 The liver has a role in maintaining homeostasis by processing and redistributing nutrients taken
368 up during digestion. Thus, the shared importance of both dietary and aqueous routes for hepatic
369 Cd is likely related to the unique location of the liver receiving not only oxygenated blood from
370 the dorsal aorta via the hepatic artery, but also venous drainage from the gut via the hepatic
371 portal vein (Hinton et al. 2001). Note, however, that Cd accumulation in the liver after 30 d was
372 not strictly additive, i.e., hepatic Cd burdens in the waterborne + diet-borne treatment (FW) were
373 less than the sum of the burdens in the food-only (FO) + water-only (WO) treatments. We
374 speculate that Cd uptake via the gills can affect uptake from the gut (negative feedback), or vice
375 versa (Kamunde et al. 2002). Alternatively, biliary excretion may be initiated when liver Cd
376 concentrations exceed a certain threshold, thus reducing accumulation below the level expected
377 on the basis of strict additivity.

378 **Hepatic sub-cellular partitioning of Cd**

379 Long-term aqueous and dietary exposures to metals have been reported to cause negative
380 effects, including reductions in growth and survival (Woodward et al. 1995), physiological
381 impairment (Laflamme et al. 2000; Levesque et al. 2002) and increased lipid peroxidation (Farag
382 et al. 1994). Therefore, we anticipated that the examination of changes in the sub-cellular
383 partitioning of Cd in response to aqueous and dietary exposure would lead to a better
384 understanding of the mechanisms of metal toxicity and detoxification that underlie these effects
385 seen at the organism level.

386 The importance of the heat-stable protein (HSP) fraction in Cd accumulation was most
387 evident in indigenous Lake Dufault fish. Cadmium concentrations in this sub-cellular fraction
388 were ~2 times higher than in the other fractions. The HSP fraction contains a variety of cellular
389 ligands including amino acids, low molecular weight peptides such as glutathione, and
390 metallothionein (MT). Among these ligands, metallothionein is of particular interest as this
391 sulphur-rich protein readily binds soft, class B metals such as cadmium (Mason and Jenkins
392 1995). The importance of this protein in the sequestration of cellular Cd has been well
393 documented in fish (Olsson and Hogstrand 1987; Laflamme et al. 2000; De Smet et al.
394 2001).Unlike indigenous Lake Dufault perch, Lake Opasatica perch (low hepatic Cd
395 concentrations) had Cd concentrations that were more or less evenly distributed among all the
396 sub-cellular fractions, including the HSP fraction. Furthermore, when compared on a
397 compartmental basis, the majority of the Cd burden was associated with the potentially metal-
398 sensitive fractions (containing organelles and heat-denaturable proteins). As hepatic Cd
399 concentrations were low in these reference fish, these results were likely due to low
400 metallothionein production within the liver, resulting in a more or less even distribution of Cd
401 among physiologically sensitive and detoxified cellular components.

402 The sub-cellular partitioning of Cd in the caged fish represented a transition between the
403 two distribution patterns seen in the indigenous perch populations. For example, when total
404 hepatic Cd concentrations were still relatively low (e.g., Cd-contaminated food only, 15 d), the
405 sub-cellular distribution of Cd mimicked that seen in indigenous Lake Opasatica fish. When
406 total hepatic Cd concentrations increased (e.g., food and water exposure, 30 d), the sub-cellular
407 distribution changed, becoming more similar to the distribution seen in indigenous Lake Dufault
408 perch.

409 To determine if Cd was accumulating differently in fish exposed to the various Cd
410 treatments, we examined changes in Cd accumulation within the HSP fraction and the metal-
411 sensitive fractions. Here the general trend was an increase in the percentage of Cd associated
412 with the HSP fraction and a decrease in Cd associated with metal-sensitive fractions as time
413 progressed, regardless of the exposure route. To determine if this accumulation was linked to
414 differences in potential toxicological impact, we examined changes in Cd concentrations in the
415 sub-cellular fractions. Here we see that concentrations increased most dramatically in the HSP
416 fraction, in all fish receiving Cd, regardless of the exposure route. In the heat-denaturable
417 protein fraction (i.e., a metal-sensitive fraction), Cd concentrations had increased approximately
418 3-fold by day 30 in fish receiving Cd via aqueous routes (either alone or with dietary Cd). In
419 contrast, Cd concentrations in the HDP fraction increased by a factor of only ~1.5 in fish
420 receiving Cd from dietary sources only. These results indicate that metallothionein is induced in
421 response to Cd exposure, regardless of the exposure route. When fish were exposed to aqueous
422 Cd (either alone or with dietary Cd), total hepatic Cd accumulation was much higher than for the
423 food-only exposures and metal detoxification was less effective, i.e., at the sub-cellular level
424 there was appreciable accumulation in metal sensitive fractions (HDP).

425 In conclusion, we have demonstrated experimentally in the field that Cd accumulation in
426 juvenile yellow perch is dependent on both aqueous and dietary sources, depending on the organ
427 studied. Whereas only aqueous Cd appeared to be important for gill and kidney Cd
428 accumulation, both dietary and aqueous Cd influenced the gut and liver. Changes in hepatic sub-
429 cellular partitioning during the various treatments showed that Cd handling was similar in all
430 exposure regimes, that is, was insensitive to the route of exposure. The importance of
431 metallothionein induction as a mechanism of sequestering and thus detoxifying cellular Cd was
432 reinforced in this study. However, when the rate of Cd accumulation was high (i.e., in the

433 aqueous exposures), metal detoxification was less effective. Taken together, the results of this
434 study suggest that both diet-borne and waterborne Cd play a role in Cd accumulation and thus
435 should both be factored into predictive models for metal-impacted ecosystems.

436 ## Acknowledgements

437 This study was supported by a grant from the Metals in the Environment Research
438 Network (MITE-RN). We are grateful to the Société de la Faune et des Parcs de l'Abitibi-
439 Témiscamingue (Government of Québec) for their logistical help with the field study. We also
440 thank Caroline Durand and Philipe Bourret for their field assistance and Michelle Geoffroy-
441 Bordeleau, Pauline Fournier and Sébastien Duval for their help in the laboratory. The statistical
442 insight of the Journal editor was greatly appreciated. Peter G.C. Campbell is supported by the
443 Canada Research Chair programme.

444

445

445 **Reference List**

446 Dallinger, R. and Kautzky, H. 1985. The importance of contaminated food for the uptake of
447 heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*): a field study. Oecologia (Heidelb) **67**:
448 82-89.

449 De Smet, H., DeWachter, B., Lobinski, R., and Blust R. 2001. Dynamics of (Cd, Zn)-
450 metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during
451 cadmium exposure. Aquat. Toxicol. **52**: 269-281.

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

455 Farag, A.M., Boese, C.J., Woodward, D.F., and Bergman, H.L. 1994. Physiological changes and
456 tissue metal accumulation in rainbow trout exposed to foodborne and waterborne metals.
457 Environ. Toxicol. Chem. **13**: 2021-2029.

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

461 Giles, M.A. 1988. Accumulation of cadmium by rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during
462 extended exposure. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **45**: 1045-1053.

463 Handy, R.D. 1993. The effect of acute exposure to dietary Cd and Cu on organ toxicant
464 concentrations in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquat. Toxicol. **27**: 1-14.

465 Harrison S.E. and Klaverkamp, J.F. 1989. Uptake, elimination and tissue distribution of dietary
466 and aqueous cadmium by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and lake whitefish (*Coregonus*
467 *clupeaformis*). Environ. Toxicol. Chem. **8**: 87-97.

468 Hinton, D.E., Segner, H., and Braunbeck, T. 2001. Toxic responses of the liver. *In* Target organ
469 toxicity in marine and freshwater teleosts: volume 1 - organs. *Edited by* D. Schlenk and
470 W.H. Benson, Taylor and Francis, New York, NY, USA pp. 91-150.
471 Kamunde, C., Clayton, C., and Wood, C.M. 2002. Waterborne vs. dietary copper uptake in
472 rainbow trout and the effects of previous waterborne copper exposure. Am. J. Physiol.-Reg.
473 Integr. Comp. Physiol. **283**: R69-R78.
474 Kraal., M.H., Kraak, M.H.S., De Groot, C.J., and Davids, C. 1995. Uptake and tissue distribution
475 of dietary and aqueous cadmium by carp (*Cyprinus carpio*). Exotoxicol. Environ. Saf. **31**:
476 179-183.
477 Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., and Hare, L. 2005. Dynamics of Cd, Cu and Zn accumulation
478 in organs and sub-cellular fractions in field-transplanted juvenile yellow perch (*Perca*
479 *flavescens*). Environ. Pollut. **138**: 324-337.
480 Laflamme, J.-S., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., and Hontela, A. 2000. Interrenal
481 metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, Zn exposure in yellow perch,
482 *Perca flavescens*, from Abitibi lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **57**: 1692-1700.
483 Larsen, B.K. and Perkins Jr., E.J. 2001. Target organ toxicity in the kidney. *In* Target organ
484 toxicity in marine and freshwater teleosts: Volume 1 - organs. *Edited by* D. Schlenk and
485 W.H. Benson, Taylor and Francis, New York, NY, USA pp. 91-150.
486 Levesque, H.M., Moon, T.W., Campbell, P.G.C., and Hontela, A. 2002. Seasonal variation in
487 carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed
488 to metals in the field. Aquat. Toxicol. **60**: 257-267.
489 Mason, A.Z. and Jenkins, K.D. 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. *In* Metal
490 Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. *Edited by* A. Tessier and D.R. Turner,
491 John Wiley and Sons Ltd., New York, NY, USA pp. 478-608.

492 McGeer, J.C., Szebedinsky, C., McDonald, D.G., and Wood, C.M. 2000. Effects of chronic
493 sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal
494 accumulation. Aquat. Toxicol. **50**: 245-256.
495 Mount, D.R., Barth, A.K., Garrison, T.D., Barten, K.A., and Hockett, J.R. 1994. Dietary and
496 waterborne exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to copper, cadmium, lead
497 and zinc using a live diet. Environ. Toxicol. Chem. **13**: 2031-2041.
498 Munger, C., Hare, L., and Tessier, A. 1999. Cadmium sources and exchange rates for *Chaoborus*
499 larvae in nature. Limnol Oceangr. **44**: 1763-1771.
500 Olsson, P.-E. and Hogstrand, C. 1987. Sub-cellular distribution and binding of cadmium to
501 metallothionein in tissues of rainbow trout after exposure to ^{109}Cd in water. Environ.
502 Toxicol. Chem. **6**: 867-874.
503 Tipping, E. 1998. Humic ion-binding Model VI: an improved description of the interactions of
504 protons and metal ions with humic substances. Aquat. Geochem. **4:** 3-48.
505 Wallace, W.G. and G.R. Lopez 1996. Relationship between sub-cellular cadmium distribution in
506 prey and cadmium trophic transfer to a predator. Estuaries **19**: 923-930.
507 Wallace, W.G. and Luoma, S.N. 2003. Sub-cellular compartmentalization of Cd and Zn in two
508 bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). Mar. Ecol. Prog. Ser. **257**:
509 123-137.
510 Wallace, W.G., G.R. Lopez, and J.S. Levinton 1998. Cadmium resistance in an oligochaete and
511 its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. Mar. Ecol. Prog. Ser. **172**:
512 225-237.
513 Wallace, W.G., Lee, B.-G., and Luoma, S.N. 2003. Sub-cellular compartimentalization of Cd
514 and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically
515 detoxified metal (BDM). Mar. Ecol. Prog. Ser. **249**: 183-197.

516 Williams, D.R. and Giesy Jr., J.P. 1978. Relative importance of food and water sources to
517 cadmium uptake by *Gambusia affinis* (Poeciliidae). Environ. Res. **16**: 326-332.
518 Woodward, D.F., Farag, A.M., Bergman, H.L., DeLonay, A.J., Little, E.E., Smith, C.E., and
519 Barrows, F.T. 1995. Metals-contaminated benthic invertebrates in the Clark Fork River,
520 Montana: effect on age-0 brown trout and rainbow trout. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **52**: 1994-
521 2004.
522

522 Table 1: Mean aqueous Cd concentrations (± standard error, N = 4) within cages located in Lake
523 Opasatica sampled after 6, 21 and 29 days of feeding perch with a Cd-contaminated
524 diet. Also given are total aqueous Cd and calculated free Cd^{2+} concentrations in both
525 lakes. Mean total aqueous Cd concentrations followed by the same letter are not
526 significantly different (one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer post-hoc test;
527 $P \leq 0.05$).

Lake	Sample	Cd (nM)	Cd^{2+} (nM)
Opasatica	Cage receiving Cd-contaminated food – 6 days	0.12 ± 0.003^{a}	
	Cage receiving Cd-contaminated food – 21 days	0.13 ± 0.009^{a}	
	Cage receiving Cd-contaminated food – 29 days	0.39 ± 0.036^{b}	
	Cage receiving reference diet – 6 days	0.10 ± 0.005^{a}	
	Lakewater outside the cages	0.11 ± 0.021^{a}	0.02*
Dufault	Lakewater	5.55 ± 0.028^{c}	2.48*

528

529 * Free Cd^{2+} concentrations were estimated using the Windermere Humic Aqueous Model
530 (WHAM 6.0.1: Tipping 1998).

531

Table 2: Mean Cd concentrations (± standard error, N = 3) in bulk zooplankton samples collected from Lakes Opasatica and Dufault in June and July. Concentrations were compared between lakes for each month with the Student t test and significant differences between lakes ($P \leq 0.001$) are represented by ***.

Lake	Month	[Cd] ($\mu g \cdot g^{-1}$ dw)
Opasatica	June	4.9 ± 0.3
	July	2.8 ± 0.2
Dufault	June	10.2 ± 0.9***
	July	11.8 ± 0.3***

Table 3: Mean Cd concentrations (± standard error, N = 3 composites of 2-5 livers) in the various sub-cellular fractions of indigenous Opasatica perch (IND-OP) and indigenous Dufault perch (IND-DU) (*Perca flavescens*) sampled on day 30 of the study. Differences in Cd concentrations among fractions were compared with a one-way ANOVA ($P \leq 0.05$). Means followed by the same letter within each lake are not significantly different ($P \leq 0.05$; Tukey-Kramer HSD post-hoc test). HDP = heat-denaturable proteins; HSP = heat-stable proteins.

	Sub-cellular fractions ($\mu g \cdot g^{-1}$ dry weight liver)			
Sample	Cellular debris	Organelles	HDP	HSP
IND-OP	0.61 ± 0.08^{ab}	0.78 ± 0.09^{ab}	0.43 ± 0.05^{a}	1.24 ± 0.29^{b}
IND-DU	3.69 ± 0.66^{a}	3.70 ± 0.81^{a}	1.80 ± 0.09^{a}	9.18 ± 0.78^{b}

Figure Captions

Figure 1: Temporal changes in Cd concentrations in gut (a) and gills (b) in caged yellow perch (*Perca flavescens*) receiving Cd from the reference diet + reference water (reference), Cd-contaminated diet + reference water (food only), reference diet + Cd-contaminated water (water only) and Cd-contaminated food + water (food and water). Also shown are Cd concentrations in indigenous perch sampled on days 0, 15 and 30 from lakes Opasatica (solid bars) and Dufault (open bars). All statistical analyses were carried out on the 30 d dataset; comparisons between indigenous perch from lakes Dufault and Opasatica are represented by * ($P \leq 0.001$) and significant differences in Cd concentrations in caged fish are represented by different letters ($P \leq 0.05$).

Note on day 30 n = 1 (# symbol) for the reference fish.

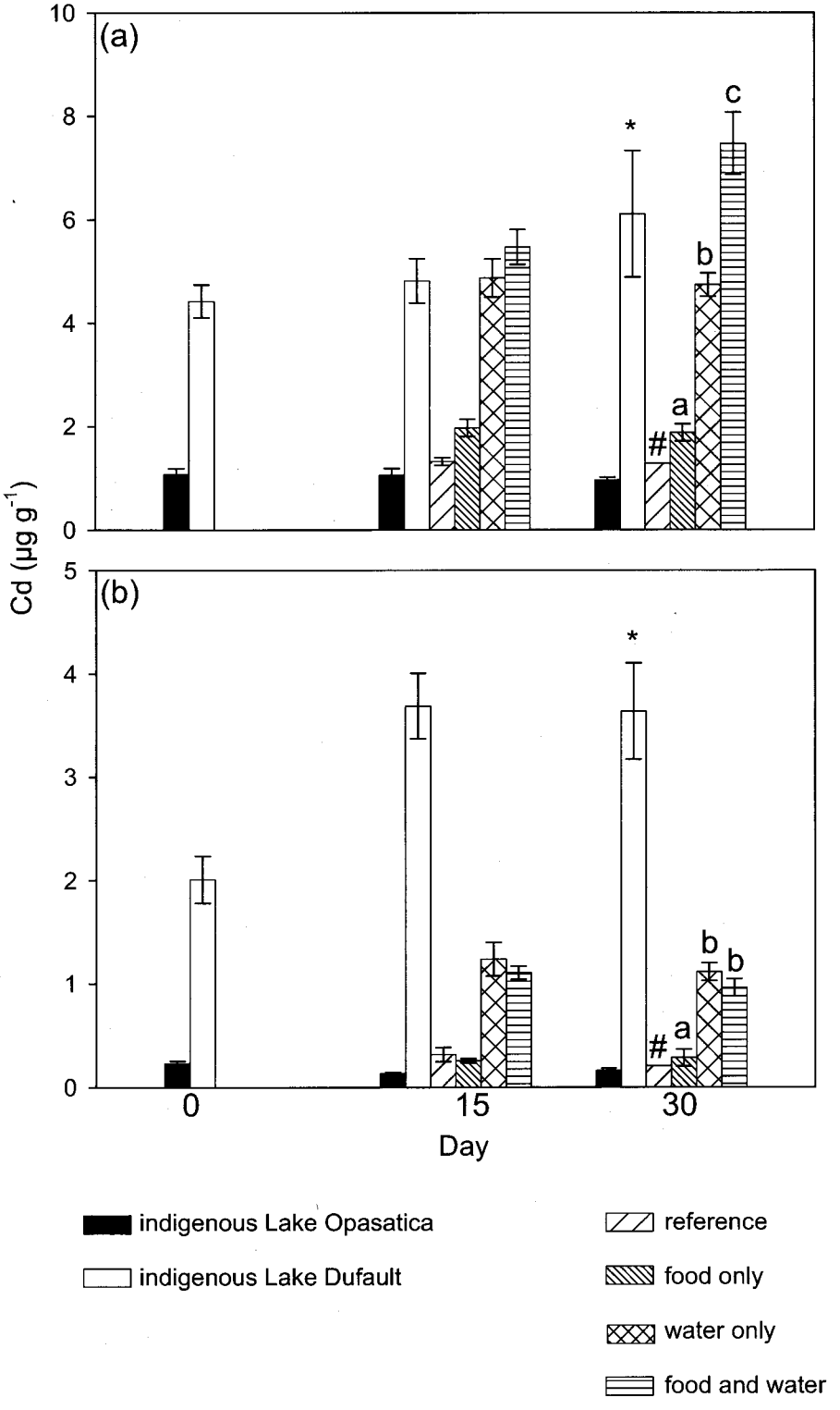
Figure 2: Temporal changes in Cd concentrations in liver (a) and kidney (b) in caged yellow perch (*Perca flavescens*) receiving Cd from reference diet + reference water (reference) Cd-contaminated diet + reference water (food only), reference diet + Cd-contaminated water (water only) and Cd-contaminated food + water (food and water). Also shown are Cd concentrations in indigenous perch sampled on days 0, 15 and 30 from lakes Opasatica (solid bars) and Dufault (open bars). Note the break in the vertical axes. All statistical analyses were carried out on the 30 d dataset; comparisons between indigenous perch from lakes Dufault and Opasatica are represented by * ($P \leq 0.001$) and significant differences in Cd concentrations in caged fish are represented by different letters ($P \leq 0.05$).

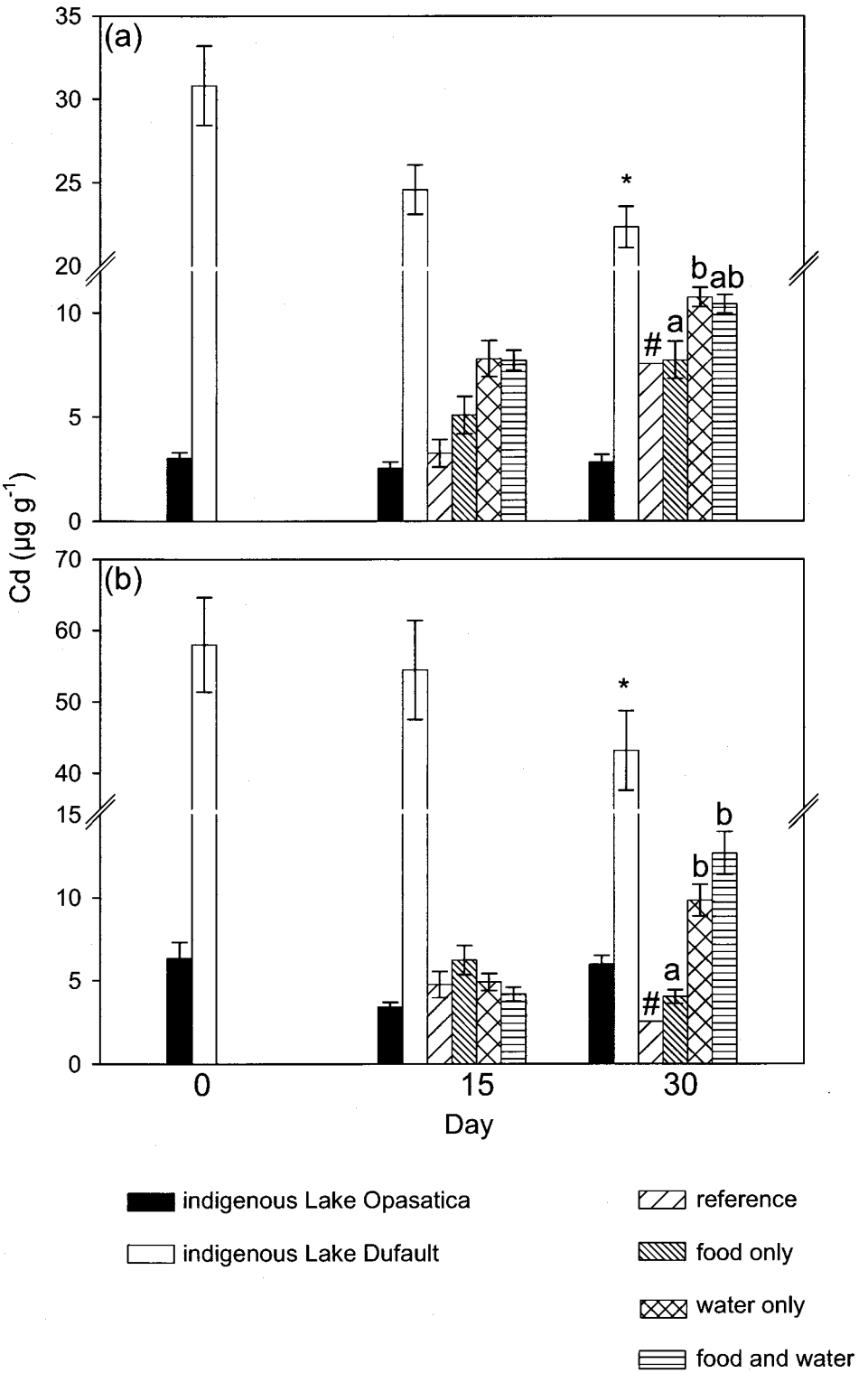
Note on day 30 n = 1 (# symbol) for the reference fish.

Figure 3: Temporal changes in Cd concentrations in hepatic sub-cellular fractions containing heat-denaturable proteins (a), organelles (b), heat-stable proteins (c) and cellular debris (d) in yellow perch (*Perca flavescens*) receiving Cd from reference diet + reference water (reference), Cd-contaminated diet + reference water (food only), reference diet + Cd-contaminated water (water only) and Cd-contaminated food + water (food and water). Also shown are Cd concentrations in sub-cellular fractions of fish sampled at time 0 (Lake Opasatica perch; solid bars).

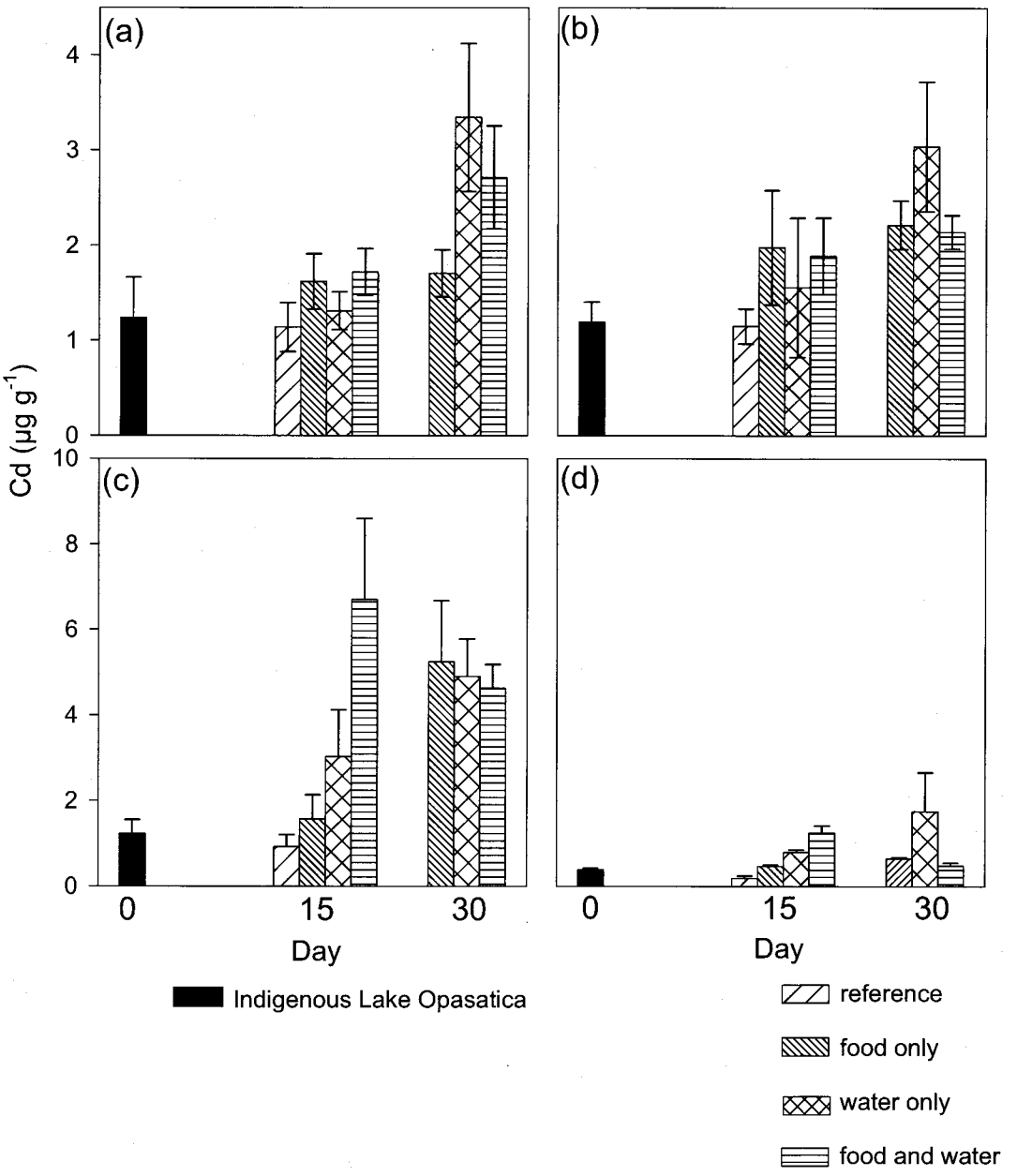
Note: reference fish on day 30 were omitted because only one fish was recovered on this day.

Figure 4: Temporal changes in the amount of Cd present in detoxified fractions (HSP; solid circles), potentially metal-sensitive fractions (open circles) and cellular debris (solid triangles), expressed as a percentage of total cellular Cd in perch receiving Cd-contaminated food only (a), Cd-contaminated water only (b) and Cd-contaminated food + water (c).


(a)
(b)
Cd (µg g-1)
Day
0
15
30
*
#
a
b
c
indigenous Lake Opasatica
indigenous Lake Dufault
reference
food only
water only
food and water


(a)
(b)
Cd (µg g-1)
Day
0
15
30
*
#
a
b
ab
indigenous Lake Opasatica
indigenous Lake Dufault
reference
food only
water only
food and water

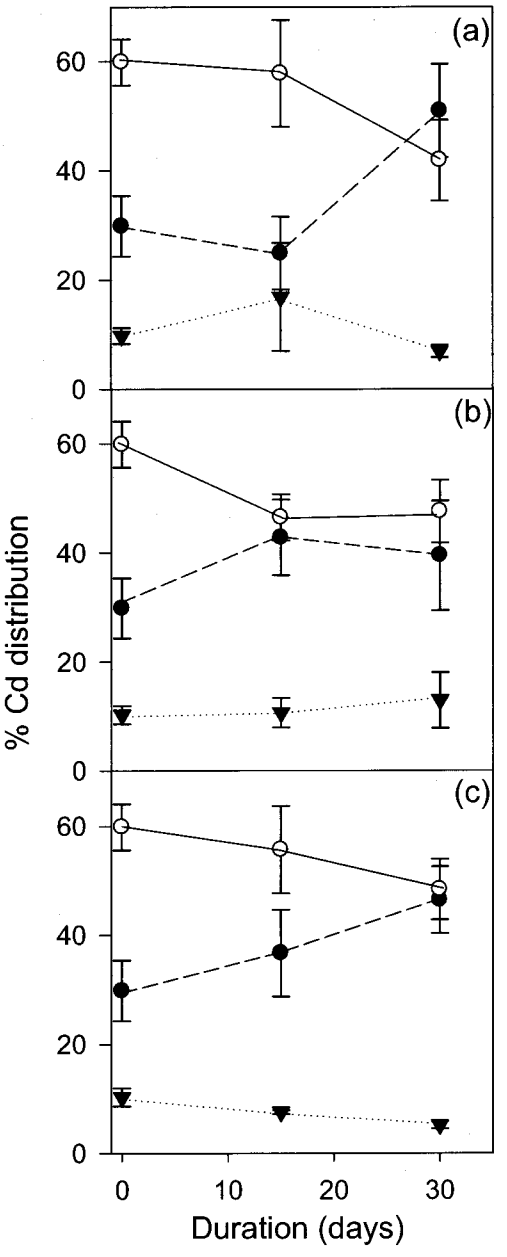
1


(a)
(b)
(c)
(d)
Cd (µg g-1)
0
1
2
3
4
0
2
4
6
8
10
0
15
30
Day
Indigenous Lake Opasatica
reference
food only
water only
food and water

2

3

1



2

11. 4e article : Seasonal variations in hepatic Cd and Cu concentrations and in the sub-cellular distribution of these metals in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*)

Lisa D. Kraemer, Peter G.C. Campbell*, Landis Hare

Université du Québec, INRS-Eau, Terre et Environnement, 490 de la Couronne, Québec City, QC, Canada G1K 9A9

Sous presse Environmental Pollution

ARTICLE IN PRESS
+ MODEL
Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
ELSEVIER
Environmental Pollution xx (2005) 1–13
ENVIRONMENTAL POLLUTION
www.elsevier.com/locate/envpol

Seasonal variations in hepatic Cd and Cu concentrations and in the sub-cellular distribution of these metals in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*)☆

Lisa D. Kraemer, Peter G.C. Campbell*, Landis Hare

Université du Québec, INRS-Eau, Terre et Environnement, 490 de la Couronne, Québec City, QC, Canada G1K 9A9

Received 24 June 2005; received in revised form 21 September 2005; accepted 3 October 2005

In fish from metal-contaminated sites, seasonal variations in hepatic Cd and Cu concentrations were greater than in fish from reference sites, and homeostatic control of sub-cellular metal distribution was compromised.

Abstract

Temporal fluctuations in metal (Cd and Cu) concentrations were monitored over four months (May to August) in the liver of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) sampled from four lakes situated along a metal concentration gradient in northwestern Quebec: Lake Opasatica (reference lake, low metal concentrations), Lake Vaudray (moderate metal concentrations) and lakes Osisko and Dufault (high metal levels). The objectives of this study were to determine if hepatic metal concentrations and metal-handling strategies at the sub-cellular level varied seasonally. Our results showed that Cd and Cu concentrations varied most, in both absolute and relative values, in fish with the highest hepatic metal concentrations, whereas fish sampled from the reference lake did not show any significant variation. To examine the sub-cellular partitioning of these two metals, we used a differential centrifugation technique that allowed the separation of cellular debris, metal detoxified fractions (heat-stable proteins such as metallothionein) and metal sensitive fractions (heat-denaturable proteins (HDP) and organelles). Whereas Cd concentrations in organelle and HDP fractions were maintained at low concentrations in perch from Lakes Opasatica and Vaudray, concentrations in these sensitive fractions were higher and more variable in perch from Lakes Dufault and Osisko, suggesting that there may be some liver dysfunction in these two fish populations. Similarly, Cu concentrations in these sensitive fractions were higher and more variable in perch from the two most Cu-contaminated lakes (Dufault and Osisko) than in perch from the other two lakes, suggesting a breakdown of homeostatic control over this metal. These results suggest not only that metal concentrations vary seasonally, but also that concentrations vary most in fish from contaminated sites. Furthermore, at the sub-cellular level, homeostatic control of metal concentrations in metal-sensitive fractions is difficult to maintain in perch with high hepatic metal concentrations.
© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Metals; Liver; Subcellular partitioning; Detoxification; Fish; Temporal variability

1. Introduction

Metals are ubiquitous in the environment and are natural components of the biosphere. Although they cannot be created or destroyed, metals can be redistributed both on a regional and global scale. Human activities, such as mining and smelting operations, have greatly influenced this redistribution of metals, and have resulted in increased concentrations of many potentially toxic metals in aquatic ecosystems. Once metals have entered these ecosystems they may be available for uptake by various aquatic species, including fish. Metal accumulation may in turn leave fish populations at an increased risk of experiencing toxicity, as evidenced by oxidative stress

☆ Contribution No. 47 from the Metals in the Environment Research Network (http://www.mite-rn.org).

* Corresponding author. Tel.: +1 418 654 2538; fax: +1 418 654 2600.
E-mail address: peter.campbell@ete.inrs.ca (P.G.C. Campbell).

0269-7491/$ - see front matter © 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.envpol.2005.10.004

(Farag et al., 1995), physiological impairment (Laflamme et al., 2000; Rajotte and Couture, 2002; Couture and Kumar, 2003) and reduced growth (Sherwood et al., 2000).

As metals present in the aquatic environment are not always bioavailable, one of the most effective ways to evaluate their potential impacts on aquatic biota is to monitor metal concentrations in a sentinel species. Yellow perch (*Perca flavescens*) show potential as a metal biosentinel because they are relatively sedentary, abundant, easy to catch and are commonly found in both pristine and metal-contaminated environments (Aalto and Newsome, 1990; Giguère et al., 2004). Perhaps the most important characteristic for a metal biomonitor species is that metal concentrations in their tissues should be correlated to those in the environment. Such correlations have indeed been demonstrated on a regional basis for yellow perch sampled from a series of lakes ranging from reference to metal-contaminated (Giguère et al., 2004).

To be able to use yellow perch effectively as a metal biomonitor, it will be important to have a good understanding of factors, other than trace metal bioavailabilities, that may influence metal concentrations in this species. Many biomonitoring studies report their findings as weight-specific metal concentrations (e.g., $\mu g\, g^{-1}$ dry tissue weight), neglecting the influence that the antecedent growth rate could have on these values. For example, if the growth rate of the biomonitor in a particular habitat is faster than the rate of accumulation, the metal concentration will decrease due to growth dilution. The importance of growth rate may also have a seasonal component, especially with juvenile fish that grow a lot during the summer.

Metal concentrations in fish may also be affected by seasonal variations in metal concentrations in their prey species. Previous studies have shown that diet may be an important route of metal exposure for many fish species (Dallinger and Kautzky, 1985; Harrison and Klaverkamp, 1989; Mount et al., 1994). In addition, metal concentrations have been shown to vary seasonally in some aquatic invertebrate species including zooplankton, a major prey choice for juvenile yellow perch (Yan and Mackie, 1989, 1990; Hare and Campbell, 1992; Fialkowski et al., 2003). These seasonal variations in dietary exposure may in turn influence metal concentrations in juvenile yellow perch.

An understanding of seasonal variations in metal concentrations in yellow perch would thus be important, especially when monitored metal concentrations are compared over a number of years; it may be important to sample at the same time of year in order to make valid comparisons (Audet and Couture, 2003; Eastwood and Couture, 2002). The goal of this study was to examine the seasonal variations of cadmium (Cd) and copper (Cu) in the livers of juvenile yellow perch sampled from lakes along a metal gradient. The liver was chosen as the target organ because it has been shown to be important for the accumulation of these two metals (Giguère et al., 2004) and because its response time to short-term fluctuations in ambient metal concentrations is slower than for organs in direct contact with the external environment, such as the gills and gut (Kraemer et al., 2005). Our hypothesis was that it would be more difficult for fish with higher hepatic metal concentrations to maintain homeostatic control, and therefore we expected that metal concentrations would be more variable over time in perch from contaminated lakes. In addition to monitoring total hepatic concentrations, we also examined the sub-cellular distribution of these metals to determine whether metal-handling strategies varied seasonally.

2. Materials and methods

2.1. The study lakes

Four lakes representing a gradient in Cd and Cu concentrations were chosen for this study. The lakes are located in the Abitibi region, centered around the city of Rouyn-Noranda, approximately 600 km northwest of Montréal, Québec, Canada. A copper smelter has been in operation since 1927 in the city of Rouyn-Noranda, and although emissions are currently controlled, lakes located downwind from this smelter are contaminated with metals such as Cd, Cu and Zn due to historical atmospheric deposition. In addition to these direct inputs from the smelter, some lakes in this region are also contaminated by run-off from mine tailings and mineralized outcrops. For the study, we selected four lakes representing a metal concentration gradient: Lake Opasatica (reference lake, low metal concentrations), Lake Vaudray (moderate metal concentrations) and lakes Osisko and Dufault (high metal levels).

2.2. Labware

To minimize trace metal contamination during sample manipulation, all plastic labware used for sample collection and storage was acid washed prior to use by soaking in 15% nitric acid for 24 h, followed by rinsing repeatedly in high-purity water ($>18\ M\Omega\ cm^{-1}$). After rinsing, the labware was placed to dry under a laminar flow hood.

2.3. Yellow perch sampling and analysis

Juvenile yellow perch ($n = 13–15$) were collected with a seine net from each lake four times during the summer (May to August 2003). The same locations within each lake were chosen at each sampling time throughout the summer. Fish were transported live back to a nearby laboratory (<2 h) where they were killed by spinal dislocation. The weight and length were recorded for each fish, and the opercular bone was collected for aging. The fish were then dissected and the livers were removed, pooled into groups of five individual livers and frozen in liquid nitrogen for sub-cellular analyses. The samples were stored at −80 °C.

For sub-cellular analyses, liver samples were removed from storage at −80 °C and gently thawed and homogenized by hand in two volumes of cold 0.9% NaCl in a glass Potter–Elvehjem homogenizer until the homogenate just appeared homogenous. Following homogenization, an aliquot was taken for mass balance calculations (see description below) and the remaining tissue homogenates were transferred to 1.5-mL Eppendorf tubes and were subjected to a differential centrifugation protocol adapted from Wallace et al. (1998). The homogenized tissue was first subjected to an 800 × *g* centrifugation for 15 min at 4 °C. This step produced a supernatant containing organelles and proteins, and a pellet containing cellular debris. The supernatant from this first homogenization was then subjected to an ultracentrifugation at 100,000 × *g* for 60 min at 4 °C, yielding a pellet containing organelles. The supernatant obtained from this centrifugation contained cytosolic macromolecules such as proteins and low molecular weight peptides. This supernatant then underwent a heat denaturation step (80 °C for 10 min), followed by placement on ice for 1 h. Following this denaturation step, the sample was centrifuged at 50,000 × *g* for 10 min at 4 °C. This step produced a pellet containing heat-denaturable proteins (HDP), such as enzymes, and a supernatant containing heat-stable proteins and peptides (HSP), such as glutathione, metallothionein and metallothionein-like proteins.

Four fractions were obtained by this centrifugation procedure: cellular debris; organelles; HDP and HSP. The initial aliquot taken immediately following homogenization as well as the sub-cellular pellets collected from the centrifugation procedure were first weighed, then lyophilized, and the dry weight was noted. With these data the dry:wet ratio could be calculated and this information, collected from the initial liver aliquot, was then used to estimate the initial dry weight of the liver samples. Both the aliquot and the pellets were then digested in 70% HNO_3 for 5 days at room temperature, after which they were diluted to 2% HNO_3 with ultrapure water. Supernatants were acidified to 2% HNO_3. Metal concentrations in the sub-cellular fractions were analyzed by inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP-MS, Thermo Elemental, Model X-7, UK). Note that metal concentrations in a particular fraction are reported as the quantity of metal in the fraction divided by the total dry weight of the liver. Blanks and a certified reference material (lobster hepatopancreas, TORT-1, National Research Council of Canada, Ottawa, ON, Canada) were digested in the same manner. Blanks indicated negligible contamination (Cd $< 0.013\ \mu g\ L^{-1}$, Cu $< 1.8\ \mu g\ L^{-1}$), and the recoveries of TORT-1 reference samples were satisfactory (mean ± SE; $n = 5$): Cd (90 ± 2%) and Cu (94 ± 12%).

2.4. Differential centrifugation quality control

To obtain a measure of the total metal content of the livers, an aliquot of the initial homogenate was taken for metal analyses before the first centrifugation step and was digested according to the same protocol as the sub-cellular pellets. This aliquot was also used in a mass balance calculation to verify the recovery of metals in the various sub-cellular fractions. Average metal mass balance recoveries {(sum of metal burdens in the 5 fractions/metal burden in the aliquot) × 100} were (mean ± SE; $n = 16$): Cd (108 ± 5%) and Cu (90 ± 2%).

2.5. Zooplankton sampling and analysis

Since zooplankton represent a major dietary choice for juvenile yellow perch (**Gingras and Boisclair, 2000**), Cd and Cu concentrations in these prey were monitored over the summer. Zooplankton were sampled from each lake three times over the summer (June, July and August). They were collected by towing a plankton net (64 μm aperture) horizontally in the top 1–2 m of the water column. The collected zooplankton was divided into groups of three and stored frozen (−20 °C) in plastic containers until the metal analysis step.

For metal analyses, the zooplankton samples were first lyophilized, weighed and then digested in 70% HNO_3 (approximately 3 mL acid per g dry weight sample). Digestions were carried out in an autoclave (120–125 °C, 1.1–1.3 kg cm^{-2}, 3 h). During each digestion run, both blanks (HNO_3 and MilliQ water) and certified reference samples (lobster hepatopancreas, TORT-2, National Research Council of Canada) were included. The digested samples were then analyzed for Cd and Cu by inductively coupled plasma–atomic emission spectrometry (ICP-AES, Varian Vista AX, Mulgrave, Victoria, Australia). Low to negligible contamination was detected in the digestion blanks ($n = 4$): Cd $< 0.33\ \mu g\ L^{-1}$ and Cu $< 0.93\ \mu g\ L^{-1}$. Certified samples were quantitatively recovered (mean ± SE; $n = 4$): Cd (108 ± 2%); Cu (104 ± 2%).

2.6. Water sampling and analysis

Water samples were collected in June and August from each study lake by in situ dialysis. The dialysis sampler consisted of eight adjacent 4-mL cells separated from the lake water by a polysulfone membrane (0.2 μm; Pall Gelman Sciences, HT-200, Ville St-Laurent, Québec, Canada). The dialysis samplers ($n = 1$ sampler per lake per sampling time) were deployed approximately 30 cm above the sediment and kept anchored in place with a brick. The samplers were allowed to equilibrate for 3 d in each lake after which they were recovered and four sub-samples were taken for analysis of Cd and Cu. Two additional sub-samples were taken for dissolved organic carbon measurements. At the time of retrieval, the ambient pH was also measured in each lake at a depth of 0.5 m, near the dialysis samplers with a pH meter (Hanna Hi 9025). Due to a problem with the pH meter, the pH was only determined for the June samples. Metal concentrations were measured by ICP-AES (Varian, Vista AX) and dissolved organic carbon was analyzed with a total organic carbon analyzer (Shimadzu, TOC-5000A, Kyoto, Japan). Blanks and appropriate standard reference materials for these analyses were included and the analytical results were within the acceptance range. For the DOC analyses, deionized and UV-treated water (ELGA LabWater Maxima system) was used for the blanks and a commercial standard solution (Analytical Products Group, Belpre, OH, USA) was used as an external standard.

2.7. Calculations and statistical analyses

All data are represented by means ± SE. Fish weight and length measurements were used in the calculation of Fulton's condition factor, defined as: {weight (g)/(length $(cm)^3$} × 100. A one-way analysis of variance (ANOVA) was used with a Tukey–Kramer Honestly Significant Difference (HSD) post hoc test ($p \leq 0.05$) to describe temporal trends in fish weight, length, condition factor, metal burdens and metal concentrations. All sub-cellular fraction data expressed as a percentage of the total hepatic burden were arcsine transformed prior to statistical analysis.

3. Results

3.1. Metal concentrations in water and prey (zooplankton)

Located upwind from the copper smelter, Lake Opasatica had the lowest aqueous concentrations of both Cd and Cu, followed by Lake Vaudray, which is located approximately 40 km downwind from the smelter (**Table 1**). Consistent with their location directly downwind from and close to the smelter, lakes Osisko and Dufault had the highest concentrations of both metals. As a measure of the metal concentration gradient, dissolved Cd concentrations in Lake Dufault were 50 and 39 times higher than those in Lake Opasatica for the June and August sampling times, respectively. The total aqueous Cu gradient was smaller, with only a 5-fold difference in concentrations between Lake Dufault and Lake Opasatica.

Table 1
Aqueous cadmium and copper concentrations, dissolved organic carbon (DOC) and pH in the four study lakes for June and August

Lake and location	June				August			
	Cd (nM)	Cu (nM)	pH	DOC (mg C L^{-1})	Cd (nM)	Cu (nM)	pH	DOC (mg C L^{-1})
Opasatica 48°5′ N 79°20′ W	0.11 ± 0.02	47 ± 1	7.66	6.95 ± 0.05	0.07 ± 0.003	34 ± 0.1	n.d.	7.05 ± 0.65
Vaudray 48°5′ N 78°40′ W	0.81 ± 0.10	46 ± 1	7.29	8.65 ± 0.35	0.64 ± 0.01	41 ± 0.3	n.d.	8.45 ± 0.35
Osisko 48°15′ N 79°0′ W	1.45 ± 0.03	89 ± 4	7.81	3.00 ± 0.00	0.41 ± 0.004	62 ± 0.3	n.d.	2.95 ± 0.15
Dufault 48°20′ N 79°20′ W	5.55 ± 0.03	225 ± 5	7.65	4.85 ± 0.05	2.58 ± 0.02	175 ± 2	n.d.	4.80 ± 0.40
Ratio (max/min)	50	5	3.3[a]	2.9	39	5		2.9

Data represent means ± SE ($n = 4$). n.d., not determined.
[a] Ratio of hydrogen ion concentrations.

Table 2
Concentrations of Cd and Cu in zooplankton sampled from each lake in June, July and August

Lake	Sampling date	Cd ($\mu g\ g^{-1}$)	Cu ($\mu g\ g^{-1}$)
Opasatica	06/06/2003	1.77 ± 0.25^{a}	58 ± 7.2^{a}
	25/07/2003	1.25 ± 0.10^{a}	8.2 ± 0.1^{b}
	15/08/2003	1.71 ± 0.05^{a}	9.2 ± 1.0^{b}
Vaudray	06/06/2003	3.63 ± 0.24^{a}	137 ± 16^{a}
	22/07/2003	11.3 ± 1.10^{b}	61 ± 10^{b}
	14/08/2003	5.76 ± 0.26^{a}	19 ± 1.6^{b}
Osisko	06/06/2003	6.27 ± 0.42^{a}	223 ± 32^{a}
	28/07/2003	9.00 ± 1.03^{a}	32.3 ± 2.8^{b}
	13/08/2003	2.73 ± 0.05^{b}	27 ± 1.4^{b}
Dufault	06/06/2003	9.79 ± 0.10^{ab}	219 ± 10^{a}
	24/07/2003	7.29 ± 0.74^{b}	52 ± 5.7^{b}
	10/08/2003	11.6 ± 1.39^{a}	60 ± 8.9^{b}

Data represent means ± SE ($n = 3$). Means followed by the same superscript letter for each metal within a lake are not significantly different ($p > 0.05$; ANOVA).

Metal concentrations in zooplankton sampled in June followed the same spatial trends as the aqueous metal concentrations (Table 2): Cd in zooplankton increased in the sequence Opasatica < Vaudray < Osisko < Dufault, whereas Cu followed the order Opasatica < Vaudray < Osisko ~ Dufault. In subsequent months the ordering of the lakes varied somewhat (Table 2), but metal concentrations were always lowest in zooplankton from Lake Opasatica. In effect, Cd concentrations in zooplankton remained similar in Lake Opasatica over the summer, but varied significantly in the other lakes. In lakes Vaudray and Osisko, Cd concentrations peaked in July, and then decreased in August, whereas concentrations in Lake Dufault zooplankton showed an opposite trend, with the minimum Cd values occurring in July (Table 2). Temporal variations were greater for Cu in zooplankton (4- to 8-fold over the course of the summer) than for Cd, but a similar trend was seen in all lakes (June ≫ July ~ August).

3.2. Fish growth

The age of fish sampled was verified by counting the number of rings on opercula, and all fish included in the analyses were 1–2 years old. The weights and lengths of all fish increased significantly ($p \leq 0.05$) from May to August (Fig. 1A,B). The condition factor also increased significantly ($p \leq 0.05$) over the summer, and by mid-August perch from Lake Opasatica (reference lake) had the highest condition factor (Fig. 1C).

3.3. Hepatic cadmium and copper

Hepatic Cd and Cu concentrations were lowest in perch from Lake Opasatica and there were no significant variations in the concentrations of either metal in livers of perch sampled from this lake over the summer (Fig. 2). Similarly, Cd concentrations in perch from Lake Osisko did not vary significantly over time, but Cu concentrations in fish sampled in June were significantly higher ($p \leq 0.05$) than in perch sampled

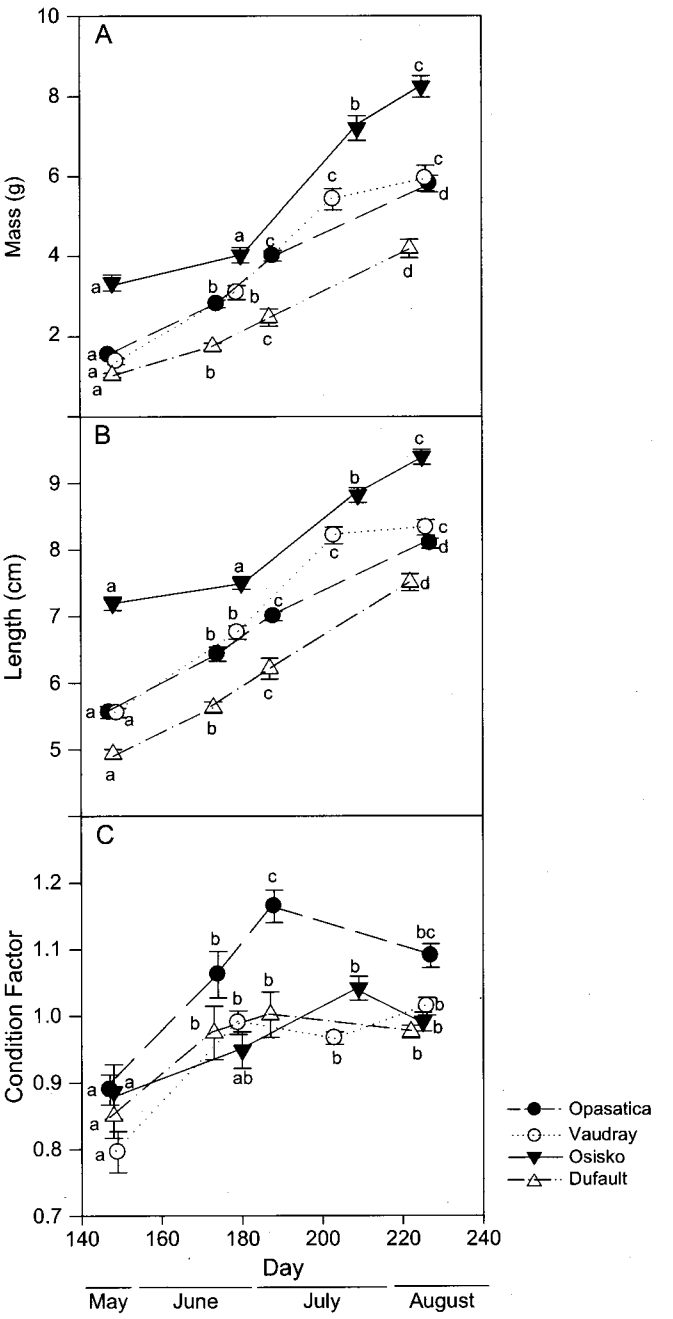


Fig. 1. Changes in mass (A), length (B) and condition factor (C) for juvenile yellow perch sampled from each lake from May to August 2003. Symbols with the same letter within each lake are not significantly different (ANOVA, $p > 0.05$).

on the other dates. Hepatic Cd concentrations in perch from lakes Vaudray and Dufault varied in a similar manner, with lowest concentrations occurring in midsummer (July). Copper concentrations in perch from these two lakes also showed a U-shaped time trend, with the highest concentrations occurring in May and the lowest occurring in June.

The hepatic Cd burden (μg) increased significantly ($p \leq 0.05$) in fish from all the study lakes over the summer (Fig. 3). By August, the Cd burden had increased approximately 3-fold in livers of perch from lakes Dufault and Vaudray, but

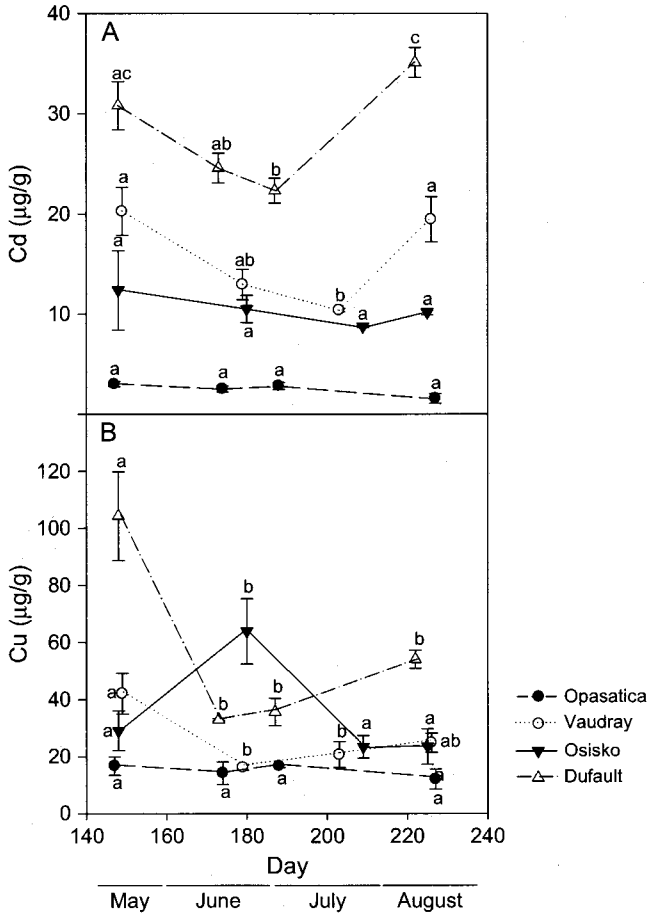


Fig. 2. Changes in hepatic Cd (A) and Cu (B) concentrations in juvenile yellow perch sampled from each lake from May to August 2003. Data are represented by means ± SE ($n = 3$ pools of 4–5 livers). Symbols with the same letter within each lake are not significantly different (ANOVA, $p > 0.05$).

only about 2-fold in fish from lakes Opasatica and Osisko. Similarly the Cu burden increased significantly in perch from lakes Opasatica and Vaudray, whereas the amount of this metal was variable in fish from lakes Dufault and Osisko, showing no distinct trend over the summer (Fig. 4). Perch from Lake Opasatica had a Cu burden that was approximately 4 times higher in August compared to May, followed by Vaudray ~ Osisko (2 times higher) > Dufault (1.5 times higher).

3.4. Sub-cellular Cd results

Hepatic Cd concentrations were highest in the heat-stable proteins (HSP) fraction in perch from the lakes with moderate to high ambient Cd concentrations (lakes Vaudray, Osisko and Dufault: Fig. 5B–D). In contrast, hepatic Cd concentrations in yellow perch from Lake Opasatica were quite similar for all fractions (Fig. 5A), including the HSP fraction, although concentrations decreased significantly ($p \leq 0.05$) in the heat-denaturable (HDP) and organelle fractions over the summer. In addition, concentrations were very low (<1.6 µg g^{-1}) in all the hepatic sub-cellular fractions for fish sampled from this reference lake.

Cadmium concentrations associated with the HDP fraction were similar in perch from lakes Vaudray and Dufault, ranging from approximately 2 to 3 µg g^{-1} with no significant ($p > 0.05$) trend over the summer (Fig. 5). In Lake Osisko, there was more variation, with Cd concentrations in the HDP fraction decreasing from 4 to 1 µg g^{-1} over the course of the summer. Cadmium concentrations also varied little in the organelle fractions of perch from Lake Vaudray (2–3 µg g^{-1}) and Lake Osisko (1–2 µg g^{-1}), whereas the concentrations were slightly higher in Lake Dufault perch (4–5 µg g^{-1}). The cellular debris fraction had concentrations that ranged from 2–3 µg g^{-1} in Lake Vaudray and Osisko perch, whereas concentrations were slightly more variable in Lake Dufault perch (3–6 µg g^{-1}).

Most of the cellular Cd burden was associated with the HSP in perch from lakes Vaudray (50–60%), Dufault (50–60%) and Osisko (40–50%) (Fig. 6) and this proportion varied only slightly over the summer. In Lake Vaudray perch, the remaining cellular Cd distribution was similar amongst all fractions (organelles, HDP, and cellular debris), ranging from 10% to 20% and showing no obvious time trends. Similarly, in Lake Dufault perch the percent Cd distribution was similar among the remaining fractions, ranging from 10% to 25% of the total cellular burden. In contrast, in Lake Osisko perch the relative Cd burden in the HDP fraction decreased from approximately 30% in May to 10% in August, during which time the percentage of Cd associated with the cellular debris fraction increased. The hepatic Cd distribution in Lake Opasatica perch showed similar trends over the summer, decreasing from approximately 30% in the organelle and HDP fractions to 17% and 4%, respectively, for these two sub-cellular fractions; concurrently, the contribution of the HSP and cellular debris fractions increased from approximately 30% and 10% in May to 55% and 24% in August.

3.5. Sub-cellular Cu results

Similar to the results for Cd, Cu concentrations were highest in the HSP fraction of perch sampled from lakes Vaudray, Osisko and Dufault (Fig. 7). In contrast, Cu concentrations were low in the HSP of Lake Opasatica perch (4–6 µg g^{-1}), and were within the same range as concentrations in the other fractions. In the two lakes with the lowest aqueous Cu concentrations (Vaudray and Opasatica), concentrations in cellular fractions were similar and ranged from 3–4 µg g^{-1} for cellular debris and organelle fractions, and 2–3 µg g^{-1} for the HDP fractions for perch from both lakes. In contrast, Cu concentrations were not only more variable in perch from lakes Dufault and Osisko, but also concentrations were much higher.

The percent Cu associated with the HSP fraction in Lake Opasatica fish increased 2-fold during the summer, from approximately 25% in May to 50% in August (Fig. 8). During this time the proportion of Cu associated with the HDP fraction decreased from approximately 15% in May to 4% in August. The percent Cu associated with the organelle fraction

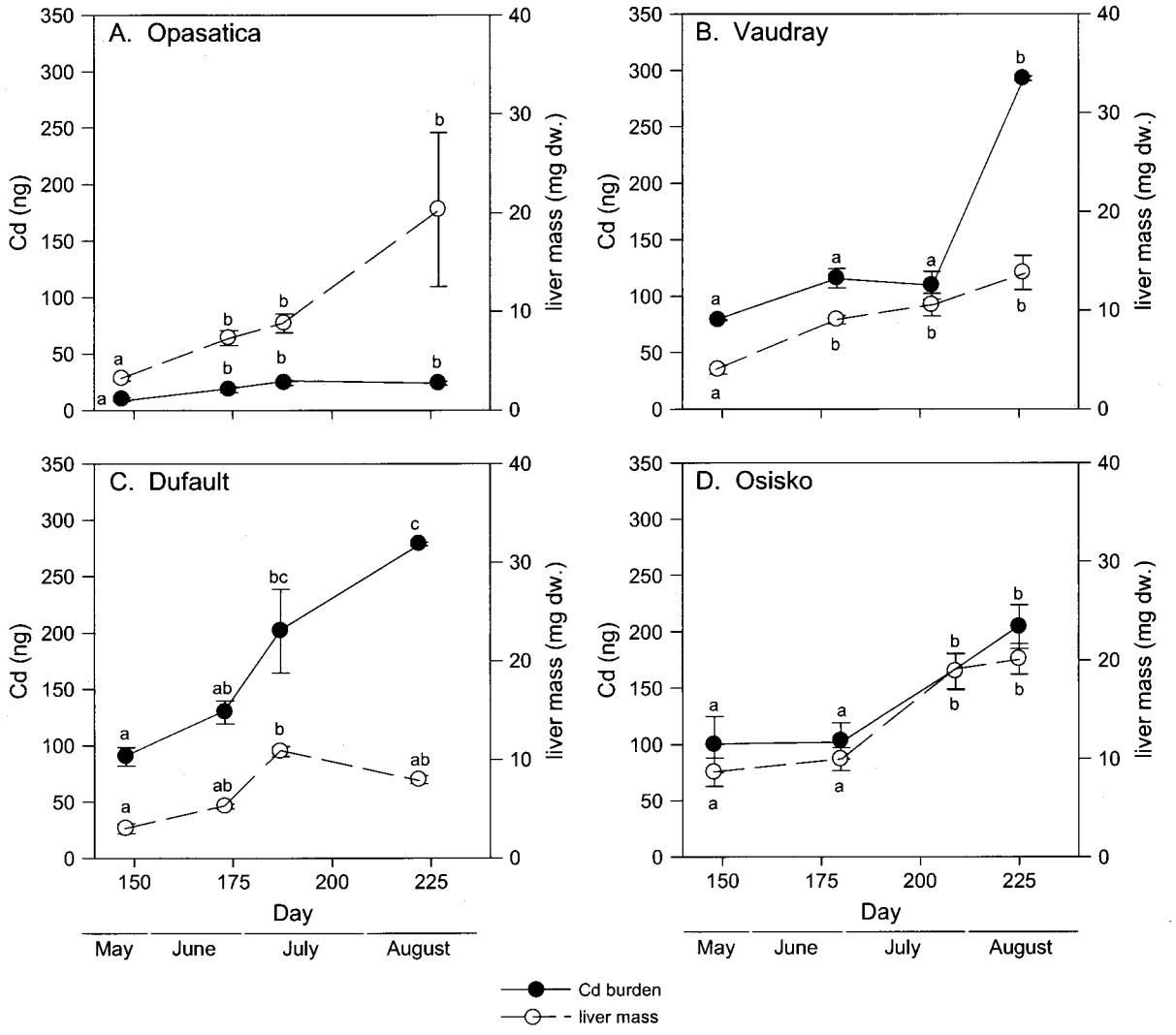


Fig. 3. Changes in the hepatic Cd burden (solid circles, solid line) and liver mass (dry weight; open circles, dashed line) for perch sampled from each of the four study lakes: Opasatica (A), Vaudray (B), Dufault (C) and Osisko (D). Data are expressed on an individual fish basis and are represented by means ± SE ($n = 3$ pools of 4–5 livers). Symbols with the same letter within each lake are not significantly different (ANOVA, $p > 0.05$).

decreased from approximately 30% in May to 20% in August, while the percent Cu associated with the cellular debris fraction remained constant (~30%) during the summer. Unlike the case in Lake Opasatica, the Cu distribution remained fairly constant in Lake Vaudray perch, with most of the burden (~50%) being associated with the HSP. Most of the Cu burden was also associated with the HSP fraction in perch from lakes Dufault and Osisko. In Lake Osisko, there was a slight decrease in the proportion of Cu associated with the HSP in July and August, and during this time the proportion of Cu associated with the cellular debris fraction increased slightly.

4. Discussion

4.1. Seasonal variation in hepatic Cd and Cu concentrations

Metal concentrations in juvenile yellow perch varied significantly over the summer (May to August) season, but only in fish with the highest hepatic concentrations of Cd (lakes Dufault and Vaudray) and Cu (lakes Dufault and Osisko). Total aqueous Cd and Cu concentrations in these lakes varied only slightly over the summer (Table 2) and therefore it is unlikely that these changes in ambient aqueous concentrations were responsible for the observed variation in hepatic concentrations. Indeed, whereas measured aqueous Cd concentrations had declined in August in lakes Dufault and Vaudray, hepatic concentrations were highest in this month in perch sampled from these lakes.

In a previous field study, we showed that hepatic Cd accumulation in juvenile yellow perch was influenced by dietary Cd (Kraemer et al., in press), and thus fluctuations in prey metal concentrations over the summer might directly influence metal concentrations in the liver. Concentrations of Cd and Cu did vary significantly in zooplankton over the summer, agreeing with previous work on various aquatic invertebrate species, including zooplankton (Yan and Mackie, 1989, 1990; Hare and Campbell, 1992; Fialkowski et al., 2003). However,

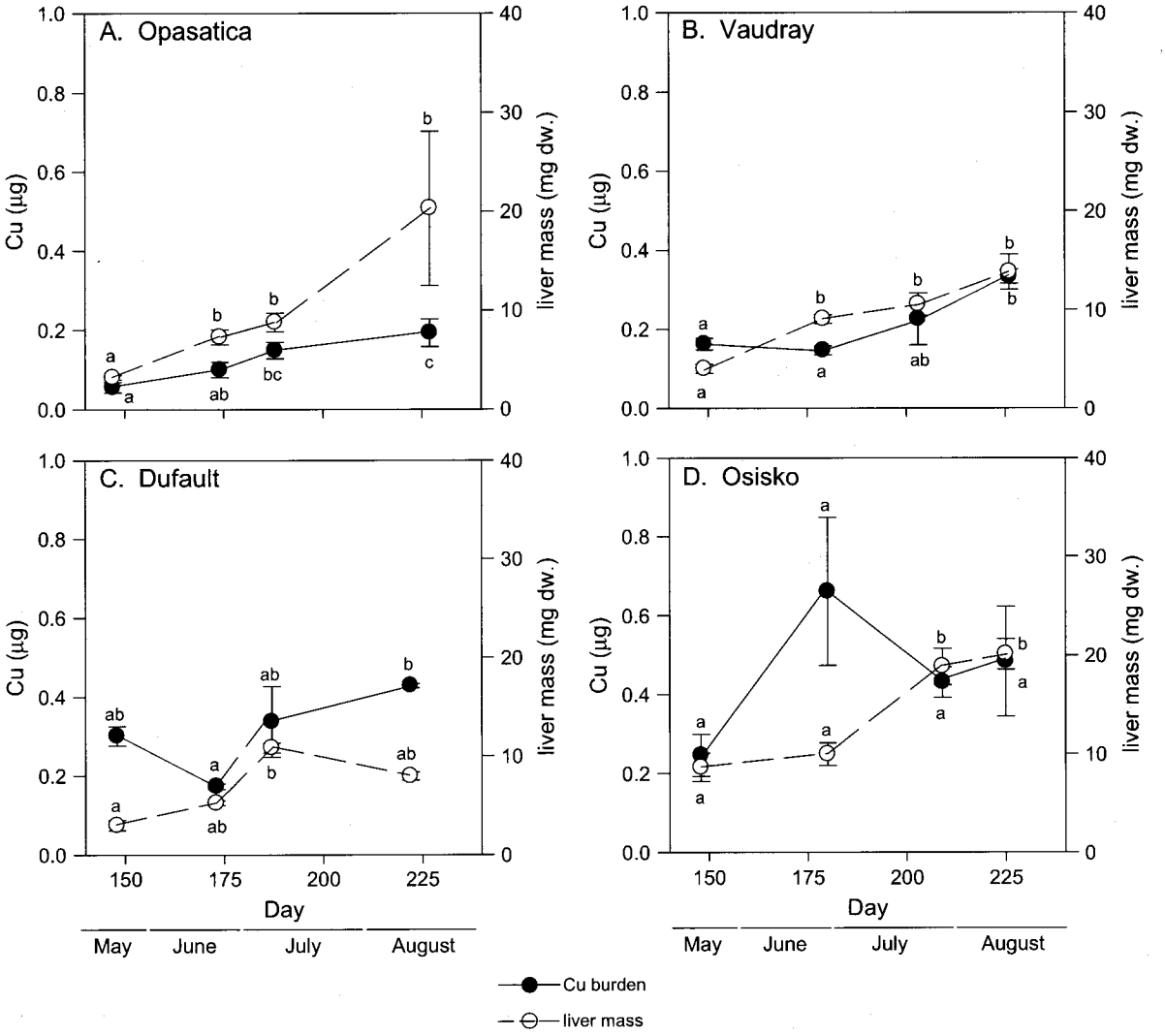


Fig. 4. Changes in the hepatic Cu burden (solid circles, solid line) and liver mass (dry weight; open circles, dashed line) for perch sampled from each of the four study lakes: Opasatica (A), Vaudray (B), Dufault (C) and Osisko (D). Data are expressed on an individual fish basis and are represented by means ± SE ($n = 3$ pools of 4–5 livers). Symbols with the same letter within each lake are not significantly different (ANOVA, $p > 0.05$).

Cd concentrations in zooplankton peaked in July, when concentrations of this metal were lowest in the livers of perch from the two most Cd-contaminated lakes (Table 2, Fig. 4). These results suggest that dietary fluctuations were not directly responsible for the variations in hepatic Cd observed in fish from these two lakes. The influence of dietary Cu, however, cannot be discounted as concentrations were highest in zooplankton sampled in early June, and similarly, hepatic Cu concentrations were also significantly higher in perch from lakes Dufault and Vaudray at the beginning of the season (Table 2, Fig. 4).

In addition to changes in ambient metal concentrations, growth rate may also influence metal concentrations within the organism. Since concentrations are dependent on weight, changes in weight due to increased growth will influence the metal concentrations, regardless of changes in the quantity of bioaccumulated metal. As fish in natural environments are chronically exposed to ambient metals through both diet and water, the amount of metal (i.e., burden) in a given organ should increase with increasing organ weight, provided that no significant changes in influx or efflux occur. Therefore, in this scenario, in order for the hepatic concentration to remain relatively constant (fish from lakes Osisko and Opasatica, Fig. 2), the rate of liver mass increase during the summer should be proportional to the rate of metal burden increase (e.g., Cd burdens in perch from lakes Osisko and Opasatica; Fig. 3). Cadmium concentrations in perch from lakes Vaudray and Dufault, however, varied significantly during the season, and an examination of Cd burdens and liver mass revealed that these variations might have occurred for different reasons.

The Cd burden in Lake Vaudray fish remained more or less constant in mid-summer, during which time the liver mass increased at a relatively constant rate (Fig. 3), resulting in significantly lower Cd concentrations in mid-summer (Fig. 2). Interestingly, concomitant with this constancy in hepatic Cd burden in Lake Vaudray fish, there was a significant increase in Cd concentrations in the bulk zooplankton from this lake. We have previously shown that the liver is influenced by both

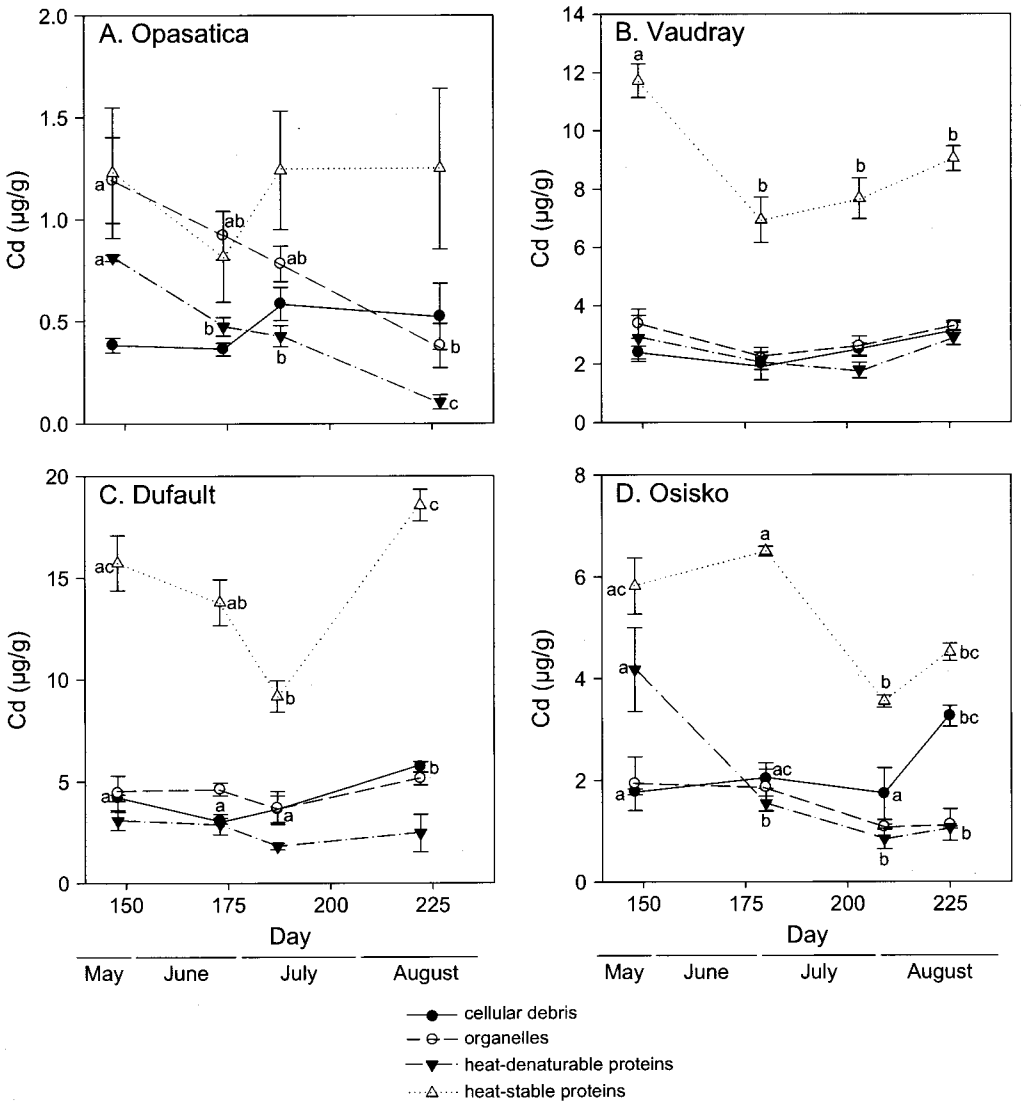


Fig. 5. Changes in Cd concentrations in sub-cellular fractions for perch from lakes Opasatica (A), Vaudray (B), Dufault (C) and Osisko (D). Data are represented by means ± SE ($n = 3$ pools of 4–5 livers). Symbols with the same letter within each lake are not significantly different (ANOVA, $p > 0.05$). Where no letters appear for a given fraction, no significant differences were observed over the summer (ANOVA, $p > 0.05$).

dietary and aqueous Cd (Kraemer et al., in press), where the dietary component is influenced by assimilation efficiency, ingestion rate and Cd concentrations in the prey. Given that the fish continued to grow over this period, suggesting a normal ingestion rate, we can only speculate that the assimilation efficiency (of Cd, but not C) decreased in mid-summer when concentrations in zooplankton were highest. In support of this hypothesis, a previous study by Douben (1989) noted that the assimilation efficiency of Cd by stone loach (*Noemacheilus barbatulus*) decreased with increasing concentration in the diet, suggesting that there is some dietary regulation of Cd assimilation.

Dietary Cd is less important as a metal source for juvenile perch in lakes with high aqueous Cd concentrations (Kraemer et al., submitted for publication). Lake Dufault fits this category and in perch from this lake hepatic Cd burdens constantly increased over the summer, whereas liver mass was variable, showing a sharp increase in July followed by a decrease in August (Fig. 3C). The increase in liver mass in July coincided with a decrease in Cd concentrations in this month (Fig. 2A), suggesting that the seasonal variation in hepatic Cd concentrations in Lake Dufault fish was linked to growth dilution. The reason for the variability in liver mass in Lake Dufault perch is uncertain, but previous research on perch from this lake showed that the hepatosomatic index {(mass of liver/mass of carcass) × 100} is lower in perch from Lake Dufault than in fish from reference lakes such as Lake Opasatica (Giguère et al., 2004), indicating that there is perhaps some liver dysfunction.

Hepatic Cu concentrations did not follow the same trend as Cd concentrations. For fish populations from lakes Dufault and Osisko, hepatic Cu concentrations were highly variable (Fig. 2B, 3-fold variation). In contrast, hepatic Cu concentrations did not vary significantly ($p > 0.05$) in Lake Opasatica, and varied only slightly in Lake Vaudray. Temporal variations

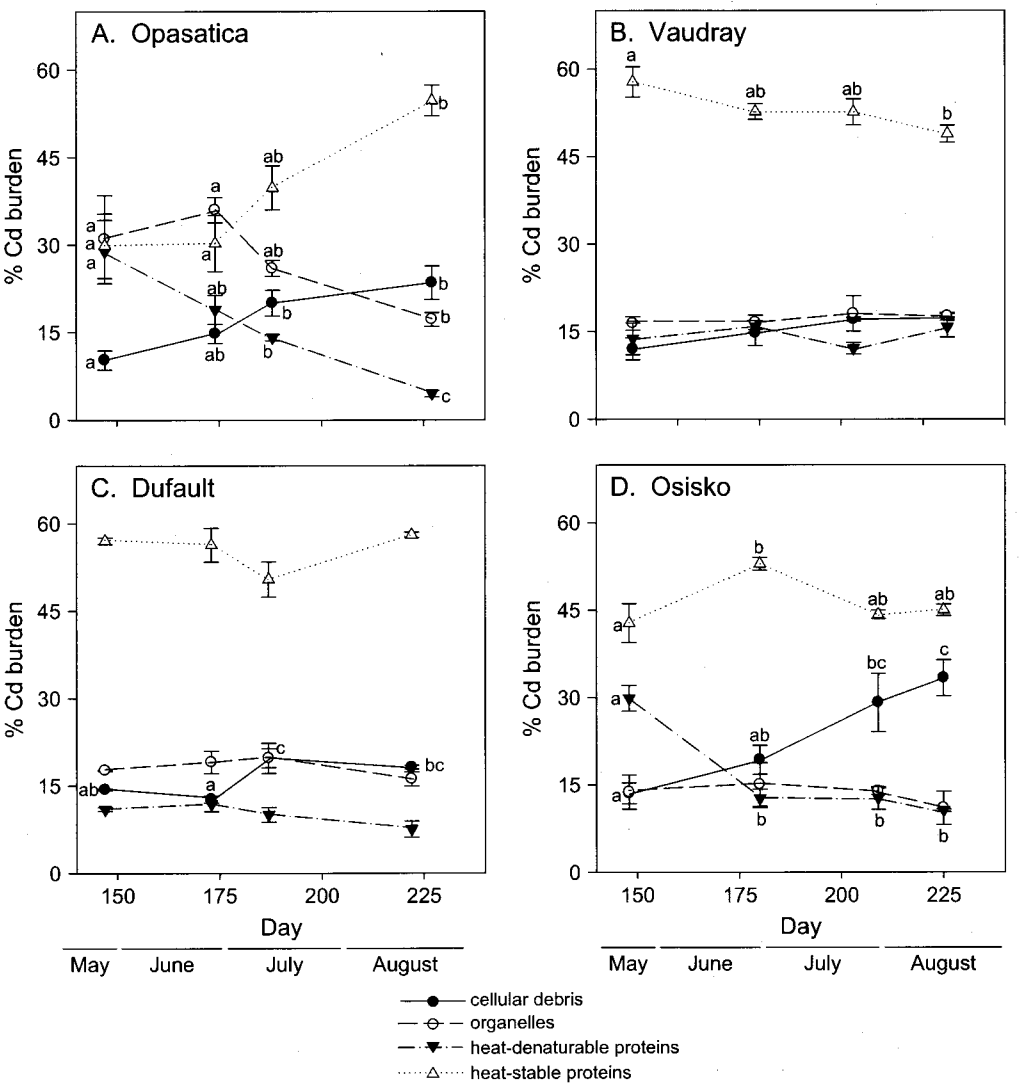


Fig. 6. Changes in the percent Cd distribution among the various sub-cellular fractions for perch from lakes Opasatica (A), Vaudray (B), Dufault (C) and Osisko (D). Data are represented by means ± SE ($n = 3$ pools of 4–5 livers). Symbols with the same letter within each lake are not significantly different (ANOVA, $p > 0.05$). Where no letters appear for a given fraction, no significant differences were observed over the summer (ANOVA, $p > 0.05$).

in hepatic Cu concentrations were also reported in previous studies on yellow perch from metal-contaminated sites in the Sudbury region (Eastwood and Couture, 2002; Couture and Rajotte, 2003). Couture and Rajotte (2003) proposed that perch are able to homeostatically control hepatic Cu concentrations below a threshold of 50 μg g^{-1}. Our results agree with this observation, as Cu concentrations in perch below the 50 μg g^{-1} threshold (lakes Vaudray and Opasatica) varied only slightly, whereas fish above this threshold (lakes Dufault and Osisko) displayed more variable hepatic Cu concentrations (Fig. 2) and burdens (Fig. 4).

4.2. Sub-cellular results

Although the use of differential centrifugation to separate sub-cellular fractions is relatively straightforward, there are various potential artifacts that can complicate the interpretation of the data, such as breaking organelles during the homogenization step, and cross-contamination of sub-cellular fractions. However, previously in two independent caging studies where juvenile yellow perch were exposed to elevated Cd, we observed that Cd concentrations in the heat-denaturable protein fraction *did not* increase with increasing total hepatic concentrations below a threshold of approximately 10 μg g^{-1} (total hepatic Cd) (unpublished results). This same response was not observed in the organelle, heat-stable protein or cellular debris fractions, where concentrations increased linearly with increasing total hepatic Cd concentrations. As one would expect linear increases in *all sub-cellular fractions* with increasing hepatic concentrations if cross-contamination of the sub-cellular fractions was uniformly occurring, these results indirectly support the notion that Cd contamination was minimal in the HDP fraction.

To investigate the seasonal variations in hepatic metal concentrations, we also examined changes in metal concentrations at the sub-cellular level. Reflecting the reference conditions, Cd concentrations were low in all sub-cellular fractions from

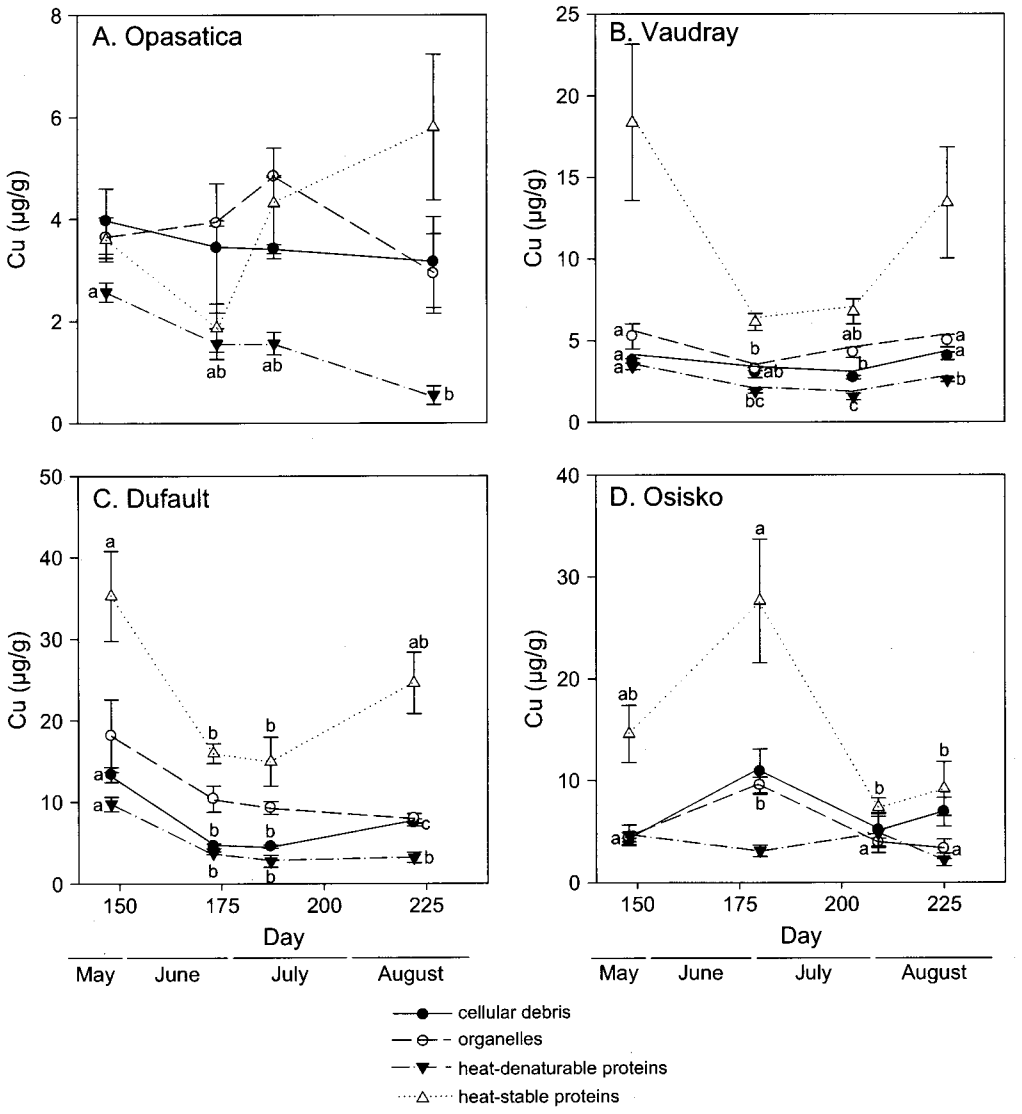


Fig. 7. Changes in Cu concentrations in sub-cellular fractions for perch from lakes Opasatica (A), Vaudray (B), Dufault (C) and Osisko (D). Data are represented by means ± SE ($n = 3$ pools of 4–5 livers). Symbols with the same letter within each lake are not significantly different (ANOVA, $p > 0.05$). Where no letters appear for a given fraction, no significant differences were observed over the summer (ANOVA, $p > 0.05$).

Lake Opasatica fish (Fig. 5A; note scale change). Although Cd concentrations were low in this lake, fish were still constantly exposed to Cd, and thus they will still accumulate this metal during their lifespan (Giguère et al., 2004). The proportion of Cd associated with the HSP fraction increased in Lake Opasatica fish during the season, while the amount of Cd decreased in the organelle and HDP fractions (Fig. 6A). The HSP fraction contains a variety of cellular ligands including amino acids, low molecular weight peptides such as glutathione, and metallothionein (MT). The role of MT in the sequestration and detoxification of certain metals, such as Cd, has been well documented in fish (Hogstrand et al., 1991; Olsvik et al., 2000, 2001; De Smet et al., 2001) and therefore the increasing percentage of Cd associated with the HSP likely represents increasingly effective cellular detoxification of this metal by MT as the fish mature, affording some protection to the more metal-sensitive fractions (organelles and HDP) from Cd accumulation. However, previous work in our laboratory has shown that this protection is incomplete in yellow perch, as some Cd does bind to potentially metal-sensitive fractions (Giguère et al., submitted for publication). The proportion of Cd associated with the cellular debris fraction also increased during the summer from approximately 10% to 25% in Lake Opasatica fish. Similarly, in Lake Osisko fish, the proportion of Cd increased in the cellular debris fraction, concomitant with a decrease in the proportion of Cd associated with the HDP fraction. The importance of this Cd redistribution to the cellular debris fraction is not clear, but this fraction collected following a slow centrifugal spin (800 g) is thought to include small, dense tertiary lysosomes. A previous study showed that these tertiary lysosomes were important for Cd storage in the kidney of a bivalve (George, 1983) and we speculate that increases in the percent Cd associated with this fraction may represent the endocytosis of Cd-impacted cellular components

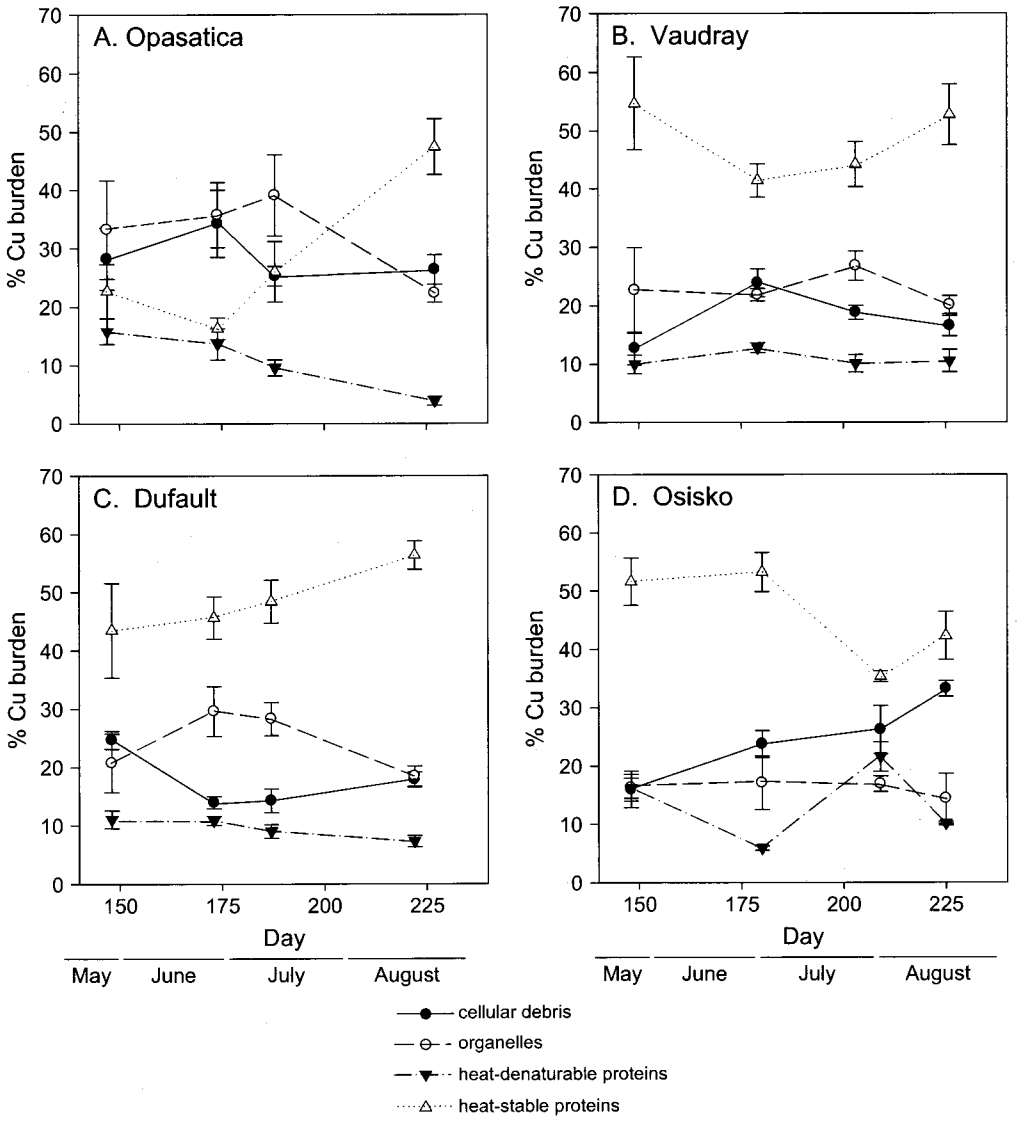


Fig. 8. Changes in the percent Cu distribution among the various sub-cellular fractions for perch from Lakes Opasatica (A), Vaudray (B), Dufault (C) and Osisko (D). Data are represented by means ± SE ($n = 3$ pools of 4–5 livers).

(e.g., damaged organelles, proteins and peptides) and their accumulation in tertiary lysosomes.

In perch from lakes Vaudray, Osisko and Dufault, most of the Cd burden (40–60%) was associated with the HSP fraction (Fig. 6). If HSP were effectively detoxifying cellular Cd, then concentrations in potentially metal-sensitive fractions should be maintained at relatively low levels. Cadmium concentrations in the organelle fractions of fish from lakes Vaudray and Osisko never exceeded 3 $\mu g\ g^{-1}$, but in Lake Dufault perch Cd concentrations in this fraction ranged from 4 to 5 $\mu g\ g^{-1}$. A recent study by Risso-de Faverney et al. (2004) demonstrated that mitochondrial dysfunction occurred in Cd-exposed rainbow trout hepatocytes, suggesting that the higher concentration of Cd in the organelle fraction of Lake Dufault perch may have toxicological implications.

Similar to our Cd results, Cu concentrations were highest in the HSP fraction of fish from lakes Vaudray, Dufault and Osisko (Fig. 8). Despite similar total hepatic Cu concentrations in perch from lakes Opasatica and Vaudray, concentrations associated with the HSP fraction were much higher in Lake Vaudray perch. The binding of Cd and Cu within the cell is not independent and the presence of one metal may influence the behavior of the other. Metallothionein binds both Cd and Cu, but the in vivo affinity of this protein is higher for Cu than Cd (Mason and Jenkins, 1995). In our study lakes, however, there is a large Cd gradient. Increases in accumulated Cd would cause an induction in the production of metallothionein which in turn would disrupt the cytosolic Cu pool resulting in more Cu being found associated with the HSP fraction due to the high affinity of this metal for metallothionein (Giguère et al., 2003).

In low ambient Cu lakes (Opasatica and Vaudray), Cu concentrations were similar in the organelle (3–5 $\mu g\ g^{-1}$) and HDP (2–3 $\mu g\ g^{-1}$) fractions. However, in the two most

Cu-contaminated environments, concentrations in the organelle fraction ranged from 3 to 10 $\mu g\, g^{-1}$ in Lake Osisko fish, and from 8 to 18 $\mu g\, g^{-1}$ in Lake Dufault fish. Similarly, Cu concentrations in the HDP fraction ranged from 2 to 5 $\mu g\, g^{-1}$ and from 3 to 10 $\mu g\, g^{-1}$, respectively, for these two lakes. These results show that not only were Cu concentrations much higher in potentially metal-sensitive fractions in perch from lakes Osisko and Dufault, but also that the concentrations were more variable than in the other lakes, supporting the idea that homeostatic control of Cu was difficult to maintain in fish from these lakes (Couture and Rajotte, 2003). These results may have various toxicological implications for the perch. For example, Cu is a redox-active metal and has been shown to be an important inducer of lipid peroxidation (Berntssen et al., 2000).

5. Conclusions

The present study has demonstrated that seasonal variations in hepatic Cd and Cu concentrations do occur in juvenile yellow perch. With the data collected from this study we observed that growth dilution is likely responsible for seasonal variations in hepatic Cd concentrations in some lakes (e.g., Lake Dufault) and we hypothesized that changes in assimilation efficiency of dietary Cd resulting from seasonal variation in the composition of the zooplankton community may also contribute to seasonal variations in hepatic Cd. Variations in Cu concentrations were likely linked to perturbations in the ability of fish to homeostatically control their hepatic copper. At the sub-cellular level, the HSP fraction bound the majority of Cd and Cu in fish from the contaminated lakes. There was, however, some binding of these metals to potentially sensitive fractions (organelles and HDP), especially in fish from heavily contaminated sites, suggesting that detoxification was incomplete for these populations.

In the context of developing yellow perch as a metal biomonitor, these results suggest not only that metal concentrations vary seasonally, but also that concentrations vary most in fish from contaminated sites. As monitoring programs are especially interested in changes in metal concentrations of biomonitors at contaminated sites, these results have direct implications on the interpretation of field data. One way to avoid the confounding impact of seasonal variations would be to sample at the same time every year, if possible. These data suggest that the seasonal variation in Cd and Cu may be linked in some way to physiological impairment, and therefore, it would be interesting and valuable from a biomonitoring point of view to see if these same trends are repeatable year after year (Couture and Rajotte, 2003).

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Metals in the Environment Research Network (MITE-RN). We would like to thank the Société de la Faune et des Parcs de l'Abitibi-Témiscamingue (Government of Québec) for their logistical help with the field study. Also, we would like to thank Catherine Dion, Caroline Durand and Philippe Bourret for their field assistance and Michelle Geoffroy-Bordeleau, Pauline Fournier and Sébastien Duval for their help in the laboratory. Anik Giguère and Emmanuelle Bonneris provided advice regarding the application of the differential centrifugation procedure. P.G.C.C. is supported by the Canada Research Chair programme.

References

Aalto, S.K., Newsome, G.E., 1990. Additional evidence supporting demic behaviour of a yellow perch (*Perca flavescens*) population. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47, 1959–1962.

Audet, D., Couture, P., 2003. Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 60, 269–278.

Berntssen, M.H.G., Lundebye, A.-K., Hamre, K., 2000. Tissue lipid peroxidative responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr fed high levels of dietary copper and cadmium. Fish Physiol. Biochem. 23, 35–48.

Couture, P., Rajotte, J.W., 2003. Morphometric and metabolic indicators of metal stress in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from Sudbury, Ontario: a review. J. Environ. Monit. 5, 216–221.

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

Dallinger, R., Kautzky, H., 1985. The importance of contaminated food for the uptake of heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*): a field study. Oecologia 67, 82–89.

De Smet, H., De Wachter, B., Lobinski, R., Blust, R., 2001. Dynamics of (Cd, Zn)-metallothionein in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. Aquat. Toxicol. 52, 269–281.

Douben, P.E.T., 1989. Metabolic rate and uptake and loss of cadmium from food by the fish *Noemacheilus barbatulus* L. (stone loach). Environ. Pollut. 59, 177–202.

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

Farag, A.M., Stansbury, M.A., Hogstrand, C., MacConnell, E., Bergman, H.L., 1995. The physiological impairment of free-ranging brown trout exposed to metals in the Clark Fork River, Montana. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52, 2038–2050.

Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Smith, B.D., Zmudzinski, L., 2003. Seasonal variation in trace metal concentrations in three talitrid amphipods from the Gulf of Gdansk. Poland. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 288, 81–93.

George, S.G., 1983. Heavy metal detoxication in the mussel *Mytilus edulis* – composition of Cd-containing kidney granules (tertiary lysosomes). Comp. Biochem. Physiol. 76C, 53–57.

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

Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., McDonald, D.G., Rasmussen, J.B., 2004. Influence of lake chemistry and fish age on Cd, Cu and Zn concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 61, 1702–1716.

Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., Couture, P. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. Aquat. Toxicol., submitted for publication.

Gingras, J., Boisclair, D., 2000. Comparison between consumption rates of yellow perch (*Perca flavescens*) estimated with a digestive tract model and with a radioisotope approach. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57, 2547–2557.

Hare, L., Campbell, P.G.C., 1992. Temporal variations of trace metals in aquatic insects. Freshwater Biol. 27, 13–27.

Harrison, S.E., Klaverkamp, J.F., 1989. Uptake, elimination and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by rainbow trout (*Salmo gairdneri*)

and lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). Environ. Toxicol. Chem. 8, 87–97.

Hogstrand, C., Lithner, G., Haux, C., 1991. The importance of metallothionein for the accumulation of copper, zinc and cadmium in environmentally exposed perch, *Perca fluviatilis*. Pharmacol. Toxicol. 68, 492–501.

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

Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., Auclair, J.-C., 2006. A field study examining the relative importance of food and water as sources of Cd for juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 63, in press.

Laflamme, J.-S., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Hontela, A., 2000. Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57, 1692–1700.

Mason, A.Z., Jenkins, K.D., 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. John Wiley, Chichester, UK, pp. 479–607.

Mount, D.R., Barth, A.K., Garrison, T.D., Barten, K.A., Hockett, J.R., 1994. Dietary and waterborne exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to copper, cadmium, lead and zinc using a live diet. Environ. Toxicol. Chem. 13, 2031–2041.

Olsvik, P.A., Gundersen, P., Andersen, R.A., Zachariassen, K.E., 2000. Metal accumulation and metallothionein in two populations of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments during a run-off episode. Aquat. Toxicol. 50, 301–316.

Olsvik, P.A., Gundersen, P., Andersen, R.A., Zachariassen, K.E., 2001. Metal accumulation and metallothionein in brown trout, *Salmo trutta*, from two Norwegian rivers differently contaminated with Cd, Cu and Zn. Comp. Biochem. Physiol. 128C, 189–201.

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

Risso-de Faverney, N.O., De Sousa, G., Rahmani, R., 2004. Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: involvement of oxidative stress. Aquat. Toxicol. 69, 247–258.

Sherwood, G.D., Rasmussen, J.B., Rowan, D.J., Brodeur, J., Hontela, A., 2000. Bioenergetic costs of heavy metal exposure in yellow perch (*Perca flavescens*): in situ estimates with a radiotracer (^{134}Cs) technique. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57, 441–450.

Wallace, W.G., Lopez, G.R., Levinton, J.S., 1998. Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. Mar. Ecol. Prog. Ser. 172, 225–237.

Yan, N.D., Mackie, G.L., 1989. Seasonal patterns in metal levels of the net plankton of three Canadian Shield lakes. Sci. Total Environ. 87/88, 439–461.

Yan, N.D., Mackie, G.L., 1990. Control of cadmium levels in *Holopedium gibberum* (Crustacea, Cladocera) in Canadian Shield lakes. Environ. Toxicol. Chem. 9, 895–908.

12. 5e article : Modeling Cd bioaccumulation in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*)

Lisa D. Kraemer, Peter G.C. Campbell*, Landis Hare

Université du Québec, INRS-Eau, Terre et Environnement, 490 de la Couronne, Québec City, QC, Canada G1K 9A9

Soumis à Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences

Modeling Cd accumulation in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*)[a]

Lisa D. Kraemer, Peter G.C. Campbell*, Landis Hare

INRS-Eau, Terre et Environnement, Université du Québec

490 de la Couronne, Québec, QC, Canada G1K 9A9

*Corresponding author: peter.campbell@ete.inrs.ca

Tel: (418) 654-2538; Fax: (418) 654-2600

[a] Contribution No. 49 from the Metals in the Environment Research Network (www.mite-rn.org)

Abstract

A key knowledge gap in the environmental risk assessment of metals is the relative importance of dietary and aqueous metals as vectors for metal accumulation in fish. To address in part this gap, we used data from a series of field transplantation and caging studies with yellow perch (*Perca flavescens*) to develop a hepatic cadmium bioaccumulation model that considers both dietary and aqueous Cd sources. Having estimated the values of various model parameters, we used the model to determine the relative importance of dietary and aqueous Cd as routes of exposure for yellow perch living in lakes differing in their Cd contamination levels. If only aqueous Cd^{2+} concentrations are into account, the model accurately describes hepatic Cd concentrations in fish from lakes with elevated [Cd^{2+}] (> 0.7 nM). However, for perch collected from lakes with low ambient Cd^{2+} concentrations, the water-only model under-predicted hepatic Cd, presumably because the relative contribution of dietary Cd increased with decreasing lakewater [Cd^{2+}]. From the perspective of risk assessment, these results imply that Cd bioaccumulation by yellow perch can be predicted using [Cd^{2+}] alone in lakes that are the especially vulnerable, that is, those that are most contaminated by Cd.

Key words: indigenous fish / metal accumulation / waterborne Cd / diet-borne Cd / model / risk assessment

Résumé

Dans le domaine de l'évaluation des risques posés par les métaux dans l'environnement, l'importance relative de l'eau ambiante et de la nourriture comme vecteurs pour l'accumulation des métaux chez les poissons indigènes, demeure incertaine. Nous avons exploré cette question en développant un modèle de bioaccumulation du cadmium (Cd hépatique) chez la perchaude (*Perca flavescens*), en nous servant de données obtenues dans le cadre d'expériences menées sur le terrain (transplantation ; manipulation du régime alimentaire). Ce modèle biodynamique tient compte de l'accumulation du Cd à partir de l'eau et de la nourriture. Une fois les paramètres du modèle établis, ce dernier a été utilisé pour évaluer comment l'importance relative de l'eau et de la nourriture comme sources du Cd variait le long d'un gradient de contamination en Cd. Dans les lacs les plus contaminés en Cd ($[Cd^{2+}] > 0,7$ nM), le modèle pouvait prédire la concentration en Cd hépatique en ne tenant compte que de la concentration ambiante en Cd^{2+} aqueux. Cependant, dans les lacs moins contaminés, la modélisation basée uniquement sur l'eau comme source du Cd sous-estimait la concentration en Cd hépatique, suggérant que dans de tels lacs le Cd présent dans la nourriture contribue plus significativement à la bioaccumulation. Dans une perspective d'évaluation de risque, ces résultats impliquent que dans les lacs les plus contaminés, où la perchaude risque d'être davantage vulnérable, la bioaccumulation du Cd peut être prédite à partir de la concentration de Cd^{2+} dans l'eau, sans tenir compte de la contribution apportée par la nourriture.

Mots clé : poisons indigènes / accumulation de métaux / Cd aqueux / Cd dans la nourriture / modèle biodynamique / évaluation de risques environnementaux

Introduction

Risk assessments for aquatic systems are often made on the basis of acute exposures of test animals to dissolved metals, but several contemporary studies suggest that metal bioaccumulation (Munger and Hare 1997) and toxicity (Hook and Fisher 2001) in aquatic invertebrates can be strongly influenced by diet-borne metals (Fisher and Hook 2002). A key question for environmental regulators is thus whether water quality guidelines expressed solely in terms of waterborne metal are sufficiently protective (Meyer et al. 2005).

For indigenous fish that are exposed to metals in both ambient water and prey, the relative importance of these two potential sources remains contentious. In the case of cadmium, some previous researchers have concluded that Cd is accumulated mainly from aqueous sources (Williams and Giesy 1978), others have suggested that diet-borne Cd is the dominant source (Dallinger and Kautzky 1985; Harrison and Klaverkamp 1989; Mount et al. 1994), whereas still others have concluded that both aqueous and dietary Cd play an important role (Farag et al. 1994; Kraal et al. 1995). The extrapolation of many of these studies to natural environments is difficult, notably because of artefacts associated with the experimental design (e.g., the use of an artificial diet). In addition, these studies are often conducted using fish species (e.g., rainbow trout) that are typically not found in metal-impacted environments.

In this context, we recently carried out a number of field studies on metal accumulation by juvenile yellow perch (*Perca flavescens*), a reasonably sedentary fish species that is commonly found in both pristine and metal-impacted lakes (Sherwood et al. 2000, Couture and Rajotte 2003, Giguère et al. 2004). An understanding of the factors affecting the relative importance of diet and waterborne Cd as routes of uptake for wild yellow perch would help

86 environmental regulators in their development of appropriate water quality guidelines and further
87 strengthen the use of this fish species as a metal biomonitor.

88 In this paper, we use data from these field studies to test the adequacy of a
89 bioaccumulation model for predicting hepatic Cd concentrations in indigenous yellow perch.
90 This model considers both metal uptake and loss, and distinguishes between water and food as
91 metal sources. We used it to predict steady-state Cd concentrations in perch from lakes located
92 along a Cd concentration gradient, as well as to predict the relative importance of dietary and
93 aqueous Cd for these fish.

94

95 Materials and Methods

96 The study lakes

97 For this study, five lakes were chosen representing a gradient in Cd concentrations. The
98 lakes we studied are located in the Abitibi region, centered around the city of Rouyn-Noranda,
99 approximately 600 km north-west of Montréal, Québec, Canada. A copper smelter has been in
100 operation since 1927 in the city of Rouyn-Noranda, and although emissions are currently
101 controlled, lakes located downwind from this smelter are contaminated with metals such as Cd
102 due to historical atmospheric deposition. In addition to these direct inputs from the smelter,
103 some lakes in this region are also contaminated by runoff from mine tailings and mineralized
104 outcrops. For model development we chose two lakes: Lake Opasatica (OP: reference lake) and
105 Lake Dufault (DU: metal-contaminated lake). For the subsequent testing of the model, in
106 addition to these two lakes, we added one reference lake (OL: Ollier), one moderately
107 contaminated lake (VA: Vaudray) and another highly contaminated lake (OS: Osisko). We also
108 considered previously published data from six additional sites: lakes Bousquet, Dasserat and

109 Héva from the Rouyn-Noranda area (Giguère et al. 2004), and lakes Raft, Laurentian, Hannah
110 and Wavy from the Sudbury region (Giguère et al. 2005).
111
112 **Dietary versus aqueous Cd as sources of uptake for juvenile yellow perch**
113 A detailed description of this experiment can be found in Kraemer et al. (2006). Briefly,
114 juvenile yellow perch (1.5 ± 0.1 g dry weight; mean ± SE) were collected from Lake Opasatica
115 and placed in cages located in both Lake Opasatica (2 cages per treatment group) and Lake
116 Dufault (2 cages per treatment group). Each cylindrical cage (height 1.2 m, diameter 0.5 m) was
117 made of Nitex netting (64 μm mesh-aperture) topped by Styrofoam floats and anchored to the
118 lake bottom (Munger et al. 1999). The floats held the cage opening well above the surface to
119 prevent zooplankton from entering by wave action. Each cage initially contained 10 fish.
120 The cages were filled by passive entry of lake water through the netting, which prevented
121 the entry of macro-zooplankton. Yellow perch were allowed to acclimate to their cages for 24 h
122 and were not fed during this time period. The caged fish in both lakes were then fed daily with
123 macro-zooplankton collected from either the reference lake (OP) or the Cd-contaminated lake
124 (DU), creating four treatment regimes: reference lakewater and reference diet (REF); reference
125 lakewater and contaminated food (FO); contaminated lakewater and reference food (WO); and
126 contaminated lakewater and contaminated food (WF). Fish were sampled after 15 and 30 d of
127 exposure and the liver was analyzed for Cd (see description below).
128
129 **Cd uptake and efflux**
130 Details of the Cd uptake and efflux experiments are outlined in Kraemer et al. (2005a and
131 2005b, respectively). For the Cd-uptake experiments, juvenile yellow perch (less than 5 g) were

132 collected from a reference lake (OP) and held in cages in a metal-contaminated lake (DU) for up
133 to 70 d. Similarly, for the Cd-efflux experiments, juvenile yellow perch were collected from the
134 contaminated lake (DU) and kept within cages in the reference lake (OP) for up to 75 d to
135 measure Cd loss. Because this size class of perch feeds mainly on zooplankton and small aquatic
136 insects (Gingras and Boisclair 2000), we designed enclosures to allow these prey to enter freely
137 thereby exposing perch to both contaminated food and contaminated water. The enclosures
138 measured 2.5 m deep and 1.7 m in diameter (volume: 5.7 m^3) and were made from 0.5 cm mesh-
139 aperture polypropylene netting. They were suspended from floating rafts made of plastic tubing
140 (10 cm diameter) and each raft supported four cages. Each cage initially contained 30 – 40 fish.
141 The fish in individual cages were sacrificed at 5 or 6 times during the 70 d Cd-exposure period
142 and 75 d Cd-loss period. Fish were transported live back to a nearby laboratory (< 2 h) where
143 they were killed by a blow to the head after which they were immediately dissected and the liver
144 was collected for metal analyses (see description below).
145
146 **Hepatic Cd concentrations in perch collected from lakes along a Cd concentration gradient**
147 For the current study, juvenile yellow perch (N = 13-15) were collected with a seine net
148 from the five principal study lakes (Dufault, Osisko, Vaudray, Ollier, Opasatica) at the end of
149 May 2003. Fish were transported live back to a nearby laboratory (< 2 h) where they were killed
150 by spinal dislocation. The fish were then dissected and the liver was removed for metal analyses
151 (see description below). Additional data on hepatic Cd concentrations in perch from lakes in the
152 Rouyn-Noranda and Sudbury regions were taken from Giguère et al. (2004; 2005).
153

154 **Liver metal analyses**

155 All liver samples used in this study were processed in a similar manner; a detailed
156 description of the experimental protocol can be found in Kraemer et al. (2005a). Metal
157 concentrations were determined by Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (ICP-MS;
158 Thermo Elemental, Model X7, UK). Blanks and a certified reference material (TORT-1) were
159 also digested; blanks indicated negligible contamination (Cd < 0.013 $\mu g \cdot L^{-1}$), and the recovery of
160 Cd in TORT-1 reference samples (N = 5; mean ± standard error, SE) was 90 ± 2%.

161

162 **Environmental Cd concentrations**

163 *Water*

164 Water samples were collected in June 2003 from the primary study lakes (Dufault,
165 Osisko, Vaudray, Ollier, Opasatica) using diffusion samplers. Each sampler consisted of 8
166 adjacent 4-mL cells separated from the lake water by a polysulphone membrane (0.2 μm nominal
167 pore size) (Pall Gelman Sciences, HT-200, Ville St-Laurent, QC). These samplers (one per lake)
168 were deployed approximately 30 cm above the sediment and kept anchored in place with a brick.
169 The samplers were allowed to equilibrate for 3 d in each lake. After equilibration with the
170 surrounding waters, the samplers were recovered, carefully sealed and sent on ice to a laboratory
171 in Québec City within 24 h of retrieval from the lakes. At the time of retrieval, the ambient pH
172 was also measured in both lakes at a depth of 0.5 m, near the diffusion samplers with a pH meter
173 (Hanna Hi 9025). Sub-samples of water were removed from the samplers for analysis of major
174 anions (SO_4, PO_4, NO_3, Cl), cations (Ca, Mg, K, Na), total dissolved trace metals (Al, Fe, Cd,
175 Cu, Zn) and dissolved organic and inorganic carbon. These solutes were measured as follows:
176 major cations and trace metal cations by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission

177 Spectrometry (ICP-AES, Vista AX, Varian Inc., Mulgrave, Victoria, Australia); anions by ion
178 chromatography (Dionex AutoIon, DX300, Sunnyvale, CA, USA); inorganic carbon by a hot
179 wire detector (HWD) gas chromatograph (Perkin Elmer, Sigma 300, Uberlingen, Germany) and
180 organic carbon by a total organic carbon analyzer (Shimadzu, TOC-5000A, Kyoto, Japan).
181 Blanks and appropriate standard reference materials for these analyses were included and the
182 analytical results were within the expected ranges. Using the above lake water analyses, we
183 estimated free Cd ion concentrations for lakewater from the five principal study lakes using the
184 Windermere Humic Aqueous Model (WHAM 6.0.1: Tipping, 1998).
185
186 *Zooplankton prey*
187 Zooplankton were collected in June 2003 to measure diet-borne Cd. They were collected
188 by horizontal tows with a plankton net (64-μm aperture) in the top 1-2 m of each of the primary
189 study lakes. In each lake, the collected zooplankton was divided into three samples and stored
190 frozen (-20°C) in acid-washed containers until Cd analysis.
191 For Cd analyses, the zooplankton samples were first lyophilized, weighed and then
192 digested in 70% HNO_3 (approximately 3 mL acid per g dry weight sample). Digestions were
193 carried out in an autoclave (120-125°C, 1.1-1.3 $kg \cdot cm^{-2}$, 3 h). During each digestion run, both
194 blanks (HNO_3 and MilliQ water) and certified reference samples (lobster hepatopancreas,
195 National Research Council of Canada, NRCC, TORT-2) were included. The digested samples
196 were then analyzed for Cd by ICP-AES. Low to negligible contamination was detected in the
197 digestion blanks (N = 4): Cd < 0.33 $\mu g \cdot L^{-1}$. Certified samples were quantitatively recovered
198 (N = 4; mean ± SE): 108 ± 2%.
199

200 **Statistical analyses**

201 All data are represented by means ± standard deviations. Statistical analyses on all
202 experimental data were performed with SigmaStat 3.11 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Prior to
203 statistical analysis, the data distributions were first examined for normality (Kolmogorov-
204 Smirnov test) and homogeneity of variance (Levene Median test). A one-way ANOVA with
205 Tukey-Kramer Honestly Significant Difference post-hoc tests ($P \leq 0.05$) was used to compare
206 Cd concentrations in perch living in the reference lake (OP), perch receiving Cd from their diet,
207 from water, or via both dietary and aqueous routes after a 30-d exposure period. Errors (standard
208 deviation) around the model predictions were estimated with parametric bootstrap re-sampling
209 techniques using a Microsoft Excel add-in, Crystal ball 2000 (Decisioneering, Denver, CO,
210 USA) (500 bootstrap samples; Wehrens et al. 2000). Increases in liver mass over time in
211 transplanted fish were examined initially with a scatterplot, and in this case a simple linear
212 regression model was then tested by calculating determination coefficients (r^2). Changes in the
213 relative importance of diet-borne Cd as a function of $[Cd^{2+}]$ was fit with a nonlinear regression
214 model using Sigmaplot (SPSS Inc, 2000).

215

216 ## Results and Discussion

217 We chose the liver of yellow perch to model Cd accumulation because it is large and easy
218 to excise, it is an important site of Cd accumulation in this fish (Giguère et al. 2004), and it is
219 influenced by both diet-borne and waterborne Cd (Kraemer et al. 2006). To describe Cd
220 exchange in the liver, we applied the following first-order, one-compartment, model (Luoma and
221 Rainbow 2005; Munger et al. 1999):

222

223 $$\frac{d[\mathrm{Cd}]_L}{dt} = k_u[\mathrm{Cd}^{2+}] + (\mathrm{AE} \times \mathrm{IR} \times [\mathrm{Cd}]_{food}) - k_e[\mathrm{Cd}]_L - k_g[\mathrm{Cd}]_L \quad (1)$$

224

225 where k_u, k_e and k_g are rate constants for Cd-influx from water ($L^{-1} \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$), Cd-efflux ($d^{-1}$) and
226 liver growth (d^{-1}), respectively, $[Cd^{2+}]$ is the free Cd ion concentration in lakewater ($nmol \cdot L^{-1}$),
227 $[Cd]_L$ is the Cd concentration in the liver ($nmol \cdot g^{-1}$ dry weight), $[Cd]_{food}$ is the Cd concentration
228 in the food of perch ($nmol \cdot g^{-1}$ dry weight), AE is the efficiency (%) with which perch assimilate
229 Cd from their food, and IR is the rate at which food is ingested by perch (g prey $\cdot$ g^{-1} perch $\cdot$ d^{-1}).

230

231 **Cd-uptake from water**

232 We first tested whether we could use Cd concentrations in water alone to predict those in
233 the liver of yellow perch, in part because this would simplify the use of this fish as a Cd
234 biomonitor. This assumption is reasonable because the results of experiments in which fish were
235 exposed to Cd either in food alone, water alone, or food + water (Kraemer et al. 2006) suggest
236 that waterborne Cd is a more important vector of exposure than diet-borne Cd for juvenile
237 yellow perch (Table 1). Accordingly, as a first approximation, we ignored terms describing Cd
238 uptake from food ($\mathrm{AE} \times \mathrm{IR} \times [\mathrm{Cd}]_{food}$). Furthermore, we assumed that Cd loss from perch was
239 negligible early in the Cd-uptake experiment (Kraemer et al. 2005a). Lastly, because changes in
240 liver mass were negligible during the Cd-uptake experiment (Figure 1A), we ignored Cd dilution
241 due to liver growth. Thus equation 1 becomes:

242

243 $$\frac{d[\mathrm{Cd}]_L}{dt} = k_u[\mathrm{Cd}^{2+}] \quad (2)$$

244

245 We estimated $\frac{d[\mathrm{Cd}]_L}{dt}$ to be the slope of the linear phase of the Cd-uptake experiment

246 (i.e., from day 10 to day 70: Kraemer et al. 2005a), in which fish were exposed to Cd in ambient

247 water and food, that is, 4.3 ± 1.5 (SD) nmol·g^{-1}·d^{-1} ($r^2 = 0.99$, $P \leq 0.01$). Substituting this value in

248 equation 2, as well as that for [Cd^{2+}] in Lake Dufault during the transplantation period (2.37

249 nM), yields a value for k_u of 1.8 L·g^{-1}·d^{-1} (Table 2). Although this value for perch liver is similar

250 to those reported for Cd in several invertebrates (*Dreissena polymorpha*, 2.0 L·g^{-1}·d^{-1}, Roditi et

251 al. 2000; *Mytilus edulis*, 0.36 L·g^{-1}·d^{-1}, Wang et al. 1996; marine copepods, 0.67 L·g^{-1}·d^{-1}, Fisher

252 et al. 2000), such comparisons are likely of limited value because they are between whole

253 animals, in the case of the invertebrates, and a single organ, in the case of the perch liver. Of

254 greater use are comparisons with other published values for the liver of other fish species. Thus,

255 using data from Giles (1988), we estimated a k_u of 0.01 L·g^{-1}·d^{-1} for the liver of rainbow trout

256 (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to high aqueous Cd concentrations (32 or 57 nM Cd). A 10-fold

257 higher k_u value for carp (*Cyprinus carpio*) can be calculated from the data given by De Smet et

258 al. (2001), that is, 0.1 L·g^{-1}·d^{-1} when this fish was exposed to Cd at very high concentrations (0.5

259 or 2.5 μM). For this calculation, the liver wet weights given in De Smet et al. (2001) were

260 changed to dry weights using the conversion in Van Campenhout et al. (2004). At even higher

261 dissolved Cd concentrations (4 μM), data on carp published by de Conto Cinier et al. (1997)

262 suggest a much lower k_u value of 0.003 L·g^{-1}·d^{-1}. Clearly, our k_u values for the liver of yellow

263 perch are considerably higher (~100x) than those estimated for this organ in other fish species.

264 Several explanations are possible. First, we estimated k_u values in these previous studies from

265 the total aqueous [Cd] reported in these papers, not [Cd^{2+}] as used in our study. Secondly, the

266 aqueous Cd concentrations used in these previous studies were much higher than that which

267 prevailed in the current study (total dissolved Cd of 32 – 4,000 nM versus 5.5 nM, respectively);
268 since facilitated (i.e., carrier-mediated) metal uptake is a function of the exposure concentration,
269 and thus is a saturable (non-linear) process, overall k_u values would be expected to decrease at
270 high exposure concentrations. Lastly, we cannot discount the possibility that various fish species
271 accumulate metals at different rates.
272
273 **Growth considerations**
274 Although we could ignore liver growth during our Cd-uptake experiment (Figure 1A), we
275 could not do so for the Cd-efflux experiment because there was a significant increase ($r^2 = 0.67$,
276 $P = 0.03$) in liver mass during this latter experiment (Figure 1B). As the Cd-efflux experiment
277 involved the transplantation of fish from a Cd-contaminated lake (Lake Dufault) to a reference
278 lake (Lake Opasatica), this difference was likely linked either to increased food availability in
279 the reference lake, or to differences in how these transplanted fish convert available food to
280 additional mass. Previous studies on adult yellow perch collected from a series of Cd-impacted
281 lakes report that growth rates of fish from Cd-contaminated lakes are generally lower than those
282 from reference lakes (Sherwood et al. 2000). The data from this earlier study also suggest that
283 for a given amount of food consumed, adult yellow perch living in a Cd-impacted lake have a
284 lower conversion efficiency (percent of food intake allocated for growth) than yellow perch from
285 reference lakes.
286 We can estimate the value of the liver growth rate constant, k_g, for our Cd-efflux
287 experiment using the equation:

288 $$W = W_o e^{k_g t} \quad (3)$$

where W is the liver weight (mg dry weight) at time t (d) and W_o is initial liver weight. The resulting k_g estimate is 0.007 ± 0.002 (SD) d^{-1}.

Cd efflux

To estimate the value of the efflux rate constant k_e, we used data from our Cd-efflux experiment, in which Cd-contaminated yellow perch were transplanted to a lake with low ambient [Cd^{2+}] (Lake Opasatica; Kraemer et al. 2005b). If we assume that Cd uptake by perch was negligible in this low-Cd lake, the integrated form of equation (1) becomes:

$$[Cd]_L = [Cd]_L^o \bullet e^{-(k_g + k_e)t} \quad (4)$$

where $[Cd]_L^o$ is the liver Cd concentration (nmol Cd · g^{-1} dry weight) at time 0 of the Cd-efflux experiment. Using a mean k_g value of 0.007 (Table 2) and data on $[Cd]_L$ from our Cd-efflux experiment, we estimated the value of the loss rate constant k_e to be 0.002 ± 0.001 (SD) d^{-1}. This value is much lower than comparable values reported for marine copepods (0.16 d^{-1}; Fisher et al. 2000) and bivalves (0.01 d^{-1} for *Mytilus edulis*, Wang et al. 1996; 0.01 d^{-1} for *Dreissena polymorpha*, Roditi et al. 2000; 0.03 d^{-1} for *Macoma balthica*, Griscom et al. 2002), as well as for a freshwater mayfly (0.09 d^{-1} for *Hexagenia limbata*, Michaud et al. 2005). However, values for these invertebrates are for whole animals whereas our values are for a single organ. In contrast to these results for invertebrates, Cd losses from the liver of several fish species are reported to be negligible following depuration periods of from 30 to 56 d (de Conto Cinier et al. 1999; Harrison and Klaverkamp 1989; Kargin and Cogun 1999), suggesting that k_e values for these fish would be as low as or lower than our value for yellow perch.

311 **Modeling steady-state Cd concentrations**

312 Using the constants for Cd uptake from water (k_u), Cd-efflux (k_e) and liver growth (k_g), as
313 well as measured Cd concentrations in lakewater, we can model steady-state liver Cd
314 concentrations. Assuming that Cd-uptake from food is negligible, at steady-state the integrated
315 form of equation 1 can be written as:

316 $$[\mathrm{Cd}]_{\mathrm{L(ss)}} = \frac{k_u[\mathrm{Cd}^{2+}]}{k_e + k_g} \quad (5)$$

317 where $[\mathrm{Cd}]_{\mathrm{L(ss)}}$ is the Cd concentration (nmol · g^{-1} dry weight) in perch liver at steady state. We
318 used a k_g value of 0.014 (± 0.003 d^{-1}, Table 2), which is a mean liver growth for juvenile yellow
319 perch collected several times during the summer (May to August) from four lakes: Opasatica
320 (mean ± SD; 0.017 ± 0.002 d^{-1}), Vaudray (mean ± SD; 0.016 ± 0.003 d^{-1}), Dufault (mean ± SD;
321 0.013 ± 0.003 d^{-1}) and Osisko (mean ± SD; 0.011 ± 0.003 d^{-1}). Using the aqueous [Cd^{2+}]
322 calculated for lakes from the Rouyn-Noranda area (this study and Giguère et al. 2004), as well as
323 [Cd^{2+}] reported previously for the Sudbury area (Giguère et al. 2005; data summarized in Table
324 3), we estimated steady-state Cd concentrations in perch livers (Figure 2).

325 There was reasonably good agreement between the measured and predicted steady state
326 liver Cd concentrations for perch from the four most Cd-contaminated lakes (as defined by
327 [Cd^{2+}], Table 3). For example, predicted $[\mathrm{Cd}]_{\mathrm{L(ss)}}$ values as a percentage of measured $[\mathrm{Cd}]_{\mathrm{L(ss)}}$
328 values were 96% for Lake Dufault, 98% for Lake Osisko and 107% for Lakes Hannah and
329 Wavy. In contrast, the percent agreement for perch from the reference lakes with low [Cd^{2+}] was
330 much lower: 67%, 23%, 12% and 6%, respectively, for lakes Laurentian, Ollier, Dasserat and
331 Opasatica. Similarly, there was poor agreement for perch from lakes with moderate [Cd^{2+}] with
332 percent similarities ranging from 3-28% for lakes Raft, Vaudray, Bousquet and Héva. Overall,

333 these results suggest that by taking into account only waterborne Cd one can predict hepatic Cd
334 concentrations reasonably well in fish from Cd-contaminated lakes, but not in fish from
335 reference or intermediate lakes. Since earlier work had shown that lake-to-lake variations in Cd
336 accumulation by yellow perch were not related to differences in ambient pH or calcium
337 concentrations (Giguère et al. 2004), we discounted the possibility that differences in lake water
338 chemistry were responsible for the poor predictions in the reference or intermediate lakes, and
339 hypothesized instead that diet-borne Cd might play a more important role in the lakes with low to
340 intermediate [Cd^{2+}] than in those having high [Cd^{2+}].

341 To test this hypothesis, we expanded equation 5 to include uptake from dietary sources
342 (see equation 1), that is,

343 $$[\mathrm{Cd}]_{\mathrm{L(ss)}} = \frac{k_u[Cd^{2+}] + (\mathrm{AE} \times \mathrm{IR} \times [Cd]_{\mathrm{food}})}{k_e + k_g} \qquad (6)$$

344 We modeled steady-state Cd concentrations for the six lakes for which we possessed data on Cd
345 in food (zooplankton; Table 3); previously-published estimates of AE and IR (presented below)
346 were used for this modeling simulation.

347 With regard to ingestion rates, Trudel et al. (2000) estimated the IR for age 1+ yellow
348 perch living at a low-metals site to be 0.028 $g \cdot g^{-1} d^{-1}$. Sherwood et al. (2000) estimated somewhat
349 lower ingestion rates for older yellow perch (age 4+) collected from some of the lakes in our
350 study area (0.016 - 0.018 $g \cdot g^{-1} d^{-1}$). As the age of our perch was closer to that of those studied by
351 Trudel et al. (2000), and because ingestion rates are likely to vary with age, we used the higher
352 value of 0.028 $g \cdot g^{-1} d^{-1}$ for our modeling exercise.

353 With regard to Cd assimilation efficiencies, Liu et al. (2002) estimated that zebrafish
354 (*Danio reiro*) fed zooplankton (*Daphnia magna*) assimilated 3-8% of the Cd in these prey.

355 These results are comparable to the AE of 2.7% estimated for juvenile silversides (*Menidia*
356 *menidia* and *Menidia beryllina*) feeding on zooplankton (Reinfelder and Fisher 1994). Much
357 higher AEs of 23%, 14-33% and 10-26% have been reported for juvenile striped bass (*Morone*
358 *saxatilis*), glassy fish (*Ambassis urotaenia*) and mudskipper (*Periophthalmus cantonensis*),
359 respectively, all of which were fed Cd-contaminated zooplankton (Ni et al. 2000; Baines and
360 Fisher 2002). As juvenile yellow perch eat mainly zooplankton, we assumed that the
361 assimilation efficiency of Cd would be comparable to these previous laboratory studies, and thus
362 as a first approximation we chose a value of 10%, which is from the lower end of the range
363 measured in these laboratory studies.

364 When both aqueous and dietary Cd are considered, our Cd modelling results show that
365 while there is still good agreement between predicted and measured values for fish from the
366 contaminated lakes, predicted values remain much lower than measured concentrations in fish
367 from the reference and intermediate lakes (Table 4), with predicted $[Cd]_{L(ss)}$ as a percentage of
368 measured $[Cd]_{L(ss)}$ values being 6% (Vaudray), 35% (Ollier) and 17% (Opasatica). Cadmium
369 assimilation efficiencies have been shown to be quite variable in fish at low dietary Cd
370 concentrations (Douben 1989), and it is possible the estimation of AE for perch from these
371 reference and intermediate lakes was too low. However, even if we increase the AE to the
372 maximum reported for fish eating zooplankton (33%; Baines and Fisher 2002), we see that while
373 there is better agreement between predicted and measured values, predicted values are still much
374 lower than those observed for fish from lakes Vaudray, Ollier and Opasatica (Figure 3).
375 Increasing the AE from 10% to 33% had a marked impact on predicted Cd concentrations in fish
376 from low to moderately contaminated lakes (Vaudray, Ollier and Opasatica), where predicted

377 concentrations increased by a factor of approximately 2, but predicted Cd concentrations were
378 virtually unchanged for fish from lakes Dufault, Bousquet and Osisko (Table 4).

379 To illustrate the idea that dietary Cd has a larger influence on Cd concentrations in fish
380 from lakes with relatively low Cd concentrations, we used the model to predict the relative
381 importance of dietary and aqueous Cd for yellow perch in six of our study lakes (those for which
382 we know $[Cd]_{food}$, Table 5) as a function of aqueous $[Cd^{2+}]$. These model simulations (Figure 4)
383 show that when aqueous Cd concentrations are low, the diet plays a more important role in
384 hepatic Cd accumulation.

385 The mechanism by which fish take up dietary Cd has not been widely studied, but it is
386 believed to involve the non-selective uptake of this metal through Ca uptake systems (Handy
387 1996). Studies on mammals have shown that dietary composition influences Cd uptake; higher
388 concentrations of zinc, iron and calcium all reduce Cd uptake from dietary sources, suggesting
389 competition among these cations for uptake sites (Reeves and Chaney 2002; Ryu et al. 2004).
390 Furthermore, recent work on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) has confirmed that increases
391 in dietary Ca reduce uptake and accumulation of waterborne Cd in gills, kidney and liver
392 (Zohouri et al. 2001; Baldisserotto et al. 2004). The large discrepancy observed between
393 predicted and measured Cd concentrations in perch from Lake Vaudray (Figure 4) might be
394 related in part to the low concentrations of competing cations in the diet, allowing for a higher
395 assimilation efficiency of dietary Cd.
396

397 **Conclusions**

398 Our objective was to use field-collected data to test a Cd accumulation model for yellow
399 perch. We showed that by taking $[Cd^{2+}]$ in lakewater alone into account, the model accurately

400 predicted hepatic [Cd] in perch from lakes with $[Cd^{2+}] > 0.7$ nM. The greater discrepancies
401 between measured and predicted values in lakes with lower dissolved Cd^{2+} concentrations are
402 likely due to a stronger contribution of dietary Cd in fish from these lakes. From the perspective
403 of risk assessment, these results imply that Cd^{2+} concentrations in lake water could be used on
404 their own to predict Cd bioaccumulation by perch living in highly contaminated lakes where
405 populations of this fish are most likely to be at risk. Predicting Cd concentrations in fish from
406 reference and intermediate lakes proved difficult, as the diet plays a larger role in determining
407 perch liver Cd concentrations and because there is a lack of information on the dietary uptake of
408 metals by fish in the field.
409

410 ## Acknowledgements

411 This study was supported by a grant from the Metals in the Environment Research
412 Network (MITE-RN). We are grateful to the Société de la Faune et des Parcs de l'Abitibi-
413 Témiscamingue (Government of Québec) for their logistical help with the field study. We also
414 thank Catherine Dion, Anabel Carrier, Sophie Cooper, Amélie Cliche, Caroline Durand and
415 Philippe Bourret for their field assistance and Michelle Geoffroy-Bordeleau, Pauline Fournier
416 and Sébastien Duval for their help in the laboratory. Jean-Christian Auclair provided helpful
417 statistical guidance. PGCC is supported by the Canada Research Chair programme.

418 **Reference List**

419 Baines, S.B., and Fisher, N.S. 2002. Assimilation and retention of selenium and other trace
420 elements from crustacean food by juvenile striped bass (*Morone saxatilis*). Limnol.
421 Oceanogr. **47**: 646-655.

422 Baldisserotto, B., Kamunde, C., Matsuo, A., and Wood, C.M. 2004. A protective effect of
423 dietary calcium against acute waterborne cadmium uptake in rainbow trout. Aquat.
424 Toxicol. **67**: 57-73.

425 Couture, P., and Rajotte, J.W. 2003. Morphometric and metabolic indicators of metal stress in
426 wild yellow perch (*Perca flavescens*) from Sudbury, Ontario: A review. J. Environ. Monit.
427 **5**: 216-221.

428 Croteau, M.-N., Hare, L., and Tessier, A. 2003. Difficulties in relating Cd concentrations in the
429 predatory insect *Chaoborus* to those of its prey in nature. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **60**: 800-
430 808.

431 Dallinger, R., and Kautzky, H. 1985. The importance of contaminated food for the uptake of
432 heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*): a field study. Oecologia **67**: 82-89.

433 De Conto Cinier, C., Petit-Ramel, M., Faure, R., and Garin, D. 1997. Cadmium bioaccumulation
434 in carp (*Cyprinus carpio*) tissues during long-term high exposure: analysis by inductively
435 coupled plasma-mass spectrometry. Ecotoxicol. Environ. Saf. **38**: 137-143.

436 De Conto Cinier, C., Petit-Ramel, M., Faure, R., Garin, D., and Bouvet, Y. 1999. Kinetics of
437 cadmium accumulation and elimination in carp *Cyprinus carpio* tissues. Comp. Biochem.
438 Physiol. Part C. **122**: 345-352.

439 De Smet, H., De Wachter, B., Lobinski, R., and Blust, R. 2001. Dynamics of (Cd, Zn)-
440 metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during
441 cadmium exposure. Aquat. Toxicol. **52**: 269-281.

442 Douben, P.E.T. 1989. Metabolic rate and uptake and loss of cadmium from food by the fish
443 *Noemacheilus barbatulus* L. (Stone Loach). Environ. Pollut. **59**: 177-202.

444 Farag, A.M., Boese, C.B., Woodward, D.F., and Bergman, H.L. 1994. Physiological changes and
445 tissue metal accumulation in rainbow trout exposed to foodborne and waterborne metals.
446 Environ. Toxicol. Chem. 13: 2021-2029.

447 Fisher, N.S., Stupakoff, I., Sanudo-Wilhelmy, S., Wang, W.X., Teyssie, J.L., Fowler, S.W., and
448 Crusius, J. 2000. Trace metals in marine copepods: a field test of a bioaccumulation model
449 coupled to laboratory uptake kinetics data. Mar. Ecol. Prog. Ser. **194**: 211-218.

450 Fisher, N.S., and Hook, S.E. 2002. Toxicology tests with aquatic animals need to consider the
451 trophic transfer of metals. Toxicol. **181**: 531-536.

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

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

458 Giles, M.A. 1988. Accumulation of cadmium by rainbow trout, *Salmo Gairdneri*, during
459 extended exposure. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **45**: 1045-1053.

460 Gingras, J., and Boisclair, D. 2000. Comparison between consumption rates of yellow perch
461 (*Perca flavescens*) estimated with a digestive tract model and with a radioisotope approach.
462 Can. J. Fish. Aquat. Sci. **57**: 2547-2557.

463 Griscom, S.B., Fisher, N.S., and Luoma, S.N. 2002. Kinetic modeling of Ag, Cd and Co
464 bioaccumulation in the clam *Macoma balthica*: quantifying dietary and dissolved sources.
465 Mar. Ecol. Prog. Ser. **240**: 127-141.

466 Handy, R.D. 1996. Dietary exposure to toxic metals in fish. *In* Toxicology of Aquatic Pollution:
467 Physiological, Molecular and Cellular Approaches. *Edited by* Taylor, E. W. Society of
468 Experimental Biology Seminar Series, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp.
469 29-60.

470 Harrison S.E., and Klaverkamp, J.F. 1989. Uptake, elimination and tissue distribution of dietary
471 and aqueous cadmium by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and lake whitefish (*Coregonus*
472 *clupeaformis*). Environ. Toxicol. Chem. **8**: 87-97.

473 Hook, S.E., and Fisher, N.S. 2001. Reproductive toxicity of metals in calanoid copepods. Marine
474 Biology **138**: 1131-1140.

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

478 Kraal, M.H., Kraak, M.H.S., De Groot, C.J., and Davids, C. 1995. Uptake and tissue distribution
479 of dietary and aqueous cadmium by carp (*Cyprinus carpio*). Exotoxicol. Environ. Saf. **31**:
480 179-183.

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

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

486 Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., and Hare, L. 2006. A field study examining the relative
487 importance of food and water as sources of Cd for juvenile yellow perch. Can. J. Fish.
488 Aquat. Sci. in press.

489 Liu, X.-J., Ni, I.-H., and Wang, W.-X. 2002. Trophic transfer of heavy metals from freshwater
490 zooplankton *Daphnia magna* to zebrafish *Danio reiro*. Water Res. **36**: 4563-4569.

491 Luoma, S.N., and Rainbow, P.S. 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics
492 as a unifying principle. Environ. Sci. Technol. **39**: 1921-1931.

493 Meyer, J.S., Adams, W.J., Brix, K.V., Luoma, S.N., Mount, D.R., Stubblefield, W.A., and
494 Wood, C.M. (*Editors*). 2005. Toxicity of Dietborne Metals to Aquatic Biota. Society of
495 Environmental Toxicology and Chemistry, SETAC Press, Pensacola, FL, USA.

496 Michaud, A., Hare, L., and Campbell, P.G.C. 2005. Exchange rates of cadmium between a
497 burrowing mayfly and its surroundings in nature. Limnol. Oceanogr. **50**: 1707-1717.

498 Mount, D.R., Barth, A.K., Garrison, T.D., Barten, K.A., and Hockett, J.R. 1994. Dietary and
499 waterborne exposure of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* to copper, cadmium, lead
500 and zinc using a live diet. Environ. Toxicol. Chem. **13**: 2031-2041.

501 Munger, C., Hare, L., and Tessier, A. 1999. Cadmium sources and exchange rates for *Chaoborus*
502 larvae in nature. Limnol Oceanogr. **44**: 1763-1771.

503 Munger, C. and L. Hare. 1997. Relative importance of water and food as cadmium sources to an
504 aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): implications for predicting Cd bioaccumulation in
505 nature. Environ. Sci. Technol. **31**: 891-895.

506 Ni I-H., Wang, W.X., and Tam, K.K. 2000. Transfer of Cd, Cr and Zn from zooplankton prey to
507 mudskipper *Periophthalmus cantonensis* and glassy *Ambassis urotaenia* fishes. Mar. Ecol.
508 Prog. Ser. **194**: 203-210.

509 Reeves, P.G., and Chaney, R.L. 2002. Nutritional status affects the absorption and whole-body
510 and organ retention of cadmium in rats fed rice-based diets. Environ. Sci. Technol. **36**:
511 2684-2692.

512 Reinfelder, J.R., and Fisher, N.S. 1994. Retention of elements absorbed by juvenile fish
513 (*Menidia menidia, Menidia beryllina*) from zooplankton prey. Limnol. Oceanogr. **39**:
514 1783-1789.

515 Roditi, H.A., Fisher, N.S., and Sanudo-Wilhelmy, S.A. 2000. Field testing a metal
516 bioaccumulation model for zebra mussels. Environ. Sci. Technol. **34**: 2817-2825.

517 Ryu, D.-Y., Lee, S.-J., Park, D.W., Choi, B-S., Klaassen, C.D., and Park, J.-D. 2004. Dietary
518 iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats. Toxicol. Lett.
519 **152**: 19-25.

520 Sherwood, G.D., Rasmussen, J.B., Rowan, D.J., Brodeur, J., and Hontela, A. 2000. Bioenergetic
521 costs of heavy metal exposure in yellow perch (*Perca flavescens*): in situ estimates with a
522 radiotracer (134 Cs) technique. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **57**: 441-450.

523 SPSS, Inc. 2000. Sigmaplot 2000 for Windows. SPSS. Inc., Chicago, IL, USA.

524

525 Tipping, E. 1998. Humic ion-binding Model VI: an improved description of the interactions of
526 protons and metal ions with humic substances. Aquat. Geochem. **4**: 3-48.

527 Trudel, M., Tremblay, A., Schetagne, R., and Rasmussen, J.B. 2000. Estimating food
528 consumption rates of fish using a mercury mass balance model. Can. J. Fish. Aquat. Sci.
529 **57**: 414-428.

530 Van Campenhout, K., Goenaga Infante, H., Adams, F., and Blust, R. 2004. Induction and
531 binding of Cd, Cu and Zn to metallothionein in carp (*Cyprinus carpio*) using HPLC-ICP-
532 TOFMS. Toxicol. Lett. **80**: 276-287.

533 Wang, W.X., Fisher, N.S., and Luoma, S.N. 1996. Kinetic determinations of trace element
534 bioaccumulation in the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. **140**: 91-113.

535 Wehrens, R., Putter, H., and Buydens, L.M.C. 2000. The bootstrap: a tutorial. Chem. Intell. Lab.
536 Syst. **54**: 35-52.

537 Williams, D.R., and Giesy, J.P. Jr. 1978. Relative importance of food and water sources to
538 cadmium uptake by *Gambusia affinis* (Poeciliidae). Environ. Res. **16**: 326-332.

539 Zohouri, M.A., Pyle, G.G., and Wood, C.M. 2001. Dietary Ca inhibits waterborne Cd uptake in
540 Cd-exposed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comp. Biochem. Physiol Part C-Toxicol.
541 Pharmacol. **130**: 347-356.

542

543

544

545

545

546

547 Table 1: Hepatic cadmium concentrations (means ± standard deviation) in juvenile yellow
548 perch from the reference lake, and in these perch exposed for 30 d to Cd via food
549 only, water only, and both food + water (Kraemer et al. 2006). Means followed by
550 the same letter are not significantly different (one-way ANOVA with Tukey-Kramer
551 HSD post-hoc tests, $P > 0.05$).

552

Exposure conditions	Hepatic Cd ($nmol \cdot g^{-1}$ dry weight)
Food only	69 ± 14^{b}
Water only	96 ± 7^{c}
Food + Water	93 ± 7^{bc}
Reference (indigenous Lake Opasatica perch)	25 ± 5^{a}

553

554

555

555

556 Table 2: Summary of the estimated values for the model rate constants. Data are represented
557 by means ± standard deviation.

558

Rate constant	Units	Symbol	Estimated value (± SD)
Growth:			
• efflux transplantation experiment	(d^{-1})	k_g	0.007 ± 0.002
• average used in steady-state estimations	(d^{-1})	k_g	0.014 ± 0.003
Cd-efflux	(d^{-1})	k_e	0.002 ± 0.001
Cd-uptake from water	($L \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$)	k_u	1.81 ± 0.60

559

560 Table 3: Geographical location of the lakes in the current study and the chemical composition of their epilimnetic water.

Region	Lake (code)	Location	pH	[DOC] mg/L	Dissolved [Cd] (nM)	$[Cd^{2+}]$ (nM)	Dissolved [Ca] (μM)	$[Ca^{2+}]$ (μM)
Rouyn-Noranda	Bousquet (BO)[2]	48°13' N 78°40' W	6.6	14.7	1.1	0.28	NR	150
	Dasserat (DA)[2]	48°13' N 79°22' W	7.5	9.5	0.18	0.03	NR	293
	Dufault (DU)[1]	48°05' N 79°20' W	7.7	4.85	5.55	2.47	442	394
	Héva (HE)[2]	48°11' N 78°19' W	6.1	9.4	0.54	0.21	NR	94
	Ollier (OL)[1]	48°11' N 79°17' W	7.7	5.9	0.28	0.06	374	324
	Opasatica (OP)[1]	48°05' N 79°20' W	7.7	6.95	0.11	0.02	372	256
	Osisko (OS)[1]	48°15' N 79°0' W	7.8	3.00	1.45	0.70	645	591
	Vaudray (VA)[1]	48°05' N 78°40' W	7.3	8.65	0.81	0.05	87	56
Sudbury	Hannah (HA)[3]	46°26' N 81°02' W	7.0	3.7	2.4	1.0	270	NR
	Laurentian (LA)[3]	46°26' N 80°57' W	6.4	4.6	0.6	0.26	110	NR
	Raft (RA)[3]	46°24' N 80°56' W	6.7	2.6	1.7	0.88	90	NR
	Wavy (WA)[3]	46°18' N 81°06' W	5.0	2.8	1.5	1.2	40	NR

561 [1] Data collected in this study. [2] Data from Giguère et al. (2004). [3] Data from Giguère et al. (2005). NR: not reported

562

563

564 Table 4: Measured concentrations (means ± SD) of Cd in the livers of yellow perch from five
565 lakes in the Rouyn-Noranda region. Also shown are model predictions using an
566 assumed assimilation efficiency of 10% and 33%.

Lake	$[Cd]_{measured}$ ($nmol \cdot g^{-1}$)	AE = 10% $[Cd]_{predicted}$ ($nmol \cdot g^{-1}$)	AE = 33% $[Cd]_{predicted}$ ($nmol \cdot g^{-1}$)	% change ($AE_{33\%} / AE_{10\%}$)
Bousquet	109 ± 34	33 ± 10	40 ± 10	1.2
Dufault	274 ± 37	280 ± 100	313 ± 95	1.1
Ollier	25 ± 2	8.7 ± 3	15 ± 5	1.7
Opasatica	27 ± 4	4.3 ± 1	10 ± 3	2.3
Osisko	75 ± 16	84 ± 27	105 ± 30	1.3
Vaudray	180 ± 37	11 ± 2	23 ± 3	2.1

567

568

568

569

570 Table 5: Cadmium concentrations (means ± standard deviations) measured in bulk

571 zooplankton from six of our study lakes.

572

573

Lake	[Cd] in bulk zooplankton ($nmol \cdot g^{-1}$ dry weight)
Bousquet[1]	18 ± 1
Dufault	87 ± 2
Ollier	17 ± 7
Opasatica	16 ± 4
Osisko	56 ± 6
Vaudray	32 ± 4

574

575 [1] Data from Croteau et al. (2003).

576

577

578

579

580

581

582

583

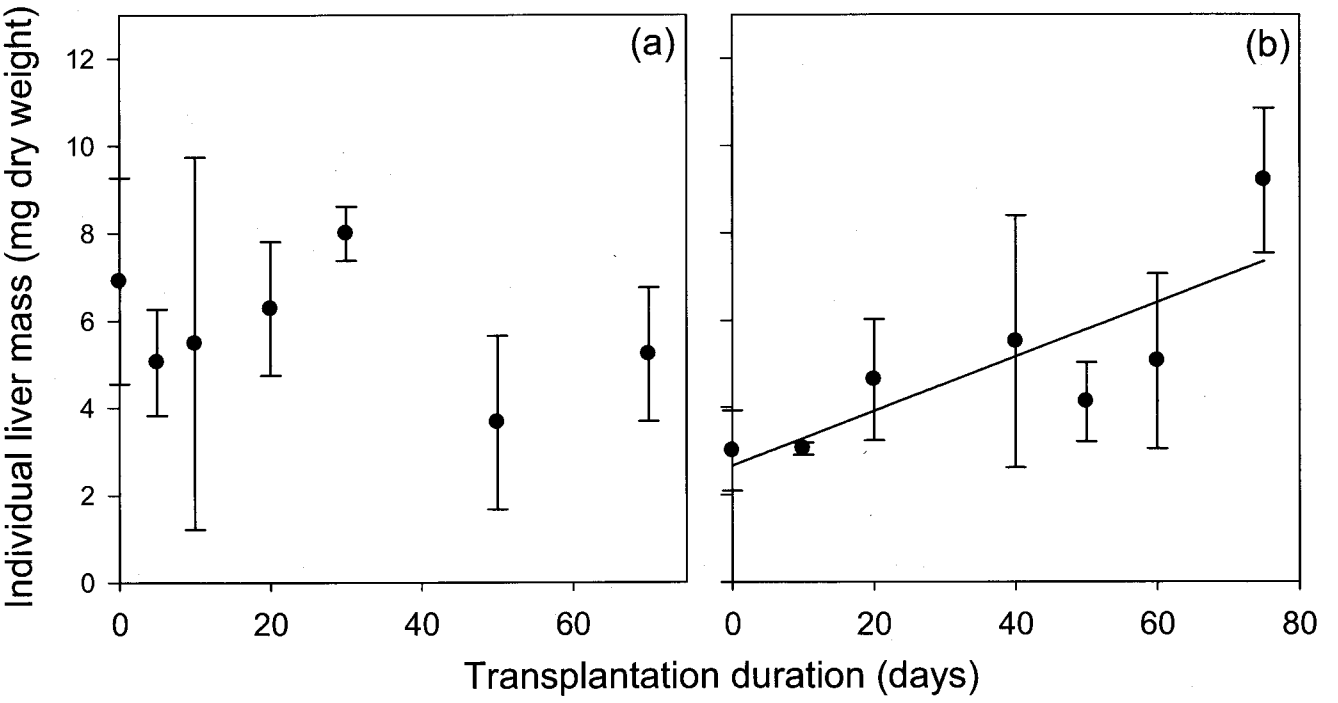
583 **Figure Captions**

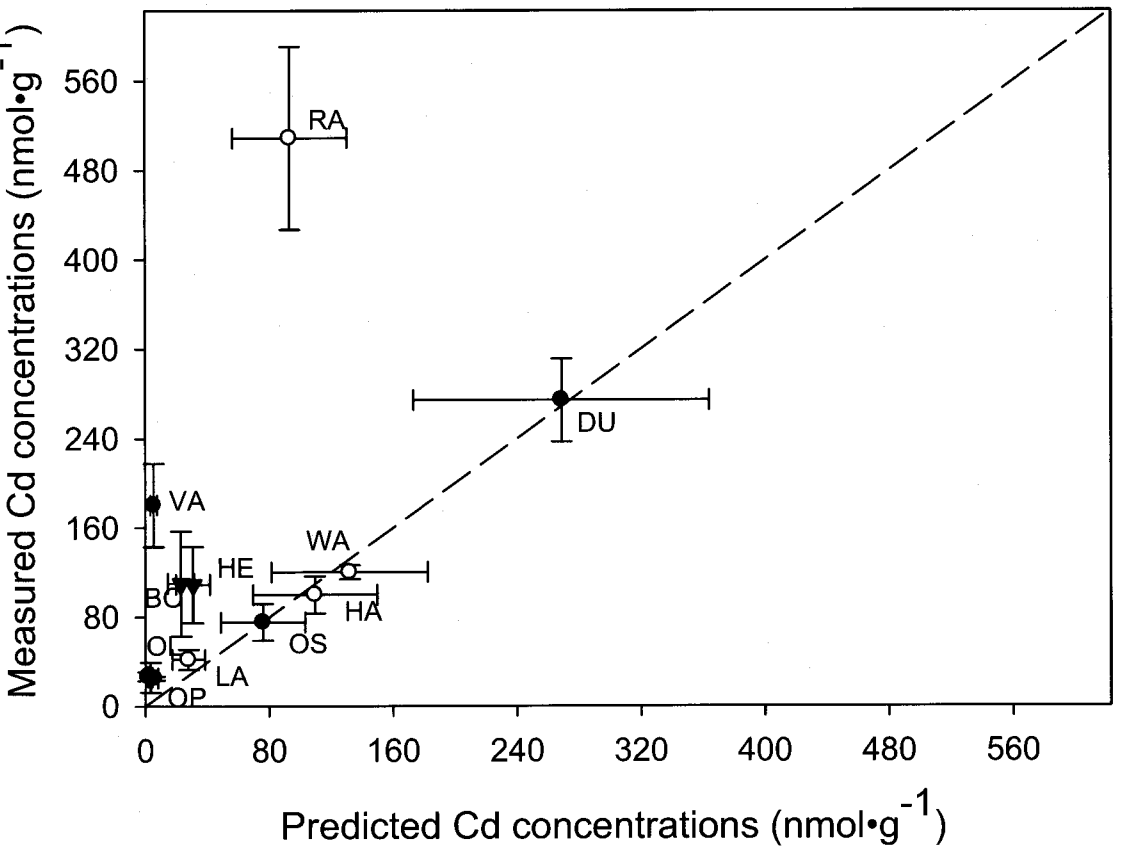
584 Figure 1: Changes in perch liver mass during the Cd-accumulation experiment (panel a) and the
585 Cd-efflux experiment (panel b). Data are represented by the mean ± SD. While no
586 significant correlation existed for graph (a), a linear regression model could be fitted
587 to graph (b) ($r^2 = 0.67$, $P \leq 0.05$).

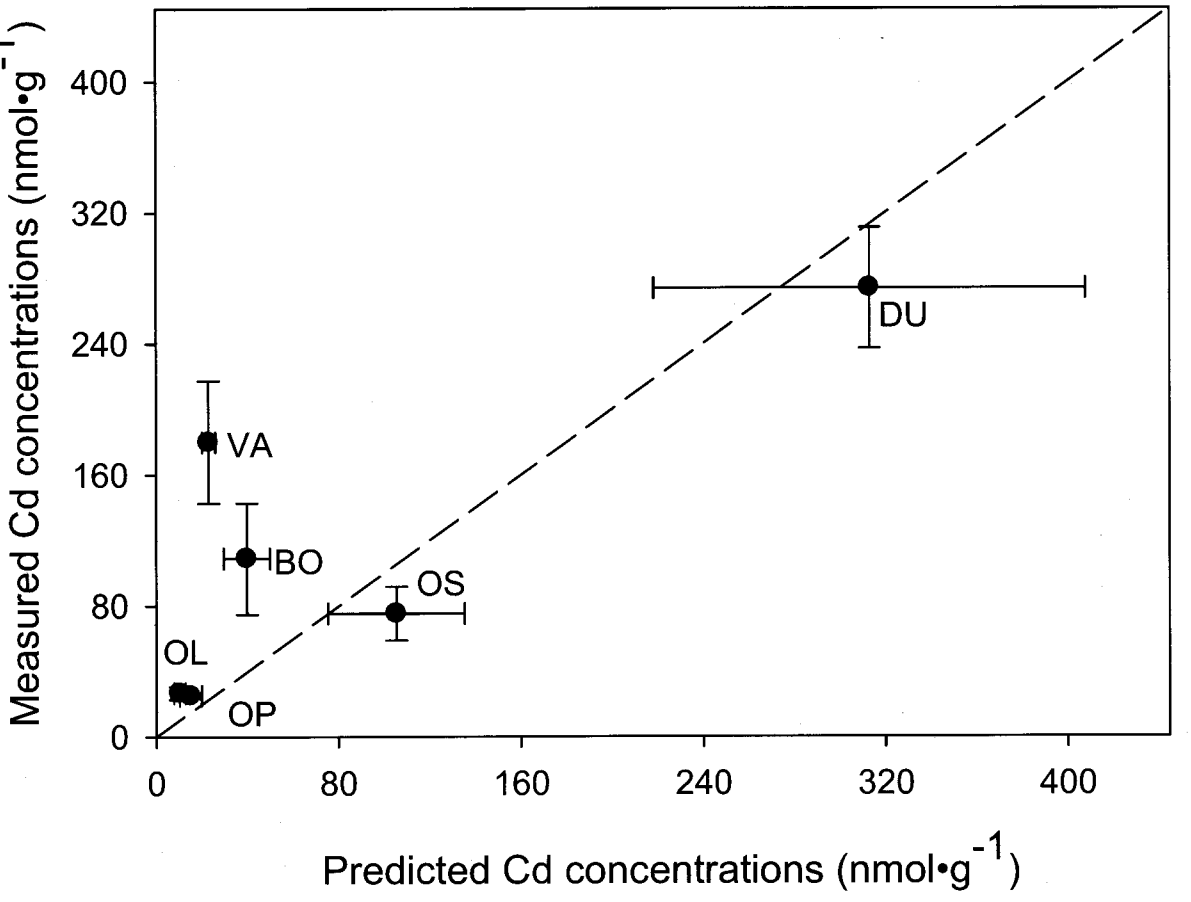
588 Figure 2: Predicted versus measured hepatic Cd concentrations for juvenile yellow perch
589 collected from Rouyn-Noranda in this study (solid circles), as well as data from this
590 same region (solid triangles: Giguère et al. 2004) and the Sudbury region (open
591 circles: Giguère et al. 2005). Each data point corresponds to perch sampled from a
592 different lake (see Table 3 for lake names and descriptions). As described in the text,
593 predictions were based on the assumption that Cd-uptake was from water only. Data
594 are represented by means ± SD, and the dashed line represents a 1:1 relationship.

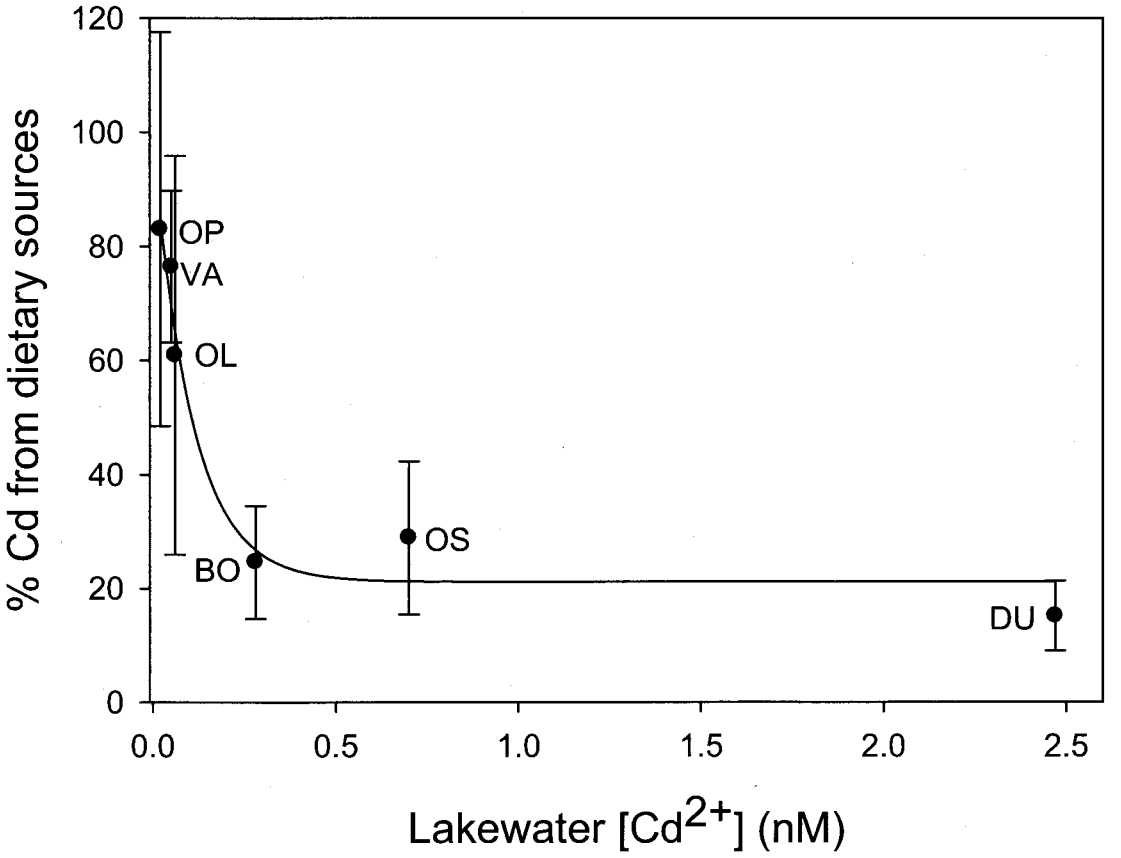
595 Figure 3: Predicted versus measured hepatic Cd concentrations for juvenile yellow perch
596 collected from six lakes in the Rouyn-Noranda area. Predictions took both waterborne
597 and diet-borne Cd into account, and assumed a Cd assimilation efficiency from prey
598 of 33%. Data are represented by means ± SD, and the dashed line represents a 1:1
599 relationship. Each data point corresponds to perch sampled from a different lake (see
600 Table 3 for lake names and descriptions).

601 Figure 4: The relative importance of dietary Cd as a function of lakewater Cd^{2+} concentrations
602 as predicted using equation 6 (means ± SD). Data are shown for the six lakes for
603 which Cd concentrations in zooplankton were known (see Table 3 for lake names and
604 descriptions). Data were fitted with a nonlinear regression model ($r^2 = 0.96$, $P \leq$
605 0.01).


Individual liver mass (mg dry weight)
(a)
(b)
0
2
4
6
8
10
12
0
20
40
60
0
20
40
60
80
Transplantation duration (days)


Measured Cd concentrations (nmol•g-1)
Predicted Cd concentrations (nmol•g-1)
0
80
160
240
320
400
480
560
RA
DU
VA
WA
HE
HA
OS
LA
OP


Measured Cd concentrations (nmol•g-1)
Predicted Cd concentrations (nmol•g-1)
0
80
160
240
320
400
VA
BO
OS
DU
OL
OP


120
100
80
60
40
20
0
% Cd from dietary sources
OP
VA
OL
BO
OS
DU
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
Lakewater [Cd2+] (nM)

13. Annexe A : Caractérisation de la fraction de protéines stables à la chaleur (HSP) : une comparaison entre les métaux (Cd, Cu et Zn) accumulés dans la fraction HSP et les concentrations de métallothionéine.

13.1 Objectif

La fraction de protéines stable à la chaleur (HSP) contient un certain nombre de protéines et de peptides cellulaires tels que le glutathion et la métallothionéine (MT). L'objectif de cette expérience était de caractériser la fraction HSP en comparant les métaux (Cd + Cu + Zn) accumulés dans la fraction HSP (déterminée par la centrifugation différentielle) aux concentrations de MT (déterminées indépendamment par analyse de saturation de mercure).

13.2 Méthodologie

Pour réaliser cet objectif, des perchaudes juvéniles ont été récoltées des lacs Dasserat et Opasatica (lacs de référence), Vaudray (lac modérément contaminé) et Dufault et Osisko (lacs fortement contaminé en métaux) en juin 2004. Une moitié de chaque foie a été prélevée pour la centrifugation différentielle, l'autre moitié étant réservée pour l'analyse de saturation de mercure (Hg). Afin d'avoir assez de tissu pour les analyses, les foies des 12 poissons furent combinés pour chaque lac (équivalent à approximativement 6 foies pour chaque analyse). Le poids humide de tissu utilisé dans la centrifugation différentielle était 0.28 ± 0.03 g (moyenne ± ET) et celui pour l'analyse de saturation de Hg était 0.30 ± 0.03 g.

Centrifugation différentielle

La figure 13-1 représente un sommaire des étapes utilisées dans la procédure de centrifugation différentielle utilisée pour obtenir la fraction HSP (pour une description détaillée, voir la section 3.4).

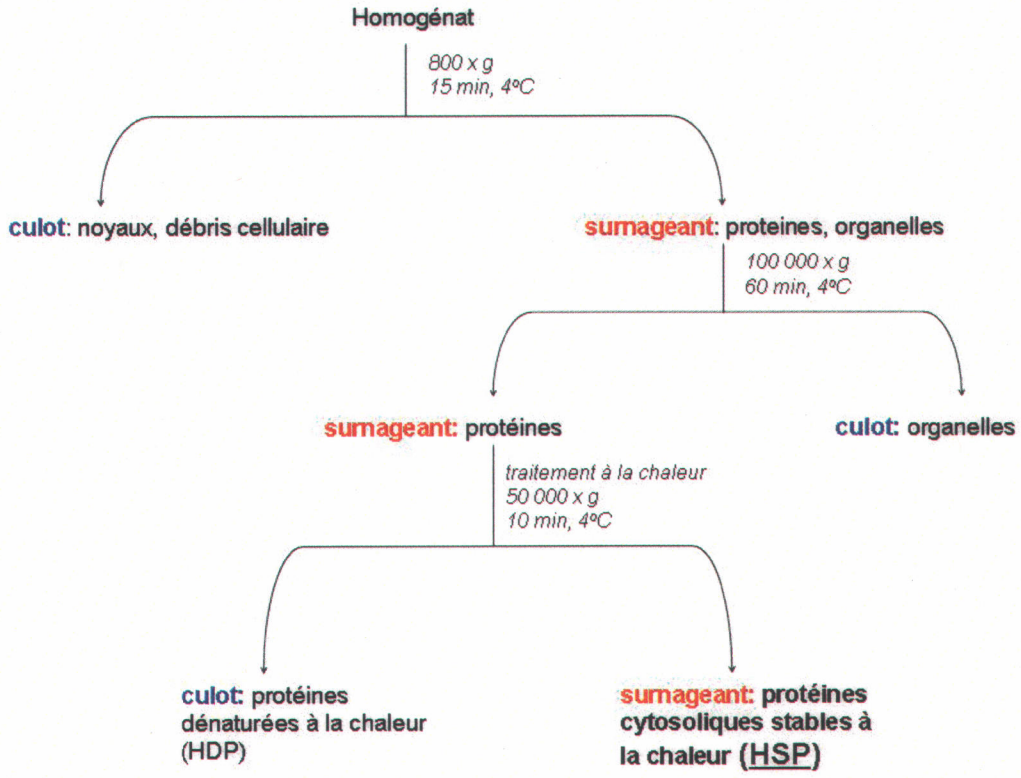


Figure 13-1: Représentation schématique de la méthode de centrifugation différentielle.

Saturation de Hg

La métallothionéine est une protéine cytoplasmique riche en cystéine, dont les groupements sulfydryl ont une affinité forte pour les métaux «mous» (Ag, Cd, Cu, Hg, Zn). L'analyse de saturation au Hg se base sur le fait que, parmi ces métaux, le Hg a la plus forte affinité pour les groupements thiol de la MT. En ajoutant un excès de Hg au broyat de tissu, on provoque le déplacement de tous les métaux qui étaient à l'origine liés à la MT, tels que le Cd, le Cu et le Zn (Klaverkamp et al., 2000). Ensuite, en dosant le Hg lié à la MT, on obtient une mesure de la concentration totale en MT dans le broyat. Pour une description détaillée de

la technique de saturation au Hg, voir Klaverkamp et al. (2000). Brièvement, cette méthode implique les étapes suivantes :

Homogénéisation du tissu

Cette étape a été effectuée dans des conditions anoxiques (c.-à-d., en présence de l'azote gazeux) pour empêcher l'oxydation de la MT. Les échantillons de foie ont été retirés du congélateur et placés sur la glace. La masse humide des échantillons a été notée, et ensuite un tampon (Tris 25 mM) a été ajouté pour diluer l'échantillon 20x (c.-à-d., un volume équivalent à 19 fois la masse humide de l'échantillon). Les broyats ont été doucement homogénéisés à la main dans un homogénéisateur de verre de Potier-Elvehjem. Les échantillons de broyat ont alors été centrifugés (30 min à 16 000 tours/min à 4°C).

Préparation de la solution de travail du ^{203}Hg

Une solution de Hg froid (non radioactif) a été préparée en dissolvant du $HgCl_2$ (1,3535 g) dans 100 mL d'acide trichloracétique (TCA, 20% w/v - solution A). La solution originale de ^{203}Hg radioactif (~1 mCi) a premièrement été diluée deux fois avec de l'eau désionisée (solution B). Une solution de travail avec une activité d'approximativement 300 000 cpm par 200 µL a alors été préparée en combinant le volume approprié de la solution B (dans notre cas, 750 µL), 500 µL de la solution A (mercure froid), et en complétant à 100 mL avec du TCA 10% (w/v).

Saturation au ^{203}Hg

L'étape de saturation au mercure a été effectuée dans des tubes d'Eppendorf de 1,5 mL. Il y avait 4 réplicats par série de tubes (figure 13-2).

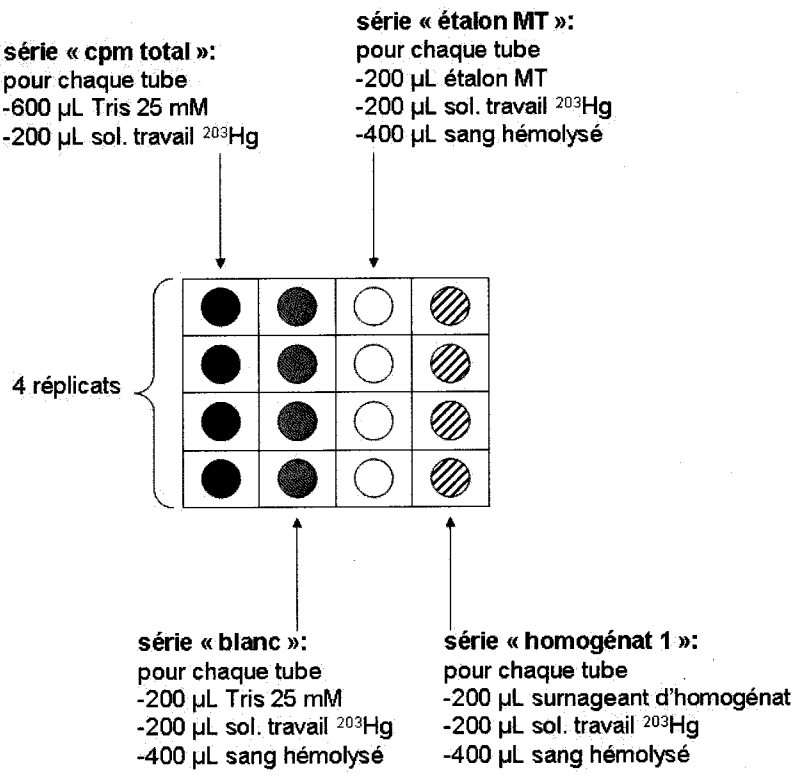


Figure 13-2: Représentation schématique des échantillons utilisés pour l'analyse de saturation au mercure.

Une fois les tubes remplis (figure 13-2), ils ont été centrifugés immédiatement (12 000 tours /min pendant 20 min). Après cette étape, le surnageant a été récolté (en faisant attention de ne pas casser le culot) et la radioactivité dans ces échantillons a été mesurée avec un compteur gamma.

Détermination des rapports de masse humide:sèche

Au moment de l'homogénéisation, 1,0-1,5 mL du broyat de tissu a été transféré à un tube d'Eppendorf qui avait été pesé à l'avance. Le tube + le broyat ont alors été pesés (en masse humide) puis l'échantillon a été séché dans un four (à 60°C pendant 24 h). Après avoir

séché, les tubes ont été pesés encore une fois pour obtenir la masse sèche. À partir de ses résultats le rapport <mass humide : masse sèche> a été calculé et utilisé pour convertir les concentrations de la MT nmol·g^{-1} masse humide en poids nmol·g^{-1} masse sèche.

Concentrations en métal (Cd, Cu et Zn) mesurées dans le standard de la MT

Les concentrations en métal (Cd, Cu, et Zn) dans le standard de la MT étaient nécessaires pour calculer la récupération de la MT pour chacun des essais analytiques. Des concentrations en métal ont été mesurées par l'ICP-AES.

13.3 Resultats

Calcul des concentrations en MT

Des concentrations de métallothionéine ont été calculées comme suit :

nmol MT / g masse sèche = (cpm (échantillon)-cpm (blanc)) / (cpm (totale)) x (10 µg Hg / (0,2 ml) x (1 nmol Hg / 0,20059 µg Hg) x (1 nmol MT / 7 nmol Hg) x la facteur de dilution (20) x ratio (masse humide / masse sèche)

Récupération de la MT

La concentration molaire de l'étalon de la MT a été calculée en déterminant les concentrations en Cd, Cu et Zn dans le standard (mesuré par ICP-AES) et puis en tenant compte de la stœchiométrie du métal liant à la MT (1 nmol MT / 7 nmol Cd; 1 nmol MT / 12 nmol Cu; 1 nmol MT / 7 nmol Zn).

$$[MT]_{théorique} = ([Cd] / 7) + ([Cu] / 12) + ([Zn] / 7)$$

Le pourcentage de récupération de l'étalon de MT a été calculé en comparant les concentrations de MT dans l'étalon tel que mesurées par l'analyse de saturation au Hg à la concentration théorique de la MT :

$$([MT]_{mesurée} / [MT]_{théorique}) \times 100$$

La récupération moyenne de l'étalon de MT était de 85 ± 1% (N = 8; moyenne ± ET).

Comparaison de la concentration de métaux accumulés dans la fraction HSP avec les concentrations de MT

En utilisant une approche semblable nous avons comparé des métaux (Cd, Cu et Zn) accumulés dans la fraction HSP aux concentrations de MT calculées par l'analyse de saturation au Hg, en tenant compte, d'abord de la stœchiométrie des métaux liés à la MT :

$$\text{nmol / g foie: } ([Cd] / 7) + ([Cu] / 12) + ([Zn] / 7)$$

Ces valeurs ont été comparées à la MT calculée par l'analyse de saturation au Hg (figure 13-3) pour des poissons prélevés de 5 lacs différents.

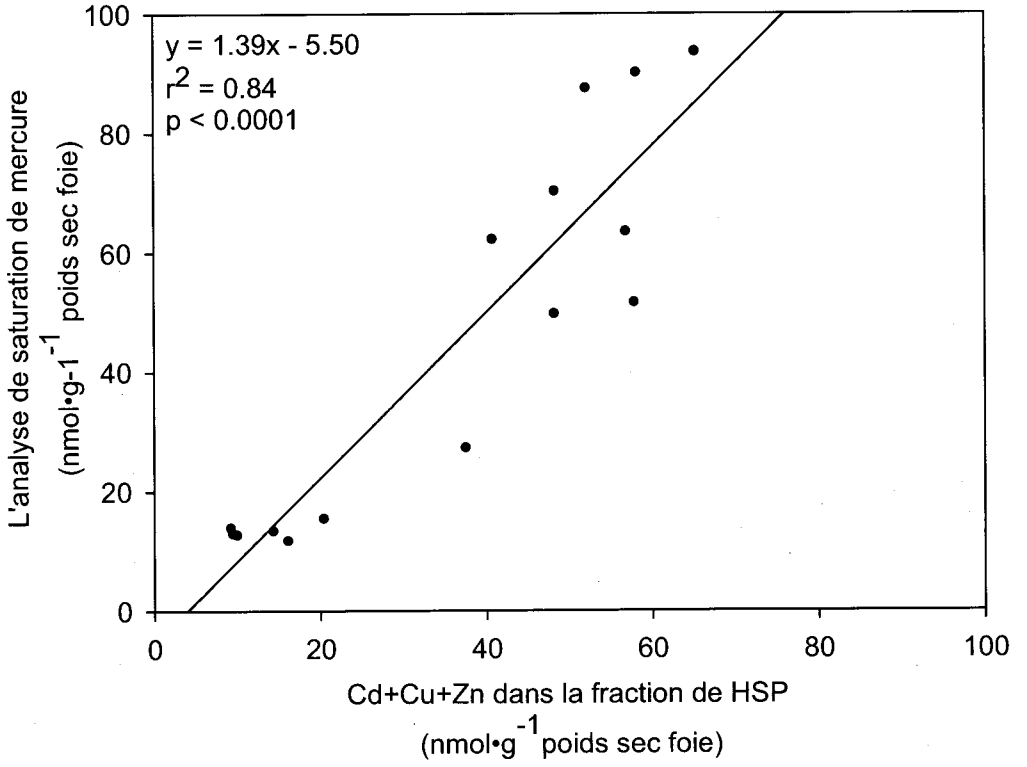


Figure 13-3: Comparaison entre les concentrations de métallothionéine déterminées par l'analyse de saturation au Hg et la concentration de métaux (Cd + Cu + Zn) accumulés dans la fraction HSP.

REPROGRAPHIE DE LA REMISE FINALE
DU MÉMOIRE OU DE LA THÈSE

Lors de la remise finale de mon mémoire ou de ma thèse, les photocopies ont été effectuées par :

l'étudiant(e) : ☑

Les photocopies effectuées par l'étudiant(e) seront sous sa responsabilité.

Lisa Kraemer
Nom

Lisa Kraemer
Signature

Nom du directeur de recherche: Peter Campbell

Nom du co-directeur de recherche: Landis Hare.

Boursier ou non-boursier: non-boursier