

Université du Québec
INRS - Centre Eau Terre Environnement

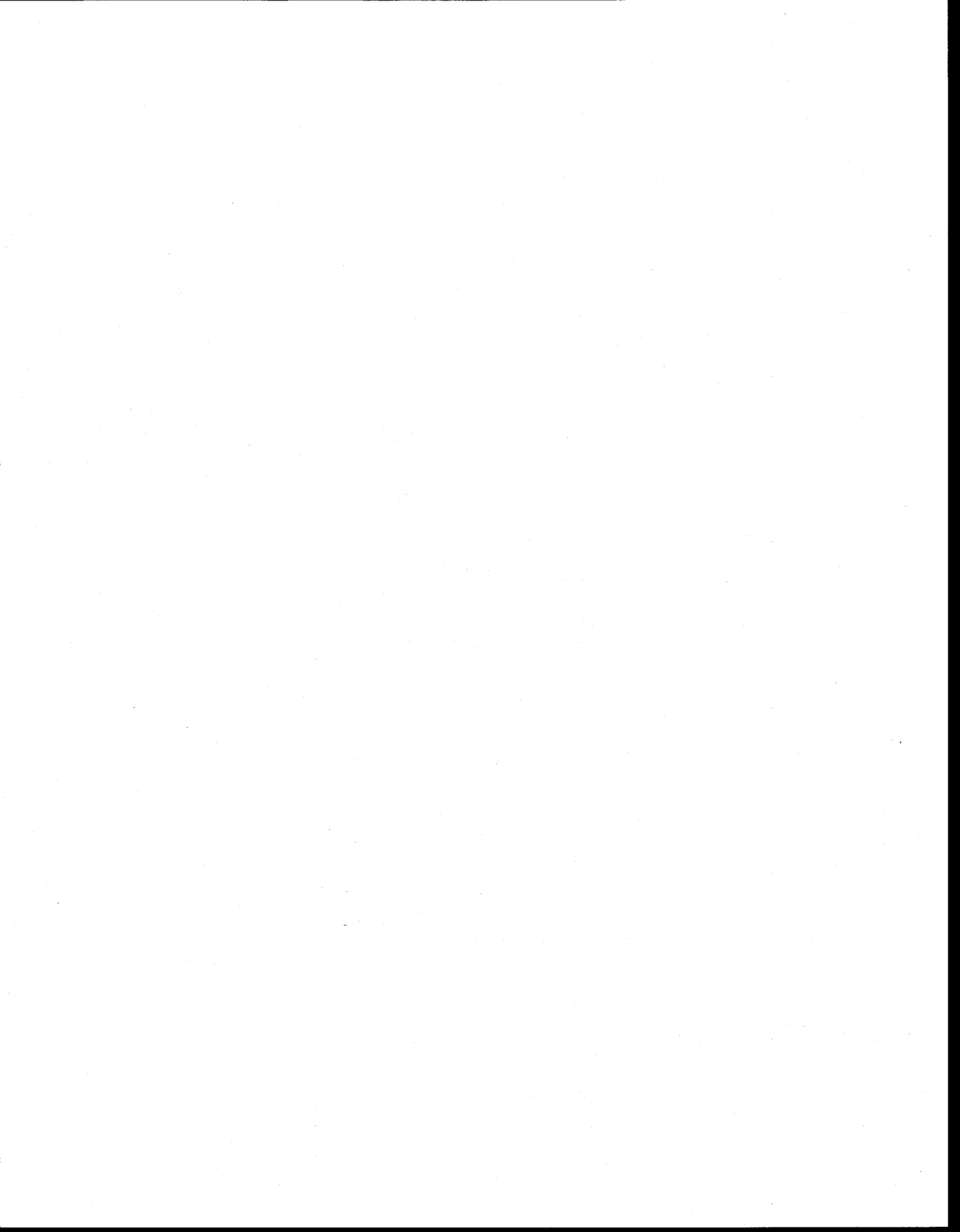
**Accumulation, répartition subcellulaire et effets du nickel et du thallium
dissous ou d'origine alimentaire chez le tête-de-boule
(*Pimephales promelas*)**

Par
Dominique Lapointe

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

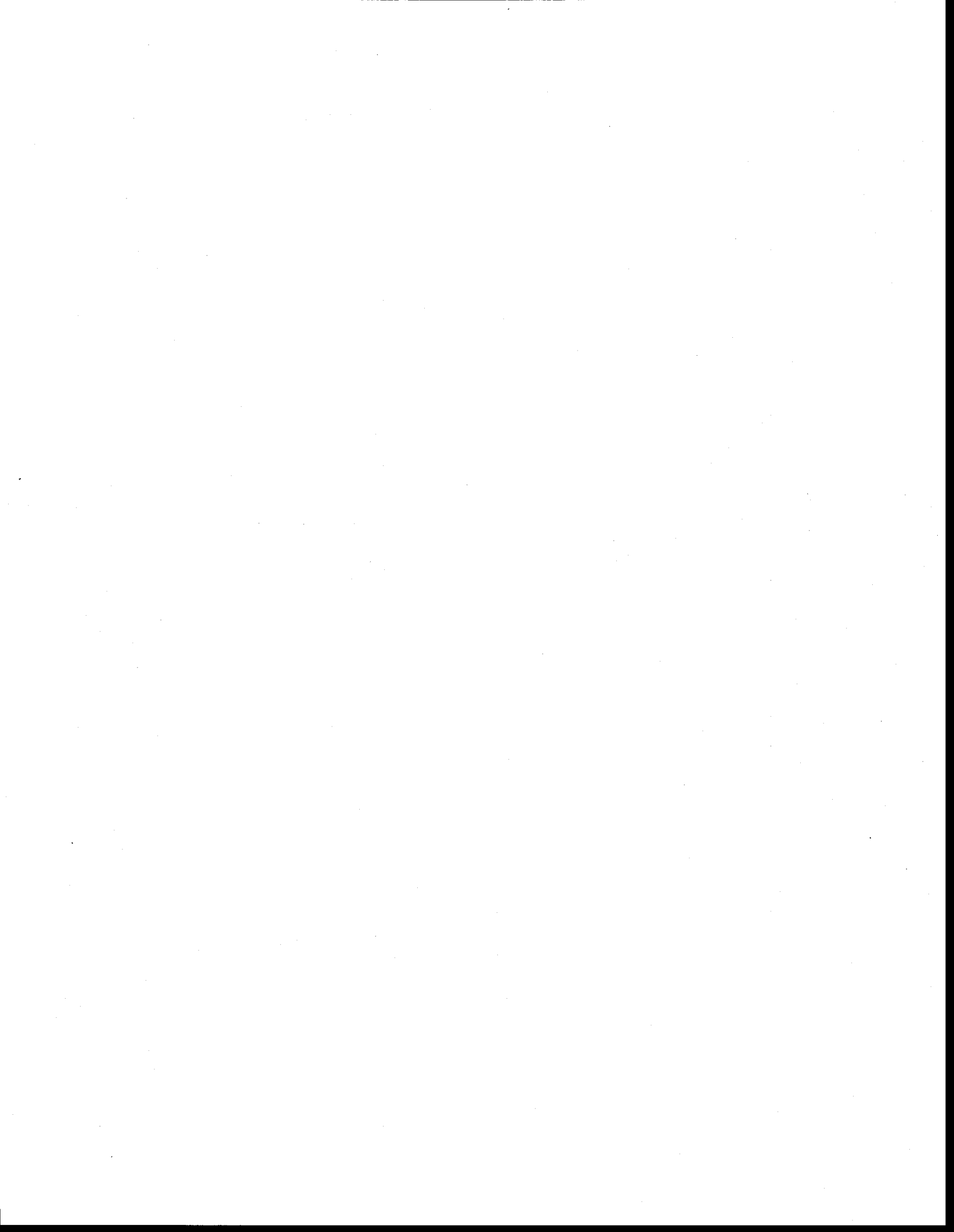
Jury d'évaluation

Examineur externe	Émilien Pelletier Institut des Sciences de la Mer
Examineur externe	James C. McGeer Wilfrid Laurier University
Examineur interne	Peter G. C. Campbell, INRS-ETE
Directeur de recherche	Patrice Couture, INRS-ETE



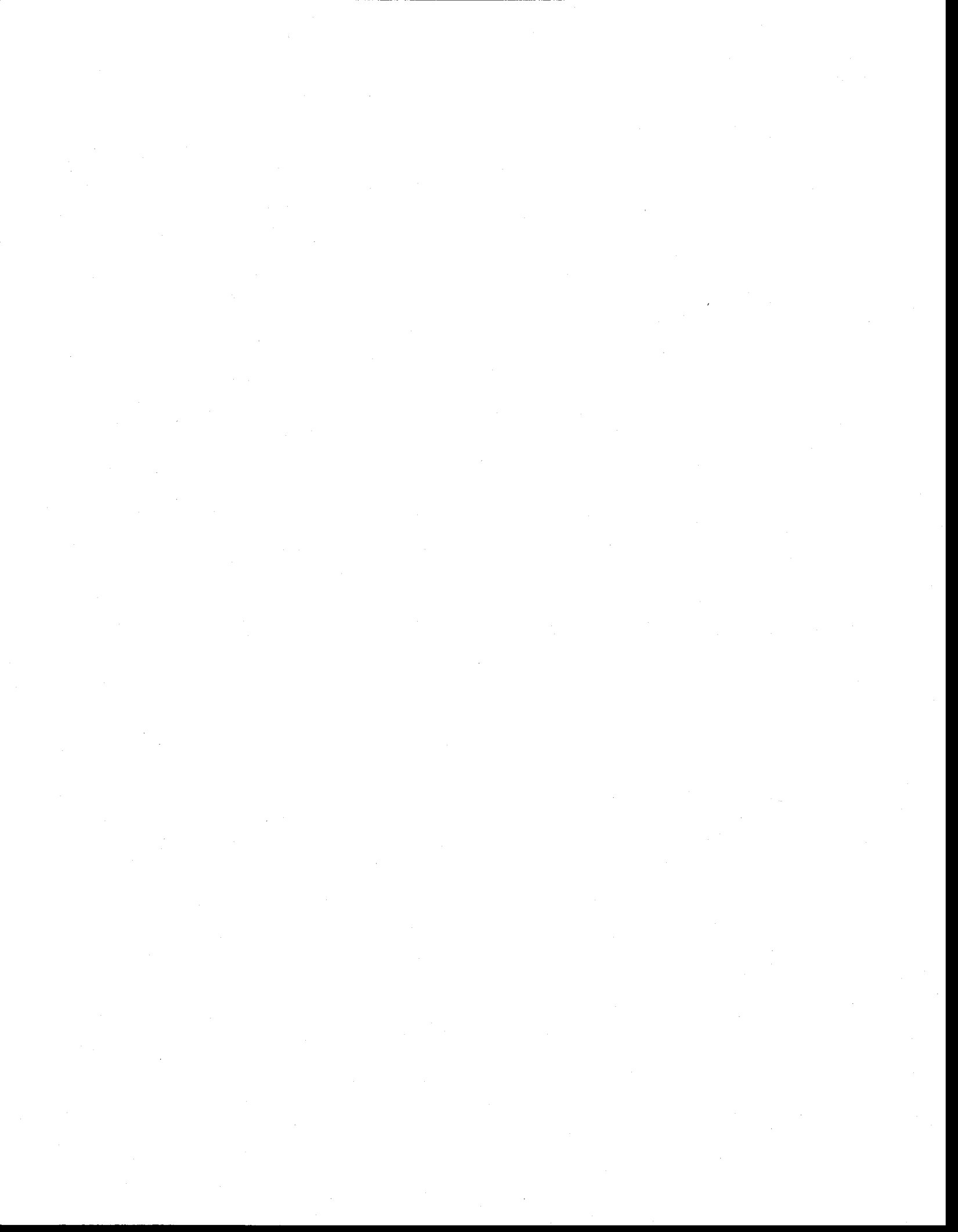
To strive, to seek, to find, and not to yield.

Lord Alfred Tennyson
Ulysses (1842)



[...] our home is not the house or the street or
the nation where we live, but the Earth itself.

James Lovelock
The Vanishing Face of Gaia
A Final Warning, 2008



Résumé

Bien qu'il soit démontré que les proies consommées peuvent représenter une importante source de métaux pour différents organismes aquatiques, la réglementation pour la protection des écosystèmes et des organismes aquatiques est établie à partir de données obtenues suite à des expositions aux métaux dissous. Afin d'évaluer adéquatement les risques associés à la présence de métaux dans l'environnement, il importe de caractériser les sources (eau vs proies), le comportement (spéciation, biodisponibilité, accumulation) et les effets toxiques potentiels des métaux. Ce projet visait donc à améliorer notre compréhension de l'accumulation métallique (nickel et thallium) chez les poissons, consommateurs finaux des chaînes alimentaires aquatiques, en utilisant le tête-de-boule (*Pimephales promelas*) comme espèce modèle.

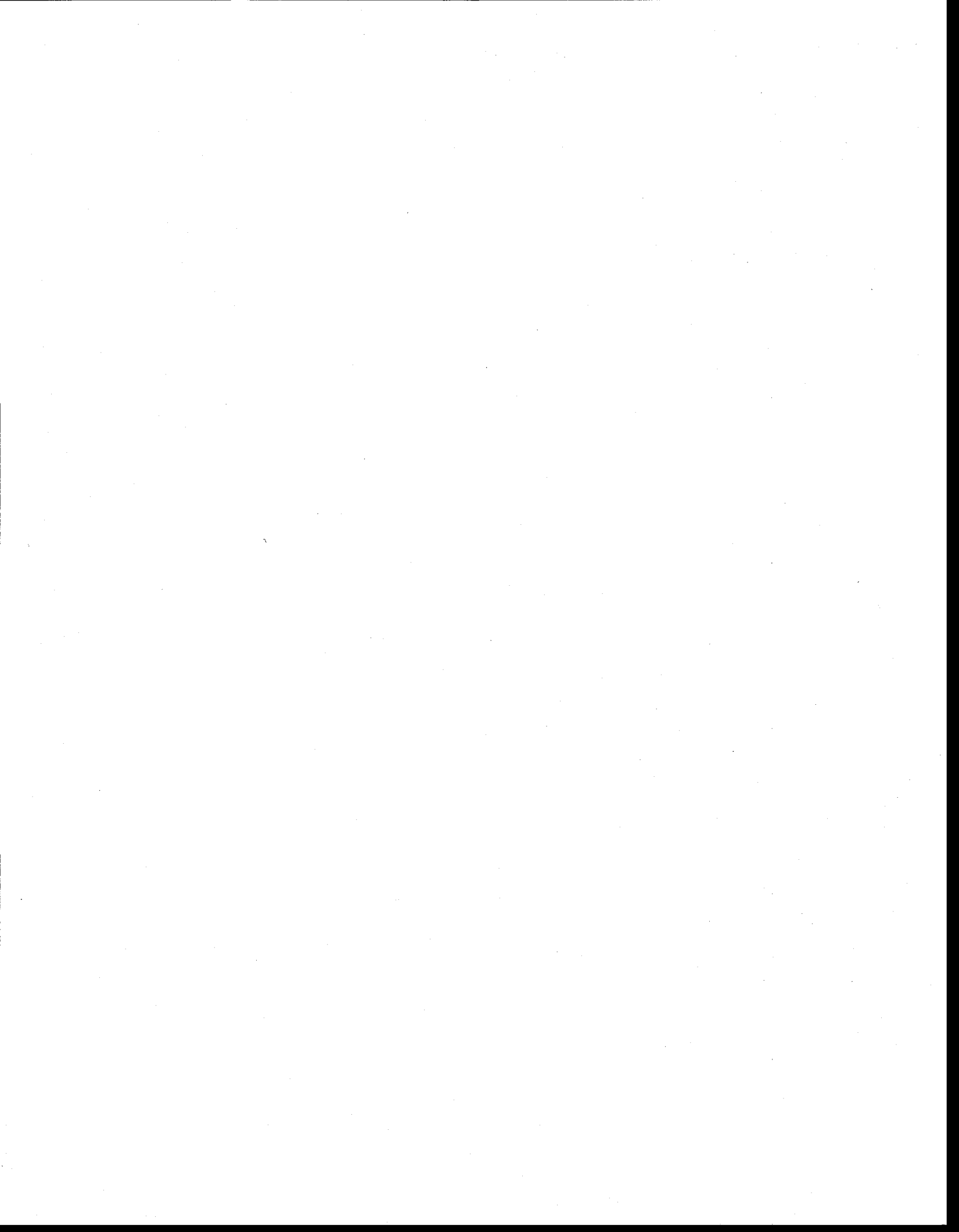
Ce projet de doctorat comportait trois objectifs principaux. Le premier objectif était de déterminer l'importance relative de l'eau et de l'alimentation dans l'accumulation et la répartition subcellulaire du nickel (Ni) et du thallium (Tl) chez différents stades de tête-de-boule. Pour atteindre cet objectif, nous avons exposé des larves et des juvéniles au Ni et au Tl par la voie aqueuse et/ou alimentaire. Sous nos conditions expérimentales environnementalement réalistes, l'eau a été la seule source importante de métal pour les larves tandis que les juvéniles ont accumulé pratiquement autant de métal par l'eau et par les proies.

Chez les poissons, les jeunes stades de vie démontrent généralement une plus grande sensibilité aux polluants. Ainsi, le deuxième objectif de ce projet était d'exposer de jeunes stades (embryons et larves) de tête-de-boule au Ni et au Tl, par voie aqueuse et/ou alimentaire, afin de mesurer l'accumulation et les effets toxiques de ces deux métaux. Nous avons évalué la toxicité du Ni et du Tl en mesurant des paramètres conventionnels, comme le temps à l'éclosion et la survie, ainsi que des paramètres physiologiques, tels le taux métabolique ou l'activité de certaines enzymes. Les concentrations de Ni que nous avons utilisées n'ont pas eu d'effet significatif sur la survie des embryons ou le taux métabolique de routine des larves. Cependant, la concentration de Ni la plus élevée a causé une diminution

du temps à l'éclosion et une augmentation des capacités aérobies et biosynthétiques des larves (augmentation de l'activité de la cytochrome C oxydase et de la nucléoside diphosphate kinase), suggérant une stimulation du métabolisme suite à une exposition au Ni dissous chez les jeunes stades. Finalement, les concentrations de Tl que nous avons utilisées n'ont pas entraîné d'effets sublétaux chez les jeunes stades de tête-de-boule pour les paramètres que nous avons évalués.

Plusieurs questions demeurent en ce qui concerne le transfert trophique des métaux vers les maillons supérieurs. Par exemple, l'influence de la spéciation des métaux dans les proies sur le transfert trophique vers les prédateurs n'est pas encore totalement comprise. Le troisième et dernier objectif fut donc de déterminer l'importance de la répartition subcellulaire du Ni et du Tl chez deux proies (*Tubifex tubifex* et *Daphnia magna*) sur leur assimilation, leur répartition subcellulaire et leur toxicité chez notre prédateur (tête-de-boule juvénile). Indépendamment du type de proie, les juvéniles ont assimilé le Tl plus efficacement que le Ni. De plus, la proportion de métal potentiellement biodisponible dans les deux types de proies n'a pas eu d'influence sur leur efficacité d'assimilation par notre prédateur. Nonobstant le fait que la majorité du Ni et du Tl assimilé par les poissons fut associée aux fractions impliquées dans la détoxification chez ces derniers, le type de proie a affecté la proportion de métal détoxiqué. Ce phénomène pourrait être du moins partiellement expliqué par les différences de concentration de métal dans les proies. Ainsi, les poissons consommant des proies plus contaminées (*D. magna* pour le Ni et *T. tubifex* pour le Tl) avaient une plus faible proportion de métal détoxiqué, ce qui suggère que les capacités de détoxification étaient excédées chez ces poissons et que l'excédent de métal s'est retrouvé dans les autres fractions subcellulaires. Le Ni alimentaire n'a pas eu d'effet néfaste sur les paramètres physiologiques mesurés tandis que chez les poissons nourris avec des daphnies contaminées en Tl, nous avons mesuré une diminution de l'activité de deux enzymes (indicatrices des capacités biosynthétiques et antioxydantes). Finalement, indépendamment du métal, nous avons mesuré une activité accrue de deux enzymes (indicatrices des capacités aérobies et antioxydantes) chez les juvéniles nourris avec *D. magna* comparativement aux juvéniles nourris avec *T. tubifex*.

Dans un contexte d'évaluation des risques environnementaux de l'exposition aux métaux, nos résultats démontrent l'importance de considérer la contribution de l'alimentation comme source de métal chez les poissons et suggèrent qu'il importe également de considérer les différents stades de vie des espèces ciblées et de bien caractériser les réseaux trophiques impliqués.



Avant-propos

Ce projet de doctorat a été entièrement financé par le réseau stratégique *Metals In The Human Environment* (MITHE-SN). Le MITHE-SN regroupe des intervenants des milieux académiques, gouvernementaux et industriels. Les différentes équipes constituant ce réseau sont réparties à travers le Canada et œuvrent dans le but de supporter l'évaluation du risque pour l'environnement et pour les humains. Le programme du MITHE-SN, d'une durée de cinq ans, vise à faire avancer les recherches canadiennes sur les métaux, en s'attardant particulièrement à la caractérisation des sources et de l'exposition, des paramètres importants de l'évaluation du risque. Le programme de recherche comprend trois thèmes : les écosystèmes aquatiques, les sols et les plantes ainsi que la nourriture et les particules ingérées. Ces trois axes de recherche couvrent plusieurs maillons de différentes chaînes alimentaires, des niveaux trophiques inférieurs jusqu'aux consommateurs finaux. Les principaux métaux et métalloïdes d'intérêt du MITHE-SN sont le Cd, le Cu, le Pb, le Ni, le Tl, l'U, le Zn, l'As et le Se.

Au Centre Eau Terre Environnement de l'INRS, l'équipe MITHE-SN est constituée de quatre professeurs et de huit étudiants. Notre projet fait partie du thème « écosystèmes aquatiques » et s'intitule : *Metal transfer along an aquatic food chain*. Il a pour objectif de déterminer de quelle façon la spéciation des métaux influence leur prise en charge par les organismes, leur transfert entre les différents niveaux trophiques (des algues aux poissons) et leurs effets. Les études réalisées dans le cadre de ce projet portent sur le Cd, le Cu, le Zn, le Ni, le Tl et le Se. Les résultats obtenus devraient permettre de mieux comprendre et prédire les tendances dans les concentrations et les effets des métaux le long des chaînes trophiques, informations qui sont essentielles pour l'évaluation du risque environnemental.

La présente étude doctorale s'attarde sur les poissons, les consommateurs finaux des chaînes alimentaires aquatiques. Les métaux qui y sont étudiés sont le Ni et le Tl.

Cette thèse comporte, en première partie, une synthèse générale de l'ensemble du doctorat, constituée de la problématique, des objectifs et hypothèses de recherche et finalement d'une interprétation et discussion des résultats. Le noyau de la thèse, en deuxième partie, est présenté sous forme de trois publications scientifiques publiées ou soumises à des revues avec comités de lecture. Des compléments d'information sur les méthodes sont présentés en annexe.

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

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

D. Lapointe : Conception et réalisation du projet (expériences en laboratoire, analyses, traitement et interprétation des données); rédaction de l'article.

P. Couture : Conception et réalisation du projet (contribution à l'interprétation des données); rédaction de l'article.

2. Lapointe, D. and Couture, P. Accumulation and effects of nickel and thallium in early-life stages of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Soumis à *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

D. Lapointe : Conception et réalisation du projet (expériences en laboratoire, analyses, traitement et interprétation des données); rédaction de l'article.

P. Couture : Conception et réalisation du projet (contribution à l'interprétation des données); rédaction de l'article.

3. Lapointe, D., Gentès, S., Ponton, D., Hare, L. and Couture, P. 2009. The influence of prey type on nickel and thallium assimilation, subcellular distribution and toxicity in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Science and Technology*. 43(22) : 8665-8670.

D. Lapointe : Conception et réalisation du projet (expériences en laboratoire, analyses, traitement et interprétation des données); rédaction de l'article.

S. Gentès : Réalisation du projet (expériences en laboratoire, analyses, traitement et interprétation des données).

D. Ponton : Conception et réalisation du projet (expériences en laboratoire, analyses); révision de l'article.

L. Hare : Conception du projet; rédaction de l'article.

P. Couture : Conception et réalisation du projet (contribution à l'interprétation des données); rédaction de l'article.



Remerciements

Le moins que l'on puisse dire, c'est que la réalisation d'un projet de doctorat n'est pas un long fleuve tranquille. Ce périple singulier comporte son lot d'écueils et ne pourrait être achevé sans l'aide et le soutien de plusieurs personnes.

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Patrice Couture, pour la confiance qu'il m'a démontrée en me confiant ce projet et pour la liberté qu'il m'a laissée dans la réalisation de celui-ci. L'écotoxicologie aquatique était un nouveau domaine de recherche pour moi mais il a su faire en sorte que mon arrivée dans son laboratoire se fasse sans heurts. Merci pour l'aide, les conseils et le temps généreusement offerts, mais surtout pour m'avoir guidée et épaulée pendant mes nombreux moments d'insécurité. Je te suis également reconnaissante de m'avoir permis de partager mes travaux à de nombreuses occasions. Cette expérience est inestimable pour ma jeune carrière et je suis consciente d'avoir été choyée. J'espère que nous aurons l'occasion de travailler ensemble à nouveau.

Je remercie les membres de mon jury d'évaluation, James C. McGeer, Émilien Pelletier et Peter G. C. Campbell, pour le temps et l'intérêt consacrés à la lecture de cette thèse ainsi que pour les commentaires fournis. Je suis certaine que votre rigoureuse contribution me permettra d'améliorer la qualité de cet ouvrage et me poussera à porter la réflexion au delà de ces pages.

Je désire également souligner la contribution des professeurs/chercheurs de l'équipe MITHE-INRS, Peter G. C. Campbell et Claude Fortin, dans la réalisation de ce projet et je voudrais dire un merci tout particulier à notre P.I., Landis Hare, pour le temps qu'il m'a accordé durant mon doctorat, lorsque j'avais besoin de mettre un peu d'ordre dans mes réflexions, et pour m'avoir initiée à l'art du « lâcher prise », bien que je n'y suis pas encore tout à fait parvenue. *Namasté*. Je remercie également mes collègues étudiants de l'équipe MITHE-INRS pour leur aide autant au laboratoire que dans l'intégration des résultats. Merci à Julie, Maïté, Michel, Isabelle, Dominic, Jonathan et Kristin.

Merci à mes collègues du 5432, Charles, Vincent, Nicolas, Audrey et Fabien, ainsi qu'aux stagiaires qui ont contribué à la réalisation de ce projet : Emmanuelle, Axel, Mélanie, Sophie et Béragère. Merci également aux techniciens du service des laboratoires de l'INRS-ETE qui m'ont aidé pour les différentes analyses en laboratoire : Stéphane, Michelle, Pauline, Réal, René, Sébastien et Lise. Sans vous tous je ne serais jamais parvenue au bout de cette aventure. Je tiens à remercier Suzanne Dussault, pour son dévouement, sa patience et sa générosité. Sans elle, notre cheminement académique pourrait rapidement devenir une expérience déroutante.

Je remercie également mes collègues et amis du 2434 (et autres bureaux) pour leur présence et leurs encouragements. Ce fut un plaisir de partager ces moments avec vous et je vous souhaite le meilleur. Dany, Romain, Sophie, Stéphane, Stéphanie, Anthony, Raoul et Kristin : Merci!

Afin de parvenir au bout de cette aventure, j'ai dû par moments mettre les bouchées doubles. Les heures sont alors rapidement devenues des jours, des semaines et parfois des mois. Durant ces périodes intenses, le support des gens qui nous sont chers est crucial. Je désire, en dernier lieu, remercier chaleureusement ma famille et mes amis (es). Je n'ai pas besoin de vous nommer, vous qui m'êtes chers, vous saurez vous reconnaître. Sans votre aide, votre compréhension, vos encouragements, votre réconfort et votre support (moral et financier!) je crois que je n'aurais pas pu noircir ces pages. J'espère, un jour, avoir l'occasion de vous rendre tout ce que vous m'avez généreusement offert.

Table des matières

PARTIE I : Synthèse

1	Introduction.....	3
1.1	Métaux d'intérêt de cette étude.....	3
1.2	Sources de métaux pour les écosystèmes aquatiques	4
1.3	Devenir des métaux dans les milieux aquatiques	6
1.3.1	Spéciation du nickel.....	9
1.3.2	Spéciation du thallium	10
1.4	Biodisponibilité des métaux.....	11
1.4.1	Prise en charge par l'eau	12
1.4.2	Prise en charge par la diète	14
1.5	Devenir des métaux dans les cellules.....	18
1.5.1	Mécanismes de détoxification.....	18
1.5.2	La répartition subcellulaire	22
1.6	Toxicité	26
1.6.1	Le nickel.....	26
1.6.2	Le thallium.....	29
1.7	Choix du tête-de-boule.....	30
2	Objectifs et hypothèses de recherche.....	33
2.1	Importance relative de l'eau et de l'alimentation	33
2.2	Accumulation et effets chez les jeunes stades de vie.....	34
2.3	Influence du type de proie sur le transfert trophique	34
3	Méthodologie	37
3.1	Organismes utilisés	37
3.2	Exposition des organismes.....	37
3.3	Mesures d'exposition et d'accumulation métalliques.....	38
3.4	Répartition subcellulaire des métaux.....	39
3.5	Détermination du taux métabolique de routine.....	40
3.6	Détermination des activités enzymatiques.....	40
4	Résultats.....	43

4.1	Accumulation de métaux chez différents stades de tête-de-boule	43
4.1.1	Embryons et larves de moins de 24 heures	43
4.1.2	Larves de plus de 24 heures	44
4.1.3	Juveniles.....	49
4.2	Importance relative de l'eau et de la diète dans l'accumulation de métaux	51
4.3	Efficacité d'assimilation chez notre prédateur.....	54
4.4	Répartition subcellulaire du nickel et du thallium	54
4.4.1	Influence de la voie d'exposition.....	55
4.4.2	Influence du type de proie.....	58
4.5	Effets de l'exposition métallique sur les paramètres physiologiques mesurés.....	58
4.5.1	Survie et temps à l'éclosion	58
4.5.2	Taux métabolique de routine	60
4.5.3	Activités enzymatiques	62
5	Discussion et intégration des résultats	65
5.1	Pertinence environnementale des paramètres d'exposition	65
5.1.1	Concentrations dans l'eau.....	65
5.1.2	Concentrations dans les proies.....	66
5.2	Accumulation métallique	66
5.2.1	Par la phase aqueuse	66
5.2.2	Par transfert trophique.....	69
5.2.3	Par les deux voies simultanément.....	70
5.3	Efficacité d'assimilation chez notre prédateur.....	71
5.4	Effets sublétaux de l'exposition métallique.....	74
5.4.1	Le nickel.....	74
5.4.2	Le thallium	75
6	Conclusions.....	77
6.1	Retour sur les objectifs et hypothèses.....	77
6.2	Perspectives de recherche	79
7	Liste des références.....	81
PARTIE II : Articles scientifiques		
8	1 ^{er} article	99

9 2° Article	111
10 3° Article	143
11 Annexe A	151
12 Annexe B	152
13 Annexe C	153
14 Annexe D	155

Liste des figures

- Figure 1-1 : Gradient de contamination en nickel mesuré dans des lacs individuels de la région de Sudbury (Ontario). Données tirées de Pyle et al. (2005) 5
- Figure 1-2 : Schéma de la spéciation des métaux.
Adapté de Campbell et Couillard (2004) 8
- Figure 1-3. Représentation des différentes étapes de l'interaction entre un métal et une membrane biologique. Modifié de Campbell (1995) 13
- Figure 1-4 : Voies d'entrée potentielles des métaux à travers les membranes biologiques. Modifié de Luoma et Rainbow (2008) 14
- Figure 1-5. Concentration de nickel mesurée dans les contenus stomacaux de perchaudes (*Perca flavescens*) de tous les groupes d'âges disponibles récoltées dans la région de Sudbury (Ontario). P. Couture, données non publiées 15
- Figure 1-6. Modèle de prise en charge des métaux dans un intestin de vertébré. Modifié de Campbell et al.(2005a) M^{n+} représente l'ion métallique tandis que A^{n-} représente les ligands anioniques. Les constantes K_1 à K_6 représentent les constantes d'équilibre des différentes étapes de diffusion. K_n signifie que plus d'un compartiment intracellulaire peut être impliqué dans l'entreposage. Les lignes tracées dans la couche de mucus illustrent les protéines auxquelles l'ion métallique se lie principalement..... 17
- Figure 1-7. Illustration des différents types de granules retrouvés chez les invertébrés. Tiré de Hopkins (1989)..... 21

- Figure 1-8. Détermination de la répartition subcellulaire d'un métal par centrifugation différentielle. Modifié de Dumas et Hare (2008) 23
- Figure 1-9 Classification des fractions opérationnelles obtenues par centrifugation différentielle. Les fractions sensibles aux métaux et les métaux détoxiqués correspondent respectivement aux compartiments MSF et BDM définis par Wallace et collaborateurs (2003) tandis que les métaux disponibles pour le transfert trophique correspondent au compartiment TAM proposé par Wallace et Luoma (2003). Adapté de Luoma et Rainbow (2008)26
- Figure 1-10 Distribution du tête-de-boule dans l'est du Canada. La zone hachurée délimite son aire de répartition (on le retrouve essentiellement en Ontario et dans le sud-ouest du Québec). Tiré de Bernatchez et Giroux (2000). 31
- Figure 3-1 Exemple de dispositif utilisé pour l'exposition des différents stades de tête-de-boule 38
- Figure 4-1 Comparaison des concentrations de nickel (moyenne + erreur type) mesurées dans les embryons et larves prélevés durant l'exposition au nickel dissous (n=5 réplicats composés de 10 embryons ou larves, sauf pour le groupe contrôle des embryons exposés pendant 24 h où n=4 (a). Les moyennes obtenues pour les 3 traitements d'une même série ont été comparées pour chaque prélèvement au moyen des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD. Les moyennes ayant des lettres différentes diffèrent ($p \leq 0.05$) 45
- Figure 4-2 Comparaison des concentrations de thallium (moyenne + erreur type) mesurées dans les embryons et larves prélevés durant l'exposition au thallium dissous (n=5 réplicats composés de 10 embryons ou larves). Les moyennes obtenues pour les 3 traitements ont été comparées pour chaque prélèvement au

moyen des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD. Les moyennes ayant des lettres différentes diffèrent ($p \leq 0.05$) 46

Figure 4-3 Comparaison des concentrations de nickel (moyenne + erreur type) mesurées dans les larves prélevées durant l'exposition au nickel dissous et/ou alimentaire (n=5 réplicats composés de 10 larves). Les moyennes obtenues pour les 3 traitements d'une même série ont été comparées pour chaque prélèvement au moyen des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD. Les moyennes ayant des lettres différentes diffèrent ($p \leq 0.05$) 47

Figure 4-4 Comparaison des concentrations de thallium (moyenne + erreur type) mesurées dans les larves prélevées durant l'exposition au thallium dissous et/ou alimentaire (n=5 réplicats composés de 10 larves). Les moyennes obtenues pour les 3 traitements d'une même série ont été comparées pour chaque prélèvement au moyen des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD. Les moyennes ayant des lettres différentes diffèrent ($p \leq 0.05$) 48

Figure 4-5 Comparaison des concentrations de nickel (moyenne + erreur type) mesurées chez les juvéniles de tête-de-boule exposés au nickel dissous et/ou alimentaire (n=7 sauf pour le jour 8 où n=5 pour les contrôles et n=6 pour le traitement Eau + Proies). Les moyennes obtenues pour les 4 traitements ont été comparées pour chaque prélèvement au moyen des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD. Les moyennes ayant des lettres différentes diffèrent ($p \leq 0.05$) 49

Figure 4-6 Comparaison des concentrations de thallium (moyenne + erreur type) mesurées chez les juvéniles de tête-de-boule exposés au thallium dissous et/ou alimentaire (n=7 sauf pour le jour 8 où n=5 pour les contrôles et n=6 pour le traitement Eau + Proies). Les moyennes obtenues pour les 4 traitements ont été comparées pour chaque prélèvement au moyen des tests de Kruskal-Wallis

- et de Tukey-Kramer HSD. Les moyennes ayant des lettres différentes diffèrent ($p \leq 0.05$) 50
- Figure 4-7 Concentrations de nouveau métal mesurées chez les juvéniles de tête-de-boule. En A, résultats pour le nickel (moyennes, $n=7$). En B, résultats pour le thallium (moyennes, $n=7$ sauf pour le jour 8 où $n=6$ pour le traitement Eau + Proies) 53
- Figure 4-8 Répartition subcellulaire du nickel entre les différentes fractions opérationnelles obtenues par centrifugation différentielle chez des juvéniles de tête-de-boule (moyenne + erreur type; $n=24$ pour les contrôles, $n=20$ pour l'Eau seulement et $n=27$ les traitements Proies seulement et Eau + Proies). Les différences significatives entre les moyennes obtenues pour les 4 traitements, comparées pour chaque fraction au moyen des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD sont identifiées par des lettres différentes ($p \leq 0.05$) 56
- Figure 4-9 Répartition subcellulaire du thallium entre les différentes fractions opérationnelles obtenues par centrifugation différentielle chez des juvéniles de tête-de-boule (moyenne + erreur type; $n=27$ pour les traitements contrôle et Eau + Proies et $n=28$ pour les traitements Eau seulement et Proies seulement). Les différences significatives entre les moyennes obtenues pour les 4 traitements, comparées pour chaque fraction au moyen des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD sont identifiées par des lettres différentes ($p \leq 0.05$) 57
- Figure 4-10 Répartition subcellulaire du nickel et du thallium entre les différentes fractions opérationnelles obtenues par centrifugation différentielle chez des juvéniles de tête-de-boule exposés aux métaux par différents types de proies (moyenne + erreur type; $n=6-7$). Mito = mitochondries. Les différences significatives entre les moyennes obtenues pour les 4 traitements, comparées pour chaque

- fraction au moyen des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD sont identifiées par des lettres différentes ($p \leq 0.05$) 59
- Figure 4-11 Temps à l'éclosion moyen (+ erreur type; n=10) d'embryons de tête-de-boule exposés au nickel ou au thallium Les moyennes des 3 traitements d'un métal donné ont été comparées à l'aide des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD. Les différences significatives sont identifiées par des lettres différentes ($p \leq 0.05$) 60
- Figure 4-12 Taux métabolique de routine mesuré pour des groupes de 5 larves (moyenne + erreur type). Pour le Ni-Série 1, n=7 pour les contrôles, n=8 pour les traitements Eau [faible] et n=5 pour le traitement Eau [élevée]. Pour le Ni-Série 2, n=8 pour le traitement Proies seulement, n=11 pour Eau [faible] + Proies et n=7 pour Eau [élevée] + Proies. Pour le Tl-Série 1, n=8 pour les contrôles, n=3 pour le traitement Eau [faible] et n=6 pour le traitement Eau [élevée], tandis que pour le Tl-Série 2, n=10 pour les traitements Proies seulement et Eau [élevée] + Proies et n=9 pour le traitement Eau [faible] + Proies. Les moyennes des 6 traitements d'un métal donné ont été comparées à l'aide des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD ($p \leq 0.05$; ces tests n'ont révélé aucune différence statistique entre les moyennes) 61
- Figure 4-13 Activités enzymatiques mesurées chez des juvéniles de tête-de-boule nourris avec des proies (*Tubifex tubifex* ou *Daphnia magna*) non contaminées (contrôles) ou contaminées (nickel ou thallium) (moyenne + erreur type; n=6-7). Les moyennes des 6 groupes (2 proies x 3 traitements) ont été comparées à l'aide des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD ($p \leq 0.05$) 63
- Figure 5-1 Relation entre l'efficacité d'assimilation du nickel (en bleu) et du thallium (en vert) chez les juvéniles de tête-de-boule et la proportion de nickel et de thallium théoriquement biodisponible chez deux types de proies (*Tubifex tubifex* et *Daphnia magna*) (valeurs moyennes; n=6-7). La ligne pointillée

illustre une relation 1 :1 entre l'efficacité d'assimilation et la proportion de métal potentiellement biodisponible. 73

Figure 5-2 Relation entre l'efficacité d'assimilation du thallium chez les juvéniles de tête-de-boule et la concentration totale de thallium mesurée chez les proies (*Tubifex tubifex* ou *Daphnia magna*) 74

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Concentrations de thallium (ng L^{-1}) mesurées dans différents écosystèmes canadiens. Adapté de Cheam (2001)	6
Tableau 4-1 : Efficacité d'assimilation (%) du nickel et du thallium chez des juvéniles de tête-de-boule nourris avec des proies différentes (moyenne \pm erreur type; $n=6-7$). Les moyennes pour un métal donné ont été comparées à l'aide du test de t ($p \leq 0.05$).	54

Liste des abréviations

ABS	<i>Aquatic Bio Systems</i>
BDM	Métaux biologiquement détoxiqués (<i>biologically detoxified metals</i>)
CCO	Cytochrome C oxydase
COD	Carbone organique dissous
EA	Efficacité d'assimilation
ERE	Évaluation du risque environnemental
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S transférase
HDP	Protéines dénaturées à la chaleur (<i>heat-denatured proteins</i>)
HSD	<i>Honestly Significant Difference</i>
HSP	Protéines stables à la chaleur (<i>heat-stable proteins</i>)
LDH	Lactate deshydrogénase
MITHE-SN	<i>Metals In The Human Environment Strategic Network</i>
Mito	Mitochondries
MSF	Fractions sensibles aux métaux (<i>metal sensitive fractions</i>)
MT	Métallothionéine
NDPK	Nucléoside diphosphate kinase
TAM	Métaux disponibles pour le transfert trophique (<i>trophically available metal</i>)
TMR	Taux métabolique de routine



PARTIE I

Synthèse



1 Introduction

Bien que la conscience environnementale dans les pays industrialisés ait grandi rapidement dans les années 70, principalement suite à des exemples visibles d'effets néfastes sur les écosystèmes, la gestion du risque associé aux substances toxiques demeure un défi perpétuel (Luoma et Rainbow, 2008). Le besoin d'évaluer les effets des activités humaines sur les écosystèmes et d'intégrer ces informations écologiques dans les processus de réglementation a donné naissance, dans les années 80, à un nouveau domaine : l'évaluation du risque environnemental (ERE) (Campbell et al., 2006). L'ERE est un processus évaluant les effets pernicious potentiels résultant d'une exposition à des contaminants ou autres agents stressants et qui peut se résumer en trois étapes clés : (1) identification du problème ou danger, (2) caractérisation de l'exposition et des effets et (3) caractérisation du risque (Chapman et Wang, 2000). La contamination métallique représente actuellement un problème très complexe et bien que notre compréhension de la science des métaux croisse rapidement, plusieurs aspects du comportement des métaux ne sont pas entièrement connus (Luoma et Rainbow, 2008).

1.1 Métaux d'intérêt de cette étude

Les métaux ciblés par cette étude sont le nickel (Ni) et le thallium (Tl). Ces deux métaux revêtent une importance environnementale car ils sont considérés très toxiques et relativement accessibles (Campbell et Couillard, 2004) et qu'ils peuvent être accumulés par divers organismes aquatiques (Borgmann et al., 1998, 2001; Ralph et Twiss, 2002).

Le Ni est le cinquième élément le plus abondant en poids après le fer, l'oxygène, le magnésium et le silicium et est le 24^e élément le plus abondant dans la croûte terrestre (WHO, 1991). Il est présent de façon naturelle dans les roches ignées ainsi que dans les combustibles fossiles (CNRC, 1982; WHO, 1991). Ce métal est utilisé dans plusieurs secteurs industriels incluant la production d'alliages et la fabrication de piles (CNRC, 1982).

Le Tl est présent à de faibles concentrations universellement dans la nature, mais particulièrement dans les minerais sulfureux de différents métaux (WHO, 1996). Autrefois, le Tl était largement utilisé comme rodenticide et comme insecticide, pratiques qui ont toutefois été bannies en Amérique du nord en raison de la toxicité non-sélective de ce métal (Nriagu et al., 1998). De nos jours, le Tl est utilisé en petite quantité par les industries de haute technologie pour la confection de semi-conducteurs, de verre optique, de cellules photoélectriques, dans certains alliages et en imagerie cardiaque (Ralph et Twiss, 2002).

1.2 Sources de métaux pour les écosystèmes aquatiques

De tous les 90 éléments présents naturellement dans la croûte terrestre, la plupart (67) peuvent être considérés comme des métaux (Williams et Fraústo da Silva, 1996). Les métaux sont souvent retrouvés en mélange avec d'autres métaux ainsi qu'avec des composés non métalliques. L'altération naturelle de la roche mère, l'érosion de sols riches en métaux suite à une exploitation forestière intensive ou à un feu de forêt, les volcans et les fentes sous-marines sont les principales sources naturelles de métaux dans l'environnement et les concentrations qui leurs sont associées constituent ce que l'on appelle le « bruit de fond ».

Les métaux sont également des sous-produits issus d'activités industrielles. Ces sources anthropiques peuvent être ponctuelles (effluents miniers ou d'usines de transformation, eaux usées municipales) ou diffuses (poussière de minerai ou émissions atmosphériques de raffineries). Les fonderies peuvent être d'importantes sources atmosphériques d'oxydes de soufre et de particules métallifères, ce qui entraîne une importante acidification et contamination des sols et des eaux de surface sur de vastes superficies (Nriagu et al., 1998; Keller et al., 1999).

Les sources anthropiques de Ni pour les milieux aquatiques comprennent la déposition de particules atmosphériques ainsi que les effluents liquides issus de l'exploitation minière, de fonderies, d'usines de transformation des métaux ainsi que de la combustion de carburants et de l'incinération de déchets (Chau et Kulikovsky-Cordeiro, 1995). De plus, le Ni est considéré comme l'un des contaminants aquatiques les plus importants associés à

l'exploitation de l'uranium au Canada (Golder Associates Ltd., 1996). Au Canada, la région de Sudbury (Ontario) est un des plus importants sites d'exploitation et de transformation de Ni et de cuivre et on y retrouve un gradient de contamination métallique (Pyle et al., 2005). Un exemple de gradient de contamination pour le Ni est présenté à la figure 1-1.

Les rejets des industries minières (directs ou atmosphériques), les briqueteries et les cimenteries représentent des sources anthropiques de Tl dans l'environnement (WHO, 1996). Cependant, la majeure partie du Tl présent dans les milieux naturels provient des émissions atmosphériques des centrales thermiques au charbon sous la forme TlO_2 (WHO, 1996). En raison de l'utilisation grandissante du Tl par différentes industries, il apparaît inévitable que les émissions de Tl dans l'environnement le soient également (Nriagu et al., 1998). Dans les écosystèmes canadiens, les concentrations de Tl varient, les provinces de l'Atlantique démontrant les plus hauts niveaux de contamination (Cheam, 2001). Des concentrations de Tl mesurées dans différentes régions du Canada sont présentées dans le tableau 1-1.

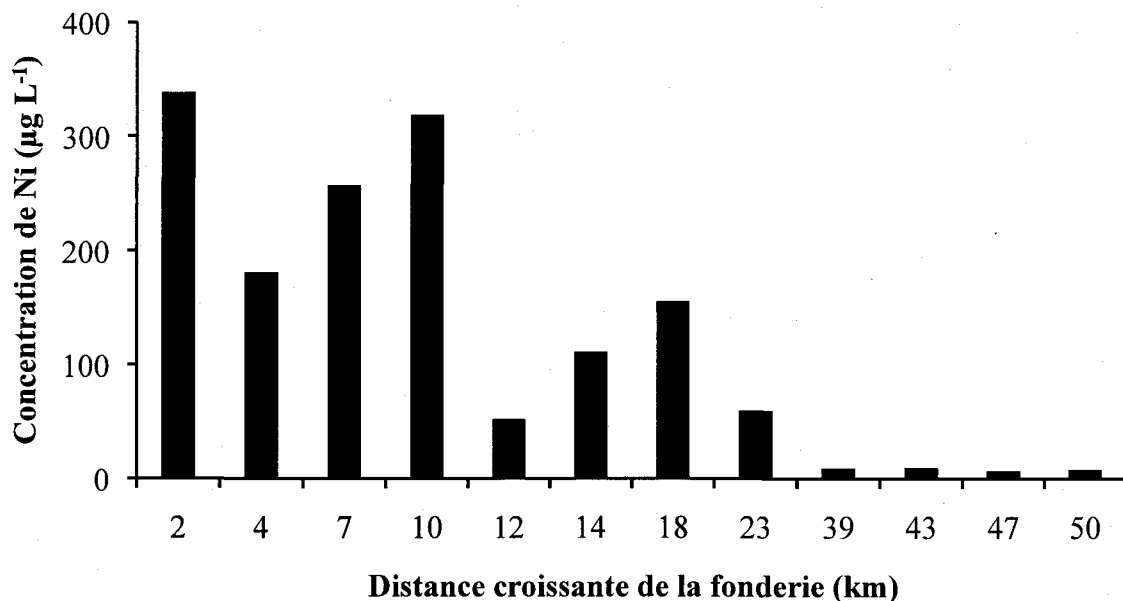


Figure 1-1 : Gradient de contamination en nickel mesuré dans des lacs individuels de la région de Sudbury (Ontario). Données tirées de Pyle et al. (2005).

Tableau 1-1 : Concentrations de thallium (ng L^{-1}) mesurées dans différents écosystèmes canadiens. Adapté de Cheam (2001).

	Neige et glace de l'Arctique	Eaux des Grands Lacs	Proximité de mines et centrales thermiques de l'ouest	Proximité de centrales thermiques (Ontario)	Proximité de mines et centrales thermiques de l'est
Étendue	0.0 – 8.4	0.9 – 48.1	0.1 - 1326	1.2 – 75.3	0.2 – 23 605
Moyenne	0.8	10.6	47	37	1376
Écart-type	0.9	7.9	172	47	3796
n	172	286	162	16	57

1.3 Devenir des métaux dans les milieux aquatiques

Les métaux atteignent les milieux aquatiques par ruissellement, par les précipitations ou par des sources ponctuelles directes. La chimie des eaux naturelles influence grandement la spéciation des métaux, laquelle affecte conséquemment le comportement et les risques environnementaux des métaux en solution (Luoma et Rainbow, 2008). Il s'avère primordial de connaître les caractéristiques physico-chimiques des eaux naturelles ainsi que la façon dont elles interagissent avec les métaux afin de pouvoir prédire la biodisponibilité et la toxicité des métaux pour les organismes vivants dans des milieux contaminés.

Il a été largement démontré que la concentration totale d'un métal dans un échantillon d'eau ne nous informe pas adéquatement sur la réactivité de ce métal dans les processus biologiques ou environnementaux (Wittmann, 1979; Campbell et Tessier, 1987; Mota et Correia Dos Santos, 1995). Afin d'y parvenir, il est essentiel de connaître la spéciation d'un métal, c'est-à-dire la distribution des différentes formes sous lesquelles le métal sera retrouvé dans un milieu donné, ce qui nous permet de mieux comprendre la biodisponibilité du métal.

Parmi les paramètres physico-chimiques des eaux naturelles, certains sont davantage influents et contrôlent la spéciation des métaux présents. Ces paramètres clés sont le pH, la température, la force ionique (I), le potentiel d'oxydo-réduction, la concentration en carbone organique dissous (COD), la salinité et la matière particulaire en suspension (Brezonik et al., 1991; Turner, 1995).

Stumm et Bilinski (1972) ont proposé une nomenclature générale de la spéciation des métaux principalement basée sur la taille des particules. Ainsi, parmi les espèces de petite taille, notons l'ion libre hydraté, les complexes et paires d'ions inorganiques et les complexes, chélates et composés organiques. Parmi les espèces de taille plus importante, notons les métaux liés à la matière organique, les colloïdes ainsi que les métaux adsorbés sur des colloïdes inorganiques ou organiques. Finalement, il y a les précipités, les particules minérales et organiques, et même les métaux présents dans le biote (vivant ou non). Une représentation schématique des différentes formes ou espèces est présentée à la figure 1-2. La proportion de métal dissous présent sous forme d'ion hydraté libre varie selon le métal et selon la variété de ligands (inorganiques ou organiques) avec lesquels il forme des complexes, ce qui influence également sa biodisponibilité, sa toxicité ainsi que sa mobilité (Campbell et Tessier, 1987; Mota et Correia Dos Santos, 1995).

Parmi les différents ligands inorganiques disponibles en milieu naturel, notons les dérivés de l'eau (H^+ et OH^-), les chlorures, les carbonates et les sulfates (Mota et Correia dos Santos, 1995). En ce qui concerne les ligands organiques, il peut s'agir de matière organique d'origine biologique ou de polluants organiques. Les composés organiques d'origine biologique proviennent d'une part du lessivage de la matière organique du sol et d'autre part des organismes aquatiques (excrétion ou décomposition) (Turner, 1995). La matière organique est constituée surtout de substances humiques (acide fulvique, acide humique et humine), mais aussi d'acides aminés et de protéines, de peptides et de polypeptides, de mono- et polysaccharides et de lipides (Mota et Correia dos Santos, 1995). Dans les systèmes aquatiques ayant un contenu élevé en matière organique, les substances humiques jouent un rôle dominant dans la distribution finale des métaux (Mota et Correia dos Santos, 1995).

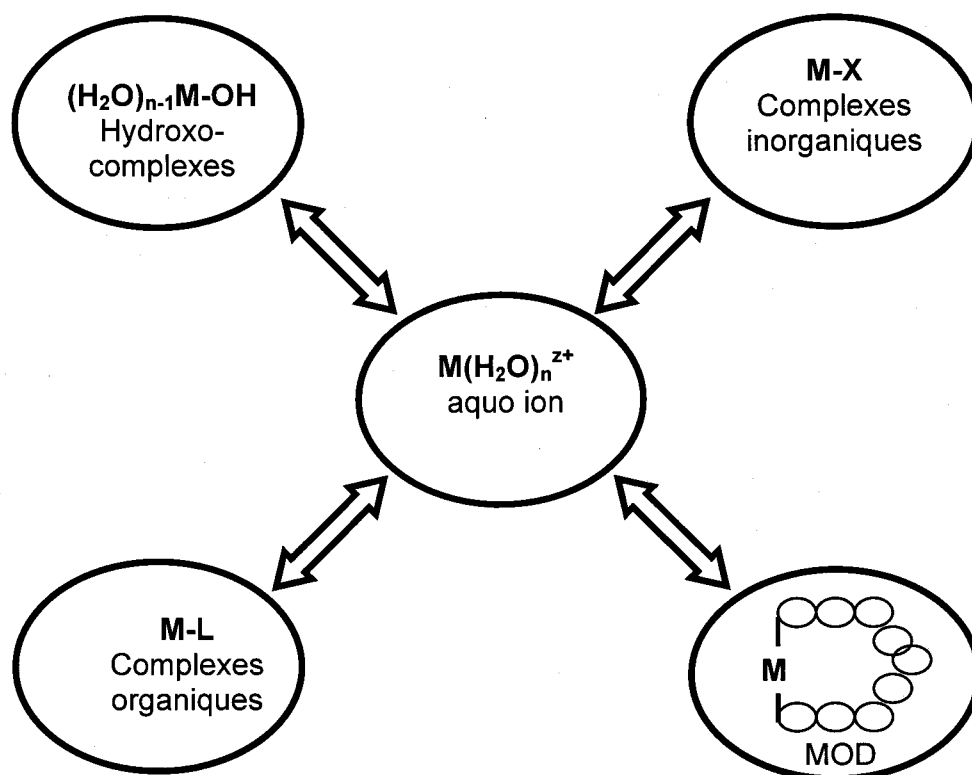


Figure 1-2 : Schéma de la spéciation des métaux. Adapté de Campbell et Couillard (2004).

Considérant que les réactions de complexation dans un milieu donné vont varier selon les métaux d'intérêt, il peut être pratique de pouvoir prédire l'issue et surtout la stabilité de ces réactions. De façon générale, la stabilité augmente avec la charge ionique (z) (loi de Coulomb). Pour une même charge, la stabilité augmente avec une diminution du rayon du cation. Ces deux concepts combinés nous donnent le rapport z^2/r comme indicateur de stabilité d'un complexe donné. Les ions métalliques sont alors séparés en 3 classes définies selon la configuration de l'orbitale extérieure (Brezonik et al., 1991). Il y a, premièrement, les cations de classe A. Ces derniers ont une orbitale extérieure complète, tendent à être ionisés en solution et sont des sphères non polarisables (dures). Ils forment généralement des complexes plutôt faibles par les liaisons électrostatiques et les complexes les plus forts sont formés avec des ligands de charge élevée et de petite taille (Brezonik et al., 1991). Notons par exemple Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , et Al^{3+} . Leurs ligands favoris, en ordre décroissant

d'affinité, sont $O > P > N > S$ (Mason et Jenkins, 1995). Il y a, deuxièmement, les cations de classe B. Ils ont de 10 à 12 électrons dans leur orbitale extérieure et leurs cations sont hautement polarisables (sphères molles). Ils tendent à former des complexes par liaison covalente et leurs affinités de complexation sont l'inverse de celles des métaux de classe A ($S > N > P > O$) (Mason et Jenkins, 1995). Notons parmi les métaux de classe B : Ag^+ , Au^+ , Tl^+ , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Sn^{2+} et Pb^{2+} . Les ions Cd^{2+} et Cu^+ sont des marginaux dans la classe B et sont parfois considérés comme des métaux de transition. Finalement, il y a les cations de transition, qui ont de 1 à 9 électrons dans leur orbitale extérieure et sont sphériquement asymétriques. Leurs ligands préférés sont intermédiaires à ceux des autres classes et leur complexation varie selon le nombre d'électrons dans leur orbitale d et les caractéristiques du milieu. Il existe différents indices servant à classer les métaux de transition. Cependant, de façon générale, les ions suivants en font partie : Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} et Fe^{3+} . En raison de sa configuration et de son affinité pour l'oxygène, le Tl^{3+} , contrairement au Tl^+ , doit être classé parmi les métaux de transition. En résumé, la spéciation des métaux traces est influencée par une variété de ligands, organiques ou inorganiques, qui peuvent former des complexes avec un cation métallique, en plus de tout changement dans l'état d'oxydoréduction du métal (Ralph et Twiss, 2002).

1.3.1 Spéciation du nickel

Le devenir du Ni dans les eaux douces dépend de plusieurs facteurs dont le pH, la force ionique, la concentration en ligands (organiques ou inorganiques) et la présence de particules solides (Snodgras, 1980). Dans les systèmes aquatiques, les espèces inorganiques du Ni sont principalement $NiCO_3$ et Ni^{2+} (Xue et al., 2001). Dans les eaux naturelles où le pH se situe entre 5 et 9, la forme dominante est l'ion divalent Ni^{2+} ($Ni(H_2O)_6^{2+}$) (WHO, 1991). Dans cette gamme de pH, le Ni peut également s'adsorber sur des oxydes de fer ou de manganèse ou former des complexes avec des ligands organiques ou inorganiques (OH^- , SO_4^{2-} , Cl^- or NH_3) (Richter et Theiss, 1980). Les eaux douces polluées par des zones de mines et de raffinage du Ni peuvent contenir en plus de ce dernier, d'autres métaux de transition en plus de ligands forts (naturels ou anthropiques), des substances humiques naturelles et de fortes concentrations en Ca^{2+} et Mg^{2+} (Mandal et al., 2002). Xue et collaborateurs (2001) rapportent

que la cinétique de complexation du Ni est lente en raison de sa configuration électronique et que cette caractéristique influence certainement sa spéciation dans les eaux naturelles ainsi que les interactions entre les ligands et les autres métaux. Il a été expérimentalement démontré que Ca^{2+} et Mg^{2+} (ainsi que Al(III) et Fe(III) dans une moins grande mesure) sont des compétiteurs du Ni^{2+} pour les sites de complexation sur les substances humiques, ce qui résulte en de faibles complexes Ni(II)-hum labiles et libère des ions Ni^{2+} (Mandal et al., 2002). Ainsi, dans les systèmes aquatiques où la [COD] est élevée, ou que la $[\text{Ca}^{2+}]$, la $[\text{Mg}^{2+}]$ ou la $[\text{H}^+]$ sont faibles, on peut s'attendre à ce que la $[\text{Ni}^{2+}]$ libre soit faible, ce qui représenterait une faible biodisponibilité et toxicité pour les organismes. Cependant, dans les lacs où le rapport $[\text{Ni}^{2+}]/[\text{COD}]$ est élevé, la $[\text{Ni}^{2+}]$ sera également élevée, résultat d'une saturation des sites de liaison du COD, le métal restant formant des aquo-complexes (Guthrie et al., 2005).

1.3.2 Spéciation du thallium

Peu de choses sont connues à ce jour au sujet de la chimie du Tl dans les environnements aquatiques. Le principal analogue biogéochimique du Tl(I) est le potassium (K) (Zitko, 1975; Flegal et al., 1986; Sager, 1994). Le Tl est retrouvé sous forme monovalente (Tl(I)) ou trivalente (Tl(III)). La forme la plus stable thermodynamiquement est Tl(I) car les électrons de l'orbitale 6s du Tl sont faiblement ionisables tandis que la forme Tl(III) est facilement réduite en Tl(I) (WHO, 1996), bien que Tl(I) soit capable d'oxydation vers la forme Tl(III) (Ralph et Twiss, 2002). La compréhension des cycles du Tl et de sa bioaccumulation dans les systèmes aquatiques doit considérer les transformations d'oxydoréduction car les deux espèces rédox du Tl ont des comportements très différents en solution (Twining et al., 2003). Une importante source de Tl dans l'environnement est la déposition du produit de combustion Tl_2O , forme qui se dissocie dans les masses d'eau et donne la forme stable Tl(I), en dépit de quoi la forme dissoute prédominante est $\text{Tl}(\text{OH})_3$ (Twiss et al., 2004). Le Tl est un métal non volatile qui existe dans l'eau principalement sous la forme Tl(I), mais il peut également se retrouver sous la forme Tl(III) dans les eaux très oxydantes (Callahan et al., 1979), former des complexes en solution avec les halogènes, l'oxygène et les sulfures (Lee, 1971), et précipiter dans les phases solides minérales. Bien que le Tl(I) soit la forme

thermodynamiquement attendue dans les eaux douces naturelles, Lin et Nriagu (1999) ont déterminé que la forme rédox prédominante de Tl dissous dans la colonne d'eau du lac Michigan était le Tl(III) ($68 \pm 6\%$). Twining et collaborateurs (2003) ont démontré que les bactéries planctoniques étaient responsables de l'oxydation de la forme stable Tl(I) en Tl(III) plus abondant, du moins dans les Grands Lacs (Érié et Ontario) et dans un petit étang d'eau douce du campus de l'université Stony Brook. Ils proposent que ce déséquilibre thermodynamique (ratio de 70% de Tl(III) vs 30% de Tl(I)) est stabilisé par des réactions de complexation entre le Tl(III) et des ligands organiques ou inorganiques, mais aussi par la conversion d'une partie du Tl en des formes qui n'échangent pas d'ions (i.e. particules minérales ou diméthylthallium). Selon O'Shea (1972), le Tl(I) n'est pas complexé par les acides humiques; leur présence n'aura donc pas d'effet sur la toxicité de cette forme de Tl. La biodisponibilité du Tl(I) pour les organismes aquatiques serait affectée par la présence d'ions inorganiques compétiteurs mais ne varie pas en présence d'agents organiques complexants (Ralph et Twiss, 2002).

1.4 Biodisponibilité des métaux

Il est reconnu que la concentration totale d'un métal dissous n'est pas un bon indicateur de la biodisponibilité de ce dernier. Tel que mentionné précédemment, les métaux se retrouvent sous plusieurs formes dans les milieux aquatiques, mais ces différentes formes ne vont pas toutes réagir avec les organismes présents dans ces milieux. Par définition, la biodisponibilité correspond à la proportion d'un contaminant présent dans l'environnement sous une ou des formes potentiellement assimilables par un organisme (Hare, 1992).

De façon générale, les ions métalliques complexés avec des macromolécules de matière organique ou des agents synthétiques fortement chélateurs ne sont pas considérés biodisponibles pour les organismes aquatiques, tandis que certains complexes inorganiques le sont (Brezonik et al., 1991). La complexation des métaux traces au COD joue un rôle important dans la solubilisation des métaux ainsi que dans la régulation de leur transport, leur biodisponibilité et leur toxicité dans les systèmes aquatiques (Mandal et al., 2002). Dans les eaux douces de surface, les concentrations d'ions métalliques libres dépendent du ratio

molaire $[M]/[COD]$, de l'affinité de l'ion pour les sites de liaison du COD, mais aussi du pH, de la force ionique, de la température et de la compétition entre les différents métaux présents et le métal d'intérêt (Guthrie et al., 2005).

1.4.1 Prise en charge par l'eau

Ce sont les membranes biologiques qui constituent la barrière entre les métaux présents dans l'environnement et les organismes. Ainsi, la biodisponibilité d'un métal dépendra, d'une part, de la spéciation du métal dans l'environnement et, d'autre part, des interactions entre le métal et les membranes biologiques qui séparent les organismes de leur milieu (Campbell, 1995). De façon générale, l'interaction entre un métal et un organisme aquatique se déroule selon les étapes suivantes : (1) advection ou diffusion du métal du milieu vers la surface biologique, (2) diffusion du métal à travers la couche de protection (p. ex. mucus chez les poissons), (3) adsorption ou complexation de surface du métal avec les sites de liaison de la membrane cellulaire et (4) prise en charge ou « internalisation » du métal (transport transmembranaire) (Campbell, 1995) La réaction du métal (M^{Z+} ou ML) avec la membrane cellulaire forme des complexes de type M-X-cellule où -X-cellule représente le ligand cellulaire présent à la surface de la cellule (Campbell, 1995). L'ensemble de ces processus est représenté à la figure 1-3.

Les membranes biologiques sont formées d'une bicouche de phospholipides bipolaires, avec leurs extrémités hydrophiles orientées vers l'extérieur et leurs chaînes hydrophobes formant l'intérieur de la couche, parsemée de protéines retenues par des interactions hydrophobiques (Simkiss et Taylor, 1995). La composition lipidique influence la structure et la perméabilité des membranes cellulaires tandis que le contenu protéique agit sur leurs fonctions et sur la perméabilité (Simkiss et Taylor, 1995). Le transport de matériel à travers les membranes peut dépendre de leur compétitivité pour former des liaisons avec les différents ligands présents dans les membranes (Simkiss et Taylor, 1995). La pénétration d'un métal à l'intérieur d'une cellule dépend de la route que ce dernier emprunte (liaison avec des protéines ou lipides membranaires, endocytose, perméabilité à travers différents canaux ou processus actifs) et de la forme sous laquelle il est présent (cation, cation hydraté, complexes chargés, complexes

inorganiques non chargés, complexes organométalliques) (Simkiss et Taylor, 1995). Les différentes voies d'entrée des métaux à travers les membranes biologiques sont présentées à la figure 1-4. La composition lipidique de la membrane ainsi que sa fluidité peuvent également influencer le transport des métaux à travers cette dernière (Simkiss et Taylor, 1995). Finalement, la sélectivité des canaux, la compétition entre les métaux et/ou différents cations, le pH et la régulation par la cellule peuvent également influencer le flux des métaux vers l'intérieur des cellules (Simkiss et Taylor, 1995).

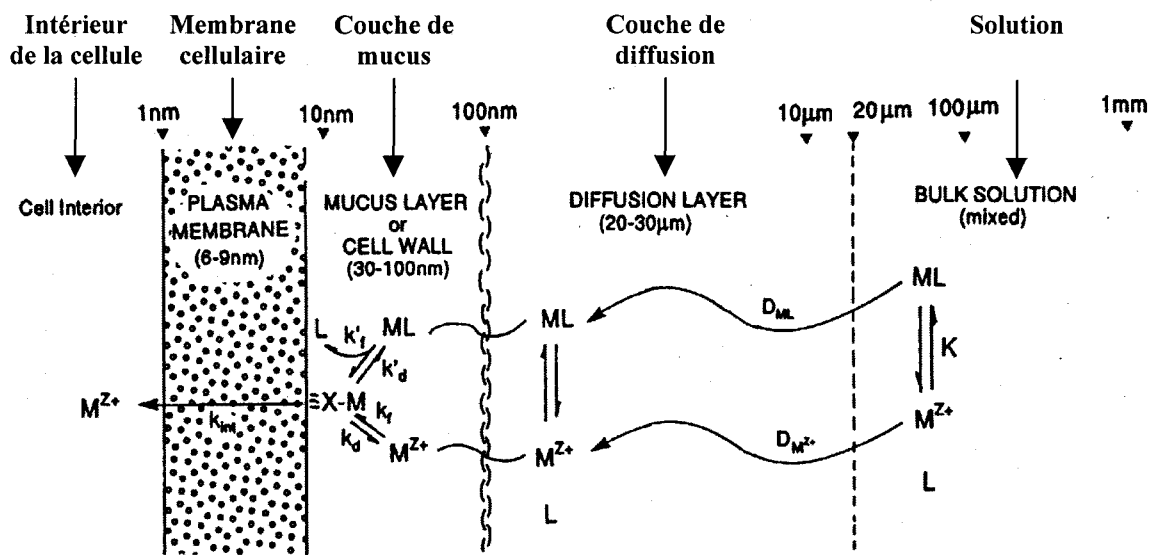


Figure 1-3. Représentation des différentes étapes de l'interaction entre un métal et une membrane biologique. Modifié de Campbell (1995).

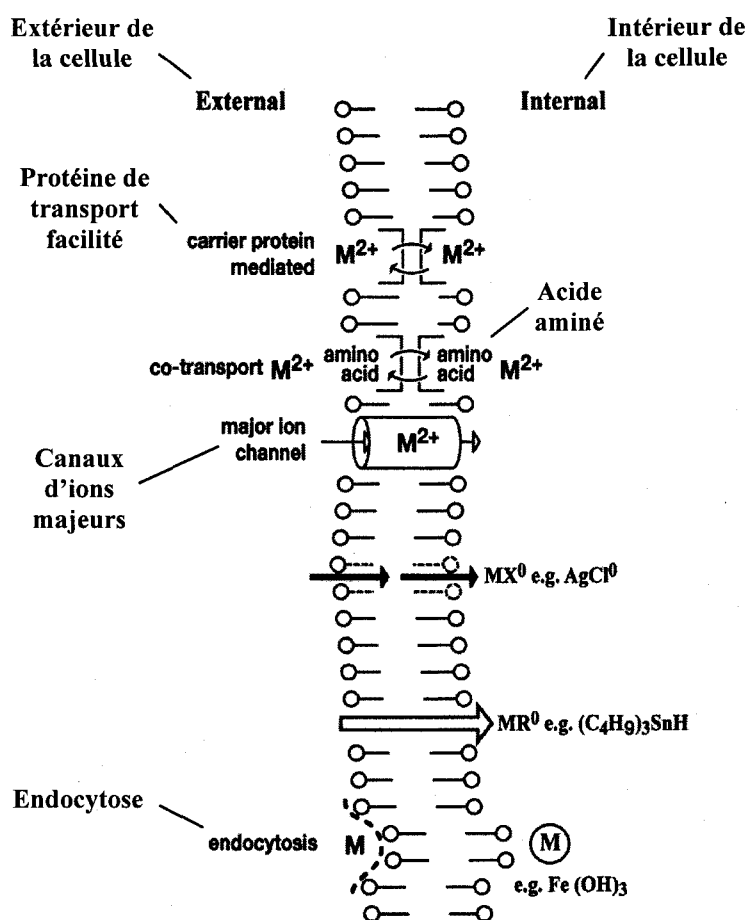


Figure 1-4 : Voies d'entrée potentielles des métaux à travers les membranes biologiques.
Modifié de Luoma et Rainbow (2008).

1.4.2 Prise en charge par la diète

Dès le début des années 90, des études ont démontré que les animaux pouvaient accumuler des quantités substantielles de métaux à partir de leur nourriture, notamment chez des copépodes marins (Reinfelder et Fisher, 1991), chez un bivalve (Luoma et al., 1992) et chez divers invertébrés aquatiques (Wang et Fisher, 1999). Les métaux « ingérés » comprennent les métaux présent dans les proies vivantes ainsi que ceux liés à des particules abiotiques,

mais n'incluent pas les métaux dissous contenus dans l'eau ingurgitée par les poissons et/ou filtrée par les bivalves (Campbell et al., 2005a). En effet, une certaine quantité des métaux accumulés par les organismes des premiers maillons des chaînes alimentaires aquatiques peut être « transférée » aux organismes des maillons supérieurs. La quantité de métal qui sera ainsi transférée dépend, d'une part, de la répartition subcellulaire du métal chez la proie et, d'autre part, de la physiologie digestive du prédateur. Nous reviendrons sur la répartition subcellulaire des métaux à la section 1.5.2.

Il est possible d'estimer la quantité de métal alimentaire à laquelle des poissons sont exposés en mesurant la concentration de métal dans les contenus stomacaux ou intestinaux de ces derniers. Ainsi, pour le gradient de contamination en Ni dissous de la région de Sudbury présenté à la figure 1-1, il est possible d'établir un gradient de contamination en Ni alimentaire (figure 1-5).

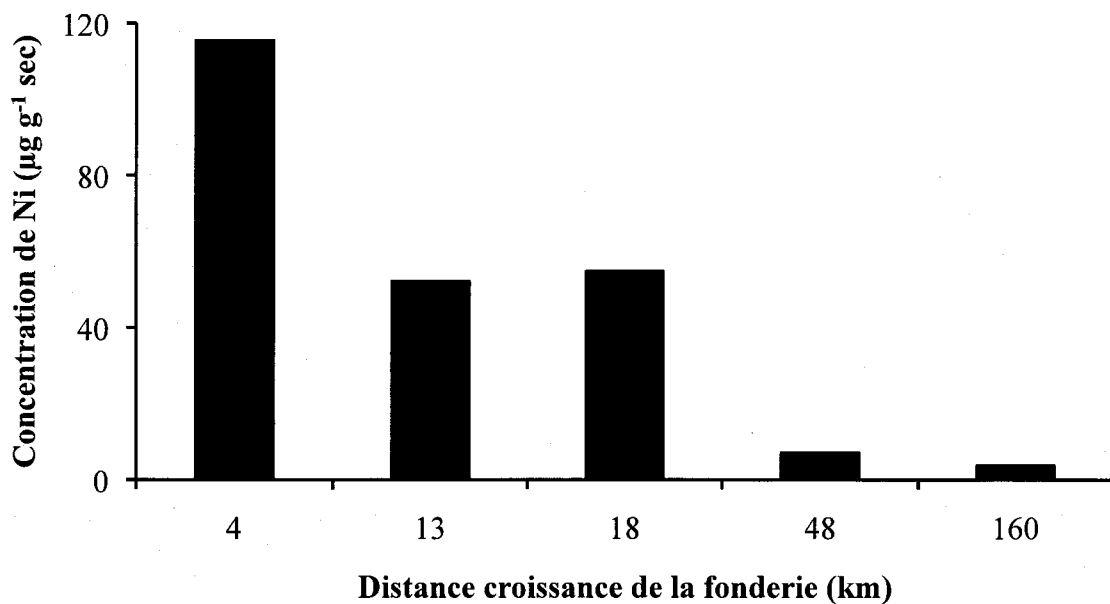


Figure 1-5. Concentrations moyennes de nickel mesurées dans les contenus stomacaux de perchaudes (*Perca flavescens*) de tous les groupes d'âges disponibles récoltées dans la région de Sudbury (Ontario). (P. Couture, données non publiées).

Afin d'évaluer la toxicité potentielle des métaux alimentaires pour les organismes qui les ingèrent, il est primordial de s'attarder à ce qui advient lorsqu'ils atteignent le tractus gastro-intestinal. Le lumen peut être considéré comme un analogue de l'environnement extérieur dans un contexte de prise en charge par la phase dissoute. L'internalisation des métaux d'origine alimentaire s'effectue par le passage des métaux à travers la paroi intestinale (Campbell et al., 2005a). Généralement inoffensifs sous leurs formes particulières, la solubilisation chimique que constitue la digestion peut rendre les métaux ingérés dommageables pour le tractus intestinal ou pour les tissus où ils seront acheminés (Campbell et al., 2005a). En plus de la solubilisation par hydrolyse, la dégradation de la nourriture (ainsi que la biodisponibilité des métaux liés à la nourriture) dépend également de la nature du matériel ingéré, des conditions chimiques du tractus (pH, potentiel redox, enzymes) et du temps de passage à travers le tractus (Campbell et al., 2005a).

Le parcours d'un métal ingéré, suite à la solubilisation dans le lumen, peut se résumer en quatre étapes (voir aussi la figure 1-6) : (1) il diffuse à travers une couche non agitée sous forme libre ou complexée, (2) il rencontre ensuite le mucus, formé de polysaccharides chargés négativement et s'y lie avec des protéines afin de migrer vers l'épithélium intestinal, (3) des protéines de transport (chaperons) vont le prendre en charge et le mener soit au compartiment intracellulaire approprié, soit à la surface basale de l'épithélium où (4) des protéines d'export vont le transporter, avec les métaux essentiels et d'autres ions, des cellules épithéliales vers le sang (Campbell et al., 2005a).

Il apparaît nécessaire de déterminer l'importance relative des voies d'exposition (eau vs nourriture) dans l'accumulation des métaux, car la voie d'exposition peut influencer le tissu où les métaux seront accumulés par les organismes (Munger et Hare, 1997; Hook et Fisher, 2001). Donc, si les métaux pris en charge à travers les branchies et l'intestin ne sont pas accumulés dans les mêmes tissus, ils représentent des menaces toxicologiques différentes pour les poissons qui y sont exposés (Reinfelder et al., 1998).

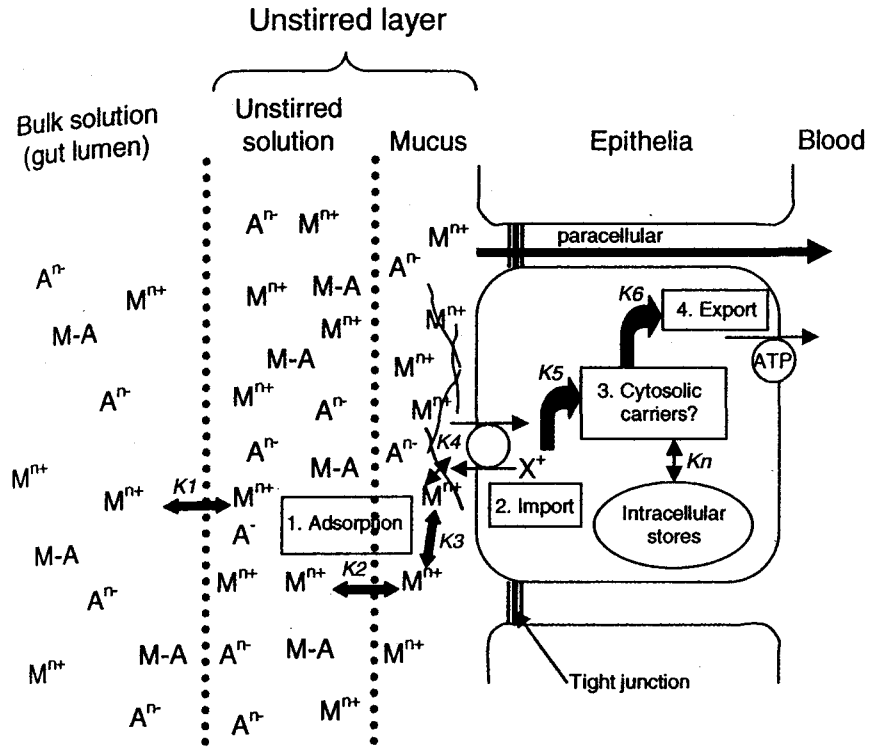


Figure 1-6. Modèle de prise en charge des métaux dans un intestin de vertébré. Tiré de Campbell et al. (2005a). M^{n+} représente l'ion métallique tandis que A^{-} représente les ligands anioniques. Les constantes K_1 à K_6 représentent les constantes d'équilibre des différentes étapes de diffusion. K_n signifie que plus d'un compartiment intracellulaire peut être impliqué dans l'entreposage. Les lignes tracées dans la couche de mucus illustrent les protéines auxquelles l'ion métallique se lie principalement.

1.5 Devenir des métaux dans les cellules

Lorsqu'un métal non essentiel est internalisé, ou qu'un métal essentiel est présent en excès dans les cellules, qu'ils proviennent de la phase aqueuse ou de la nourriture, différents processus sont sollicités dans le but de minimiser les effets néfastes de leur présence.

1.5.1 Mécanismes de détoxification

La détoxification des métaux représente l'ensemble des stratégies, processus et mécanismes, qu'ils soient cellulaires ou physiologiques, visant à prévenir, réduire ou renverser les effets toxiques induits par les métaux (Mason et Jenkins, 1995). Conceptuellement, il existe deux stratégies de détoxification qui peuvent être employées par un organisme afin de contrôler la spéciation intracellulaire d'un métal : (1) la régulation (équilibre entre prise en charge et excrétion et contrôle du fardeau métallique) ainsi que (2) la synthèse de ligands qui lient les métaux et les empêchent de réagir dans les processus cellulaires (Mason et Jenkins, 1995).

La première stratégie disponible afin de réguler l'accumulation de métaux est le contrôle de la prise en charge. À cette fin, les organismes ont développé différents mécanismes : la réduction de la biodisponibilité du métal dans l'environnement en altérant la spéciation chimique de ce dernier, la complexation du métal à la surface de l'animal, la diminution de la perméabilité relative de l'épithélium, la réduction du transport vers la cellule à travers la bicouche lipidique et l'adoption de stratégies d'évitement (comportement) (Mason et Jenkins, 1995).

Une deuxième stratégie de régulation de l'accumulation de métaux adoptée par les organismes est l'élimination. Ils y parviennent à l'aide de pompes à ions dirigées vers l'extérieur de la cellule ou en complexant le métal à des ligands éliminés dans l'urine, les fèces et la bile ou incorporés dans certaines structures corporelles (Mason et Jenkins, 1995). Finalement, certains organismes parviennent à diminuer leur fardeau métallique en éliminant des cellules ayant un contenu élevé en métaux (Mason et Jenkins, 1995).

La synthèse de ligands est la stratégie la plus fréquemment adoptée par les organismes aquatiques eucaryotes (Mason et Jenkins, 1995). Les ligands cellulaires servant de « puits » pour les métaux peuvent être des protéines à haute affinité pour les métaux, des lysosomes ou des concrétions minérales ou organiques. Parmi ces ligands, on retrouve les métallothionéines (MT), les phytochélatines, le glutathion et les granules. Nous allons nous attarder aux MT et aux granules car elles constituent deux des cinq compartiments subcellulaires auxquels nous nous intéresserons à la section 1.5.2.

Les MT sont des métalloprotéines ayant une forte teneur en cystéine, une absence totale d'acides aminés aromatiques, une forte affinité pour les métaux, un faible poids moléculaire (6 - 10 kD), une absence de ponts disulfure, une grande thermostabilité ainsi qu'une résistance aux acides (Roesijadi, 1992; Stillman, 1995). Les MT ont une structure tridimensionnelle, comportent deux domaines globulaires composés de cystéines (S) reliés entre eux par deux lysines et les ions métalliques qu'elles retiennent sont isolés de l'extérieur par la chaîne peptidique (Campbell et Couillard, 2004). De plus, ces protéines peuvent prendre différentes formes et séquestrer des ions métalliques différents simultanément. La synthèse des MT est généralement induite par la présence de métaux et bien qu'elles jouent un rôle dans la régulation des métaux essentiels et dans la protection contre le stress oxydatif, c'est leur implication dans la détoxification des métaux traces qui est d'intérêt dans cette étude. Par exemple, Giguère et collaborateurs (2003) ont observé une augmentation significative de la concentration de MT dans les branchies d'un bivalve aquatique avec une augmentation de la $[Cd^{2+}]$ dans l'eau de surface de lacs d'un gradient de contamination. Campbell et collaborateurs (2005b) ont obtenu des résultats similaires en comparant deux espèces (*Perca flavescens* et *Pyganodon grandis*) provenant de lacs propres et de lacs contaminés. Ainsi, la majorité du Cd accumulé dans le foie de *P. flavescens* et dans la glande digestive de *P. grandis* était retrouvée dans la fraction contenant les MT. Cependant, dans les branchies de *P. grandis*, le Cd était principalement entreposé dans des granules riches en calcium. Chez un même organisme, des stratégies différentes peuvent donc être utilisées selon le tissu. Les concentrations de MT étaient également significativement supérieures dans les reins de touladis et de grands corégones ainsi que dans le foie de grands corégones nourris avec des diètes à forte teneur en Ni (Ptashynski et al., 2001).

Tout comme les MT, les granules sont présentes chez plusieurs organismes, mais tout particulièrement chez les invertébrés. Le terme « granule » est un terme général faisant référence à des inclusions riches en métal contenant un composé minéral inorganique (Mason et Jenkins, 1995). Quatre types de granules ont été définis par Hopkin (1989) pour les invertébrés terrestres (figure 1-7). Il y a tout d'abord les granules de type A. Ces granules sont formées de couches concentriques de calcium et de magnésium et sont situées dans une vacuole liée à la membrane cellulaire (vers le cytosol). Elles sont très dures, insolubles et peuvent accumuler des métaux potentiellement toxiques de classe A ou de transition (i.e. Mn, Zn et Pb). Les granules de type B ont une structure plus hétérogène. Cependant, leur composition demeure constante : des sulfures associés à des métaux de classe B ou de transition (i.e. Cd, Cu, Hg, Zn, Pb et Fe). Ces granules sont insolubles dans l'eau ou dans l'alcool et sont principalement composés de matériel organique. Leur rôle dans la détoxification est plus grand que pour les granules de type A et la présence d'une enzyme lysosomale (acide phosphatase) suppose qu'elles sont formées dans les lysosomes. La fonction principale des granules de type C est probablement l'entreposage du fer à l'intérieur des cellules. Finalement, il y a les granules de type D. Elles sont différentes des autres types de granules par leur grande taille, leur composition en carbonate de calcium et leur localisation extracellulaire. Ces granules seraient impliquées dans le contrôle du pH extracellulaire par la conversion de CO₂ par l'anhydrase carbonique. Les granules peuvent également servir de réservoir de calcium pour la calcification de la coquille ou de la carapace chez des invertébrés (Becker et al., 1974; Silverman et al., 1985).

Lors d'une exposition à court terme aux métaux, les organismes vont induire la synthèse de protéines telles la MT, ce qui constitue un processus de détoxification actif (Vijver et al., 2004). Lors d'une exposition chronique, la séquestration des métaux dans des granules joue également un rôle important dans la protection de l'organisme contre les effets néfastes des métaux (Vijver et al., 2004). Tel que mentionné précédemment, les granules sont une importante stratégie de détoxification dans les branchies de *P. grandis* (Campbell et al., 2005a). Wallace et collaborateurs (1998) ont démontré que des vers ayant développé une résistance au Cd en raison de leur habitat produisent des protéines semblables à la MT ainsi

que des granules afin de séquestrer le Cd tandis que des vers non résistants n'ont produit que des MT.

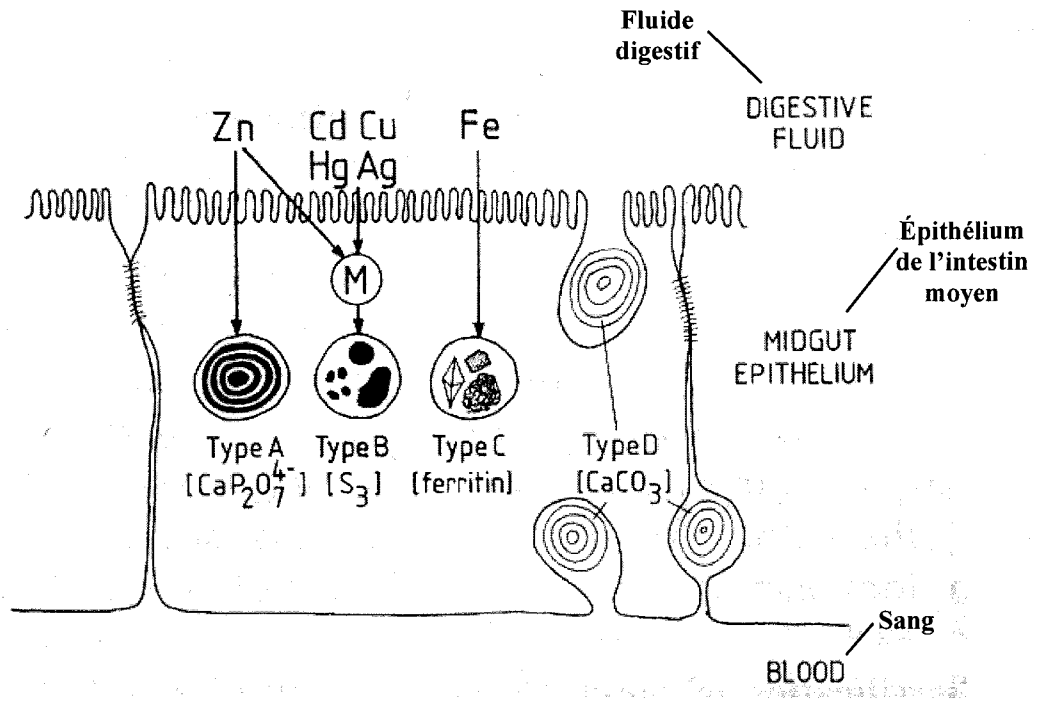


Figure 1-7. Illustration des différents types de granules retrouvées chez les invertébrés. Modifié de Hopkins (1989).

1.5.2 La répartition subcellulaire

Les métaux internalisés dans les cellules sont séquestrés par des ligands. La répartition subcellulaire d'un métal, c'est-à-dire les différentes fractions opérationnelles ou « compartiments » auxquels il sera lié dans la cellule, diffère selon les métaux, la pré-exposition, la tolérance, la voie d'entrée (eau vs proies) et/ou l'espèce (Vijver et al., 2004). Des espèces différentes vivant dans un même environnement peuvent avoir recours à des stratégies différentes. Giguère et collaborateurs (2006) ont démontré que des perchaudes capturées le long d'un gradient de contamination ont accumulé le Cd et le Cu principalement dans la fraction contenant les MT tandis que dans les branchies de bivalves prélevés dans les mêmes lacs, ces métaux ont été retrouvés dans la fraction contenant les granules. Aussi, des truites arc-en-ciel ont accumulé d'importantes quantités de Cd suite à une exposition par la nourriture tandis que suite à une exposition au Cd dissous, des quantités moindres ont été accumulées et ce dans la carcasse plutôt qu'ailleurs (Szebedinszky et al., 2001).

Une façon de déterminer la répartition subcellulaire d'un métal chez un organisme consiste à isoler, par centrifugation différentielle, les différentes fractions pouvant séquestrer des métaux. Un exemple de protocole de centrifugation différentielle est présenté à la figure 1-8. À partir de la répartition subcellulaire des métaux, Wallace et collaborateurs (2003) ont proposé une classification des fractions où se retrouvent les métaux dans les cellules basée sur la sensibilité d'une fraction face au métal séquestré. Ainsi, les fractions où les fonctions biologiques pourraient être affectées par la présence d'un métal (i.e. organelles et enzymes) sont regroupées en un seul compartiment dit « sensible aux métaux » (*metal sensitive fractions* ou **MSF**) (figure 1-9). La détermination de la quantité de métal lié à ces compartiments sensibles d'une cellule pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de toxicité (Wallace et al., 2003). La deuxième classification qualitative des fractions concerne la détoxification des métaux. L'induction de MT ou la précipitation de métaux dans les granules insolubles sont des stratégies reliées à la tolérance ou à la résistance aux métaux (Wallace et al., 1998). En raison de leur rôle important dans la détoxification, les métaux séquestrés dans ces deux fractions sont considérés comme des « métaux

biologiquement détoxiqués » (*biologically detoxified metal* ou **BDM**) (Wallace et al., 2003) (figure 1-9).

Tel que mentionné à la section 1.4.2, la quantité de métal transféré d'une proie à un prédateur dépend de la répartition du métal chez la proie et de la physiologie digestive du prédateur. Ainsi, la séquestration d'un métal à l'intérieur d'une proie vivante peut influencer la biodisponibilité, l'absorption et la toxicité de ce métal chez un prédateur. Par exemple, les métaux liés aux matériaux non digérés sont rapidement incorporés aux fèces et excrétés par le prédateur tandis que les métaux liés à des protéines ou accumulés dans des tissus mous sont plus facilement assimilables et donc biodisponibles (Campbell et al., 2005a).

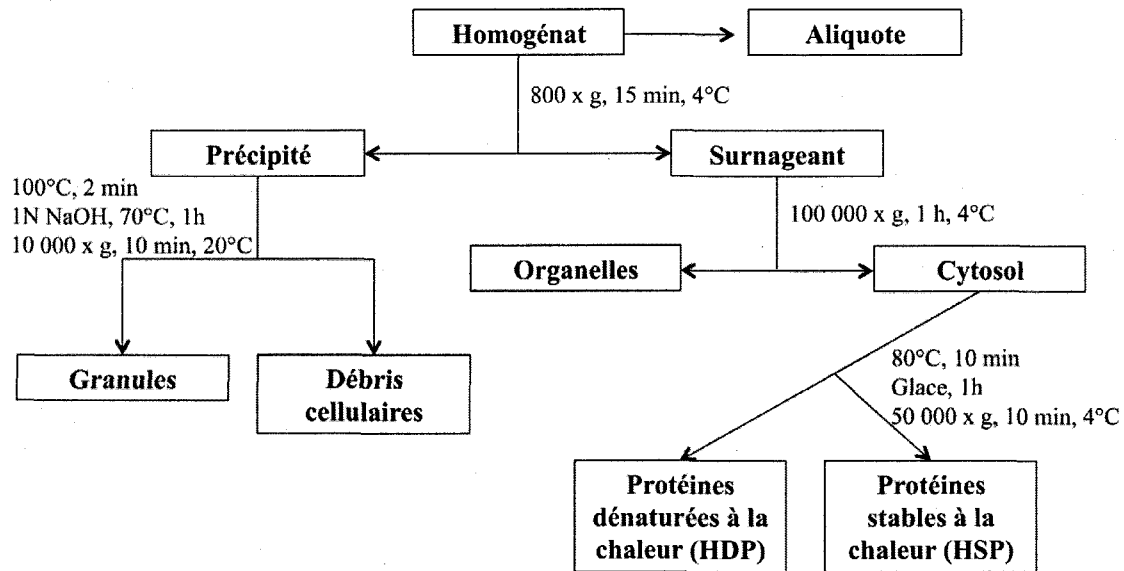


Figure 1-8. Détermination de la répartition subcellulaire d'un métal par centrifugation différentielle. Modifié de Dumas et Hare (2008).

Au niveau subcellulaire, Wallace et Lopez (1996) ont démontré que seuls les métaux liés à la fraction soluble (p.ex. cytosol) chez un oligochète (*Limnodrilus hoffmeisteri*) étaient disponibles pour une crevette (*Palaemonetes pugio*) et que les facteurs qui influencent la répartition subcellulaire des métaux chez cette proie affectent directement le transfert des métaux vers ce prédateur. De plus, Wallace et Lopez (1997) ont démontré que le Cd associé aux protéines cytosoliques (MT et enzymes) chez cet oligochète est absorbé à environ 100% par *P. pugio* tandis que le Cd séquestré dans les granules n'était pas disponible pour le transfert trophique parce que ces granules sont insolubles dans le tractus digestif de *P. pugio* (pH ~5.1) (Wallace et Lopez, 1997; Wallace et al., 1998). Des résultats semblables ont été obtenus lors du transfert du Cd de bivalves vers une espèce de crevette (Wallace et Luoma, 2003) et lors du transfert du Cd et du Zn d'*Artemia franciscana* vers *Palaemonetes pugio* (Seebaugh et Wallace, 2004). Ces résultats suggèrent que les métaux associés aux organelles, aux enzymes et aux MT dans une proie représentent la portion du métal biodisponible pour un prédateur, mais que les métaux associés aux débris cellulaires et aux granules ne sont pas disponibles pour le transfert trophique. L'obtention de résultats comme ceux-ci a mené à la définition d'un nouveau compartiment contenant les « métaux disponibles pour le transfert trophique » (*trophically available metal* ou **TAM**). Il est constitué des organelles, des protéines dénaturées à la chaleur (enzymes) et des protéines stables à la chaleur (incluant les MT). Cette nouvelle fraction, illustrée à la figure 1-9, pourrait fournir des informations importantes sur les facteurs qui contrôlent l'accumulation, la toxicité et le transfert trophique des métaux dans les écosystèmes aquatiques (Wallace et al., 2003).

Parce que les MT font partie de la fraction TAM et que les granules n'y sont pas, la stratégie de détoxification utilisée par une proie pourrait contrôler la biodisponibilité des métaux pour les prédateurs (Wallace et Luoma, 2003). Cependant, Cheung et Wang (2005) ont obtenu des résultats plus mitigés en exposant un gastéropode marin à cinq proies différentes et à trois métaux (Cd, Ag, Zn). Ils ont obtenu des valeurs d'efficacité d'assimilation relativement comparables et élevées (50-90%) chez leur prédateur pour tous les métaux provenant des différentes proies. Une corrélation positive significative a été obtenue entre l'efficacité d'assimilation du Cd et la fraction contenant les MT et entre l'efficacité d'assimilation du Zn et l'ensemble des fractions contenant les organelles, les protéines sensibles à la chaleur et les

protéines stables à la chaleur. Cependant, aucune relation n'a été obtenue pour l'Ag et les différentes fractions subcellulaires. De plus, pour un prédateur exposé de différentes façons à une proie, les efficacités d'assimilation des métaux n'étaient pas corrélées avec la répartition subcellulaire chez ce type de proie. Finalement, pour leurs trois métaux, ils ont obtenu des efficacités d'assimilation variant de 40 à 80% pour les métaux provenant de la fraction insoluble ainsi que pour ceux des granules, ce qui implique que ces métaux étaient biodisponibles pour ce gastéropode.

Chez les poissons, la relation entre l'efficacité d'assimilation d'un métal et sa répartition subcellulaire chez la proie n'est pas aussi probante que celle démontrée chez les invertébrés. Zhang et Wang (2006) n'ont pas observé de relation entre l'efficacité d'assimilation du Cd chez *Terapon jarbua* et sa répartition subcellulaire chez différents types de proies tandis que l'efficacité d'assimilation du Se et du Zn chez ce même poisson était positivement corrélée avec la proportion de métal lié aux fractions cytosoliques (HDP+HSP), sans toutefois atteindre la relation 1 :1 observée chez certains invertébrés. Le taux d'ingestion, le temps de passage dans le tractus, la qualité et la quantité de nourriture ingérée et la physiologie digestive sont des facteurs qui s'ajoutent à la répartition subcellulaire d'un métal chez une proie afin d'expliquer l'efficacité d'assimilation d'un métal chez un poisson.

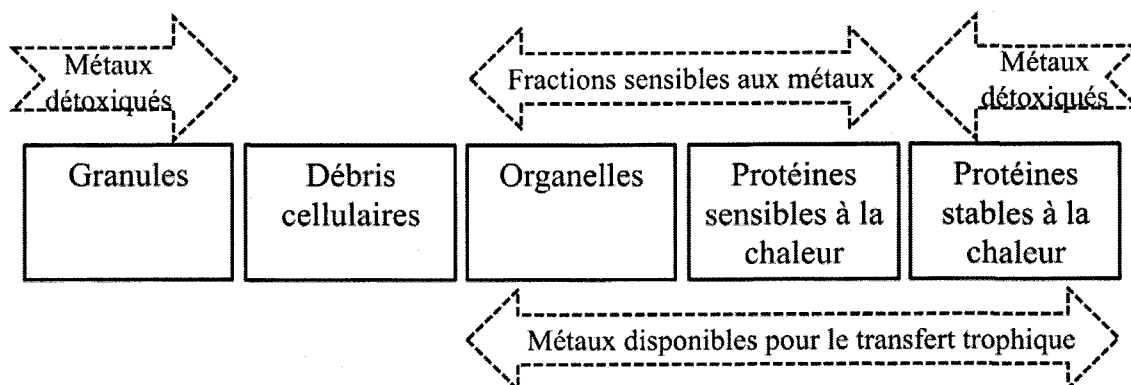


Figure 1-9 Classification des fractions opérationnelles obtenues par centrifugation différentielle. Les fractions sensibles aux métaux et les métaux détoxiqués correspondent respectivement aux compartiments MSF et BDM définis par Wallace et collaborateurs (2003) tandis que les métaux disponibles pour le transfert trophique correspondent au compartiment TAM proposé par Wallace et Luoma (2003). Adapté de Luoma et Rainbow (2008).

1.6 Toxicité

Plusieurs études en toxicologie ont démontré les effets néfastes de métaux essentiels et non essentiels sur des organismes. Ces effets peuvent être sublétaux (p.ex. diminution de la reproduction, diminution de la croissance) ou peuvent entraîner la mort de l'individu. La présente section portera sur les effets toxiques qui sont associés à nos métaux d'intérêt chez divers organismes aquatiques.

1.6.1 Le nickel

Le Ni est un élément essentiel mineur et conséquemment, le biote a développé des mécanismes permettant de maintenir son homéostasie (Phipps et al., 2002). Son essentialité

est généralement acceptée en raison des symptômes causés par une carence en Ni chez les vertébrés terrestres et de son rôle crucial chez plusieurs bactéries et plantes (Muysen et al., 2004). Bien que des démonstrations indirectes émergent (Ptashynski et Klaverkamp, 2002; Muysen et al., 2004; Chowdhury et al., 2008), l'essentialité du Ni chez les organismes aquatiques n'est pas encore établie.

Tous les métaux traces, qu'ils soient essentiels ou non, sont potentiellement toxiques (Luoma et Rainbow, 2008). Les effets d'une exposition au Ni dissous chez différentes espèces d'algues varient en fonction de l'espèce et des conditions expérimentales. Par exemple, à 24° C et à un pH variant de 6,3 à 6,9, la concentration à laquelle on mesure une inhibition de la croissance correspondant à 50% de la valeur contrôle pour 7 jours d'exposition (CE_{50} – 7 jours) est de 0,99 mg Ni L⁻¹ chez *Selenastrum capricornutum* (Chiaudani et Vighi, 1978), tandis que des concentrations de 10 à 30 mg Ni L⁻¹ sont létales pour *Chlorella* sp (Upitis et al., 1980).

Pane et collaborateurs (2003a) ont démontré que la toxicité aiguë et chronique du Ni chez *Daphnia magna* est au moins partiellement due à l'antagonisme du Ni pour le cation Mg²⁺. Ainsi, les [Mg] corporelles et la prise en charge unidirectionnelle de Mg²⁺ diminuent significativement suite à une exposition aiguë ou chronique au Ni. De plus, une étude (chronique) effectuée sur deux générations de *D. magna* a démontré une diminution du poids à 11 jours ainsi qu'une diminution de certains métabolites (glycogène et ATP) chez les individus de la deuxième génération, ce qui suggère une augmentation de la sensibilité au Ni chez les individus issus de parents exposés (Pane et al., 2004a).

Chez le poisson-crapaud (*Opsanus beta*), l'exposition de 72 h au Ni dissous (215 et 606 µM de Ni en eau salée) a eu un effet marqué sur l'équilibre hydrominéral du fluide intestinal (augmentation des niveaux de Na⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, K⁺ et Mg²⁺) (Pane et al., 2006). Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), le Ni agit principalement sur le système respiratoire (Pane et al., 2003b). Une exposition aiguë au Ni (~10 mg L⁻¹) affecte la respiration de truites au repos uniquement par des mécanismes branchiaux (Pane et al., 2004b) tandis qu'une

exposition chronique (243-394 $\mu\text{g L}^{-1}$; 40-99 jours; concentrations dans la gamme de valeurs présentées à la figure 1-1) affecte la physiologie de l'exercice (Pane et al., 2004c).

Le Ni ne semble pas affecter la croissance chez les poissons (Sayer et al., 1991; Pyle, 2000; Pyle et al., 2002a). Une concentration de Ni égale ou supérieure à 380 $\mu\text{g L}^{-1}$ n'altère pas de façon significative la survie, la croissance ou la reproduction chez le tête-de-boule tandis qu'une concentration de Ni de 730 $\mu\text{g L}^{-1}$ diminue significativement le nombre d'œufs produits par ponte ainsi que leur taux d'éclosion (Pickering, 1974). Chez le tête-de-boule, la toxicité du Ni varie selon l'âge, la présence de matière organique naturelle, et certaines caractéristiques de l'eau telles la dureté, l'alcalinité et le pH (Hoang et al., 2004). De plus, Hoang et collaborateurs (2004) ont déterminé que l'âge était le facteur ayant la plus forte influence sur la toxicité du Ni; les jeunes poissons étant beaucoup plus sensibles que les plus vieux. Ces résultats supportent ceux présentés par Pyle et collaborateurs (2002b) qui affirmaient que la toxicité du Ni dissous chez les larves de tête-de-boule diminuait avec une augmentation de la dureté, une augmentation du pH ou, dans une certaine mesure, avec une augmentation de la concentration de particules en suspension. Dans une étude en laboratoire sur la toxicité des effluents de mines d'uranium, Pyle et collaborateurs (2002a) ont observé une éclosion hâtive chez des embryons de tête-de-boule exposés à des eaux contaminées en Ni.

Des différences au niveau de la concentration de métallothionéines (MT) dans les reins et dans le foie, de la concentration de peroxydes de lipides, de la concentration en hémoglobine et de la valeur de l'hématocrite, de la concentration en K^+ , Na^+ et Cl^- et des altérations histologiques ont été observées chez deux espèces de poissons (*Coregonus clupeaformis* et *Salvelinus namaycush*) exposées au Ni d'origine alimentaire (Ptashynski et al., 2001). Dans une seconde étude portant sur la toxicité du Ni d'origine alimentaire chez *C. clupeaformis*, aucun effet significatif n'a été observé au niveau des paramètres hématologiques (concentration de glucose et d'hémoglobine et hématocrite) ou au niveau des organes ou de l'organisme entier (indice hépatosomatique, croissance et indice d'embonpoint) (Ptashynski et al., 2002). Cependant, des altérations histologiques dans les reins, des concentrations

supérieures de MT dans l'intestin et des concentrations de peroxydes de lipides dans le plasma ont été observées à différents degrés.

1.6.2 Le thallium

Selon l'organisation mondiale de la santé (WHO, 1996), le méthylmercure est le seul métal à démontrer une toxicité supérieure à celle du Tl chez l'humain. Cependant, peu de données sont disponibles sur la toxicité du Tl dans les milieux aquatiques. De plus, la plupart des études parues avant 2002 portent sur la toxicité du Tl(I) et ne s'attardent pas au Tl(III). Cependant, les travaux de Ralph et Twiss (2002) sur l'algue *Chlorella* ont démontré que la toxicité du Tl(III) était considérablement supérieure à celle du Tl(I), mais les concentrations de Tl(III) total dissous doivent être de l'ordre de 10^{-6} M pour que la toxicité du Tl(III) se manifeste. Comme il est un analogue de K^+ dans l'ATP_{ase} Na-K, le Tl(I) peut être transporté à travers les membranes cellulaires (Brismar, 1998). La toxicité de Tl(I) est moindre mais cette forme biodisponible représente la majeure partie du Tl(I) total dissous.

La toxicité du Tl(I) chez *Hyalella azteca* est inférieure à celle du Cd et du Hg, mais elle est équivalente à celle du Pb et supérieure à celle du Ni, du Cu ou du Zn lorsque ces amphipodes sont exposés dans l'eau du lac Ontario (Borgmann et al., 1998). Le Tl a des effets chroniques sur la survie, la croissance et la reproduction de *H. azteca* (Borgmann et al., 1998). Bien que l'accumulation de Tl par *H. azteca* soit proportionnelle à la concentration de Tl dans l'eau, l'importance de la concentration en K dans le milieu sur l'accumulation et la toxicité du Tl chez cette espèce font de la concentration corporelle de Tl un meilleur indicateur de sa toxicité que la concentration dans l'environnement (Borgmann et al., 1998).

Chez les poissons, les embryons et les jeunes larves sont les stades les plus sensibles aux effets toxiques de plusieurs polluants (McKim, 1977; Macek et Sleight, 1977). Un aspect supplémentaire de la toxicité du Tl concerne le métabolisme du glutathion (GSH). En effet, il a été démontré, sur des fractions pures et dans des fractions cytosoliques de cerveau de rats, que le Tl^+ , le Tl^{3+} et le $Tl(OH)_3$ affectent négativement le métabolisme du GSH (Hanzel et al., 2005). Le GSH participe à plusieurs réactions physiologiques, telles le maintien de

l'homéostasie des oxydants, la signalisation cellulaire, la détoxification (incluant les métaux par le biais d'une liaison avec un groupement -SH) et finalement, le GSH joue un rôle important dans la défense contre les radicaux libres (revus par Hanzel et al., 2005). La présence de $Tl(OH)_3$ (1-25 μM) a induit une diminution de la concentration en GSH, a inhibé l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) lorsqu'un peroxyde organique est utilisé comme substrat et a inhibé l'activité de la glutathion réductase (GR) (Hanzel et al., 2005).

Le Tl représente une menace pour la santé humaine car il affecte principalement le système nerveux central, causant des troubles de la vision, l'alopecie et même la mort (Xiao et al., 2004). De plus, un empoisonnement au Tl chez l'humain peut causer la myocardopathie, la néphrotoxicité et la neurodégénérescence, des pathologies impliquant un déséquilibre du GSH (Bartfay et Bartfay, 2000; Martin et al., 2000; Bhatia et al., 2003; Kedziora-Kornatowska et al., 2003).

1.7 Choix du tête-de-boule

Le tête-de-boule (*Pimephales promelas*) est un petit cyprin dont la taille moyenne à l'âge adulte atteint 5 cm, qui se nourrit d'insectes aquatiques, de zooplancton, de matières végétales et de détritiques et qui représente une proie importante pour plusieurs prédateurs (Bernatchez et Giroux, 2000). Le tête-de-boule apprécie les eaux chaudes et se retrouve généralement dans de petits ruisseaux à faible courant, des étangs et des petits lacs à fond vaseux (Bernatchez et Giroux, 2000). Sa distribution dans l'est du Canada est présentée à la figure 1-10. Il s'agit d'une espèce très prolifique qui peut tolérer des conditions de température, d'acidité et détérioration de l'habitat qui pourraient être fatales à d'autres espèces (Bernatchez et Giroux, 2000).

Nous avons choisi d'utiliser cette espèce car elle est sensible aux métaux (Hickie et al., 1993), son aire de distribution chevauche des régions contaminées par des métaux, elle est fréquemment utilisée dans des tests de toxicité pour fins de législation et elle est facile à garder et à reproduire en captivité.

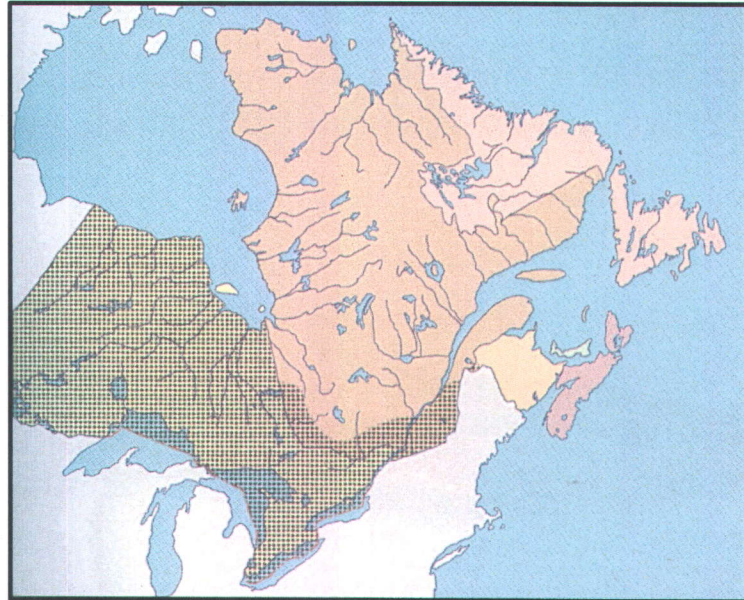
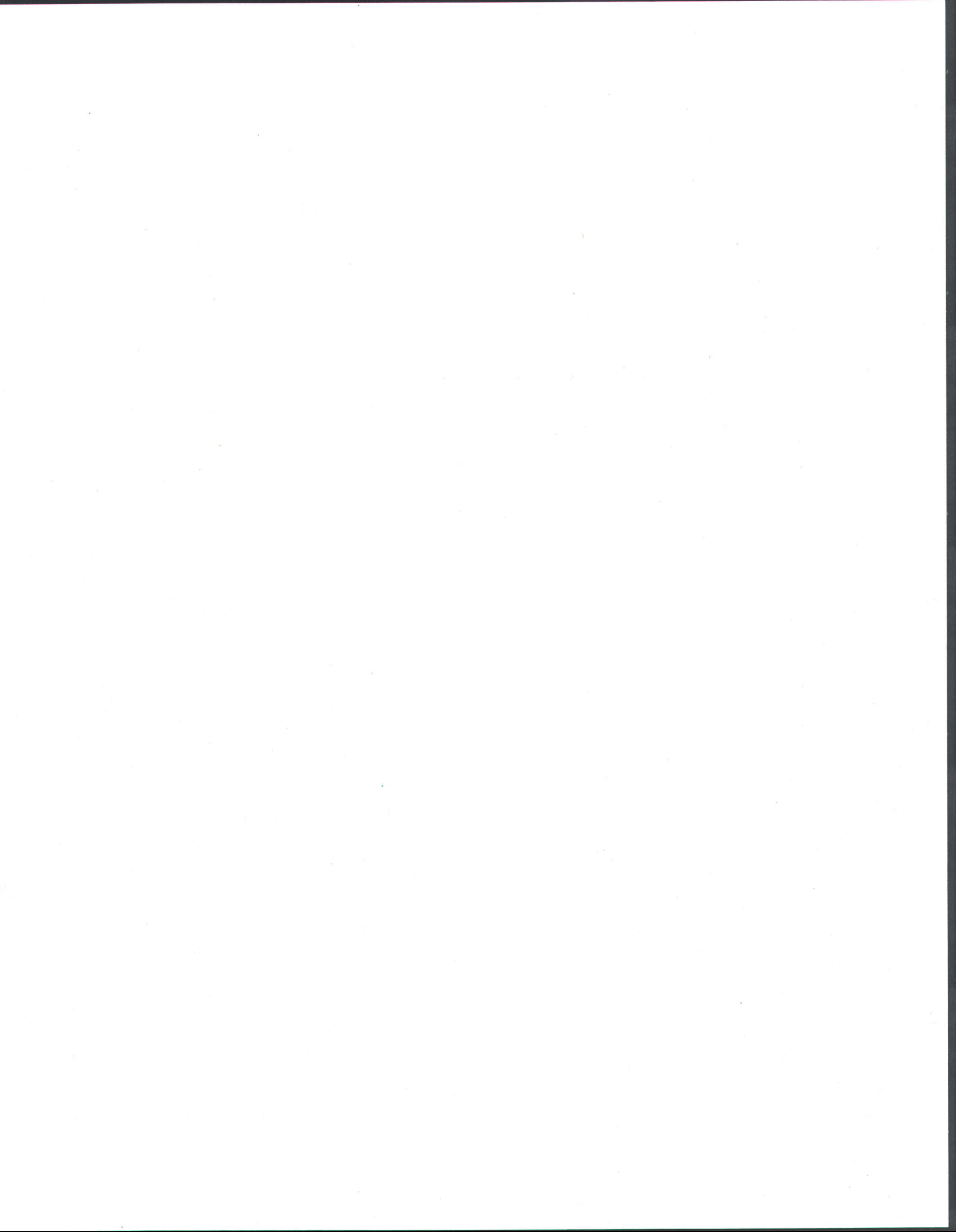


Figure 1-10 Distribution du tête-de-boule dans l'est du Canada. La zone hachurée délimite son aire de répartition (on le retrouve essentiellement en Ontario et dans le sud-ouest du Québec). Tiré de Bernatchez et Giroux (2000).



2 Objectifs et hypothèses de recherche

L'objectif général de cette thèse était d'évaluer l'accumulation, la répartition subcellulaire et les effets de métaux dissous ou alimentaires (Ni et Tl) chez un organisme représentant un maillon supérieur d'une chaîne alimentaire aquatique.

2.1 Importance relative de l'eau et de l'alimentation

Les lignes directrices pour la protection des écosystèmes et des organismes aquatiques sont établies à partir de données obtenues suite à des expositions aux métaux dissous. Cependant, il est désormais établi que les proies consommées peuvent constituer une importante source de métaux (Spry et al., 1988; Reinfelder et Fisher, 1991; Griscom et al., 2002; Clearwater et al., 2002; Hare et al., 2003; Meyer et al., 2005; Zhang et Wang, 2005 et Croisetière et al., 2006). Notre premier objectif spécifique était donc de déterminer l'importance relative de l'eau et des proies dans l'accumulation et la répartition subcellulaire du Ni et du Tl chez différents stades de tête-de-boule en exposant des larves et des juvéniles au Ni et au Tl dissous, alimentaire ou aux deux formes simultanément. À notre connaissance, aucune étude ne s'est encore intéressée à l'importance relative de l'eau et de l'alimentation dans la prise en charge de concentrations environnementalement réalistes de Ni et de Tl chez un poisson.

Notre hypothèse était que les deux voies d'exposition contribueraient au fardeau métallique, sans toutefois prétendre qu'elles seraient complètement additives. De plus, nous avons émis l'hypothèse que la voie d'exposition influencerait la répartition subcellulaire du Ni et du Tl car nous supposons que le site de prise en charge, soit les branchies ou l'intestin, influence les formes de métaux assimilées et conséquemment leur distribution à l'intérieur des cellules.

2.2 Accumulation et effets chez les jeunes stades de vie

Nos deux métaux d'intérêt (Ni et Tl) sont potentiellement toxiques (Campbell et Couillard, 2004) et peuvent être accumulés par différents organismes (Borgmann et al., 1998, 2001; Ralph et Twiss, 2002). De plus, chez les poissons, les jeunes stades de vie démontrent généralement une plus grande sensibilité aux métaux (Macek et Sleight, 1977; McKim, 1977; Hoang et al., 2004). Ainsi, notre deuxième objectif spécifique était d'exposer de jeunes stades de tête-de-boule au Ni et au Tl, par voie aqueuse et/ou alimentaire, afin de mesurer l'accumulation et les effets toxiques de ces deux métaux. Afin d'évaluer la toxicité du Ni et du Tl chez notre espèce modèle, nous avons évalué des paramètres conventionnels, comme le temps à l'éclosion et la survie, ainsi que des paramètres physiologiques, tels le taux métabolique ou l'activité de certaines enzymes.

Puisqu'il est déjà établi que le Ni diminue le temps à l'éclosion chez le tête-de-boule (Pickering, 1974; Pyle et al., 2002a), nous avons émis l'hypothèse que ce métal « stimulerait » d'autres paramètres métaboliques, dont le taux métabolique de routine. Considérant que la forte toxicité du Tl est reconnue et qu'il a été démontré que le Tl a un effet négatif sur les défenses antioxydantes impliquant le glutathion, nous avons également émis l'hypothèse qu'une exposition au Tl se traduirait par une mortalité accrue et une perturbation de l'activité d'enzymes reliées au stress oxydatif.

2.3 Influence du type de proie sur le transfert trophique

Les stratégies de détoxification des métaux varient selon différents facteurs tels l'espèce, le métal et la tolérance (Vijver et al., 2004). De plus, leur impact sur le transfert trophique des métaux n'est pas encore totalement compris. Plusieurs études ont porté sur le transfert de plusieurs éléments au niveau des maillons inférieurs des chaînes alimentaires aquatiques. Cependant, en ce qui concerne le transfert vers les maillons supérieurs, plusieurs questions demeurent. Notre troisième et dernier objectif spécifique fut de déterminer l'importance de la répartition subcellulaire du Ni et du Tl chez deux proies (invertébrés) sur l'efficacité

d'assimilation, la répartition subcellulaire et la toxicité chez un prédateur (tête-de-boule juvénile).

Notre hypothèse était que l'efficacité d'assimilation de ces deux métaux serait proportionnelle à la proportion de métal associé au compartiment TAM (métal potentiellement biodisponible), mais que la relation observée ne sera pas forcément une relation 1 : 1 comme ce fut le cas pour des copépodes marins nourris avec du phytoplancton (Reinfelder et Fisher, 1991) ou pour des crevettes se nourrissant de bivalves (Wallace et Luoma, 2003) ou d'oligochètes (Wallace et al., 1998), en raison des différences de physiologie digestive entre ces organismes et les poissons. De plus, nous avons émis l'hypothèse que la répartition du Ni et du Tl à l'intérieur des proies influencerait la répartition de ces métaux chez notre prédateur et conséquemment leur toxicité.



3 Méthodologie

3.1 Organismes utilisés

Dans le but de constituer un élevage de tête-de-boule, nous avons obtenu des organismes de deux fournisseurs : Mark Brisco, et Aquatic Bio Systems Inc. (ABS). Leurs coordonnées figurent à l'annexe A. Les têtes-de-boule utilisés lors des expériences provenaient soit de notre élevage, soit de chez ABS.

Pour l'hébergement des têtes-de-boule, nous avons utilisé une eau reconstituée à partir d'eau déminéralisée. La constitution de cette eau est présentée à l'annexe B. Les conditions d'hébergement des têtes-de-boule ont été déterminées à partir des lignes directrices présentées dans le rapport SPE 1/RM/22 (1992). Notre protocole d'hébergement, tout comme nos protocoles expérimentaux, ont été approuvés par le comité local de protection des animaux.

Dans un souci de pertinence environnementale, lors des expérimentations, nous avons choisi de nourrir nos poissons avec des proies vivantes (propres ou contaminées). Nous avons donc utilisé différentes espèces de proies. Les nauplii d'*Artemia salina* servant à nourrir les larves de tête-de-boule étaient élevées à partir de cystes provenant de chez Mirdo Importations. Les tête-de-boule juvéniles étaient nourris soit avec des vers, *Tubifex tubifex*, provenant de chez Aquatic Research Organisms, soit avec des crustacés, *Daphnia magna*, provenant de chez ABS ou du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. Les coordonnées de ces fournisseurs figurent également à l'annexe A.

3.2 Exposition des organismes

Les différents milieux d'exposition ont été préparés en ajoutant des sels de métaux à l'eau reconstituée (chapitres 8, 9 et 10). La préparation des proies (propres ou contaminées) est détaillée aux chapitres 8, 9 et 10. Les embryons, les larves et les juvéniles de tête-de-boule

ont été exposés aux différents traitements dans des gobelets en plastique insérés dans un dispositif permettant de contrôler et maintenir la température (figure 3-1). Un tableau décrivant les différents traitements utilisés (concentration de métal, durée d'exposition, etc) est présenté à l'annexe C.

3.3 Mesures d'exposition et d'accumulation métalliques

Durant l'exposition des différents stades de tête-de-boule aux divers traitements, des échantillons d'eau et de proies ont été récoltés afin de quantifier les paramètres d'exposition (chapitres 8, 9 et 10 et annexe C). Des organismes ont également été prélevés, au cours ou à la fin de l'exposition, afin de déterminer l'accumulation de Ni et de Tl (chapitres 8, 9 et 10). La teneur en Ni et en Tl a également été mesurée dans les différentes fractions subcellulaires obtenues suite au protocole de centrifugation différentielle (voir section 3.4).

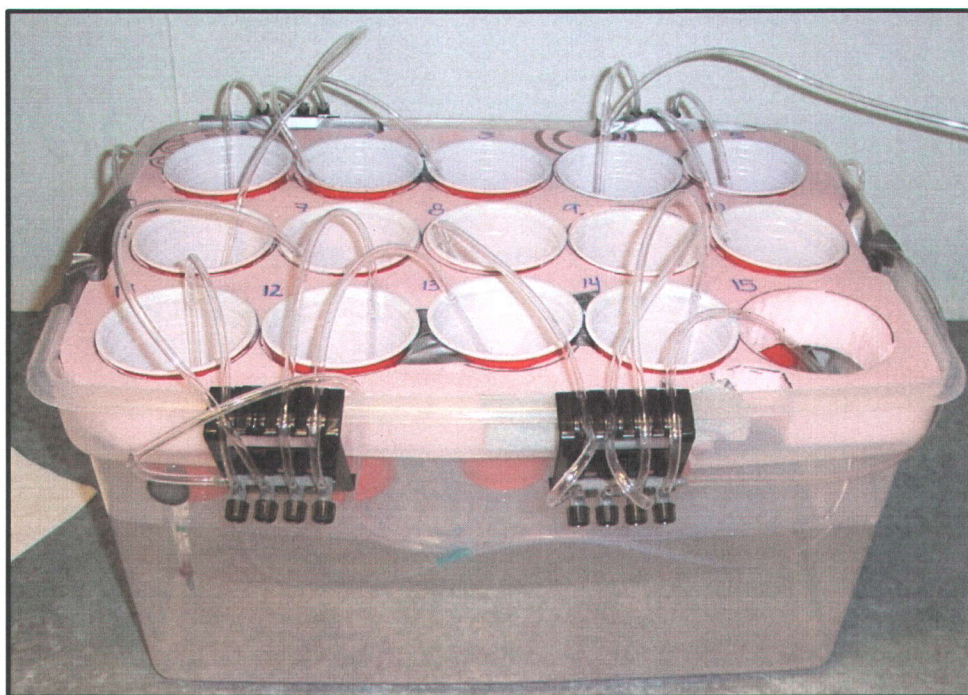


Figure 3-1 : Exemple de dispositif utilisé pour l'exposition des différents stades de vie de tête-de-boule.

Les concentrations de métaux (Ni et Tl) dans les échantillons d'eau acidifiés (1-2.5 % HNO₃) et les surnageants obtenus lors de la centrifugation différentielle (8.5 % HNO₃) ont été mesurées par spectrométrie de masse (ICP-MS, Thermo Elemental, X Series). Des blancs et des échantillons de référence pour le Ni et le Tl ont été inclus dans les analyses.

Les échantillons de proies, de poissons ainsi que les culots obtenus lors de la centrifugation différentielle ont été lyophilisés et pesés avant d'être digérés à température ambiante dans l'acide nitrique concentré et le peroxyde d'hydrogène (HNO₃ de 70 %; ~ 25 µL d'acide par mg de tissu sec et H₂O₂ de 30 %; ~20 µL de peroxyde par mg de tissu sec). Des blancs (HNO₃ et eau MilliQ) et des échantillons de référence certifiés pour le Ni (hépatopancréas de homard, CNRC, TORT-2) ont été inclus dans chaque série de digestions. À notre connaissance, il n'existe pas d'échantillon de référence certifié biologique pour le Tl. Les concentrations de Ni et de Tl ont ensuite été mesurées par spectrométrie de masse (ICP-MS).

3.4 Répartition subcellulaire des métaux

Pour estimer la répartition subcellulaire du Ni et du Tl chez les têtes-de-boule juvéniles entiers (chapitres 8 et 10), nous avons utilisé un protocole de centrifugation différentielle. Les poissons ont d'abord été pesés, coupés en petits morceaux à l'aide d'une lame de rasoir et ensuite homogénéisés dans 9 volumes de tampon sucrose (250 mM) Tris (10 mM) de pH 7.4 en effectuant 5 passages à basse vitesse sur un homogénéisateur motorisé de type Potter-Elvehjem. Les tissus homogénéisés ont ensuite été transférés dans des tubes pour microcentrifugeuse de 1.5 mL pour être centrifugés selon un protocole adapté de celui de Wallace et al. (2003), tel que décrit par Giguère et al. (2006) (chapitres 8 et 10). Cette procédure nous permet d'obtenir six fractions subcellulaires définies de façon opérationnelle : les débris cellulaires, incluant les membranes et les cellules non brisées, les granules (et autres particules résistantes au NaOH), les mitochondries, les autres organelles (microsomes et lysosomes), les protéines dénaturées à la chaleur (HDP), telles que les enzymes et finalement les protéines stables à la chaleur (HSP), telles que la métallothionéine. La détermination de la concentration en métaux de chacune de ces fractions a été décrite à la section 3.3.

3.5 Détermination du taux métabolique de routine

Le taux métabolique de routine correspond au taux métabolique moyen observé chez un poisson à jeun pour lequel le taux métabolique est influencé par une activité aléatoire sous des conditions expérimentales réduisant la capacité de mouvement et limitant les stimuli externes (Fry, 1971). Nous avons mesuré le taux métabolique de routine (TMR) chez les larves (chapitre 9) et certains juvéniles (chapitre 10) de tête-de-boule. Pour les larves, la mesure a été effectuée dans une seringue de 60 mL, tandis que le TMR des juvéniles a été déterminé dans un bécher de 100 mL. Après une période d'acclimatation aux dispositifs de 30 minutes, nous avons inséré une électrode à oxygène (modèle E101; Analytical Sensors Inc., Sugar Land, Texas, USA), deux tubes de type Tygon (R-3603) assurant la circulation de l'eau à l'aide d'une pompe péristaltique (Masterflex LS ; modèle 7519-10; Cole and Parmer Canada Inc., Montréal, QC, Canada) et nous avons finalement scellé le dispositif afin d'éviter les échanges gazeux avec l'air ambiant. La consommation d'oxygène a été suivie pendant 1 à 2 heures à l'aide d'un oxymètre OM 200 (Cameron Instrument Company, Guelph, ON, Canada) et les données étaient directement transférées à un ordinateur (interface Vernier LabPro et logiciel Logger Pro 3.2; Qubit Systems, Kingston, ON, Canada). À la fin de la mesure, les poissons ont été immédiatement sacrifiés, pesés et placés au congélateur (-80 °C) pour les analyses enzymatiques (section 3-6). Nous avons déterminé le TMR à l'aide de l'équation suivante :

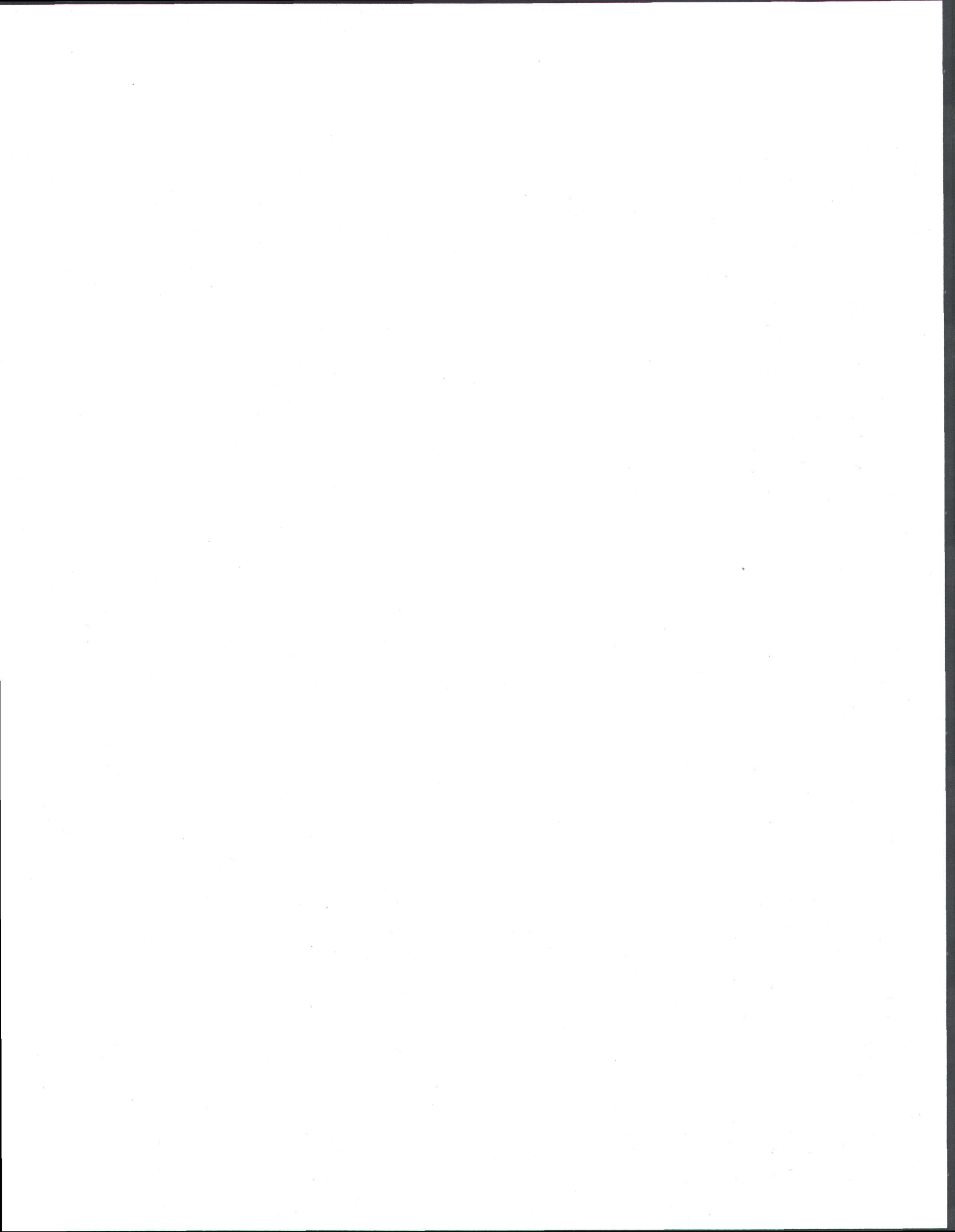
$$\text{TMR (mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \left(\frac{\text{pente} \times \text{volume}}{\text{poids}} \right)$$

où la pente correspond au changement dans la concentration en oxygène en $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, le volume d'eau est exprimé en L et le poids du poissons est exprimé en kg.

3.6 Détermination des activités enzymatiques

Nous avons mesuré l'activité de 3 enzymes chez les larves (chapitre 9) et de 4 enzymes chez certains juvéniles (chapitre 10) de tête-de-boule à l'aide d'un spectrophotomètre (UV/Vis) à température contrôlée (Varian, modèles 100 et 300, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Nous avons choisi la cytochrome C oxydase (CCO), une enzyme mitochondriale (complexe IV de

la chaîne de transport des électrons), à titre d'indicateur des capacités aérobies. Nous avons mesuré la lactate déshydrogénase (LDH), une enzyme glycolytique assurant la conversion réciproque de pyruvate en lactate ainsi que la conversion réciproque de NADH en NAD⁺ qui accompagne cette dernière, à titre d'indicateur des capacités anaérobies. Afin d'estimer les capacités biosynthétiques, nous avons mesuré la nucléoside diphosphate kinase (NDPK), une enzyme catalysant le transfert de groupements phosphates entre différents nucléotides. Finalement, afin d'évaluer la détoxification et le stress oxydatif, nous avons mesuré l'activité de la glutathion S-transférase (GST). Cette enzyme assure la conjugaison de diverses substances intracellulaires (ex : xénobiotiques, peroxydes de lipides) et la complexation de métaux aux groupements sulfhydriles du glutathion réduit.



4 Résultats

Les principaux résultats obtenus dans le cadre de ce projet de doctorat sont présentés dans cette section. Ces résultats, ainsi que des résultats additionnels, figurent dans des articles individuels (chapitres 8 à 10). Les concentrations de Ni et de Tl utilisées sont présentées dans l'annexe C.

4.1 Accumulation de métaux chez différents stades de tête-de-boule

4.1.1 Embryons et larves de moins de 24 heures

Les embryons et les larves dépendant de leurs réserves vitellines (jusqu'à environ 48 h après l'éclosion) ont été exposés aux métaux uniquement par la phase dissoute (chapitre 9). En raison du grand nombre de réplicats nécessaires pour obtenir ces résultats, il n'a pas été possible de réaliser les expositions à tous les traitements en même temps. Nous avons donc utilisé deux lots d'embryons (provenant de la même colonie). Les expositions ont été effectuées en deux séries : les traitements Contrôle, Eau [faible] et Eau [élevée] (série 1) ont précédé les traitements Proies seulement, Eau [faible] + Proies et Eau [élevée] + Proies (série 2). Pour cette raison, il n'a pas été possible de comparer statistiquement les traitements des deux séries entre-eux.

Après 24 ou 48 h d'exposition, seuls les embryons exposés à la concentration de Ni la plus élevée avaient une concentration de Ni significativement supérieure à celle des contrôles (figure 4-1 a et b). Par contre, chez les larves prélevées moins de 24 h après l'éclosion, il n'y avait pas de différence significative entre les concentrations mesurées chez les larves issues des trois différents traitements (figure 4-1 b).

Les concentrations de Tl mesurées chez les embryons de la série 1 (24 h ou 48 h d'exposition) exposés à la concentration la plus élevée étaient significativement supérieures à celles mesurées chez les individus du groupe contrôle (figure 4-2 a) tandis que pour les

embryons (24 h ou 48 h d'exposition) et les larves de moins de 24 h de la série 2, l'exposition à la concentration la plus faible a été suffisante pour obtenir une accumulation de Tl significativement supérieure à celle mesurée chez les poissons non exposés (figure 4-2 b).

4.1.2 Larves de plus de 24 heures

Les larves ont été exposées par les deux voies simultanément à partir de 48 h après l'éclosion (chapitre 9).

Les larves exposées au Ni dissous (concentration faible et élevée) avaient des concentrations supérieures aux contrôles (figure 4-3 a) et les larves exposées au Ni dissous et alimentaire simultanément (concentration faible et élevée) avaient des concentrations supérieures à celles mesurées chez les proies exposées seulement au Ni alimentaire (figure 4-3 b).

À l'instar des larves exposées au Ni dissous, les larves exposées au Tl par la phase aqueuse (contamination faible et élevée) ont accumulé significativement plus de Tl que les contrôles et les concentrations mesurées chez les larves exposées à la concentration la plus élevée étaient significativement supérieures à celles mesurées chez les larves du traitement Eau [faible] (figure 4-4 a). Tout comme pour le Ni, les larves exposées au Tl dissous et alimentaire simultanément (concentration faible et élevée) avaient des concentrations supérieures à celles mesurées chez les proies exposées seulement au Tl alimentaire (figure 4-4 b), mais les larves du traitement Eau [élevée] + Proies avaient des concentrations de Tl supérieures à celles mesurées chez les larves du traitement Eau [faible] + Proies (figure 4-4 b).

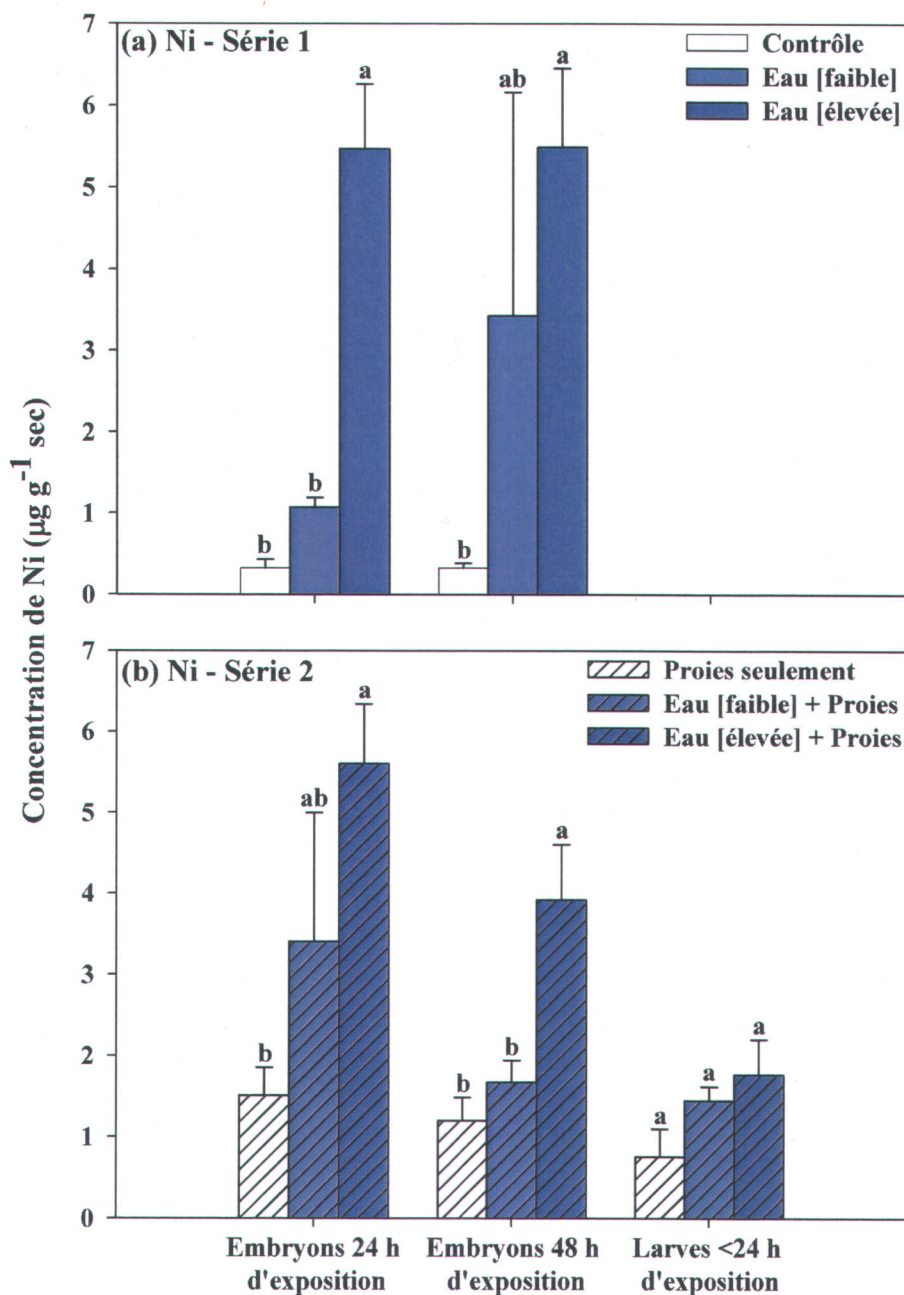


Figure 4-1

Comparaison des concentrations de nickel (moyenne + erreur type) mesurées dans les embryons et larves prélevés durant l'exposition au nickel dissous ($n=5$ réplicats composés de 10 embryons ou larves, sauf pour le groupe contrôle des embryons exposés pendant 24 h où $n=4$) (a). Les moyennes obtenues pour les 3 traitements d'une même série ont été comparées pour chaque prélèvement au moyen des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD. Les moyennes ayant des lettres différentes diffèrent ($p \leq 0.05$).

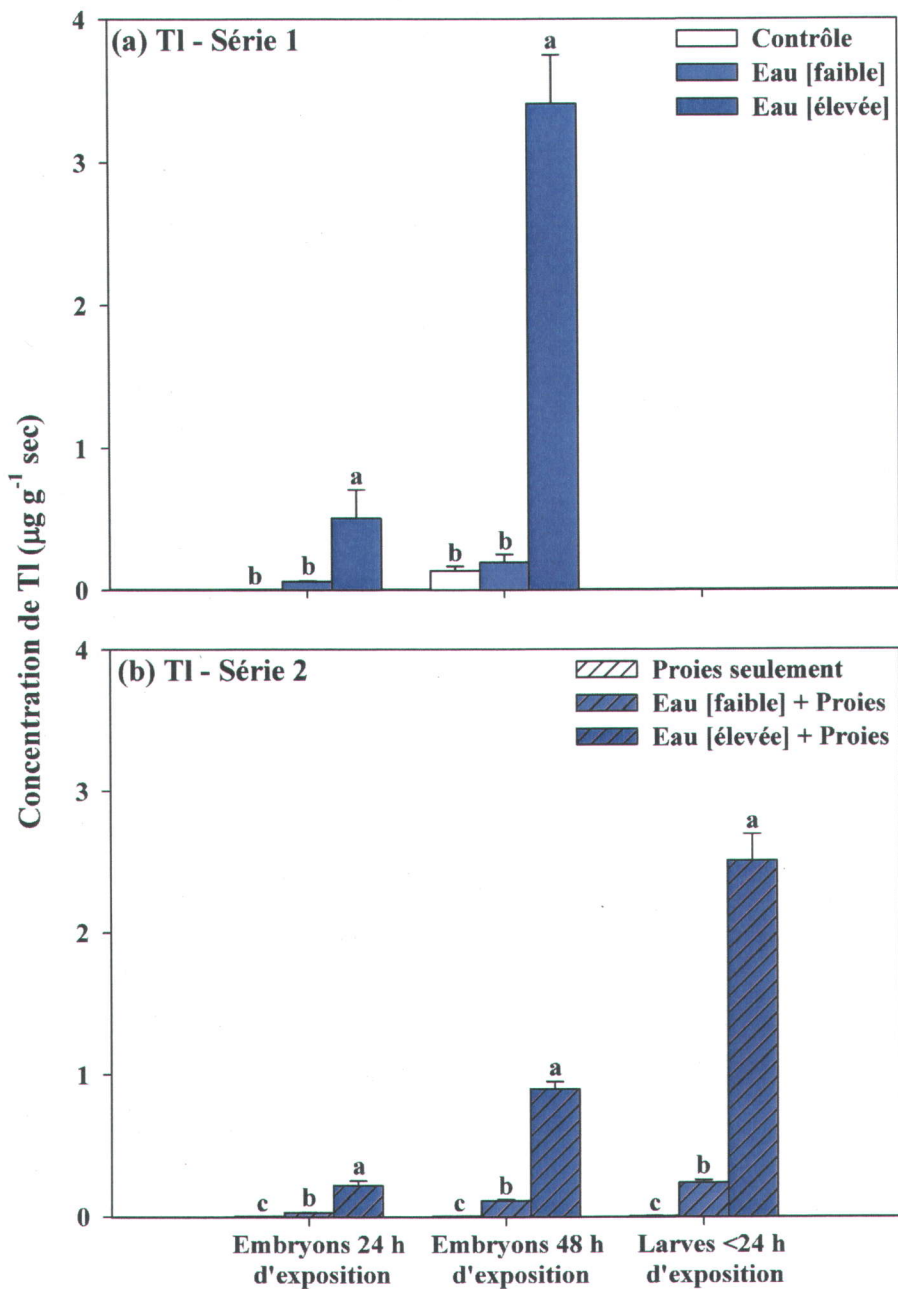


Figure 4-2

Comparaison des concentrations de thallium (moyenne + erreur type) mesurées dans les embryons et larves prélevés durant l'exposition au thallium dissous ($n=5$ réplicats composés de 10 embryons ou larves). Les moyennes obtenues pour les 3 traitements ont été comparées pour chaque prélèvement au moyen des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD. Les moyennes ayant des lettres différentes diffèrent ($p \leq 0.05$).

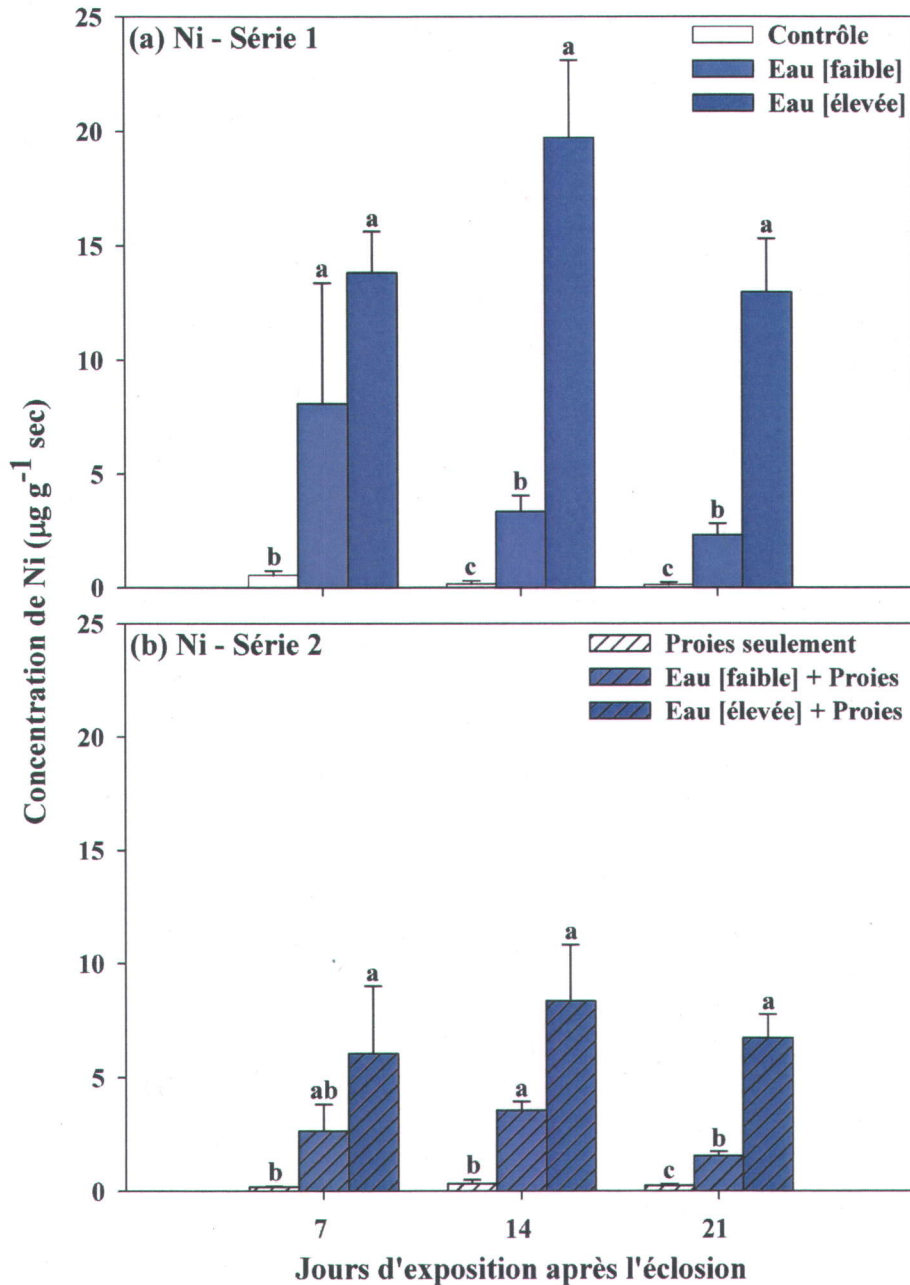


Figure 4-3 Comparaison des concentrations de nickel (moyenne + erreur type) mesurées dans les larves prélevées durant l'exposition au nickel dissous et/ou alimentaire ($n=5$ réplicats composés de 10 larves). Les moyennes obtenues pour les 3 traitements d'une même série ont été comparées pour chaque prélèvement au moyen des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD. Les moyennes ayant des lettres différentes diffèrent ($p \leq 0.05$).

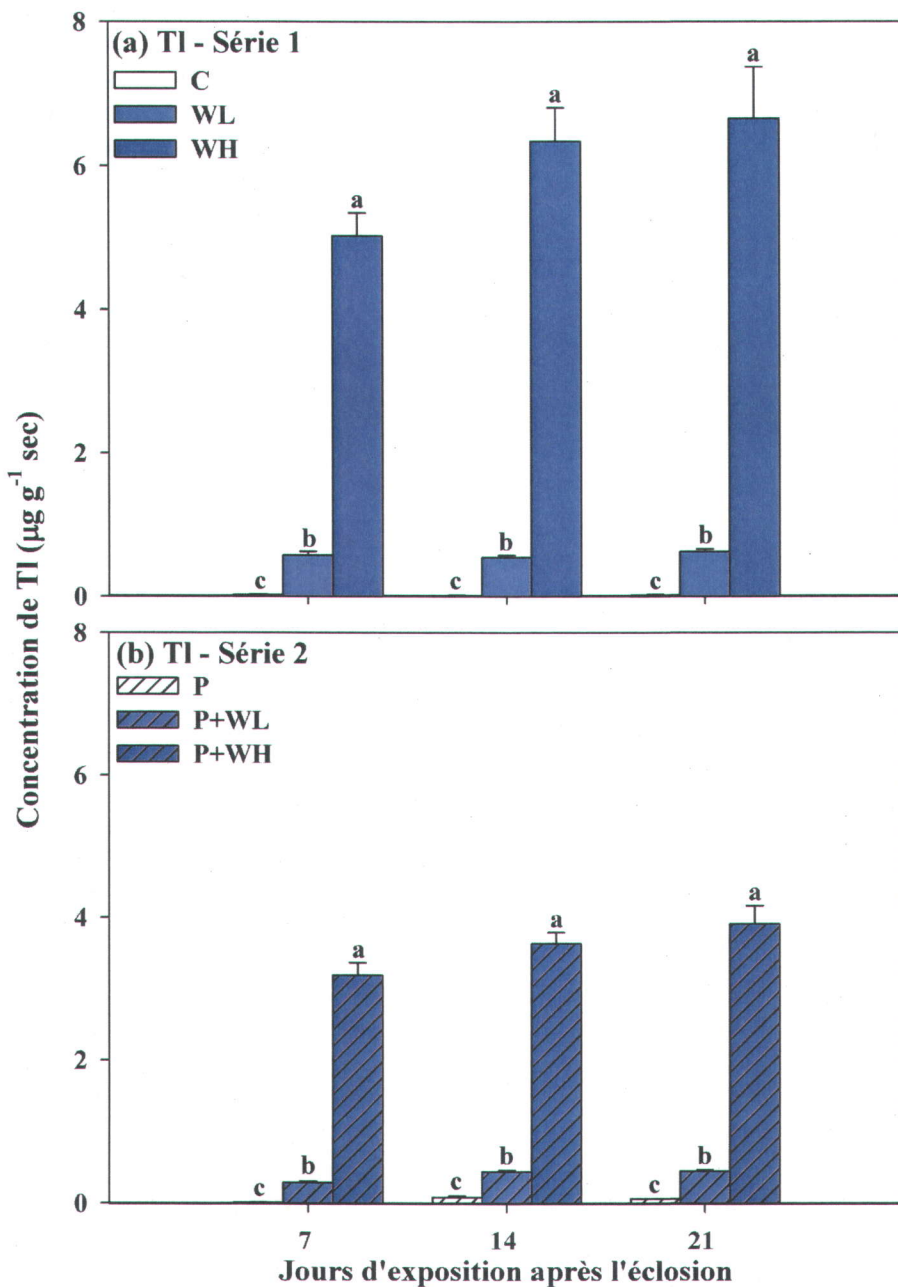


Figure 4-4 Comparaison des concentrations de thallium (moyenne + erreur type) mesurées dans les larves prélevées durant l'exposition au thallium dissous et/ou alimentaire ($n=5$ réplicats composés de 10 larves). Les moyennes obtenues pour les 3 traitements d'une même série ont été comparées pour chaque prélèvement au moyen des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD. Les moyennes ayant des lettres différentes diffèrent ($p \leq 0.05$).

4.1.3 Juvéniles

Des juvéniles âgés de 4 mois ont été exposés aux métaux dissous et/ou alimentaires pendant un maximum de 8 jours (chapitre 8).

Les concentrations de Ni mesurées chez les poissons des traitements Eau seulement, Proies seulement et Eau + Proies étaient significativement supérieures à celles des poissons contrôles, et ce pour tous les temps d'expositions (figure 4-5). Cependant, pour un temps d'exposition donné, nous n'avons pas mesuré de différences significatives entre les concentrations des trois groupes de poissons exposés (à l'exception des traitements Proies seulement et Eau + Proies après 2 jours d'exposition) (figure 4-5).

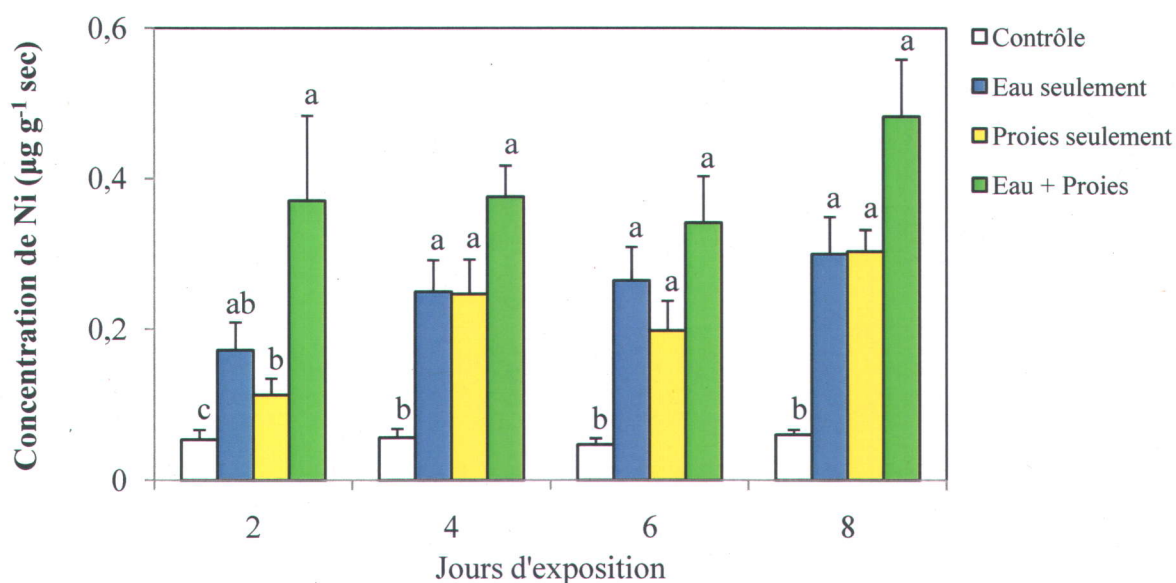


Figure 4-5 Comparaison des concentrations de nickel (moyenne + erreur type) mesurées chez les juvéniles de tête-de-boule exposés au nickel dissous et/ou alimentaire ($n=7$ sauf pour le jour 8 où $n=5$ pour les contrôles et $n=6$ pour le traitement Eau + Proies). Les moyennes obtenues pour les 4 traitements ont été comparées pour chaque prélèvement au moyen des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD. Les moyennes ayant des lettres différentes diffèrent ($p \leq 0.05$).

Pour les juvéniles exposés au Tl, les concentrations obtenues étaient également significativement supérieures à celles des groupes contrôle (figure 4-6). Contrairement aux résultats obtenus pour le Ni, nous avons observé des différences entre les traitements pour un temps donné. Ainsi, après 2 jours d'exposition, les juvéniles de tête-de-boule ont accumulé significativement moins de Tl par les proies que par l'eau ou par l'exposition combinée (eau + proies) (figure 4-6). Après 4 et 6 jours d'exposition, la concentration de Tl était significativement différente entre les 3 traitements d'exposition et augmentait selon l'ordre suivant : Eau seulement < Proies seulement < Eau + Proies (figure 4-6). Finalement, après 8 jours d'exposition, nous n'avons pas mesuré de différences significatives entre les concentrations de Tl pour ces 3 traitements (figure 4-6).

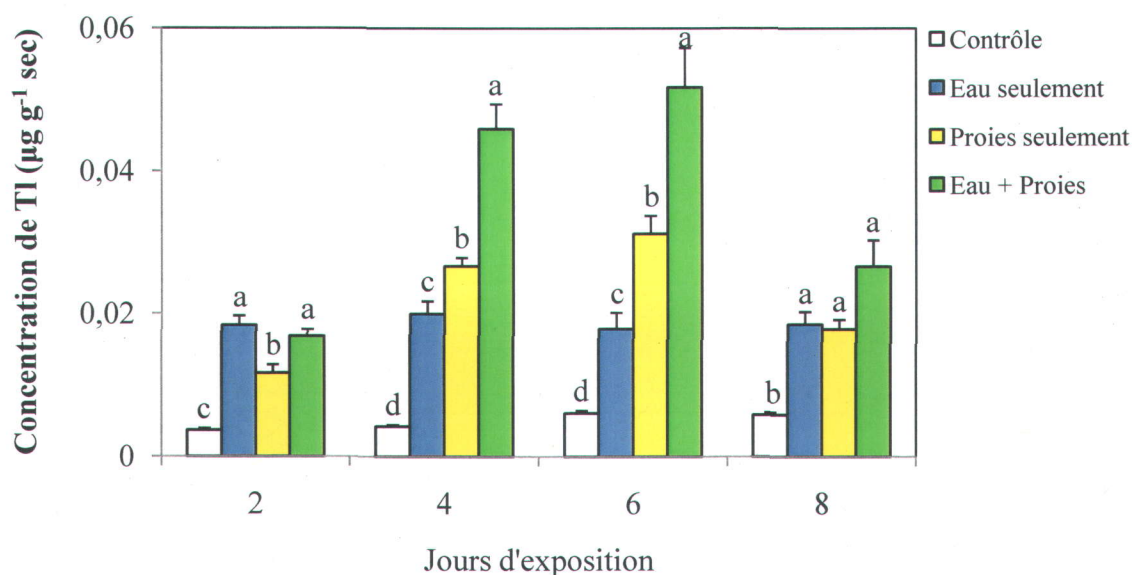


Figure 4-6 Comparaison des concentrations de thallium (moyenne + erreur type) mesurées chez les juvéniles de tête-de-boule exposés au thallium dissous et/ou alimentaire ($n=7$ sauf pour le jour 8 où $n=5$ pour les contrôles et $n=6$ pour le traitement Eau + Proies). Les moyennes obtenues pour les 4 traitements ont été comparées pour chaque prélèvement au moyen des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD. Les moyennes ayant des lettres différentes diffèrent ($p \leq 0.05$).

4.2 Importance relative de l'eau et de la diète dans l'accumulation de métaux

L'absence d'accumulation métallique chez les larves exposées aux métaux par la voie alimentaire présentée aux figures 4-3 (Ni) et 4-4 (Tl) démontre que pour les larves de 21 jours et moins, l'eau a été la seule source de métal (chapitre 9).

Contrairement aux larves, les juvéniles ont accumulé des concentrations significatives de métal par les deux voies d'exposition (figures 4-5 (Ni) et 4-6 (Tl); chapitre 8). La figure 4-7 présente les concentrations de nouveau métal accumulé par chacune des voies d'exposition et les compare aux concentrations de nouveau métal mesurées suite à l'exposition combinée (chapitre 8). Tel que souligné à la section 2, nous avons utilisé des concentrations de Ni dissous et alimentaire environnementalement réalistes ($16.0 \pm 0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ et $10.0 \pm 0.3 \mu\text{g g}^{-1}$ sec, respectivement; annexe C). Notre concentration de Ni dissous est légèrement supérieure à celle mesurée dans un lac de la région de Sudbury où la contamination en Ni est faible (lac Geneva; $4.5 \mu\text{g L}^{-1}$) mais inférieure à celle d'un lac où le niveau de contamination est intermédiaire (lac Crowley; $73.2 \mu\text{g L}^{-1}$) (P. Couture, données non publiées). Considérant que la concentration de Ni dans nos proies se compare davantage à celle mesurée dans les contenus stomacaux de perchaudes prélevées dans le lac Geneva ($7.2 \pm 2.5 - 9.9 \pm 3.3 \mu\text{g g}^{-1}$ sec) comparativement au lac Crowley ($52.2 \pm 7.5 - 156.7 \pm 32.7 \mu\text{g g}^{-1}$ sec) (P. Couture, données non publiées), nous pouvons supposer que les paramètres de notre exposition combinée pourraient être observés simultanément en milieu naturel.

Chez les juvéniles exposés au Ni pendant 2 jours, l'eau semble avoir été une source de Ni plus importante que les proies et les poissons exposés aux 2 sources simultanément semblent avoir accumulé plus de nouveau métal que la somme des 2 voies séparées (figure 4-7A). Par contre, après 4, 6 et 8 jours d'exposition, l'eau et les proies tendent à représenter des sources équivalentes de nouveau Ni et la somme des deux voies séparées semble similaire à la concentration obtenue par l'exposition simultanée (figure 4-7A).

Après 2 jours d'exposition, tout comme pour le Ni, les juvéniles de tête-de-boule ont accumulé plus de nouveau Tl par l'eau que par les proies et la somme des deux voies séparées tend à être plus grande que l'accumulation de nouveau Tl par les deux voies simultanément (figure 4-7B). Tandis que la concentration de nouveau Tl accumulé par l'eau semble être restée constante dans le temps (de 2 à 8 jours), le nouveau Tl provenant des proies seulement était très important après 4 et 6 jours d'exposition et cette fois la somme des voies séparées tend à se comparer à l'exposition combinée (figure 4-7B). Finalement, après 8 jours d'exposition, les poissons semblent avoir accumulé pratiquement autant de nouveau Tl par l'eau que par les proies et la somme de ces concentrations apparaît similaire à la concentration de nouveau Tl mesurée chez les poissons exposés au Tl par l'eau et les proies simultanément (figure 4-7B).

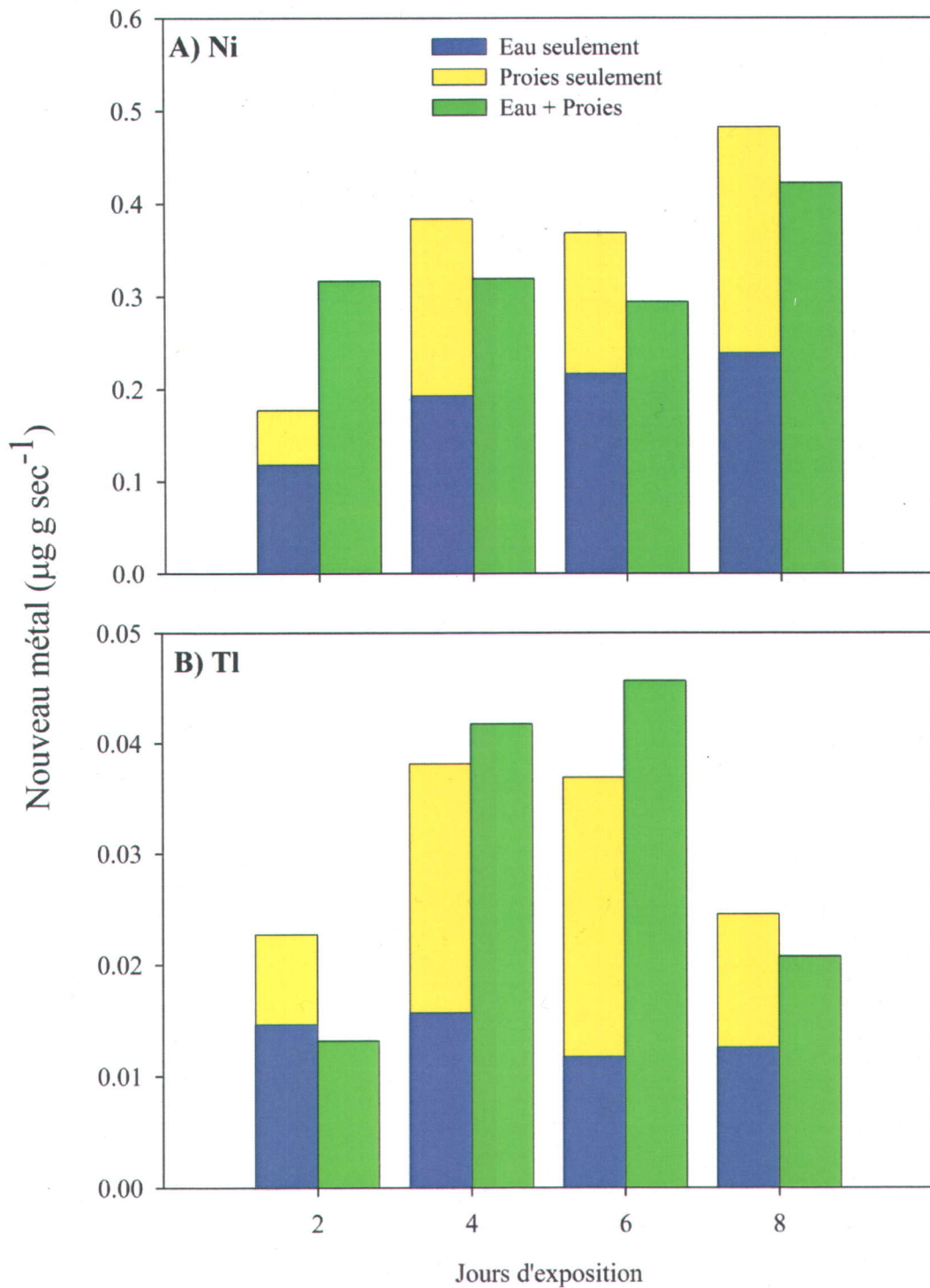


Figure 4-7 Concentrations de nouveau métal mesurées chez les juvéniles de tête-de-boule. En A, résultats pour le nickel (moyennes, n=7). En B, résultats pour le thallium (moyennes, n=7 sauf pour le jour 8 où n=6 pour le traitement Eau + Proies).

4.3 Efficacité d'assimilation chez notre prédateur

Nous avons mesuré l'efficacité d'assimilation (EA) du Ni et du Tl chez des juvéniles de tête-de-boule nourris avec deux types de proies vivantes contaminées (*Tubifex tubifex* et *Daphnia magna*) pendant 7 jours (chapitre 10). De façon générale, les poissons ont mieux assimilé le Tl que le Ni (tableau 4-1). Le type de proie ingérée n'a pas affecté l'efficacité d'assimilation du Ni tandis que les poissons nourris avec *D. magna* ont assimilé significativement plus de Tl que les poissons nourris avec *T. tubifex* (tableau 4-1).

Tableau 4-1 : Efficacité d'assimilation (%) du nickel et du thallium chez des juvéniles de tête-de-boule nourris avec des proies différentes (moyenne \pm erreur type; n=6-7). Les moyennes pour un métal donné ont été comparées à l'aide du test de t ($p \leq 0.05$).

<i>Proie</i>	<i>Ni</i>	<i>Tl</i>
<i>ingérée</i>	<i>(moyenne \pm erreur type)</i>	<i>(moyenne \pm erreur type)</i>
<i>T. tubifex</i>	11 \pm 3	31 \pm 9 ^b
<i>D. magna</i>	10 \pm 4	70 \pm 6 ^a

Nous avons également déterminé des valeurs d'EA du Ni et du Tl pour les juvéniles du traitement Proies seulement du chapitre 8 (2, 4, 6 et 8 jours d'exposition; nourris avec *T. tubifex*). L'EA moyenne pour le Ni était de 29 \pm 4% (pas de différence significative entre les temps d'exposition) tandis que pour le Tl, l'EA était de 15 \pm 2^{ab}, 21 \pm 5^a, 24 \pm 3^a et 9 \pm 1^b% après 2, 4, 6 et 8 jours d'exposition, respectivement, pour une valeur moyenne de 17 \pm 2%.

4.4 Répartition subcellulaire du nickel et du thallium

Nous avons déterminé la répartition subcellulaire de nos métaux d'intérêt dans deux contextes différents. D'une part, nous avons évalué l'influence de la voie d'exposition sur la répartition subcellulaire (chapitre 8) et, d'autre part, l'influence du type de proie sur ce paramètre (chapitre 10).

4.4.1 Influence de la voie d'exposition

La plus grande proportion du Ni internalisé chez ces juvéniles était lié aux protéines stables à la chaleur (HSP), aux granules et aux débris cellulaires tandis qu'une faible proportion (<10%) de Ni était associé aux autres fractions (figure 4-8). La proportion de Ni lié aux HSP était significativement plus faible chez les poissons exposés par l'eau et par les deux voies simultanément comparativement aux contrôles tandis que la proportion de Ni lié aux granules était significativement plus élevée chez les poissons exposés au Ni (Eau seulement, Proies seulement et Eau + Proies) que chez le groupe contrôle (figure 4-8). De plus, chez les poissons exposés au Ni (3 traitements), la proportion de métal associé aux mitochondries était significativement plus faible que chez les contrôles (figure 4-8). Les poissons du traitement Eau + Proies avaient significativement plus de granules (16.4 ± 0.6 mg sec; $p \leq 0.05$) que les poissons des trois autres traitements ($\sim 3-6$ mg sec) tandis que la concentration de Ni de la fraction granules était significativement supérieure chez les poissons du traitement Eau seulement (4 ± 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ sec ; $p \leq 0.05$) comparativement aux poissons des autres traitements ($\sim 0.3-1.4$ $\mu\text{g g}^{-1}$ sec).

À l'instar du Ni, la plupart du Tl internalisé était associé aux granules, aux débris cellulaires et aux HSP (figure 4-9). Nous avons mesuré un effet significatif du traitement seulement pour 3 compartiments subcellulaires : les débris cellulaires, les mitochondries et les HSP. Chez les poissons exposés au Tl (Eau seulement, Proies seulement et Eau + Proies), la proportion de métal lié aux mitochondries était inférieure comparativement aux contrôles tandis que la proportion de Tl lié à leurs HSP était supérieure (figure 4-9). Finalement, seuls les poissons des traitements Proies seulement et Eau + Proies avaient une moins grande proportion de Tl associée aux débris que le groupe contrôle (figure 4-9). Contrairement aux résultats observés pour le Ni, nous n'avons mesuré de différences au niveau de la quantité de granules chez les poissons exposés Tl. Cependant, la concentration de Tl était significativement supérieure chez les poissons des traitements Eau seulement, Proies seulement et Eau + Proies (38 ± 9 , 32 ± 3 et 49 ± 5 ng L⁻¹) comparativement au groupe contrôle (6.6 ± 0.5 ng L⁻¹; $p \leq 0.05$).

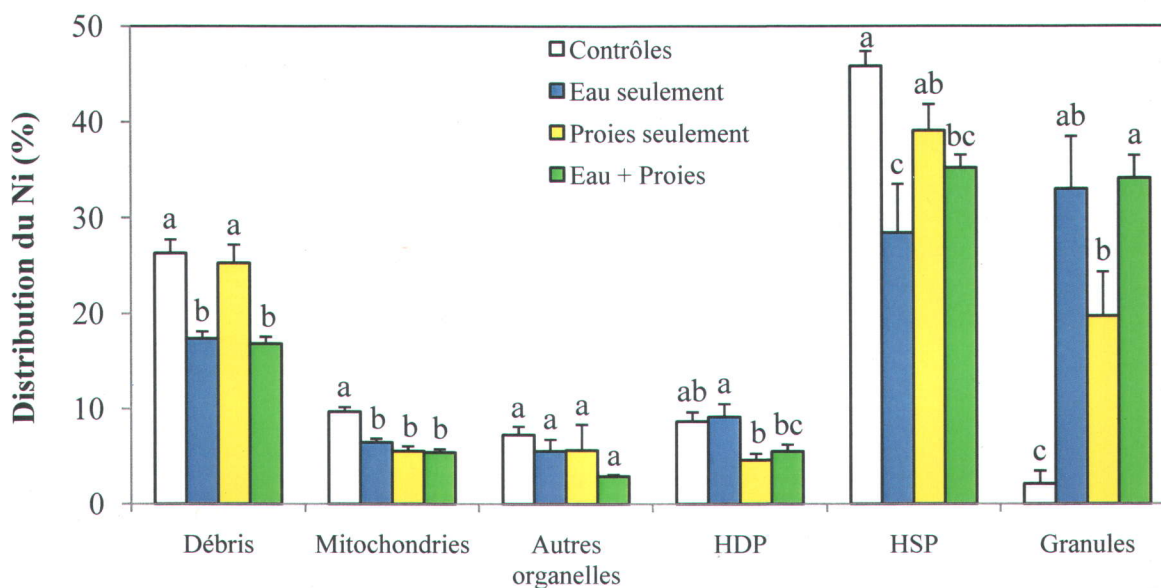


Figure 4-8 Répartition subcellulaire du nickel entre les différentes fractions opérationnelles obtenues par centrifugation différentielle chez des juvéniles de tête-de-boule (moyenne + erreur type; $n=24$ pour les contrôles, $n=20$ pour l'Eau seulement et $n=27$ les traitements Proies seulement et Eau + Proies). Les différences significatives entre les moyennes obtenues pour les 4 traitements, comparées pour chaque fraction au moyen des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD sont identifiées par des lettres différentes ($p \leq 0.05$).

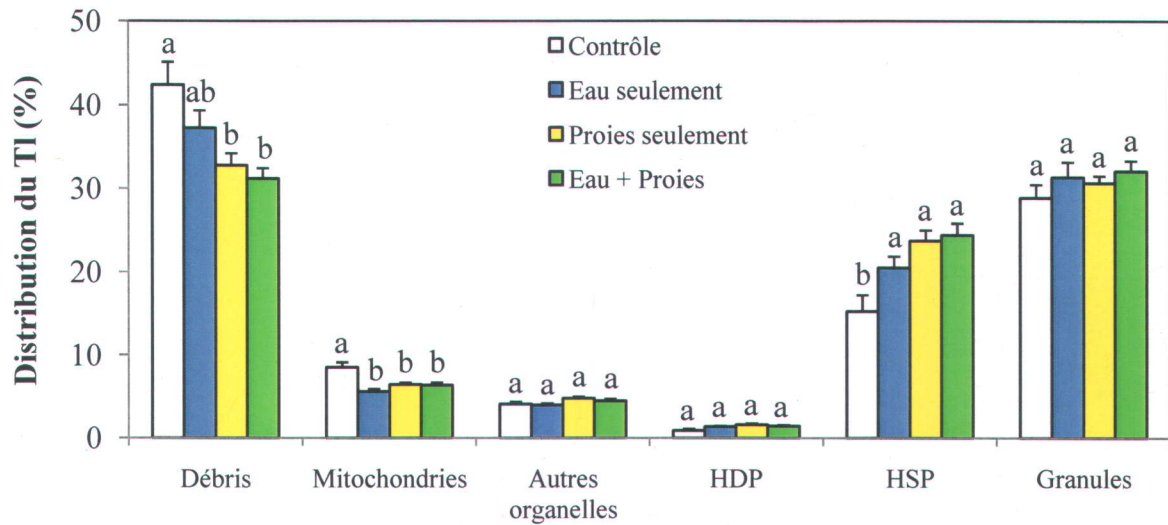


Figure 4-9 Répartition subcellulaire du thallium entre les différentes fractions opérationnelles obtenues par centrifugation différentielle chez des juvéniles de tête-de-boule (moyenne + erreur type; $n=27$ pour les traitements contrôle et Eau + Proies et $n=28$ pour les traitements Eau seulement et Proies seulement). Les différences significatives entre les moyennes obtenues pour les 4 traitements, comparées pour chaque fraction au moyen des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD sont identifiées par des lettres différentes ($p \leq 0.05$).

4.4.2 Influence du type de proie

En dépit du métal ou du type de proie consommée, la plus grande proportion de métal était liée aux granules, aux HSP et aux débris cellulaires (figure 4-10). Chez les juvéniles exposés au Ni, seule la proportion de métal lié aux protéines sensibles à la chaleur (HDP) était significativement différente selon le type de proie consommée (la proportion étant supérieure chez les poissons nourris avec *D. magna* plutôt que *T. tubifex*) (figure 4-10). La proportion de Tl lié aux HSP était significativement supérieure chez les poissons nourris avec *D. magna* comparativement aux poissons nourris avec *T. tubifex* tandis que ces derniers avaient significativement plus de Tl associé aux débris cellulaires (figure 4-10).

4.5 Effets de l'exposition métallique sur les paramètres physiologiques mesurés

4.5.1 Survie et temps à l'éclosion

La survie des embryons n'a pas été affectée par l'exposition au Ni et au Tl (le taux de survie a varié de 96±1 à 99±1%) (chapitre 9). Par contre, le temps à l'éclosion a été significativement plus court chez les embryons exposés au Ni comparativement aux embryons non exposés (figure 4-11). L'exposition au Tl quant à elle n'a pas affecté le temps à l'éclosion (figure 4-11).

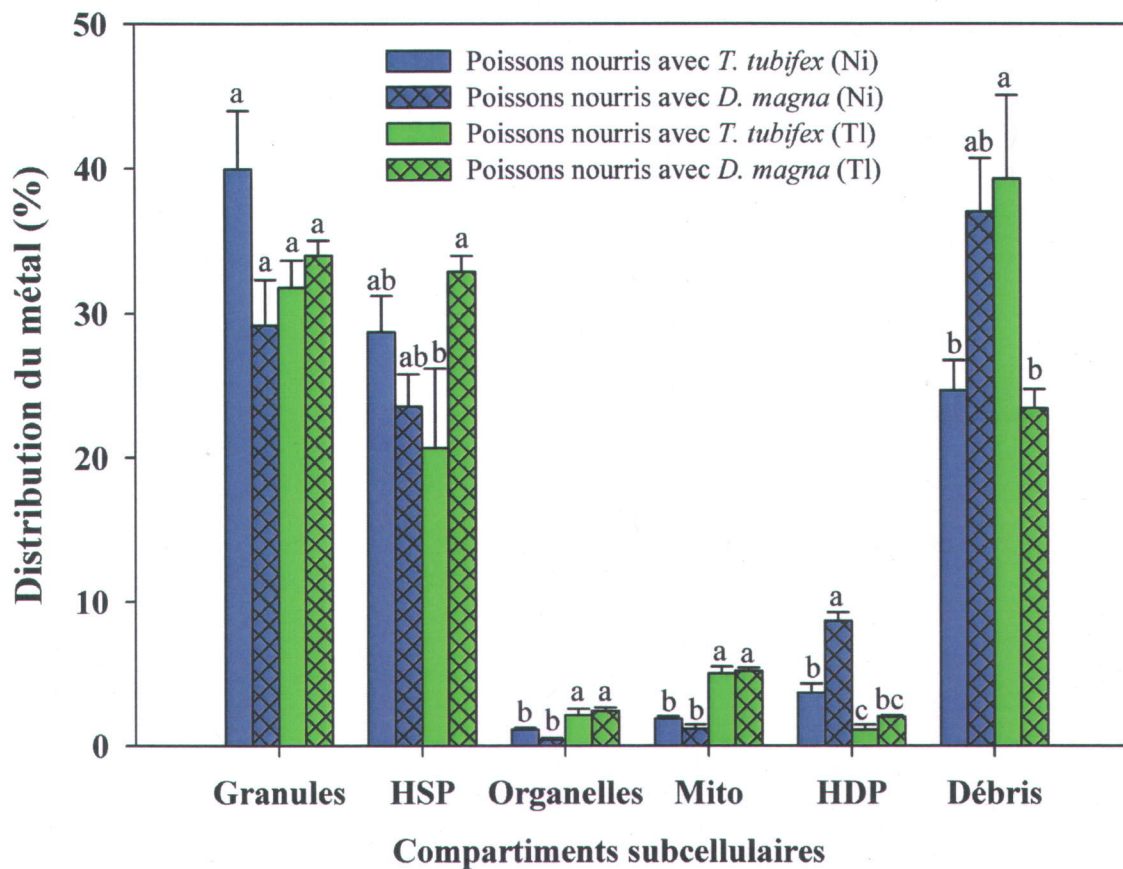


Figure 4-10 Répartition subcellulaire du nickel et du thallium entre les différentes fractions opérationnelles obtenues par centrifugation différentielle chez des juvéniles de tête-de-boule exposés aux métaux par différents types de proies (moyenne + erreur type; n=6-7). Mito = mitochondries. Les différences significatives entre les moyennes obtenues pour les 4 traitements, comparées pour chaque fraction au moyen des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD sont identifiées par des lettres différentes ($p \leq 0.05$).

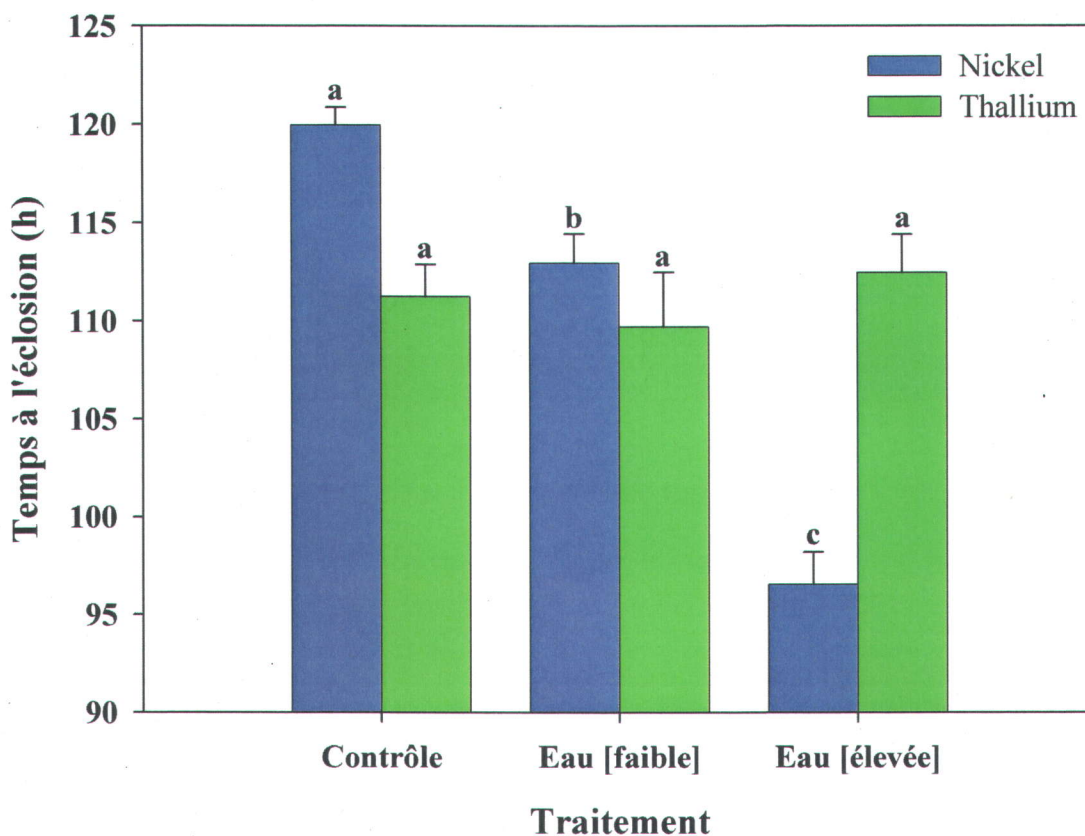


Figure 4-11 Temps à l'éclosion moyen (+ erreur type; n=10) d'embryons de tête-de-boule exposés au nickel ou au thallium. Les moyennes des 3 traitements d'un métal donné ont été comparées à l'aide des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD. Les différences significatives sont identifiées par des lettres différentes ($p \leq 0.05$).

4.5.2 Taux métabolique de routine

Nous nous sommes intéressés au taux métabolique de routine (TMR) dans deux expériences. Premièrement, lorsque nous avons étudié l'accumulation et la toxicité du Ni et du Tl chez les jeunes stades de tête-de-boule (chapitre 9) et deuxièmement, lorsque nous avons examiné l'effet du type de proie sur la prise en charge et la toxicité de nos métaux d'intérêt chez des juvéniles de tête-de-boule (chapitre 10).

Chez les larves exposées au métal aqueux pendant 21 jours (chapitre 9), nous n'avons pas mesuré d'effet significatif des traitements sur le TMR (figure 4-12). Par contre, chez les larves ayant été nourries avec des proies contaminées (série 2), le TMR tend à être plus faible que pour les larves ayant été nourries avec des proies non contaminées (série 1; figure 4-12).

Chez les juvéniles, le métal et/ou le type de proie n'ont pas eu d'effet significatif sur le TMR (chapitre 10).

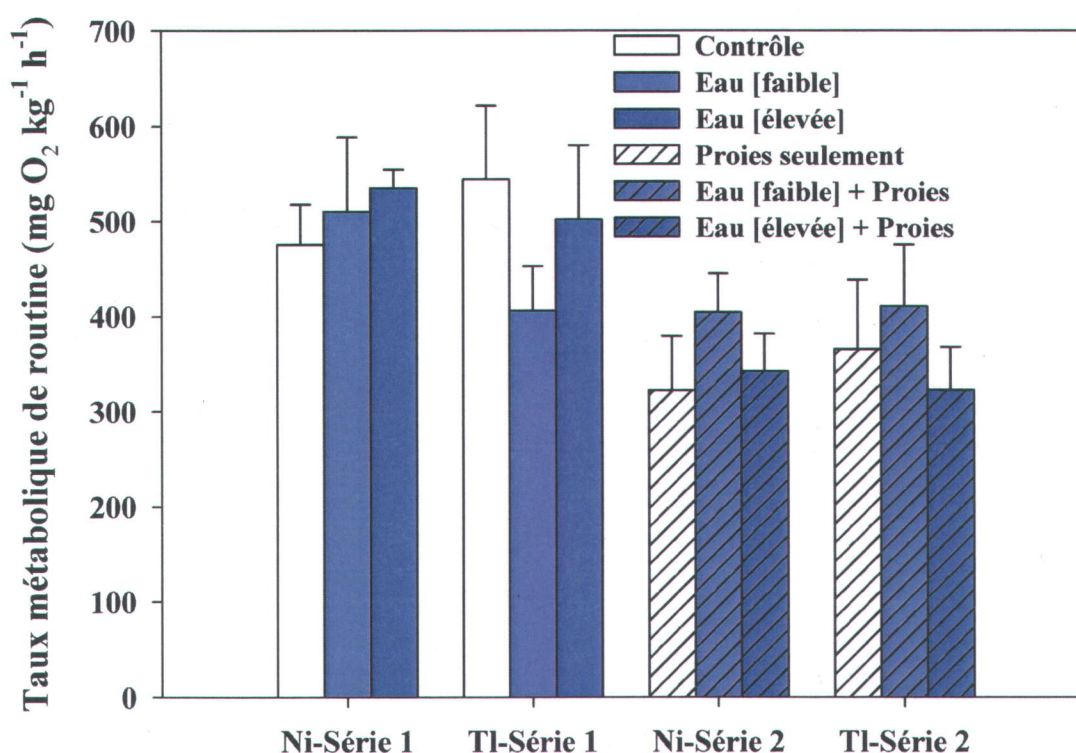


Figure 4-12 Taux métabolique de routine mesuré pour des groupes de 5 larves (moyenne + erreur type). Pour le Ni-Série 1, n=7 pour les contrôles, n=8 pour les traitements Eau [faible] et n=5 pour le traitement Eau [élevée]. Pour le Ni-Série 2, n=8 pour le traitement Proies seulement, n=11 pour Eau [faible] + Proies et n=7 pour Eau [élevée] + Proies. Pour le TI-Série 1, n=8 pour les contrôles, n=3 pour le traitement Eau [faible] et n=6 pour le traitement Eau [élevée], tandis que pour le TI-Série 2, n=10 pour les traitements Proies seulement et Eau [élevée] + Proies et n=9 pour le traitement Eau [faible] + Proies. Les moyennes des 6 traitements d'un métal donné ont été comparées à l'aide des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD ($p \leq 0.05$; ces tests n'ont révélé aucune différence statistique entre les moyennes).

4.5.3 Activités enzymatiques

Nous avons mesuré l'activité de 4 enzymes chez les mêmes poissons que pour le taux métabolique de routine (chapitres 9 et 10). Les enzymes étudiées étaient la cytochrome C oxydase (CCO), la lactate déshydrogénase (LDH), la nucléoside diphosphate kinase (NDPK), et la glutathion S-transférase (GST; chapitre 10 seulement).

Chez les larves, l'exposition au métal n'a pas eu d'effet significatif sur l'activité de la LDH. Cependant, pour les larves exposées à la concentration la plus élevée de Ni dissous et au Ni alimentaire simultanément, nous avons mesuré une activité significativement supérieure à celle du traitement P pour la CCO et la NDPK (chapitre 9).

Chez les juvéniles exposés aux métaux par deux proies différentes, nous n'avons pas mesuré d'effet significatif du Ni sur l'activité des 4 enzymes (figure 4-13). Cependant, pour les poissons nourris avec *D. magna*, l'exposition au Tl a significativement diminué l'activité de la NDPK et de la GST comparativement aux contrôles (figure 4-13). Chez les juvéniles du groupe contrôle (nourris avec des proies non contaminées), les poissons nourris avec *D. magna* avaient des activités de la CCO, de la NDPK et de la GST significativement supérieures à celles mesurées chez les poissons nourris avec *T. tubifex* (figure 4-13).

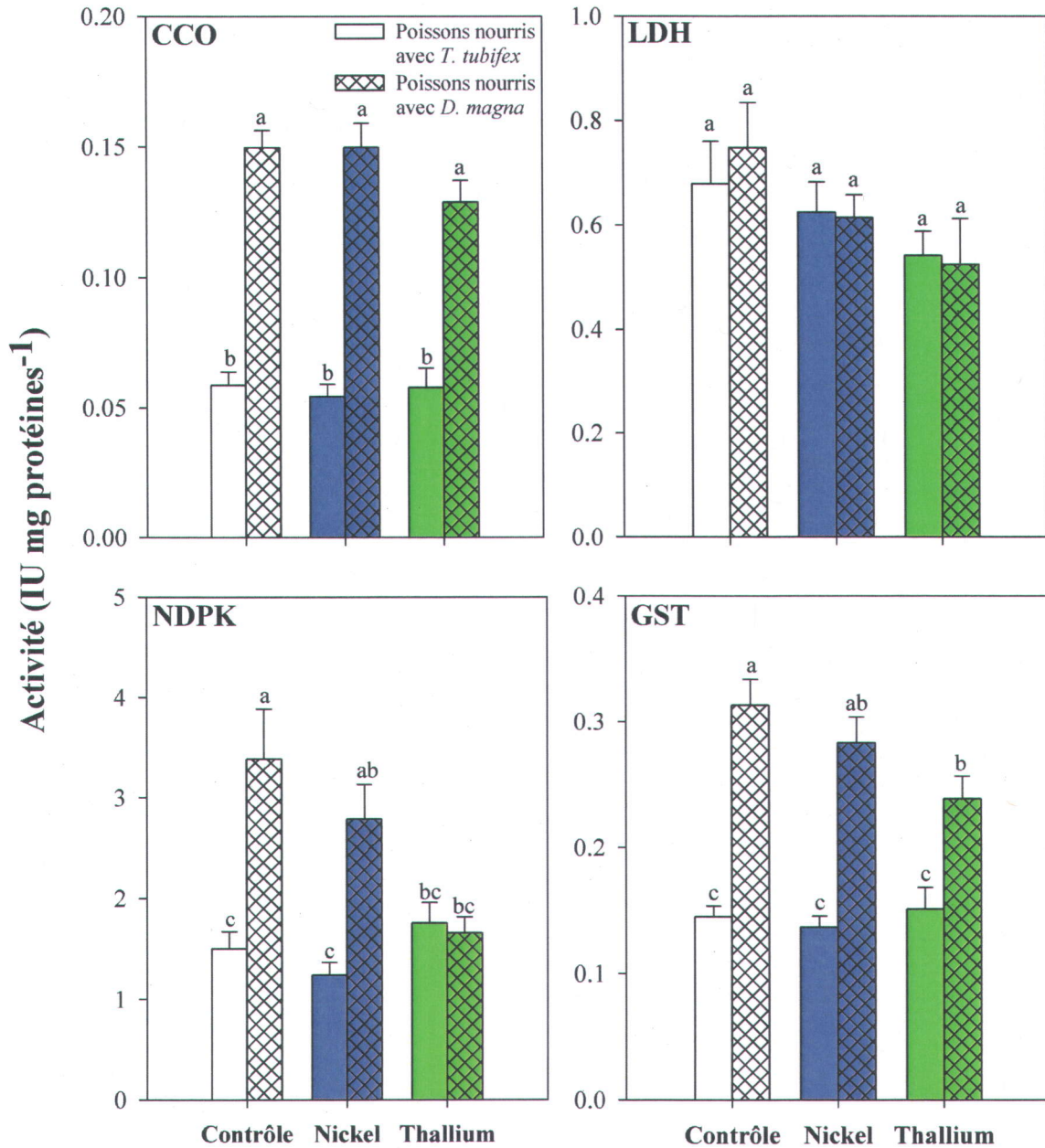


Figure 4-13 Activités enzymatiques mesurées chez des juvéniles de tête-de-boule nourris avec des proies (*Tubifex tubifex* ou *Daphnia magna*) non contaminées (contrôles) ou contaminées (nickel ou thallium) (moyenne + erreur type; n=6-7). Les moyennes des 6 groupes (2 proies x 3 traitements) ont été comparées à l'aide des tests de Kruskal-Wallis et de Tukey-Kramer HSD ($p \leq 0.05$).



5 Discussion et intégration des résultats

5.1 Pertinence environnementale des paramètres d'exposition

Afin que les résultats issus de ce projet puissent contribuer à la compréhension du comportement du Ni et du Tl dans les chaînes alimentaires aquatiques et fournir des informations pour l'ERE, nos travaux de laboratoire devaient reproduire des niveaux de contamination observés en milieu naturel. Ainsi, les concentrations de Ni et de Tl que nous avons utilisées (annexe C), autant pour l'eau que pour les proies, étaient comparables aux concentrations mesurées dans différents écosystèmes naturels contaminés.

5.1.1 Concentrations dans l'eau

Pour l'exposition des jeunes stades de vie (embryons et larves), nous avons utilisé deux niveaux de contamination : faible et élevée (chapitre 9). La concentration faible de Ni dissous (24.8 ± 0.4 et $27.0 \pm 0.8 \mu\text{g L}^{-1}$ pour les séries 1 et 2, respectivement) était similaire à la ligne directrice ontarienne pour la qualité de l'eau ($25 \mu\text{g L}^{-1}$; P.W.Q.O., 1994) tandis que la concentration élevée (252 ± 2 et $256 \pm 2 \mu\text{g L}^{-1}$) se situait dans la gamme de valeurs mesurées pour des lacs contaminés de la région de Sudbury (de 52 à $338 \mu\text{g L}^{-1}$; Pyle et al., 2005; voir aussi figure 1-1). La concentration utilisée pour l'exposition des juvéniles ($16.0 \pm 0.5 \mu\text{g L}^{-1}$; chapitre 8) était supérieure aux concentrations rapportées par Pyle et collaborateurs (2005) pour des lacs de référence de la région de Sudbury (7 à $10 \mu\text{g L}^{-1}$) mais était inférieure à la concentration mesurée dans un lac pour lequel le niveau de contamination est faible ($52 \mu\text{g L}^{-1}$).

Nos concentrations de Tl dissous (0.091 ± 0.001 , 0.0878 ± 0.0005 , 0.89 ± 0.01 et $0.902 \pm 0.006 \mu\text{g L}^{-1}$) utilisées pour l'exposition des embryons et des larves (chapitre 9) ainsi que la concentration utilisée pour l'exposition des juvéniles ($0.166 \pm 0.006 \mu\text{g L}^{-1}$; chapitre 8) se situaient dans la gamme de valeurs rapportées par Cheam (2001) mesurées près de mines ou de centrales thermiques au charbon dans l'ouest (0.0001 à $1.3 \mu\text{g L}^{-1}$) ou dans l'est (0.0002 à

24 $\mu\text{g L}^{-1}$) du Canada, mais étaient supérieures aux concentrations mesurées dans les Grands-Lacs (0.0009 à 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$).

5.1.2 Concentrations dans les proies

Les concentrations de Ni mesurées chez *Artémia salina* ($14 \pm 2 \mu\text{g g}^{-1}$ sec; chapitre 9), chez *Tubifex tubifex* ($10.0 \pm 0.3 \mu\text{g g}^{-1}$ sec; chapitre 8) et chez *T. tubifex* et *D. magna* (22 ± 5 et $108 \pm 14 \mu\text{g g}^{-1}$ sec, respectivement; chapitre 10) étaient dans la gamme de concentrations (7 à $115 \mu\text{g g}^{-1}$ sec) mesurées pour des contenus intestinaux de perchaudes prélevées dans des lacs du gradient de contamination de Sudbury et présentées à la figure 1-5 (P. Couture, INRS-ETE, données non publiées).

À notre connaissance, il n'y a pas de données de concentration de Tl mesurées dans des contenus stomacaux ou intestinaux de poissons disponibles à ce jour. Cependant, les concentrations de Tl mesurées chez *Artémia salina* ($0.086 \pm 0.006 \mu\text{g g}^{-1}$ sec; chapitre 9), chez *Tubifex tubifex* ($1.4 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ sec; chapitre 8) et chez *T. tubifex* et *D. magna* (0.9 ± 0.1 et $0.09 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$ sec, respectivement; chapitre 10) étaient supérieures à des concentrations rapportées pour des œufs de plies prélevées dans le port de Boston (<0.015 à $<0.023 \mu\text{g g}^{-1}$ sec; Vitaliano et Zdanowicz, 1992), mais inférieures à la concentration de Tl ($1.5 \mu\text{g g}^{-1}$ sec) estimée pour des touladis entiers provenant du lac Michigan (Lin et al., 2001).

5.2 Accumulation métallique

5.2.1 Par la phase aqueuse

L'accumulation de Ni dissous a été significative pour tous les stades de vie étudiés (comparativement aux organismes non exposés) et les patrons d'accumulation de Ni dissous chez les jeunes stades suggèrent la présence de mécanismes de régulation (chapitre 9). Les mécanismes de prise en charge du Ni ne sont pas connus chez les poissons. Par contre, puisque chez les mammifères la prise en charge du Ni implique les systèmes de transport du

fer (Gunshin et al., 1997; Tallkvist et al., 2003) et du magnésium (Goytain et Quamme, 2005), nous pouvons supposer qu'il en est de même chez les poissons.

Chez les embryons, nous avons mesuré une accumulation significative de Ni seulement lors de l'exposition à la concentration la plus élevée. Cependant, les concentrations mesurées après 24 ou 48 h d'exposition n'étaient pas statistiquement différentes, ce qui suggère l'atteinte d'un état stationnaire. Chez les larves exposées au Ni dissous pendant 7, 14 et 21 jours après l'éclosion, l'accumulation de Ni a été significative (comparativement aux larves non exposées) lors de l'exposition aux deux niveaux de contamination. À l'instar des embryons, les concentrations de Ni mesurées chez les larves d'un traitement donné n'ont pas augmenté avec le temps d'exposition (pas de différences significatives entre 7, 14 et 21 jours après l'éclosion), suggérant encore une fois l'atteinte d'un état stationnaire. Cependant, les concentrations mesurées chez les larves exposées à la concentration la plus élevée (de 7 à 21 jours après l'éclosion) étaient significativement supérieures à celles mesurées chez les embryons, ce qui suggère que la bioaccumulation de Ni dissous (à ce niveau de contamination) était plus importante chez les larves que chez les embryons. Brix et collaborateurs (2004) ont démontré, chez des embryons de truite arc-en-ciel, que le chorion représentait une barrière partielle contre de fortes concentrations de Ni puisque 36, 63 et 1% du Ni accumulé était associé au chorion, au vitellus et à l'embryon, respectivement. Le chorion aurait donc pu jouer un rôle similaire chez nos embryons de tête-de-boule.

Chez les juvéniles exposés au Ni dissous, l'accumulation de Ni a eu tendance à augmenter avec le temps d'exposition (2, 4, 6 ou 8 jours), ce qui diffère des patrons que nous avons observés chez les autres stades (figure 4-5). Cependant, le niveau de contamination auquel les juvéniles ont été exposés ($\sim 16 \mu\text{g L}^{-1}$) était inférieur aux niveaux de contamination précédents (~ 25 et $250 \mu\text{g L}^{-1}$). Aussi, le temps d'exposition a été plutôt bref (< 8 jours) et les juvéniles utilisés n'avaient pas été préalablement exposés aux métaux. Ainsi, les résultats que nous avons obtenus pour les juvéniles suggèrent que le niveau de contamination et/ou le temps d'exposition auxquels ils ont été soumis n'ont pas nécessité un recours aux mécanismes de régulation.

L'accumulation de Tl dissous a été significative pour tous les stades de vie étudiés (comparativement aux organismes non exposés, à l'exception des embryons de la série 1) mais les patrons d'accumulation de Tl dissous ont différé de ceux observés pour le Ni.

Pour les embryons et larves de moins de 24 h, l'accumulation de Tl a été beaucoup plus importante chez les individus exposés à la concentration la plus élevée comparativement à la concentration la plus faible (figure 4-2). De plus, pour ce niveau de contamination, l'accumulation de Tl a augmenté avec le temps d'exposition ($p < 0.05$). Ces résultats suggèrent que l'état stationnaire n'a pas été atteint et que le chorion n'a pas été une barrière efficace contre la concentration la plus élevée de Tl et que la prise en charge de ce dernier n'était pas soumise à des mécanismes de régulation. Chez les larves plus âgées, l'accumulation de Tl a été significative pour les deux niveaux d'exposition mais l'accumulation de Tl dissous n'a pas augmenté avec une augmentation du temps d'exposition.

Chez les juvéniles, l'accumulation de Tl dissous a rapidement atteint un plateau (après seulement 2 jours d'exposition), ce qui suggère une saturation des sites d'entrée du métal ou une certaine forme de régulation au niveau des branchies limitant la prise en charge et l'accumulation (à $\sim 0.02 \mu\text{g g}^{-1} \text{sec}$; figure 4-6). Une étude portant sur la bioaccumulation du Tl chez *Hyalella azteca* a démontré que la concentration de potassium (K) dans l'eau affectait la prise en charge et la toxicité du Tl tandis que d'autres ions tels le calcium, le magnésium et le sodium n'ont pas eu d'effet (Borgmann et al., 1998). Un effet similaire du K sur la prise en charge de Tl(I) a été mesuré chez deux espèces de phytoplancton (Twiss et al., 2004). Ces études suggèrent que le site d'entrée et/ou de régulation du Tl pourrait être relié à l'homéostasie du K dans les cellules épithéliales.

Les différents patrons d'accumulation que nous avons obtenus pour le Tl dissous suggèrent que lorsque les larves et les juvéniles de tête-de-boule sont exposés à une concentration plutôt faible (0.091 ± 0.001 , 0.0878 ± 0.0005 et $0.095 \pm 0.001 \mu\text{g L}^{-1}$, pour les larves des séries 1 et 2 et les juvéniles, respectivement), ils parviennent à limiter la prise en charge de Tl dissous, ce qui expliquerait l'obtention de plateaux lorsque nous avons examiné

l'accumulation. Cependant, les concentrations plus élevées de Tl (par exemple 0.902 ± 0.006 $\mu\text{g L}^{-1}$ chez les larves de la série 2) semblent excéder la capacité de régulation et engendrer une importante bioaccumulation.

5.2.2 Par transfert trophique

Pour les larves exposées au Ni et au Tl par les proies seulement pendant 21 jours ou moins (chapitre 9), nous n'avons pas mesuré d'accumulation importante du métal (comparativement aux larves exposées par les deux voies simultanément), suggérant que chez ces jeunes poissons, l'alimentation ne représente pas une source importante de ces métaux (figures 4-3 et 4-4). Selon Smith (1989), l'efficacité d'assimilation chez les poissons peut s'accroître durant le développement larvaire ou demeurer faible jusqu'à la transformation de la larve au juvénile. La faible accumulation de métaux par les proies chez les larves de tête-de-boule pourrait donc être reliée au développement du système digestif. Par ailleurs, le comportement de prise alimentaire peut également être en cause. Les larves peuvent avoir refusé d'ingérer des proies contaminées et ainsi avoir diminué leur prise alimentaire, ce qui aurait limité leur exposition au métal alimentaire et pourrait expliquer l'absence d'accumulation significative chez les larves exposées aux métaux par les proies uniquement.

Les résultats obtenus pour les juvéniles diffèrent de ceux obtenus pour les larves. En effet, les juvéniles ont significativement accumulé le Ni et le Tl contenu dans leurs proies (*T. tubifex*) (chapitre 8). Les concentrations de Ni mesurées suite à l'exposition par les proies étaient similaires à celles mesurées lors de l'exposition par l'eau (figure 4-5). De plus, les concentrations semblent avoir augmenté dans le temps, ce qui suggère que les juvéniles exposés au Ni alimentaire pendant 8 jours ou moins n'ont pas eu recours à des stratégies de régulation. L'importante contribution des deux voies d'exposition dans l'accumulation du Ni suggère que ce métal fut internalisé par une pompe, un canal ou un autre type de transporteur commun aux épithéliums des branchies et de l'intestin.

L'accumulation de Tl alimentaire chez les juvéniles a augmenté avec le temps (de 2 à 6 jours) avant de diminuer après 8 jours d'exposition (figure 4-6). Ces résultats suggèrent

l'activation de mécanismes de régulation au niveau de l'intestin afin de contrôler la prise en charge de Tl par les proies.

5.2.3 Par les deux voies simultanément

Bien que l'exposition aux métaux par l'eau et par l'alimentation de façon indépendante nous renseigne sur le comportement des métaux provenant de chacune des voies d'exposition, ce scénario ne reflète pas la réalité à laquelle les organismes aquatiques sont exposés en milieu naturel. Ainsi, nous avons également mesuré l'accumulation de Ni et de Tl chez des poissons exposés aux métaux dissous et alimentaire simultanément (chapitres 8 et 9).

Chez les larves exposées au Ni ou au Tl pendant 7, 14 et 21 jours, l'accumulation de métal semble avoir été plus faible chez les larves exposées par l'eau (concentration élevée) et les proies simultanément comparativement aux larves exposées à la même concentration de métal dissous (figures 4-3 et 4-4). Ces résultats suggèrent que la présence de métal dans les proies a provoqué une diminution de la prise en charge par les branchies. Des études sur la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) ont démontré que la présence de certains cations dans la diète inhibait la prise en charge d'un autre élément par l'eau (Pyle et al., 2003; Baldisserotto et al., 2005). Cependant, considérant que nos résultats suggèrent une très faible accumulation de métal par les proies chez les larves, il est peu probable que ces mécanismes s'appliquent à notre système. Afin d'expliquer la faible accumulation de métal alimentaire chez les larves de 21 jours et moins, nous avons proposé une diminution du taux d'ingestion. En poursuivant cette réflexion, nous pouvons supposer que ces larves moins bien alimentées auraient un statut énergétique diminué, et conséquemment un métabolisme déprimé. Ainsi, il serait possible que les larves du traitement Eau [élevée] + Proies aient eu un taux métabolique inférieur, tel que suggéré par la figure 4-12, ce qui expliquerait qu'elles aient accumulé moins de métal que les larves du traitement Eau [élevée].

De façon générale, chez les juvéniles exposés au Ni et au Tl par l'eau et les proies simultanément, les concentrations de nouveau métal obtenues étaient comparables à la somme des concentrations accumulées par les deux voies d'exposition séparées, suggérant

que chez les juvéniles de tête-de-boule, l'eau et les proies représentent des voies d'exposition au moins partiellement additives (figure 4-7).

5.3 Efficacité d'assimilation chez notre prédateur

L'efficacité d'assimilation (EA) constitue la mesure la plus utile de la biodisponibilité des métaux présents dans l'alimentation car elle représente autant l'efficacité avec laquelle les métaux présents dans la diète sont libérés dans l'intestin que l'internalisation des métaux dans les tissus des animaux (Luoma et Rainbow, 2008). Les valeurs moyennes d'EA que nous avons obtenues pour le Ni (~10-11% pour les juvéniles du chapitre 10 et 29% pour les juvéniles du chapitre 8) se comparent à celles rapportées chez des invertébrés (17 à 80%; Hédoïn et al., 2007; Dumas et Hare, 2008). Nos valeurs d'EA du Tl (~17, 31 et 70% pour les juvéniles nourris avec *T. tubifex* du chapitre 8, pour ceux du chapitre 10 et pour les juvéniles nourris avec *D. magna* du chapitre 10, respectivement) sont également comparables aux valeurs disponibles dans la littérature (40 à 70%; Twining et Fisher, 2004; Dumas et Hare, 2008).

Chez différents invertébrés, l'EA de métaux est directement reliée à la proportion de métal retrouvée dans le cytoplasme de leurs proies (Reinfelder et Fisher, 1991; Wallace et Lopez, 1996). Cependant, les relations entre la distribution d'un métal à l'intérieur d'une proie et son assimilation par un prédateur varient largement. Ainsi, bien qu'il soit généralement accepté que la spéciation du métal internalisé dans les proies affecte le transfert trophique vers le prochain maillon de la chaîne alimentaire (Vijver et al., 2004), des facteurs environnementaux (quantité de proies disponibles), écologiques (type de proie) et biologiques (taux d'ingestion, temps de passage dans l'intestin, processus digestifs, physiologie du système digestif) influencent également la prise en charge de métaux par un prédateur (Liu et al., 2002; Campbell et al., 2005a; Zhang et Wang, 2006; Luoma et Rainbow, 2008).

Nous avons comparé les EA moyennes (Ni et Tl) obtenues pour les juvéniles de tête-de-boule avec la proportion de métal potentiellement biodisponible (TAM; voir section 1.5.2 et figure

1-9) estimée pour le type de proie consommée (figure 5-1). De façon générale, la répartition subcellulaire du Ni et du Tl chez les proies n'a pas eu d'influence sur l'efficacité avec laquelle notre prédateur les a assimilés. Les juvéniles ont assimilé un maximum de 29% du Ni ingéré en dépit du fait qu'au moins 50% du métal contenu dans les proies était associé au compartiment TAM. Ces résultats démontrent que le TAM n'est pas un bon indicateur de l'EA du Ni chez cette espèce et suggèrent que les juvéniles ont régulé leurs concentrations de Ni en limitant sa prise en charge dans l'intestin. Pour le Tl, nous avons observé une relation différente entre l'EA et le TAM comparativement au Ni. Ainsi, bien que la proportion de Tl potentiellement biodisponible était similaire d'une proie à l'autre (~50%), les poissons ont mieux assimilé ce métal lorsqu'il provenait de *D. magna* plutôt que de *T. tubifex* (figure 5-1). Encore une fois, nos résultats démontrent que nous ne pouvons prédire l'EA du Tl chez les juvéniles de tête-de-boule en examinant la proportion de Tl liée au TAM dans les proies.

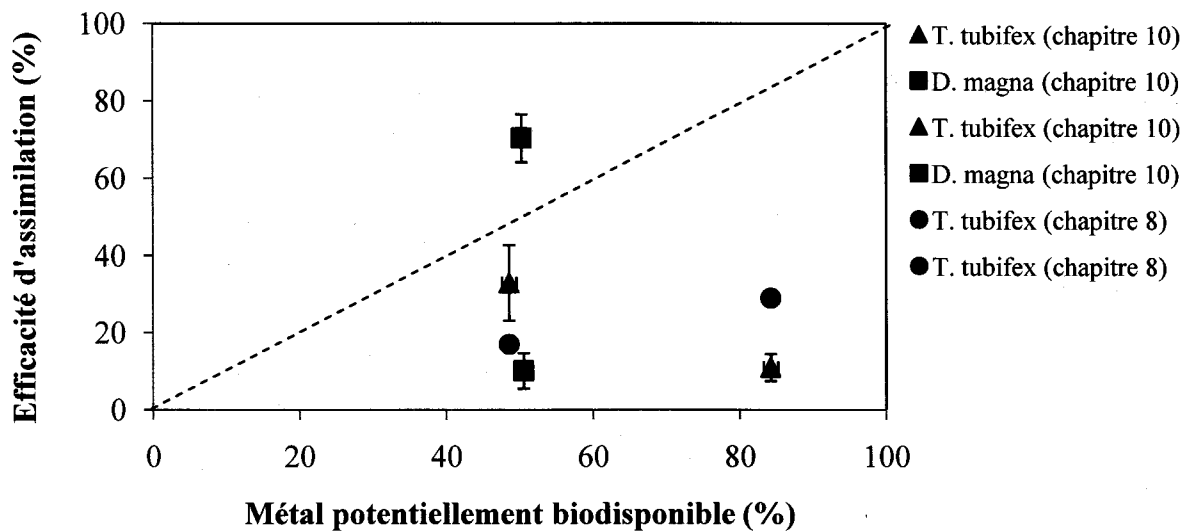


Figure 5-1 Relation entre l'efficacité d'assimilation du nickel (en bleu) et du thallium (en vert) chez les juvéniles de tête-de-boule et la proportion de nickel et de thallium théoriquement biodisponible chez deux types de proies (*Tubifex tubifex* et *Daphnia magna*) (valeurs moyennes; n=6-7). La ligne pointillée illustre une relation 1 :1 entre l'efficacité d'assimilation et la proportion de métal potentiellement biodisponible.

Dans le but de parvenir à identifier un paramètre relatif aux proies ingérées nous permettant de prédire l'EA d'un élément par un prédateur, nous avons examiné la relation entre l'EA du Ni et du Tl chez les juvéniles de tête-de-boule et plusieurs paramètres (concentration totale de métal dans les proies, concentration de métal dans le TAM, proportion et/ou concentration de métal dans différentes fractions subcellulaires). Pour le Ni, nous n'avons malheureusement pas obtenu de relations significatives, bien que ce ne soit pas inattendu pour un métal apparemment régulé. Cependant, dans le cas du Tl, l'EA a eu tendance à diminuer avec une augmentation de la concentration de métal dans les proies, suggérant une saturation des sites de prise en charge de l'épithélium intestinal (figure 5-2). Il apparaît néanmoins que l'efficacité d'assimilation du Ni et du Tl chez les juvéniles de tête-de-boule dépend d'avantage de la physiologie digestive de cette espèce plutôt que de la répartition de ces métaux chez les proies.

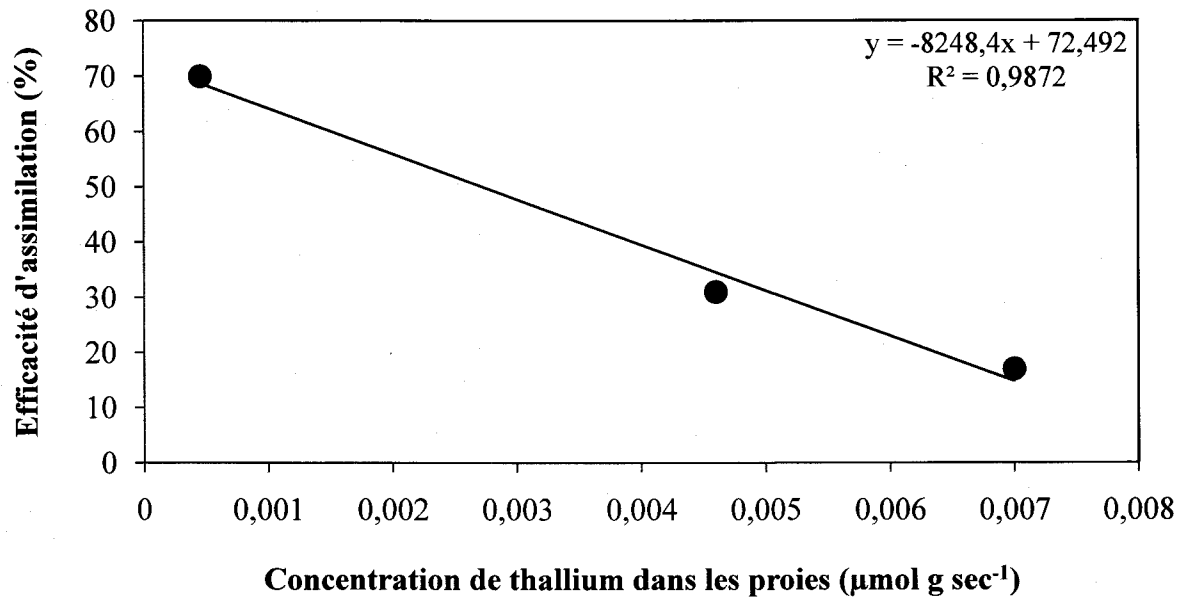


Figure 5-2 Relation entre l'efficacité d'assimilation du thallium chez les juvéniles de tête-de-boule et la concentration totale de thallium mesurée chez les proies (*Tubifex tubifex* ou *Daphnia magna*).

5.4 Effets sublétaux de l'exposition métallique

5.4.1 Le nickel

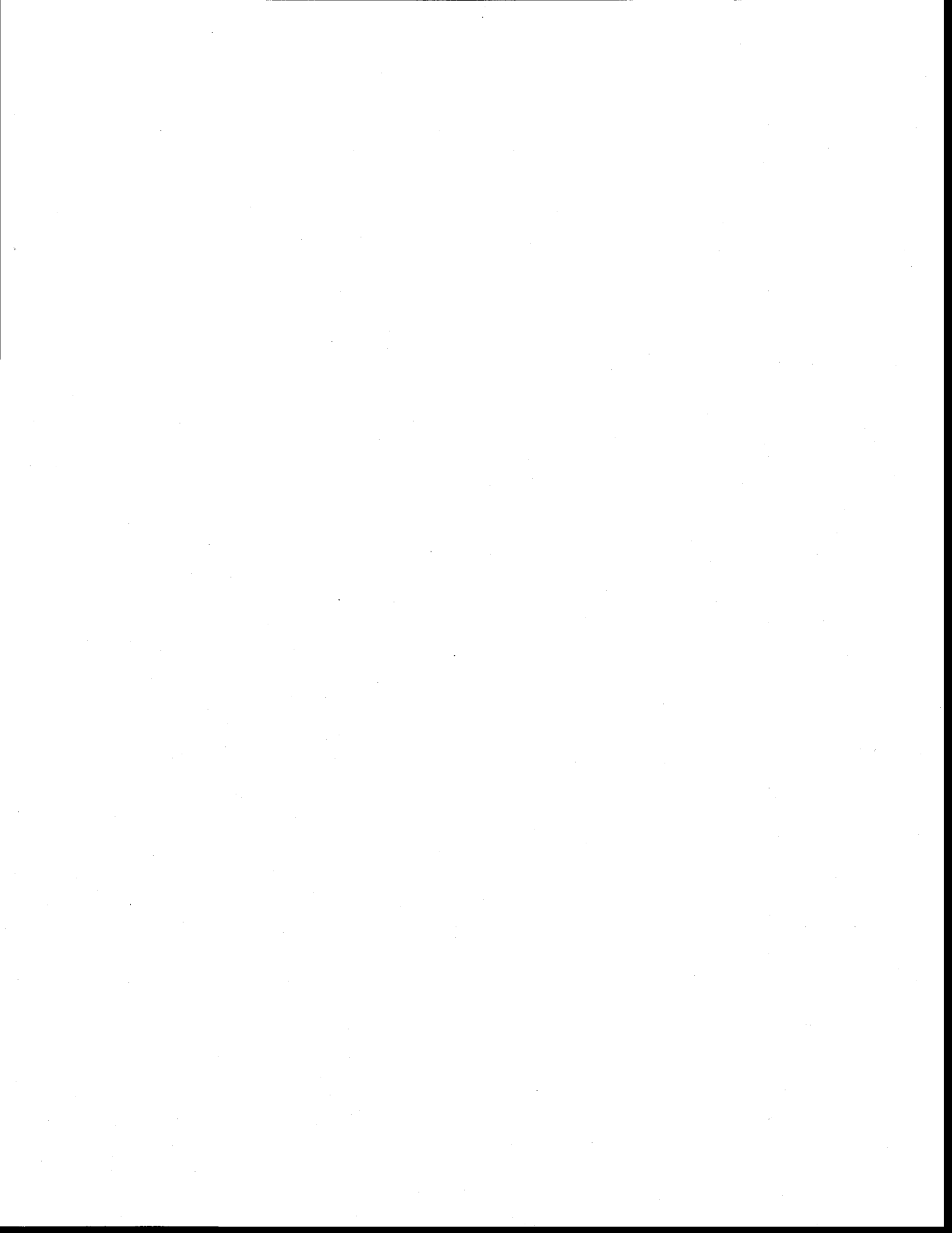
Des études antérieures portant sur les poissons n'ont pas démontré d'effets du Ni sur la croissance (Pickering, 1974; Sayer et al., 1991; Pyle, 2000; Pyle et al., 2002a) ou sur la survie et la reproduction (Pickering, 1974). Les concentrations environnementalement réalistes de Ni que nous avons utilisées n'ont pas eu d'effets sur la survie des embryons (chapitre 9), ni sur le taux métabolique de routine des larves (chapitre 9) et des juvéniles (chapitre 10). De plus, chez les juvéniles exposés au Ni alimentaire, nous n'avons pas mesuré d'effet significatif du métal sur l'activité des quatre enzymes mesurées (CCO, LDH, NDPK et GST).

Tout comme Pyle et collaborateurs (2002a), nous avons observé une diminution du temps à l'éclosion lors de l'exposition au Ni dissous (figure 4-11). Chez les larves, nous avons mesuré l'effet du Ni sur l'activité de la CCO, de la LDH et de la NDPK (chapitre 9). Seules la CCO, indicatrice des capacités aérobies, et la NDPK, indicatrice des capacités biosynthétiques, ont été affectées par l'exposition au Ni, leurs activités étant significativement supérieures chez les larves du traitement Eau [élevée] + Proies comparativement aux larves du traitement Proies seulement (chapitre 9). Ces deux effets du Ni, bien que subtils, suggèrent que lorsque les poissons sont exposés à une contamination en Ni, leur capacités métaboliques sont accrues. Nos résultats supportent les conclusions d'une étude sur la perchaude (*Perca flavescens*) où il est suggéré qu'une exposition élevée au Ni engendre une augmentation des besoins énergétiques ou du coût métabolique (Couture et al., 2008).

5.4.2 Le thallium

Les concentrations environnementalement réalistes de Tl que nous avons utilisées n'ont pas eu d'effets sur la survie ou le temps à l'éclosion des embryons (chapitre 9), sur le taux métabolique de routine des larves (chapitre 9) et des juvéniles (chapitre 10), ni sur les activités enzymatiques mesurées chez les larves (chapitre 9).

Cependant, chez les juvéniles exposés au Tl alimentaire par *D. magna* (chapitre 10), l'exposition au Tl a significativement diminué l'activité de la NDPK et de la GST comparativement aux contrôles (figure 4-13). L'effet du Tl sur la NDPK suggère que ce métal pourrait avoir un effet pernicieux sur la croissance des tête-de-boule se nourrissant de proies pélagiques. Il a été démontré, dans des fractions cytosoliques de cerveau de rats, que le Tl inhibe les défenses antioxydantes qui dépendent du GSH (par exemple l'activité de la glutathion peroxydase et de la glutathion réductase) (Hanzel et al., 2005). Ainsi, nous pouvons supposer que les tête-de-boule exposés au Tl alimentaire via *D. magna* seraient plus susceptibles au stress oxydatif.



6 Conclusions

Ce projet de doctorat a permis d'améliorer notre compréhension du comportement du Ni et du Tl chez les poissons en évaluant l'accumulation, la répartition subcellulaire et les effets de ces métaux, d'origine aqueuse ou alimentaire, chez le tête-de-boule.

6.1 Retour sur les objectifs et hypothèses

À notre connaissance, aucune étude ne s'était encore intéressée à l'importance relative de l'eau et des proies dans l'accumulation et la répartition subcellulaire du Ni et du Tl chez un poisson. Nous avons examiné cette question chez les larves et les juvéniles de tête-de-boule en les exposant à des concentrations environnementalement réalistes de métaux dissous et/ou alimentaires. Nous avons proposé, au début de cette thèse, que les deux voies d'expositions contribueraient au fardeau métallique. Il s'est avéré que nous avons partiellement vu juste car les juvéniles ont accumulé pratiquement autant de métal par l'eau et par les proies tandis que l'eau a été la principale source de métal pour les larves. De plus, dans le cas des juvéniles, nous avons supposé que la voie d'exposition aurait un effet sur la répartition subcellulaire du Ni et du Tl. Bien que la voie d'exposition ait eu un effet mitigé sur la répartition subcellulaire du Tl, les poissons exposés au Ni alimentaire avaient une moins grande proportion de Ni associée aux fractions sensibles aux métaux (surtout les protéines sensibles à la chaleur) comparativement aux poissons exposés au Ni dissous.

Les organismes vivant dans des milieux affectés par la contamination métallique sont exposés aux métaux dès le début de leur cycle de vie. De plus, chez les poissons, les jeunes stades de vie démontrent généralement une plus grande sensibilité aux métaux. Ainsi, nous avons évalué l'accumulation et la toxicité de nos deux métaux d'intérêt chez les jeunes stades de tête-de-boule en les exposant au Ni et au Tl, par l'eau et/ou par les proies. Puisque nous savions déjà que le Ni diminuait le temps à l'éclosion chez cette espèce, nous avons supposé que ce métal stimulerait d'autres paramètres métaboliques. De plus, puisqu'il a été démontré que le Tl diminuait les défenses antioxydantes impliquant le glutathion et que sa toxicité

élevée et non sélective est reconnue, nous avons supposé qu'une exposition au Tl se traduirait par une mortalité accrue et des effets sublétaux sur les paramètres physiologiques mesurés. De façon générale, nous n'avons pas mesuré d'effets néfastes importants chez les jeunes stades de tête-de-boule suite à une exposition de 21 jours au Ni ou au Tl. La survie et le taux métabolique de routine n'ont pas été affectés. Tel que nous l'avons envisagé, l'exposition à des concentrations réalistes de Ni dissous a diminué le temps à l'éclosion et augmenté les capacités aérobies et biosynthétiques, suggérant une activation de certaines voies métaboliques. Cependant, contrairement à ce que nous avons supposé, nous n'avons pas mesuré d'effets toxiques du Tl chez les têtes-de-boule de 21 jours ou moins.

Bien qu'il soit établi que les proies représentent une source importante de métaux chez les poissons, plusieurs questions demeurent quant aux facteurs influençant le transfert trophique des métaux vers les maillons supérieurs des chaînes alimentaires aquatiques. Dans le but de fournir des informations à ce sujet, nous avons étudié, en dernier lieu, l'importance de la répartition subcellulaire du Ni et du Tl chez deux proies (invertébrés) sur l'efficacité d'assimilation, la répartition subcellulaire et la toxicité chez les juvéniles de tête-de-boule. Notre hypothèse était que la proportion de métal potentiellement biodisponible (associée au compartiment TAM) chez les proies serait un bon indicateur de l'efficacité d'assimilation de nos métaux d'intérêt, sans toutefois prétendre que la relation observée entre les deux paramètres serait 1 : 1 comme c'est le cas pour certaines relations prédateur-proies (copépode-phytoplancton (Reinfelder et Fisher, 1991), crevette-oligochète (Wallace et al., 1998), crevette-bivalve (Wallace et Luoma, 2003)). La proportion de Ni et de Tl liée au TAM dans les deux proies que nous avons utilisées n'a pas eu d'influence sur l'efficacité d'assimilation de ces métaux par notre prédateur. Cependant, dans le cas du Tl, la concentration de métal dans les proies semble avoir affecté ce paramètre. En effet, nous avons observé une diminution de l'efficacité d'assimilation lorsque la concentration de Tl augmente dans les proies, ce qui pourrait s'expliquer par une saturation des sites de prise en charge de l'épithélium intestinal. Nous avons également supposé que la répartition du Ni et du Tl à l'intérieur des proies influencerait la répartition de ces métaux chez notre prédateur et conséquemment leur toxicité. Le type de proie a affecté la proportion de métal détoxiqué, les poissons ayant détoxiqué une plus grande portion de Ni lorsqu'ils étaient nourris avec *T.*

tubifex tandis que pour le Tl, la proportion détoxiquée était supérieure chez les poissons nourris avec *D. magna*. Cependant, les différences de proportion de métal détoxiqué observées pourraient être reliées aux différences de concentration de métal mesurées chez les prédateurs. Dans le cas du Ni, les poissons nourris avec *D. magna* ont accumulé deux fois plus de Ni que les poissons nourris avec *T. tubifex*, tandis que dans le cas du Tl, les poissons nourris avec *D. magna* ont accumulé 4.5 fois moins de Tl que les poissons nourris avec *T. tubifex*. Ainsi, la proportion de métal détoxiqué serait supérieure chez les poissons ayant accumulé moins de métal. En dépit des métaux, le type de proie ingéré a affecté l'activité de deux enzymes (CCO et GST), ce qui est probablement relié à la différence de comportement de quête alimentaire employé selon le type de proie. Bien que le Ni alimentaire n'ait pas eu d'effet néfaste sur les paramètres physiologiques mesurés, pour les poissons exposés au Tl par *D. magna*, nous avons mesuré une diminution de l'activité de deux enzymes (NDPK et GST). L'effet du Tl sur les défenses antioxydantes impliquant le glutathion a déjà été observé chez le rat. Cependant, à notre connaissance, nos résultats sont les premiers à démontrer un effet néfaste du Tl sur l'activité de la NDPK, ce qui suggère que le Tl pourrait affecter la croissance chez les juvéniles de tête-de-boule se nourrissant de *D. magna* contaminées en Tl.

6.2 Perspectives de recherche

Bien que ce projet de doctorat ait fourni des informations pertinentes en regard avec l'évaluation des risques associés à la présence de Ni et de Tl dans les écosystèmes aquatiques, il n'en demeure pas moins qu'il s'agit d'un travail en laboratoire. Malgré les efforts que nous avons mis pour que nos paramètres d'exposition soient environnementalement pertinents (concentrations utilisées, choix de proies vivantes plutôt que de la nourriture commerciale), ces conditions contrôlées et les temps d'exposition utilisés ne reflètent pas la complexité des milieux naturels. Ainsi, une première avenue à explorer suite à ce projet serait d'effectuer des expériences sur le terrain dans le but de les comparer et de les intégrer avec les résultats présentés dans cette thèse. Cela permettrait d'avoir une meilleure compréhension des différents paramètres sous-jacents du comportement des métaux dans les chaînes alimentaires aquatiques.

D'autre part, plusieurs des résultats que nous avons obtenus pour le Ni suggèrent la présence de mécanismes de régulation de cet élément chez le tête-de-boule et conséquemment, supportent l'hypothèse de l'essentialité du Ni chez les poissons. Malheureusement, bien que les travaux portant sur ces questions commencent à émerger, les mécanismes ne sont pas encore identifiés. Des travaux sur l'identification des mécanismes de prise en charge du Ni, autant dans les épithéliums branchiaux qu'intestinaux sont donc requis afin d'orienter les recherches sur l'essentialité de cet élément.

Lorsque nous avons étudié le transfert trophique du Ni et du Tl, nous avons utilisé deux espèces de proies dans le but d'évaluer l'influence de la répartition subcellulaire du métal chez la proie sur l'efficacité d'assimilation du métal chez le prédateur. Nos résultats ont démontré que contrairement à ce qui avait été observé pour les premiers maillons des chaînes alimentaires aquatiques, l'utilisation du compartiment TAM ne nous permet pas de prédire l'efficacité avec laquelle le tête-de-boule assimile le Ni et le Tl. Pour le Ni, aucun des autres paramètres que nous avons mesurés chez les proies se sont avérés utiles pour estimer l'efficacité d'assimilation. Cependant, il semble y avoir une relation entre la concentration totale de Tl dans les proies et l'efficacité d'assimilation de ce métal par notre prédateur, bien que nous n'ayons que trois points pour établir cette relation. Il serait donc intéressant de reproduire cet aspect de l'expérience en utilisant davantage de concentrations et de types de proies afin d'ajouter des points de comparaison et de vérifier si la relation est toujours présente et significative. De plus, puisque l'efficacité d'assimilation semble dépendre davantage de la physiologie digestive du poisson que de la répartition du métal dans les proies, il s'avère important d'améliorer notre compréhension des mécanismes de prise en charge et/ou d'excrétion des métaux d'origine alimentaire.

Finalement, comme les organismes vivant dans des milieux contaminés sont exposés aux métaux de l'embryon jusqu'à la fin de leur vie et que nous nous sommes attardés aux jeunes stades et aux juvéniles, il serait également important de poursuivre cette étude en utilisant des poissons adultes. Cela permettrait, d'une part, de fournir des informations pour l'ensemble du cycle de vie du tête-de-boule et d'autre part, de vérifier si certaines tendances observées chez les larves ou les juvéniles persistent à l'âge adulte.

7 Liste des références

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

Bartfay, W.J. et Bartfay, E. 2000. Iron-overload cardiomyopathy : evidence for a free radical-mediated mechanism of injury and dysfunction in a marine model. *Biological Research in Nursing*. 2 : 49-59.

Becker, G.L., Chen, C.H., Greenawalt, J.W. et Lehninger, A.L. 1974. Calcium phosphate granules in the hépatopancréas of the blue crab *Callinectes sapidus*. *The Journal of Cell Biology*. 61 : 316-326.

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

Bhatia, S., Shukla, R., Venkata Madhu, S., Kaur Gambhir, J. et Madhava Prabhu, K. 2003. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clinical Biochemistry*. 36 : 557-562.

Borgmann, U., Cheam, V., Norwood, W.P. et Lechner, J. 1998. Toxicity and bioaccumulation of thallium in *Hyaella azteca*, with comparison to other metals and prediction of environmental impact. *Environmental Pollution*. 99 : 105-114.

Borgmann, U., Norwood, W.P., Reynoldson, T.B. et Rosa, F. 2001. Identifying cause in sediment assessments : bioavailability and the sediment quality triad. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 58 : 950-960.

Brezonik, P.L, King, S.O. et Mach, C.E. 1991. The influence of water chemistry on trace metal bioavailability and toxicity to aquatic organisms. Dans *Metal ecotoxicology Concepts & Applications*. M.C. Newman et A.W. McIntosh (eds). Lewis Publishers. Chelsea. pp: 1-32.

Brismar, T. 1998. Dans *Thallium in the Environment*. J. Nriagu (ed). John Wiley & Sons. New York. Pp 241-261.

Brix, K.V., Keithly, J., DeForest, D.K. et Laughlin, J. 2004. Acute and chronic toxicity of nickel to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23(9) : 2221-2228.

Callahan, M.A., Ehreth, D.J. et Levins, P.L. 1979. Sources of toxic pollutants found in influent to sewage treatment plants. Proc. 8th National Conference on Municipal Sludge Management. 55-61.

Campbell, P.G.C. 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. Dans *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. A. Tessier et D.R. Turner (eds). John Wiley and sons. Chichester. pp : 45-102.

Campbell, P.G.C. et Couillard, Y. 2004. Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques. Dans *Écotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement*. É. Pelletier, Campbell, P.G.C. et Denizeau, F. (eds). Presses de l'Université du Québec. Québec. pp : 9-61.

Campbell, P.G.C. et Tessier, A. 1987. Metal speciation in natural waters: Influence of environmental acidification. *Advances in chemistry series No 216: Sources and fate of aquatic pollutants*. pp : 185-207.

Campbell, P.G.C., Clearwater, S.J., Brown, P.B., Fisher, N.S., Hogstrand, C., Lopez, G.R., Mayer, L.M. et Meyer, J.S. 2005a. Digestive physiology, chemistry and nutrition. Dans *Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms*. J.S. Meyer, W.J. Adams, K.V. Brix, S.N.

Luoma, D.R. Mount, W.A. Stubblefield et C.M. Wood (eds). SETAC Press. Pensacola. pp : 13-58.

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

Campbell, P.G.C., Chapman, P.M. et Hale, B.A. 2006. Risk assessment of metals in the environment. *Issues in Environmental Science and Technology*. 22: 102-131.

Chapman, P.M., et Wang, F. 2000. Issues in ecological risk assessment of inorganic metals and metalloids. *Human and Ecological Risk Assessment*. 6 : 965-988.

Chau, Y.K. et Kulikovsky-Cordeiro, O.T.R. 1995. Occurrence of nickel in the Canadian environment. *Environmental Reviews*. 3 : 95-120.

Cheam, V. 2001. Thallium contamination of water in Canada. *Water Quality Research Journal of Canada*. 36(4) : 851-877.

Cheung, M. et Wang, W.-X. 2005. Influence of subcellular metal compartmentalization in different prey on the transfer of metals to a predatory gastropod. *Marine Ecology Progress Series*. 286 : 155-166.

Chiaudani, G. et Vighi, M. 1978. The use of *Selenastrum capricornutum* batch cultures in toxicity studies. *Mitt. Int. Ver. Limnol.* 21: 316- 329.

Chowdhury, M.J., Bucking, C. et Wood, C.M. 2008. Pre-exposure to waterborne nickel downregulates gastrointestinal nickel uptake in rainbow trout: indirect evidence for nickel essentiality. *Environmental Science and Technology*. 42 : 1359-1364.

Clearwater, S.J., Farag, A.M. et Meyer, J.S. 2002. Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish. *Comparative biochemistry and Physiology C. Toxicology and Pharmacology*. 132 : 269-313.

CNRC. 1982. Effets du nickel sur l'environnement canadien. Publication no. CNRC 18569 du secrétariat de l'environnement. 355 pages.

Couture, P., Rajotte, J.W. et Pyle, G.G. 2008. Seasonal and regional variations of metal contamination and condition indicators in Yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. III. Energetic and physiological indicators. *Human and Ecological Risk Assessment*. 14(1) : 146-165.

Croisetière, L., Hare, L. et Tessier, A. 2006. A field experiment to determine the relative importance of prey and water as sources of As, Cd, Co, Cu, Pb and Zn for the aquatic invertebrate *Sialis velata*. *Environmental Science and Technology*. 40 : 873-879.

Dumas, J. et Hare, L. 2008. The internal distribution of nickel and thallium in two freshwater invertebrates and its relevance to trophic transfer. *Environmental Science and Technology*. 42 : 5144-5149.

Flegal, A.R., Settle, D.M. et Patterson, C.C. 1986. Thallium in marine plankton. *Marine Biology*. 90: 501-503.

Fry, F.E.J. 1971. The effect of environmental factors on the physiology of fish. Dans *Fish physiology. Volume VI. Environmental Relations and Behavior*. W.S. Hoar et D.J. Randall (eds). Academic Press, New York. pp: 1-98.

Giguère, A., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Perceval, O., Hare, L., Pinel-Alloul, B. et 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. *Aquatic Toxicology*. 64 : 185-200.

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

Golder Associates Ltd. 1996. A Review of the biophysical effects of uranium mining and milling in Canada. RSP-0056. Atomic Energy Control Board. Ottawa. ON.

Goytain, A. et Quamme, G.A. 2005. Identification and characterization of a novel mammalian Mg²⁺ transporter with channel-like properties. *BMC Genomics*. 6 : 48.

Griscom, S.B., Fisher, N.S. et Luoma, S.N. 2002. Kinetic modeling of Ag, Cd and Co bioaccumulation in the clam *Macoma balthica*: quantifying dietary and dissolved sources. *Marine Ecology Progress Series*. 240 : 127-141.

Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Golan, J.L. et Hediger, M.A. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*. 388 : 482-488.

Guthrie, J.W., Hassan, N.M., Salam, M.S.A., Fafous, I.I., Murimboh, C.A., Murimboh, J., Chakrabarti, C.L. et Grégoire, D.C. 2005. Complexation of Ni, Cu, Zn, and Cd by DOC in some metal-impacted freshwater lakes : a comparison of approaches using electrochemical determination of free-metal ion and labile complexes and a computer speciation model, WHAM V and VI. *Analytical Chimica Acta*. 528 : 205-218.

Hanzel, C.E., Villaverde, M.S. et Verstraeten, S.V. 2005. Glutathione metabolism is impaired in vitro by thallium(III) hydroxide. *Toxicology*. 207: 501-510.

Hare, L. 1992. Aquatic Insects and Trace metals : Bioavailability, bioaccumulation and toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*. 22(5/6) : 327-369.

Hare, L., Tessier, A. et Borgmann, U. 2003 Metal sources for freshwater invertebrates: Pertinence for risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment*. 9 : 779-793.

Hédoin, L., Pringault, O., Metian, M., Bustamante, P. et Warnau, M. 2007. Nickel bioaccumulation in bivalves from the New Caledonia lagoon: seawater and food exposure. *Chemosphere*. 66 : 1449-1457.

Hickie, B.E., Hutchinson, N.J., Dixon, D.G. et Hodson, P.V. 1993. Toxicity of trace metals mixtures to alevin rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and larval fathead minnows (*Pimephales promelas*) in soft, acidic water. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 50 : 1348-1355.

Hoang, T.C., Tomasso, J.R. et Klaine, S.J. 2004. Influence of water quality and age on nickel toxicity to Fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23(1) : 86-92.

Hook, S.E. et Fisher, N.S. 2001. Sublethal effects of silver in zooplankton: Importance of exposure pathways and implications for toxicity testing. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20 : 568-574.

Hopkin, S.P. 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Elsevier Applied Science. London. 366 pages.

Kedziora-Kornatowska, K., Szram, S., Kornatowski, T., Szadujkis-Szadurski, L., Kedziora, J. et Bartosz, G. 2003. Effect of vitamin E and vitamin C supplementation on antioxidative state and renal glomerular basement membrane thickness in diabetic kidney. *Nephron Experimental Nephrology*. 95 : 134-143.

Keller, W.B., Heneberry, J.H. et Gunn, J.M. 1999. Effects of emission reductions from the Sudbury smelters on the recovery of acid- and metal-damaged lakes. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 6 : 189-198.

Lee, A.G. 1971. The chemistry of thallium. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Publishing Company.

Lin, T.-S. et Nriagu, J. 1999. Thallium speciation in the Great Lakes. *Environmental Science and Technology*. 33 : 3394-3397.

Lin, T.-S., Nriagu, J. et Wang, X.-Q. 2001. Thallium concentration in lake trout from lake Michigan. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 67: 921-925.

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

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

Luoma, S.N., Johns, C., Fisher, N.S., Steinberg, N.A., Oremland, R.S., et Reinfelder, J.R. 1992. Determination of selenium bioavailability to a benthic bivalve from particulate and solute pathways. *Environmental Science and Technology*. 26 : 485-491.

Macek, K.J. et Sleight, B.H. III. 1977. Utility of toxicity tests with embryos and fry of fish in evaluating hazards associated with the chronic toxicity of chemicals to fishes. Dans *Aquatic toxicological hazard evaluation*. F.L. Mayer et J.L. Hamelink (eds). ASTM STP634. ASTM Philadelphia. P. 137.

Mandal, R., Hassan, N.M., Murimboh, J., Chakrabarti, C.L., Back, M.H., Rahayu, U. et Lean, D.R.S. 2002. Chemical speciation and toxicity of nickel species in natural waters from the Sudbury area (Canada). *Environmental Science and Technology*. 36 : 1477-1484.

Martin, L.J., Brambrink, A.M., Price, A.C., Kaiser, A., Agnew, D.M., Ichord, R.N. et Traystman, R.J. 2000. Neuronal death in newborn striatum after hypoxia-ischemia is necrosis and evolves with oxidative stress. *Neurobiological Diseases*. 7 : 169-191.

Mason, A.Z. et Jenkins, K.D. 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. Dans *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. A. Tessier et D.R. Turner (eds). John Wiley and sons. Chichester. pp : 479-608.

McKim, J.M. 1977. Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*. 34 : 1148-1154.

Meyer, J. S., Adams, W.J., Brix, K. V., Luoma, S.N., Mount, D. R., Stubblefield, W. A. et Wood, C. M. 2005. *Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms*; SETAC Press. Pensacola, FL, USA.

Mota, A.M. et Correia dos Santos, M.M. 1995. Trace metal speciation of labile chemical species in natural waters: electrochemical methods. Dans *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. A. Tessier et D.R. Turner (eds). John Wiley & sons Ltd. Chichester. pp. 205-258.

Munger, C. et Hare, L. 1997. Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): Implications for predicting Cd bioaccumulation in nature. *Environmental Science and Technology*. 31 : 891-895.

Muyssen, B.T.A., Brix, K.V., DeForest, D.K. et Janssen, C.R. 2004. Nickel essentiality and homeostasis in aquatic organisms. *Environmental Reviews*. 12 : 113-131.

Nriagu, J.O., Wong, H.K.T., Lawson, G. et Daniel, P. 1998. Saturation of ecosystems with toxic metals in Sudbury basin, Ontario, Canada. *The Science of the Total Environment*. 223 : 99-117.

O'Shea, T.A. 1972. Anodic stripping voltammetric study of the competitive interactions between trace metals and the alkaline earths for complexing ligands in aquatic environments. *Dissertations. The University of Michigan*. University microfilms. Ann Arbor. Michigan. Order No. 73-6891.

- Pane, E.F., Smith, C., McGeer, J.C. et Wood, C.M. 2003a. Mechanisms of acute and chronic waterborne nickel toxicity in the freshwater Cladoceran, *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology*. 37 : 4382-4389.
- Pane, E.F., Richards, J.G. et Wood, C.M. 2003b. Acute waterborne nickel toxicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) occurs by a respiratory rather than ionoregulatory mechanism. *Aquatic Toxicology*. 63 : 65-82.
- Pane, E.F., McGeer, J.C. et Wood, C.M. 2004a. Effects of chronic waterborne nickel exposure on two successive generations of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23(4) : 1051-1056.
- Pane, E.F., Haque, A. et Wood, C.M. 2004b. Mechanistic analysis of acute, Ni-induced respiratory toxicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an exclusively branchial phenomenon. *Aquatic Toxicology*. 69 : 11-24.
- Pane, E.F., Haque, A., Goss, G.G. et Wood, C.M. 2004c. The physiological consequences of exposure to chronic, sublethal waterborne nickel in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): exercise vs resting physiology. *The Journal of Experimental Biology*. 207 : 1249-1261.
- Pane, E.F., McDonald, M.D., Curry, H.N., Blanchard, J., Wood, C.M. et Grosell, M. 2006. Hydromineral balance in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) exposed to waterborne or infused nickel. *Aquatic Toxicology*. 80 : 70-81.
- Phipps, T., Tank, S.L., Wirtz, J., Brewer, L., Coyner, A., Ortego, L.S. et Fairbrother, A. 2002. Essentiality of nickel and homeostatic mechanisms for its regulation in terrestrial organisms. *Environmental Reviews*. 10 : 209-261.
- Pickering, Q.H. 1974. Chronic toxicity of nickel to the fathead minnow. *Journal of Water Pollution Control Federation*. 46(4) : 760-765.

Ptashynski, M.D., et Klaverkamp, J.F. 2002. Accumulation, distribution and toxicology of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology*. 58 : 249-264.

Ptashynski, M.D., Pedlar, R.M., Evans, R.E., Wautier, K.G., Baron, C.L. et Klaverkamp, J.F. 2001. Accumulation, distribution and toxicology of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 130 : 145-162.

Ptashynski, M.D., Pedlar, R.M., Evans, R.E., Wautier, K.G., Baron, C.L. et Klaverkamp, J.F. 2002. Toxicology of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology*. 58 : 229-247.

P.W.Q.O. 1994. Provincial water quality objectives, Water management policies guidelines, Ministry of Environment and Energy, Ontario, Canada. ISBN 0-7778-8473-9.

Pyle, G.G. 2000. The toxicity and bioavailability of nickel and molybdenum to standard toxicity-test fish species and fish species found in the Northern Canadian Lakes. Doctoral thesis, Department of biology, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada.

Pyle, G.G., Swanson, S.M. et Lehmkuhl, D.M. 2002a. Toxicity of uranium mine receiving waters to early life stage of fathead minnows (*Pimephales promelas*) in the laboratory. *Environmental Pollution*. 116 : 243-255.

Pyle, G.G., Swanson, S.M. et Lehmkuhl, D.M. 2002b. The influence of water hardness, pH, and suspended solids on nickel toxicity to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Water, Air and Soil Pollution*. 133 : 215-226.

Pyle, G.G., Kamunde, C.N., McDonald, D.G. et Wood, C.M. 2003. Dietary sodium inhibits aqueous copper uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology*. 206 : 609-618.

Pyle, G.G., Rajotte, J.W. et Couture, P. 2005. Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 61 : 287-312.

Ralph, L. et Twiss, M.R. 2002. Comparative toxicity of thallium (I), thallium (II) and cadmium (II) to the unicellular alga *Chlorella* isolated from Lake Erie. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 68 : 261-268.

Rapport SPE 1/RM/22. Canadian Environmental Protection Service. 1992. Biological Test Method: Test of Larval Growth and Survival Using Fathead Minnows. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

Reinfelder, J.R. et Fisher, N.S. 1991. The assimilation of elements ingested by marine copepods. *Science*. 251 : 794-796.

Reinfelder, J.R., Fisher, N.S., Luoma, S.N., Nichols, J.W. et Wang, W.-X. 1998. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: A critique of the kinetic model approach. *The Science of the Total Environment*. 219: 117-135.

Richter, O.R. et Theis, T.L. 1980. Nickel speciation in a soil/water system. Dans *Nickel in the environment*. Nriagu, J.O. (ed). John Wiley and Sons. New York, Chichester, Brisbane, Toronto. pp. 189-202.

Roesijadi, G. 1992. Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic toxicology*. 22 : 81-114.

Sager, M. 1994. Thallium. *Toxicology and Environmental Chemistry*. 45: 11-32..

Sayer, M.D.J., Reader, J.P., Morris, R. 1991. Embryonic and larval development of brook trout, *Salmo trutta* L.: exposure to trace metal mixtures in soft water. *Journal of fish biology*. 38 : 773-787.

Seebaugh, D.R. et Wallace, W.G. 2004. Importance of metal-binding proteins in the partitioning of Cd and Zn as trophically available metal (TAM) in the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Marine Ecology Progress Series*. 272 : 215-230.

Silverman, H., Steffens, W.L. et Dietz, T.H. 1985. Calcium from extracellular concretions in the gills of freshwater unionid mussels is mobilized during reproduction. *Journal of Experimental Zoology*. 236 : 137-147.

Simkiss, K. et Taylor, M.G. 1995. Transport of metals across membranes. Dans *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. A. Tessier et D.R. Turner (eds). John Wiley and sons. Chichester. pp : 2-44.

Smith, L.S. 1989. Digestive functions in teleost fishes. In: Halver, J.E. (Ed), Fish nutrition. Academic Press Inc. P. 331-385.

Snodgras, W. 1980. Distribution and behaviour of nickel in the aquatic environment. Dans *Nickel in the environment*. Nriagu, J.O. (ed). John Wiley and Sons. New York. Chichester. Brisbane. Toronto. pp : 203-274.

Spry, D.J., Hodson, P.V. et Wood, C.M. 1988. Relative contributions of dietary and waterborne zinc in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 45 : 32-41.

Stillman, M.J. 1995. Metallothioneins. *Co-ordination Chemistry Reviews*. 144 : 461-511.

Stumm, W. et Bilinski, H. 1972. Trace metals in natural waters: Difficulties of interpretation arising from our ignorance on their speciation. Dans *Advances on water pollution research*. S.H. Jenkins (ed). Proceedings of the 6th international conference in Jerusalem. Pergamon Press. New York. pp : 39-52.

Szebedinszky, C., McGeer, J.C., McDonald, D.G. et Wood, C.M. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20 : 597-607.

Tallkvist, J., Bowlus, C.L. et Lunnerdal, B. 2003. Effect of iron treatment on nickel absorption and gene expression of the divalent metal transporter (DMT1) by human intestinal caco-2 cells. *Pharmacology and Toxicology*. 92 : 121-124.

Turner, D.R. 1995. Problems in trace metal speciation modeling. Dans *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. A. Tessier et D.R. Turner (eds). John Wiley & sons Ltd. Chichester. pp. 149-204.

Twining, B.S. et Fisher, N.S. 2004. Trophic transfer of trace metals from protozoa to mesozooplankton. *Limnology and Oceanography*. 41 : 28-39.

Twining, B.S., Twiss, M.R. et Fisher, N.S. 2003. Oxidation of thallium by freshwater plankton communities. *Environmental Science and Technology*. 37 : 2720-2726.

Twiss, M.R., Twining, B.S. et Fisher, N.S. 2004. Bioconcentration of inorganic and organic thallium by freshwater phytoplankton. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23(4): 968-973.

Upitis, V.V., Nollendorf, A.F. et Pakalne, D.S. 1980. Relevance of nickel for culturing microalgae. Dans *Trace Element Symposium Nickel, Jena, German Democratic Republic, 7-11 July, 1980*. Anke, M., Schneider, H.-J. et Brückner, Chr. (eds). Jena, Friedrich-Schiller University, pp. 171-183 (en Allemand).

Vijver, M.G., Van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., Van Straalen, N.M. et Peijnenburg, W.J.G.M. 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review. *Environmental Science and Toxicology*. 38(18) : 4705-4712.

Vitaliano, J.J. et Zdanowicz, V.S. 1992. Trace metals in eggs of winter flounder from Boston Harbor, a contaminated North American estuary. *Marine Pollution Bulletin*. 24(7) : 364-367.

Wallace, W.G. et Lopez, G.R. 1996. Relationship between subcellular cadmium distribution in prey and cadmium trophic transfer to a predator. *Estuaries*. 19 : 923-930.

Wallace, W.G. et Lopez, G.R. 1997. Bioavailability of biologically sequestered cadmium and the implications of metal detoxification. *Marine Ecology Progress Series*. 147 : 149-157.

Wallace, W.G. et Luoma, S.N. 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Marine Ecology Progress Series*. 257 : 125-137.

Wallace, W.G., Lopez, G.R. et Levinton, J.S. 1998. Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. *Marine Ecology Progress Series*. 172 : 225-237.

Wallace, W.G., Lee, B.G. et Luoma, S.N. 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series*. 249 : 183-197.

Wang, W.-X. et Fisher, N.S. 1999. Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: a synthesis. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18(9) : 2034-2045.

WHO. 1991. Nickel. *Environmental Health Criteria No. 108*. World Health Organization. Geneva.

WHO. 1996. Thallium. *Environmental Health Criteria No. 182*. World Health Organization. Geneva.

Williams, R.J.P. et Fraústo da Silva. 1996. *The natural selection of chemical elements*. Oxford, Clarendon Press.

Wittmann, G.T.W. 1979. Toxic metals. Dans *Metal pollution in the aquatic environment*. U. Förstner et G.T.W. Wittmann (eds). Springer-Verlag. Berlin. pp : 3-68.

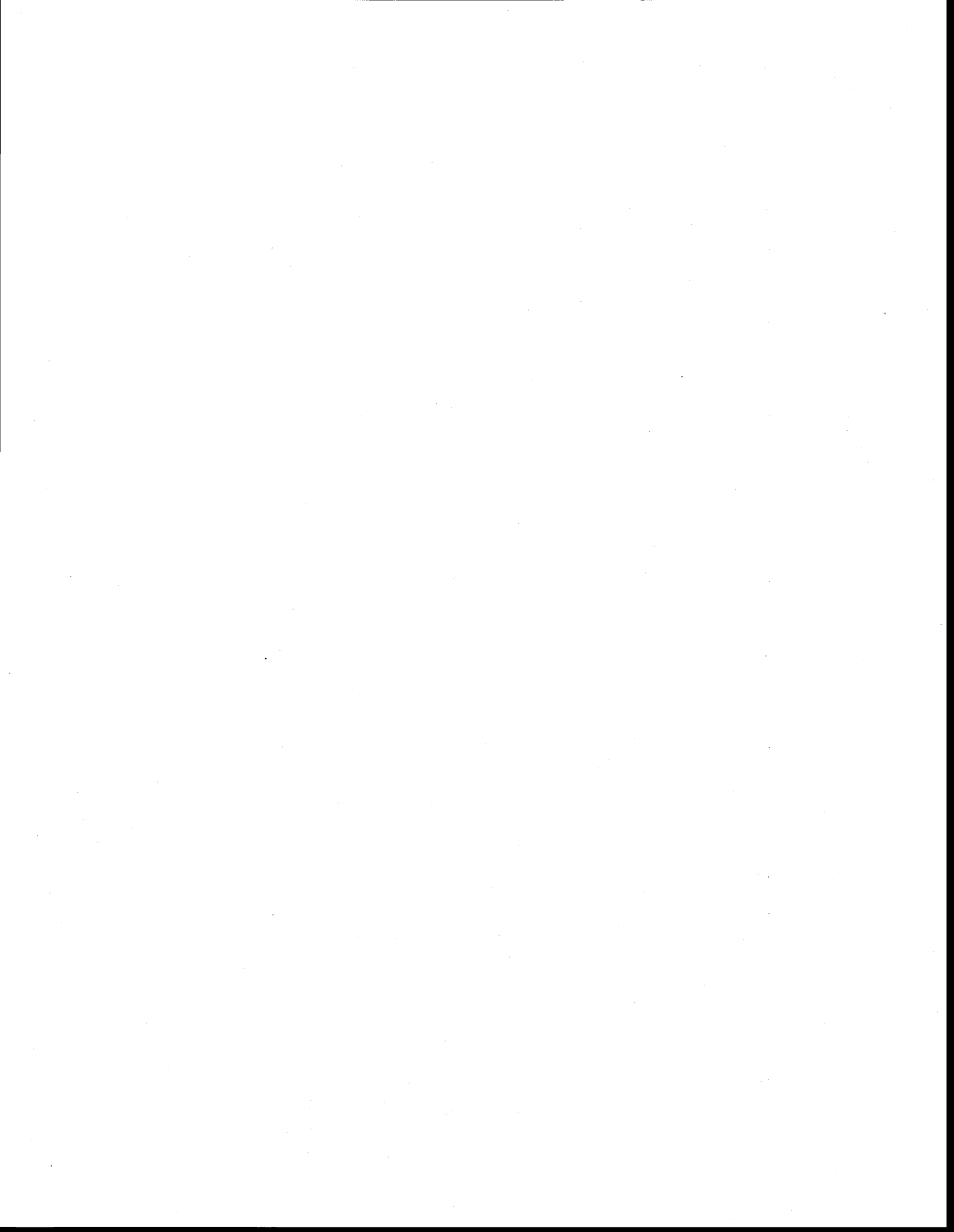
Xiao, T., Guha, J., Boyle, D., Liu, C.-Q., Zheng, B., Wilson, G.C., Rouleau, A. et Chen, J. 2004. Naturally occurring thallium: a hidden geoenvironmental health hazard? *Environment International*. 30 : 501-507.

Xue, H.B., Jansen, S., Prasch, A. et Sigg, L. 2001. Nickel speciation and complexation kinetics in freshwater by ligand exchange and DPCSV. *Environmental Science and Technology*. 35 : 539-546.

Zhang, L. et Wang, W.X. 2005 Effects of Zn pre-exposure on Cd and Zn bioaccumulation and metallothionein levels in two species of marine fish. *Aquatic Toxicology*. 73 : 353-369.

Zhang, L. et Wang, W.X. 2006 Significance of subcellular metal distribution in prey in influencing the trophic transfer of metals in a marine fish. *Limnology and Oceanography*. 51(5) : 2008-2017.

Zitko, V. 1975. Toxicity and pollution potential of thallium. *Science of the Total Environment*. 4 : 185-192.



PARTIE II

Articles scientifiques



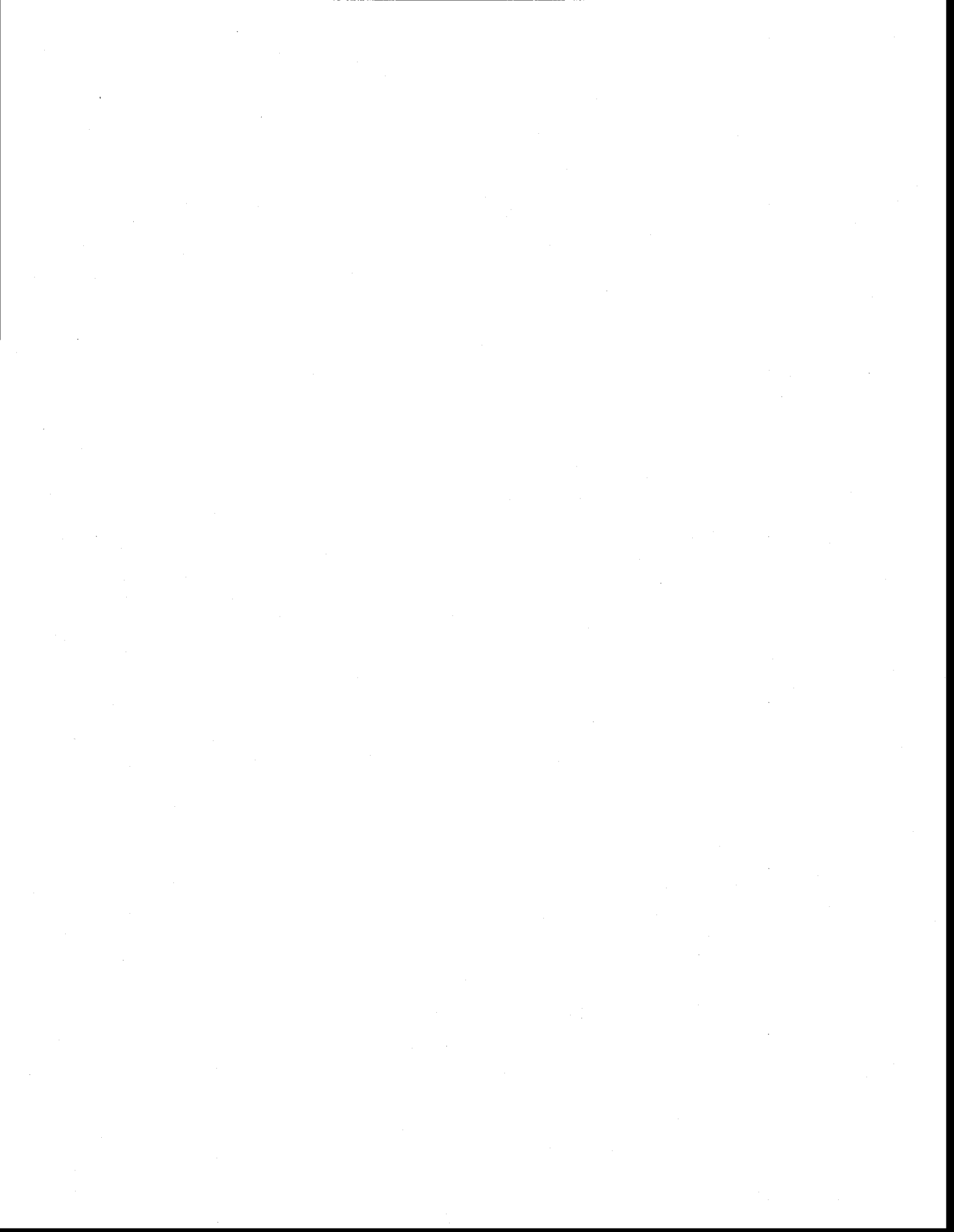
8 1^{er} article

Influence of the route of exposure on the accumulation and subcellular distribution of nickel and thallium in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*)

Dominique Lapointe and Patrice Couture

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

Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2009, 57 : 571-580



Influence of the Route of Exposure on the Accumulation and Subcellular Distribution of Nickel and Thallium in Juvenile Fathead Minnows (*Pimephales promelas*)

Dominique Lapointe · Patrice Couture

Received: 6 October 2008 / Accepted: 9 February 2009 / Published online: 1 March 2009
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract In this study, we examine the relative contribution of water and live prey (*Tubifex tubifex*) as sources of nickel (Ni) and thallium (Tl) in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). Overall, both water and prey were important sources of metals for our fish, although only approximately 35% of the metal estimated available for trophic transfer in the prey was assimilated. We also investigated the influence of exposure route on the subcellular distribution of these two metals. Once assimilated, most of the Ni was found in the granules, debris, and heat-stable protein (HSP), regardless of the route of exposure. Thallium was also mostly located in granules, debris, and HSP, and fish exposed from both water and prey had a higher proportion of Tl bound to the HSP compartment compared to control fish. Our results, obtained using environmentally relevant concentrations, suggest the presence of regulation mechanisms for both metals. Nevertheless, we measured increased metal concentrations in potentially metal-sensitive subcellular fractions when fish were exposed from water and diet simultaneously compared to a single route of exposure, suggesting that exposure to Ni and Tl from both routes could represent a risk of toxicity.

Nickel (Ni) can be released in natural ecosystems during mining, smelting, refining, metal reprocessing, fuel

combustion, and waste incineration (Chau and Kulikovskiy-Cordeiro 1995). Sources of thallium (Tl) contamination in aquatic environments include metal smelting, cement manufacturing, and high-technology industries, but most Tl is released from coal combustion (WHO 1996; Ralph and Twiss 2002). To assess the ecological risks associated with the occurrence of trace elements in aquatic ecosystems, we need to understand how they react in the environment and to what extent these contaminants exert toxicity on aquatic organisms.

Exposure assessment is an important component of risk assessment (Chapman and Wang 2000). Thus, we need to characterize exposure parameters such as the sources of trace elements for animals (water or prey), their speciation in each source (which affects their bioavailability), and their concentrations. It is well known that metals in water are taken up by aquatic animals (Williams and Giesy 1978; Griscom and Fisher 2002; Hare et al. 2003; Couture et al. 2008), but many studies have also shown that their prey can also be an important or even the major route of exposure to metals; examples include copepods (Reinfelder and Fisher 1991; Wang and Fisher 1999), insects (Munger and Hare 1997; Roy and Hare 1999; Hare et al. 2003; Croisetière et al. 2006), bivalve mollusks (Luoma et al. 1992; Griscom et al. 2002), and fish (Spry et al. 1988; Clearwater et al. 2002; Xu and Wang 2002; Zhang and Wang 2005). Considering that risk assessments for aquatic ecosystems are mostly based on exposures of test animals to dissolved metals, there is a concern for regulators to consider the contribution of dietary metals and to evaluate whether water quality guidelines established for dissolved metals are sufficiently protective (Fisher and Hook 2002; Hare et al. 2003). Thus, additional knowledge is required about the relative contribution of the diet in total metal bioaccumulation and potential toxic effects of dietborne metals.

D. Lapointe · P. Couture (✉)
Institut National de la Recherche Scientifique—Centre Eau,
Terre et Environnement (INRS-ETE), Université du Québec,
490 de la Couronne, Québec, QC G1K 9A9, Canada
e-mail: patrice.couture@ete.inrs.ca

Once a metal has been internalized in a cell, its subcellular distribution can be estimated using a differential centrifugation protocol providing operationally defined fractions (see review by Vijver et al. 2004). The nature of the various subcellular fractions procures them with different affinities for metals, which may in turn influence the food-chain transfer to higher consumers (Vijver et al. 2004). In fact, it has been suggested that different subcellular compartments are not necessarily equally available for trophic transfer (Wallace and Luoma 2003).

In this study, juvenile fathead minnows were exposed to either Ni or Tl using four experimental treatments (unexposed controls, water-only exposure, prey-only exposure, and water + prey exposure) to examine the relative contributions of water and live prey as sources of Ni and Tl, to calculate the assimilation efficiency (AE) for the two metals, and to determine the influence of water and prey on the subcellular distribution of these metals in our fish predator. We used environmentally relevant metal concentrations, which were representative of contamination levels observed in impacted regions (based on water and fish stomach content). Fish were exposed for various lengths of time and their subcellular distributions of Ni and Tl were determined. With these data, we estimated the proportions of each metal that were detoxified, bound to physiologically metal-sensitive fractions, or available for transfer to higher consumers, contributing to the knowledge base required for ecological risk assessment of these metals.

Materials and Methods

Sediment Preparation and Prey Contamination

Sediment was collected from Lake Saint Joseph (46°53' N, 71°38' W), a Canadian Shield lake located 40 km northwest of Québec City (Québec, Canada), at a depth of ~ 5 m using an Ekman grab. To this sediment, we added either NiNO₃ (200 g L⁻¹) in 3 L of sediment or TlNO₃ (4 g L⁻¹) in 6 L of sediment to reach nominal concentrations of 180 and 1.3 µg g dry weight⁻¹ for Ni and Tl, respectively. This metal-spiked sediment was mixed and stored at 4°C for 21 days to achieve partial chemical equilibration. Reconstituted water (CaCl₂ 35.3 mg L⁻¹; MgSO₄ 32.8 mg L⁻¹; NaHCO₃ 51.2 mg L⁻¹; KCl 2.1 mg L⁻¹; NaBr 0.55 mg L⁻¹; CaSO₄ 3.4 mg L⁻¹) was used as overlying water. Samples of both clean and contaminated sediments were collected before and during prey contamination for metal analyses then stored at -20°C.

Prey fed to juvenile fathead minnows during the experiment were live *Tubifex tubifex*. Cultures of *T. tubifex* were purchased from Aquatic Research Organisms Inc. (Hampton, NH, USA) and were maintained in the

laboratory in clean sediment from Lake Saint Joseph and reconstituted water as overlying water. To obtain metal-contaminated prey, we cultured *T. tubifex* in the metal-spiked sediment for 3 weeks. Clean and metal contaminated prey were gut purged before being fed to fish. Gut purging of metal contaminated *T. tubifex* consisted of ~ 5 h spent in clean sediment, to push contaminated sediment from the worms, and ~ 19 h spent in clean reconstituted water to clear their guts of any remaining sediment. Clean *T. tubifex* were only purged in reconstituted water for 19 h. Clean and contaminated *T. tubifex* were sampled once a week during the experiment and stored at -20°C for metal analyses.

Test Fish

Juvenile fathead minnows used in the Ni exposure experiment were raised from embryos purchased from Aquatic BioSystems Inc. (Fort Collins, CO, USA) and those used in the Tl exposure experiment were obtained from our breeding culture. In both cases, embryos, larvae, and juveniles were held in reconstituted water having a nominal total hardness of 53 mg L⁻¹ as CaCO₃ and reared according to Canadian Environmental Protection Service (1992). Rearing and experiments were conducted in a temperature-controlled room (23°C) under a 16 h light/8 h dark photoperiod. During the growth period, fish larvae and juveniles were fed either 24-h-old nauplii or frozen adult brine shrimp (*Artemia salina*), respectively (Mirdo Importations, Montréal, QC, Canada). The maintenance conditions and the experiment described below were approved by our local animal care committee.

Experimental Design

Tests were conducted in 60 aerated 450-mL plastic beverage cups inserted into Styrofoam covers fitted on 45-L plastic water containers in which the temperature was maintained at 23°C (15 cups per container). The temperature of the incoming air was tempered by immersing the air lines in the containers. Tests followed a static-renewal design and at least 80% of the exposure water was replaced daily. Exposures were conducted in two series: Tl exposure followed Ni exposure. Fish were 4 months old and weighed 0.35 ± 0.02 and 0.15 ± 0.01 g for Ni and Tl experiments, respectively (data given as mean ± standard error; *n* = 112). In each series, 112 fish were randomly assigned to one of the four experimental treatments (28 individually exposed fish per treatment): control (C), water exposure (W), prey exposure (P), and water and prey exposure (W + P). Nominal environmentally relevant concentrations of metals in water were 15.6 and 0.1 µg L⁻¹ for Ni (NiSO₄) and Tl (TlNO₃), respectively.

Fish were starved for 1 day prior to their placement in the cups and then acclimated to the cups, in clean water, for 1 day. Water in the cups was then replaced, and in treatments W and W + P reconstituted water was replaced by contaminated water. Water samples were taken every 2 days, acidified (1% HNO₃), and stored at 4°C for metal analyses. During water replacement, feces were removed. Fish were fed 5% of their body weight (wet weight of prey to wet weight of fish) daily as prescribed in the biological test method and guidance documents on fathead minnows (EPS 1/RM/22 1992) with either clean (treatments C and W) or metal-contaminated prey (treatments P and W + P). In a preliminary experiment, we confirmed that prey were rapidly consumed by the fish (in < 2 min) and, accordingly, that the leaching of metals from the prey was unlikely to contribute to aqueous metal contamination. Fish were starved for 1 day prior to being sacrificed, which, we assumed, was sufficient to clear the gut. Samples ($n = 7$ fish per treatment) were taken after 2, 4, 6, and 8 days of exposure excluding acclimation and gut clearance (1 day each) and stored at -80°C for subcellular fractionation and metal analyses.

Subcellular Fractionation

Fish were thawed on ice, weighed, chopped with a surgical steel razor blade, and homogenized in 9 vol of sucrose (250 mM) and Tris (10 mM) buffer (pH 7.4) using five low-speed passages in a motorized Potter-Elvehjem homogenizer. To determine total fish Ni and Tl concentrations, an aliquot of the homogenates was taken, weighed, and stored at -20°C for metal analysis. The homogenates were transferred into 1.5-mL flat-top microcentrifuge tubes and were subjected to a differential centrifugation protocol adapted from Wallace et al. (2003) as described by Giguère et al. (2006). Six operationally defined subcellular fractions were obtained with this centrifugation protocol: cellular debris including cell membranes and unbroken cells, granules (and other NaOH-resistant particles), mitochondria, other organelles (microsomes and lysosomes), heat-denatured proteins (HDPs) including enzymes, and heat-stable proteins (HSPs) such as metallothionein (MT). The resistant fraction (granules) was separated from the initial centrifugation pellet using NaOH digestion as described by Giguère et al. (2006). The HDP and HSP fractions were separated by subsequent heat treatment and centrifugation as described by Giguère et al. (2006). Supernatants (cellular debris and HSP) were acidified to 10% HNO₃, diluted to 8.5% HNO₃ with 30% H₂O₂, and stored at 4°C for metal analysis. Pellets (granules, mitochondria, organelles, and HDP) were stored at -20°C for metal analyses.

Metal Analyses and Quality Control

Sediments, prey, pellets, and aliquots were freeze-dried, weighed and digested according to the method described by Borgmann et al. (2001). Metal concentrations in sediment, water, prey, subcellular fractions, and aliquots were analyzed by inductively coupled plasma-mass spectrometry (Model X-7; Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA). Method detection limits for Ni and Tl were 0.011 ± 0.002 and $0.0006 \pm 0.0002 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. A certified biological reference material (TORT-2, lobster hepatopancreas; National Research Council, Ottawa, Ontario, Canada) was submitted to the digestion protocol described above. The recoveries of Ni in TORT-2 reference samples ($n = 8$) was $89\% \pm 2\%$ (mean \pm SE). To our knowledge, no certified biological reference material is available for Tl determination.

To assess the recovery of Tl in subcellular fractions, we used the metal burden determined for the aliquot in a mass balance calculation of all fractions [(sum of metal burdens in the six subcellular fractions/metal burden in the aliquot) \times 100]. The average recovery of Tl was $100\% \pm 1\%$ ($n = 117$; mean \pm SE). Due to analytical interference of calcium oxides in the Ni analyses and because the calcium level in the granule fraction was very high, the Ni burden in the granule fraction was calculated instead of measured using the following equation:

$$Ni_{granule} = Ni_{aliquot} - (Ni_{debris} + Ni_{mitochondria} + Ni_{organelles} + Ni_{HDP} + Ni_{HSP})$$

where $Ni_{aliquot}$ represents the burden of Ni in the homogenates subjected to the subcellular fractionation protocol and $Ni_{(debris, mitochondria, organelles, HDP, \text{ or } HSP)}$ represents the burden of Ni in each of these fractions. A recovery of 100% was thus assumed.

Statistical Analyses and Calculated Parameters

For each dataset, we tested for differences between our experimental treatments. When conditions of normality (using the Shapiro-Wilk test) and of homogeneity of variance (using the Levene test) were violated, we used the nonparametric Kruskal-Wallis test; otherwise one-way analysis of variance (ANOVA) was performed. Multiple comparisons were examined with the Tukey-Kramer HSD test ($p \leq 0.05$). For the Tl dataset, statistical analyses were performed on log₁₀ transformed data. Statistical analyses were performed using JMP IN 7.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

To evaluate if one route of exposure contributed more importantly to the total metal accumulation in our predator, we calculated the newly accumulated metal (NAM):

$$\text{NAM} = (M_{\text{water and/or prey}} - M_{\text{control}})$$

where $M_{\text{water and/or prey}}$ represents the metal concentration in water-, prey-, or water + prey-exposed fish and M_{control} represents the mean metal concentration in control fish.

Assimilation efficiency (AE) was calculated according to the following equation:

$$\text{AE}(\%) = \left[\frac{(M_{\text{prey only}} - M_{\text{control}})}{M_{\text{prey}}} \right] \times 100$$

where $M_{\text{prey only}}$ represents the metal burden in prey-only-treatment fish, M_{control} represents the mean metal burden in control fish, and M_{prey} represents the total amount of metal contained in the prey ingested.

Temporal changes in metal distribution within a given subcellular fraction and for a given treatment were observed only in a few cases, but these trends did not show consistent temporal tendencies. We therefore pooled the fish from each sampling time for a given treatment ($n = 7 \times 4$ sampling times), yielding a higher number of individuals for each treatment ($n = 28$). These pooled data were used for Figs. 3–5. In these figures, a sample size lower than 28 indicates that unreliable metal concentrations or data under the detection limit of the instrument were eliminated.

Subcellular compartments were defined using the biological significance of the various subcellular fractions as described by Wallace et al. (2003) and Wallace and Luoma (2003). Briefly, biologically detoxified metal (BDM) refers to the metal bound to granules and HSP fractions. Metal-sensitive fractions (MSFs) include mitochondria, other organelles, and HDP. Trophically available metal (TAM) represents the metal found in mitochondria, other organelles, HDPs, and HSPs.

Results

Mortality was negligible during the course of the experiment. Only 1 of the 224 fish used in this experiment died. To decrease the stress of transfer to experimental conditions, initial weight was not determined. Therefore, we do not know whether the different treatments led to differences in growth rate during the exposure period (2, 4, 6, or 8 days).

However, in a subsequent experiment where we fed juvenile fathead minnows for 7 days with either clean or contaminated live *T. tubifex* using the same ration, we observed no significant change in weight during the experiment (D. Lapointe and P. Couture, INRS-ETE, unpublished data).

Ni and Tl in Sediment, Water, and Prey

The metal concentrations in our contaminated media were at least 18- and 6.5-fold higher than the control values for Ni and Tl, respectively (Table 1). Whereas *T. tubifex* were an order of magnitude less contaminated than sediment for Ni, for Tl the concentration in *T. tubifex* was similar to the concentration in sediment.

Metal Bioaccumulation, Importance of Each Route of Exposure and Assimilation Efficiency

Total Ni concentrations in control fish remained at a constant level throughout the experiment (Fig. 1a). Ni concentrations in fish receiving Ni from water, prey, or both routes were higher than in control fish after 2 days of Ni exposure and remained constant after 4 days (no statistical differences among days 4, 6, and 8). Total Tl concentrations in control fish also remained low during the experiment but were significantly higher after 6 and 8 days of exposure than after 2 or 4 days. Fish from the three other treatments showed significantly higher Tl concentrations than controls after 2 days of exposure (Fig. 1b). Tl concentrations in water-only-exposed fish remained constant throughout the experiment (no statistical difference between days of exposure), whereas Tl concentrations in fish receiving Tl from prey or from both water and prey were significantly higher after 4 and 6 days of exposure compared to concentrations measured after 8 days, but all were significantly higher than the concentrations measured after only 2 days of exposure.

Under our exposure parameters, after 2 days of exposure, fish accumulated more new Ni from water than prey, but the two individual routes added represented only approximately half of the metal accumulated in fish exposed to both routes simultaneously (Fig. 2a). After 4, 6,

Table 1 Mean nickel (Ni) and thallium (Tl) concentrations measured in sediment, water, and prey (\pm standard error)

	[Ni]		[Tl]	
	Reference	Contaminated	Reference	Contaminated
Sediment ($\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.)	5.64 \pm 0.04	175 \pm 4	0.163 \pm 0.004	1.06 \pm 0.02
Water ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.48 \pm 0.02	16.0 \pm 0.5	0.0089 \pm 0.0009	0.095 \pm 0.001
<i>T. tubifex</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.)	0.56 \pm 0.01	10.0 \pm 0.3	0.166 \pm 0.006	1.4 \pm 0.1

Note. $n = 12$ for sediment, $n = 30$ for water, and $n = 26$ for control and 21 for contaminated prey. For water, reference values include samples from control and prey-only treatments, whereas contaminated values include samples from water-only and water + prey treatments

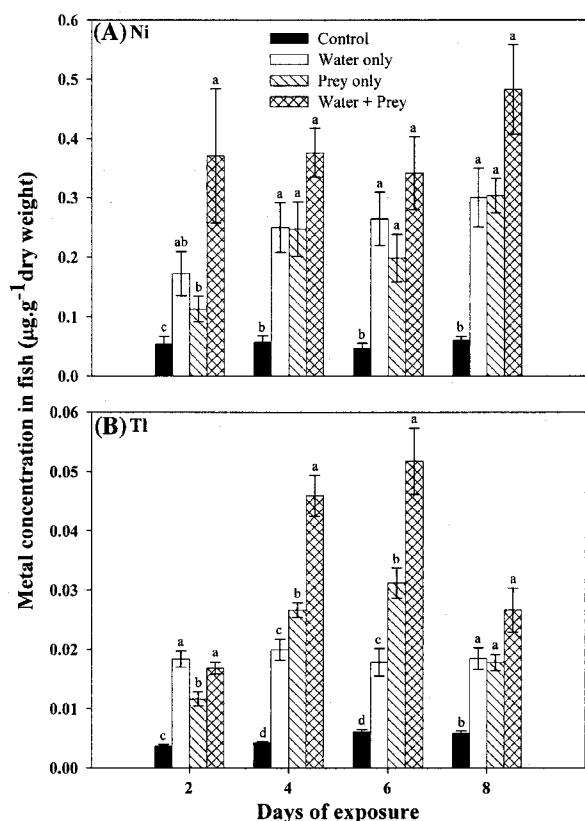


Fig. 1 Ni (a) and Tl (b) concentrations in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to clean water + clean prey (control), contaminated water + clean prey (water only), clean water + contaminated prey (prey only), or contaminated water + contaminated prey (water + prey). Data are mean \pm standard error ($n = 7$, except on day 8, where $n = 5$ for controls and $n = 6$ for water + prey). Significant statistical differences between treatments for a given time are represented by different letters ($p \leq 0.05$)

or 8 days of exposure, newly accumulated Ni was almost equal in water- or prey-exposed fish, and the sum of both individual routes was slightly higher than the newly accumulated Ni measured in fish of the combined exposure (Fig. 2a). For Tl exposures, after 2 days, fish from the water-only treatment had similar concentrations of newly accumulated Tl compared with fish from the water + prey treatment, while fish exposed only to contaminated prey accumulated lower concentrations of new Tl than fish of the two other treatments (Fig. 2b). However, after 4 and 6 days, fish of the prey-only treatment accumulated more new Tl than fish from the water-only treatment, and the two individual routes added represented a slightly lower newly accumulated Tl level than fish from the combined treatment (Fig. 2b). After 8 days, fish from both routes of separate exposures had similar concentrations of newly accumulated Tl, and the sum of both individual routes was

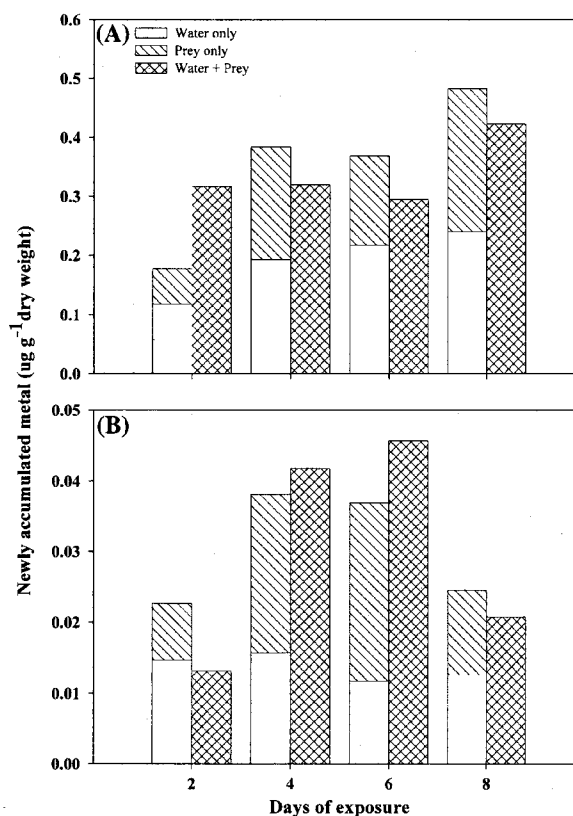


Fig. 2 Concentrations of newly accumulated Ni (a) and Tl (b) in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to contaminated water + clean prey (water only), clean water + contaminated prey (prey only), or contaminated water + contaminated prey (water + prey). Data are shown as mean ($n = 7$, except on day 8, where $n = 5$ [Ni] and $n = 6$ [Tl] for controls and $n = 6$ for water + prey)

slightly higher than the newly accumulated Tl measured in fish of the combined exposure (Fig. 2b).

The mean Ni AE value was $29 \pm 4\%$ (no statistically significant effect of time). For Tl, AE values after 2, 4, 6, and 8 days were $15 \pm 2\%$, $21 \pm 5\%$, $24 \pm 3\%$, and $9 \pm 1\%$ respectively, for a mean value of $17 \pm 2\%$ (AE after 8 days being significantly lower than the AE after 4 and 6 days ($p = 0.006$) but not different from the AE after 2 days).

Subcellular Metal Distribution

Only fish in the water + prey treatment had significantly higher Ni concentrations in the metal-sensitive fractions (mitochondria, organelles, and HDP) than control fish (Fig. 3a). However, Tl concentrations in metal-sensitive fractions tended to increase with exposure ($C < W < P < W + P$) (Fig. 3b).

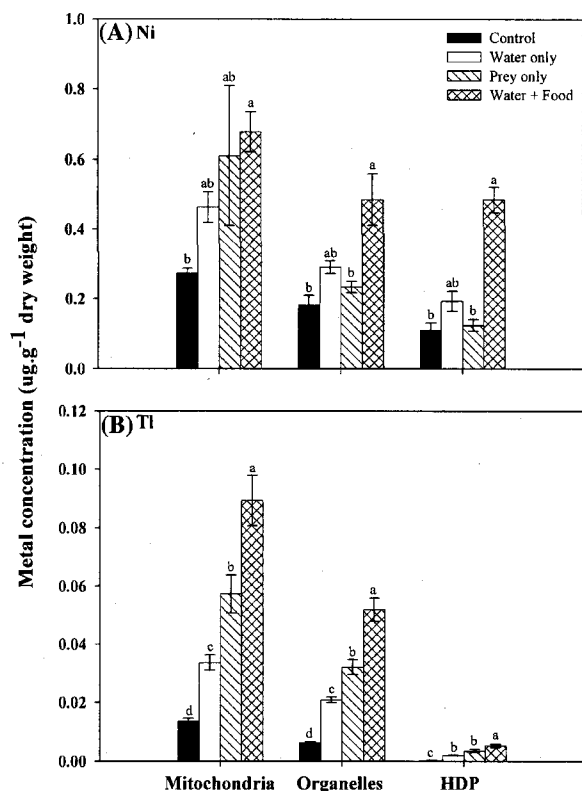


Fig. 3 Ni (a) and Tl (b) accumulation in metal-sensitive fractions (mitochondria, organelles, and HDP) in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to four treatments (as described in the legend of Fig. 1). Data are mean \pm standard error. In a, $n = 21$ for water only and $n = 25$ for control, prey, and water + prey. In b, $n = 27$ for control and water + prey, and $n = 28$ for water only and prey only. Significant statistical differences between treatments for a given subcellular fraction are represented by different letters ($p \leq 0.05$)

Most of the Ni was bound to the HSP, granule, and cellular debris fractions (Fig. 4a). The proportion of Ni found in the HSP fraction was significantly lower in fish of the W and W + P treatments than in controls, and the proportion of Ni bound to the granule fraction was significantly higher in Ni-exposed fish (W, P, and W + P) than in controls (Fig. 4a). Other subcellular fractions played a relatively minor role (<10%) in binding Ni, and Ni-exposed fish tended to have a lower proportion of their Ni bound to these fractions than control fish (Fig. 4a). Most of the Tl was found in three subcellular fractions: granules (29 to 32%), debris (31 to 42%), and HSP (15 to 24%) (Fig. 4b). Significant differences in Tl distribution between treatments were observed in debris, mitochondria, and HSP. Tl-exposed fish had a significantly lower proportion of their Tl bound to the mitochondrial fraction compared to control fish. Fish from the P treatment and the W + P treatment had a significantly lower proportion of their Tl

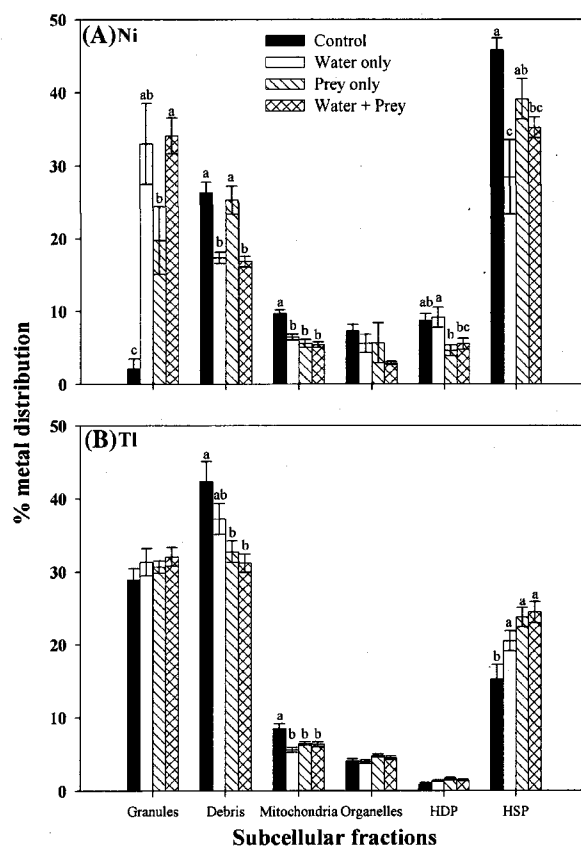


Fig. 4 Ni (a) and Tl (b) subcellular distribution in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to four treatments (as described in the legend of Fig. 1). Data are mean \pm standard error. In a, $n = 24$ for control, $n = 20$ for water only and $n = 27$ for prey and water + prey. In b, $n = 27$ for control and water + prey, and $n = 28$ for water only and prey only. Significant statistical differences between treatments for a given subcellular fraction are represented by different letters ($p \leq 0.05$)

bound to the debris and a significantly higher proportion bound to the HSP fraction compared to controls.

When we examined the subcellular distribution of metals according to the classification proposed by Wallace and Luoma (2003) and Wallace et al. (2003), a higher proportion of the Ni was biologically detoxified in Ni-exposed fish than in controls (Fig. 5a). Consequently, Ni-exposed fish tended to have lower proportions of Ni bound to MSF and debris than control fish (Fig. 5a). Control fish had a greater proportion of their Ni available for trophic transfer (i.e., TAM) than Ni-exposed fish (Fig. 5a). Tl-exposed fish detoxified a higher proportion of their Tl than control fish, whereas water-only-exposed fish had a lower proportion of their Tl bound to MSF compared to controls (Fig. 5b). Finally, fish from the P and W + P treatments had a significantly higher proportion of trophically available Tl than the control group.

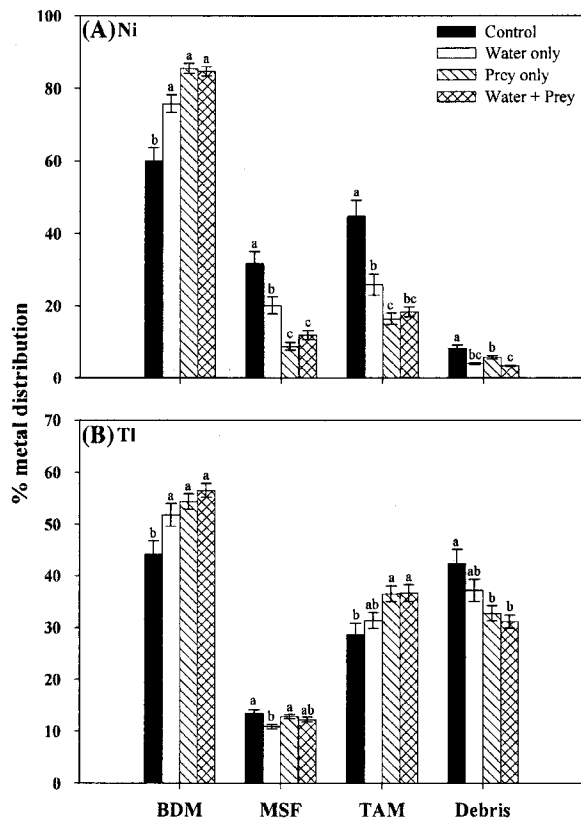


Fig. 5 Proportions of total Ni (a) or Tl (b) that are either biologically detoxified (BDM), found in metal-sensitive fractions (MSFs), trophically available (TAM), or found in the cellular debris fraction (debris) in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to four treatments (as described in the legend of Fig. 1). Data are mean \pm standard error. In a, $n = 24$ for control, $n = 20$ for water only, and $n = 27$ for prey and water + prey. In b, $n = 27$ for control and water + prey, and $n = 28$ for water only and prey only. Significant statistical differences between treatments for a given subcellular fraction are represented by different letters ($p \leq 0.05$)

Discussion

Our water Ni contamination level ($16.0 \pm 0.5 \mu\text{g L}^{-1}$) was higher than the range of concentrations measured by Pyle et al. (2005) in reference lakes ($7.0\text{--}9.7 \mu\text{g L}^{-1}$) in the Sudbury region (Ontario, Canada) but lower than their least contaminated lake ($52.0 \pm 2.6 \mu\text{g L}^{-1}$). Our prey Ni contamination level ($10.0 \pm 0.3 \mu\text{g g}^{-1}\text{d.w.}$) was in the range of values measured for gut contents (7.2 ± 2.5 to $52.2 \pm 7.5 \mu\text{g g}^{-1}\text{d.w.}$) of yellow perch sampled in lakes of the Sudbury region having similar levels of contamination (P. Couture, unpublished data). Our contaminated water Tl concentration ($0.166 \pm 0.006 \mu\text{g L}^{-1}$) corresponds to the median value measured in eastern Canada ($0.159 \mu\text{g L}^{-1}$) (Cheam 2001) and was approximately 10 times higher than concentrations measured in the Great Lakes (Lin and Nriagu 1999). To our knowledge, there are no fish stomach or

gut contents Tl data available in the literature. However, our prey Tl contamination level ($1.4 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1}\text{d.w.}$) corresponds to the estimated Tl concentration ($1.5 \mu\text{g g}^{-1}$) in lake trout of Lake Michigan (Lin et al. 2001).

The concentrations of newly accumulated Ni measured in fish exposed from water or prey only presented in Fig. 2A demonstrate that under our environmentally relevant concentrations, both water and live *T. tubifex* can be important routes of Ni exposure for juvenile fathead minnows. Moreover, these results suggest that Ni was internalized by a pump or another transporter present in the epithelial tissue of both the gill and the digestive tract. Also, the absence of temporal tendencies in total Ni concentrations (except for fish of the prey-exposure treatment) (Fig. 1A) suggests that regulation mechanisms were rapidly engaged to limit Ni uptake or to enhance Ni excretion. Our results do not allow us to propose such a mechanism, and to our knowledge, there are no studies on Ni uptake or regulation in fish using similar levels of contamination. Although Ni essentiality in fish is not established, our results corroborate previous studies on Ni accumulation and tissue distribution that suggested homeostatic regulation of Ni (Ray et al. 1990; Ptashynski and Klaverkamp 2002; Chowdhury et al. 2008), a characteristic typical of essential metals (Muysen et al. 2004).

Bioaccumulation of waterborne Tl was more rapid than dietborne Tl. After 2 days of exposure, water-exposed fish reached similar Tl concentrations as fish exposed to Tl from both routes simultaneously. However, whole-body concentrations in water-exposed fish had reached a plateau at that time, suggesting a rapid solicitation of regulatory processes in the gills limiting Tl uptake and accumulation. Bioaccumulation of dietborne Tl after 2 days of exposure was lower than from the aqueous source but, nevertheless, significantly higher than the concentration in the controls. Total Tl accumulation from prey or from both water and prey simultaneously increased from day 2 until day 6 and decreased at day 8. These results suggest the activation of regulation mechanisms in the gut to control dietborne Tl uptake or elimination. We found no studies on Tl uptake in fish. Nevertheless, potassium (K) concentrations in the water affected Tl uptake in two species of phytoplankton (Twiss et al. 2004) and in *Hyalella azteca* (Borgmann et al. 1998). Thus, the site of entry and/or the regulation of Tl could be related to K homeostasis in the epithelial cells. As for Ni, our results of newly accumulated Tl suggest that in the context of our study, both water and prey can be significant sources of Tl for juvenile fathead minnows (Fig. 2b). However, the patterns of newly accumulated metal we obtained apply only to our experimental conditions, considering that the relative contribution of each source may be influenced by factors such as the concentration in each medium and metal bioavailability.

Relationships between metal distribution within a prey and its assimilation by a predator vary widely. Metal AEs in marine herbivores (Reinfelder and Fisher 1991) and grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) (Wallace and Lopez 1996) are reported to be directly related to the proportions of metal that are in the cytoplasm of their prey. In contrast, studies on fish report Cd AEs of 3–19% in mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) (Seebaugh et al. 2005) and 9.8% in common carp (*Cyprinus carpio*) (Redeker et al. 2007), whereas the proportion of Cd that is estimated to be potentially available to these predators (TAM) was ~68% and 72% in their respective prey types. Moreover, Zhang and Wang (2006) showed that the assimilation of dietary Cd, Se, and Zn in a marine fish, *Terapon jarbua*, was determined by the subcellular distribution of the metal in the prey but also by the digestive physiology of the fish. Our results are quite different from those of Wallace and Luoma (2003), who reported an approximately 1:1 relationship between the proportion of Cd bound to TAM fractions in *Potamocorbula amurensis* and Cd AE in the oriental shrimp *Palaemon macrodactylus* but are in the range of AE values reported for different metals in fish (AEs for Cd, Se, and Zn in *Terapon jarbua* are 3–9%, 13–36%, and 2–52%, respectively [Zhang and Wang 2006]). Regarding our predator-prey system, a recent study showed that the oligocheate *T. tubifex* accumulated both Ni and Tl and that the proportion of internalized metal considered to be trophically available (TAM) was 84% and 49%, respectively (Dumas and Hare 2008). In contrast, our mean values for the AE of Ni and Tl were only $29 \pm 4\%$ and $17 \pm 2\%$ for Ni and Tl, respectively, which is only one-third of the proportions estimated to be available for uptake. Dumas and Hare (2008) obtained AEs of ~83% and 70% for Ni and Tl, respectively, in the alderfly *Sialis velata* fed with the same prey as in this study (*T. tubifex*). Thus, the substantially lower AEs measured in fish (29% and 17%) compared to the AEs obtained in this invertebrate predator (83% and 70%) are linked either to important digestive and physiological differences (i.e., gut passage time, gut chemistry or gut epithelium properties) between the two predators, or to a higher capacity for regulating gut metal uptake in the fish, or to both.

To our knowledge, only two previous studies have examined the subcellular distribution of Ni in fish tissues: olfactory epithelium and nerve of northern pike (*Esox lucius*) (Tallkvist et al. 1998) and liver of wild yellow perch (*Perca flavescens*) (Giguère et al. 2006). Since those studies examined the Ni subcellular distribution in a given organ, in contrast to our study, where we examined the whole organisms, and since we did not exactly characterize the same subcellular fractions, our study cannot be compared with theirs. Regardless of the route of exposure, more of the Ni accumulated in our fish was bound to the

HSP, granule, and cellular debris fractions than to the HDP, and for the granule fraction, the proportion of Ni was higher in Ni-exposed fish ($20 \pm 5\%$ to $34 \pm 2\%$) than in the control group ($2 \pm 1\%$). Nevertheless, regulation mechanisms appear to have been inadequate for fathead minnows receiving Ni from both routes simultaneously because the Ni concentrations measured in potentially metal-sensitive fractions of the water + prey treatment were higher than in control fish, suggesting that simultaneous exposure to both sources of Ni may represent a threat for juvenile fathead minnows. The higher Ni concentrations measured in mitochondria could affect metabolic capacities or increase oxidative stress. Moreover, the presence of Ni bound to microsomes, lysosomes, or HDP (e.g., enzymes) could decrease their capacity to assume their respective roles in fish cells.

We are aware of only one study on Tl subcellular distribution, reporting observations for two invertebrate species: *Chironomus riparius* and *T. tubifex* (Dumas and Hare, 2008). In *C. riparius*, Tl was found in HSP > debris > organelles > granules > HDP, whereas in *T. Tubifex*, the proportion of Tl found in the granules, debris, organelles, and HSP were similar and significantly higher than the proportion of Tl bound to HDP (Dumas and Hare 2008). The distribution in the latter species was similar to our observations for fathead minnows, considering that their “organelle” fraction also contained the mitochondria. In our fish, Tl was mostly bound to three fractions: granules, cellular debris, and HSP. The increased proportion of Tl bound to the HSP fraction in Tl-exposed fish suggests the stimulation of this detoxification mechanism in juvenile fathead minnows. The higher Tl concentrations in potentially metal-sensitive fractions of Tl-exposed fish compared to controls (the difference being even greater for dietary Tl exposure) (Fig. 3b) suggest that the increased detoxification shown in Figs. 4 and 5 was insufficient to protect sensitive subcellular compartments and that dietborne Tl may represent a greater threat than aqueous sources for juvenile fathead minnows.

In the context of ecological risk assessment, we must also consider our fish as potential prey for piscivores, including humans. Since metal AE by our predator was only one-third of what was estimated to be bioavailable according to the TAM concept, one can speculate that the AE of a predator feeding on our fish would also be lower than the proportion of metal bound to the TAM fractions. Our results indicate that the estimated proportions of trophically available Ni in Ni-exposed fish and controls are approximately 50% and 72%, respectively. Nevertheless, since the Ni concentration in three of the subcellular fractions constituting the TAM (mitochondria, other organelles, and HDP) of Ni-exposed fish was higher than in controls, a significant Ni burden could be transferred to

higher consumers feeding on Ni-contaminated fish, depending on the AE of the predator. In contrast to Ni, the proportion of trophically available Tl was significantly higher in fish exposed to Tl (~ 36%) compared to the control group (~ 28%), but the Tl concentrations in three subcellular fractions of the TAM (mitochondria, other organelles, and HDP) were also higher in Tl-exposed fish compared to control fish. Trophic transfer of Tl from contaminated fathead minnows to a predator could therefore be important.

Under our environmentally relevant concentrations, both water and live prey contributed to the accumulation of new Ni and Tl in juvenile fathead minnows. In the case of Ni, our results suggest that both sources induced regulation mechanisms in our predator. In contrast, aqueous Tl appeared to be better regulated than the dietary form. Trophic transfer of both Ni and Tl from *T. tubifex* to fathead minnows was lower than the proportion of metal considered to be trophically available in this prey species and lower than the assimilation measured in the invertebrate predator *Sialis velata* (Dumas and Hare 2008). In fact, approximately 65% of the TAM of both Ni and Tl in *T. tubifex* was not assimilated by our fish. Once assimilated by fish, both metals were mostly bound to the HSP, granule, and debris fractions. However, in metal-exposed fish, the increased concentrations of both elements in metal-sensitive subcellular fractions allow us to propose that, in the context of our study, exposure to both sources of metals represents a risk of toxicity, considering the physiological roles of these cellular constituents.

Acknowledgments This study was supported by a grant from the Metals in the Human Environment Strategic Network (MITHE-SN). We thank L. Hare for his comments on the manuscript. We would also like to thank Mélanie Massias for her help during the experiments and acknowledge the assistance of Michelle Geoffroy-Bordeleau and Pauline Fournier with the metal analyses.

References

- Borgmann U, Cheam V, Norwood WP, Lechner J (1998) Toxicity and bioaccumulation of thallium in *Hyalella azteca*, with comparison to other metals and prediction of environmental impact. *Environ Pollution* 99:105–114. doi:10.1016/S0269-7491(97)00181-4
- Borgmann U, Néron R, Norwood WP (2001) Quantification of bioavailable nickel in sediments and toxic thresholds to *Hyalella azteca*. *Environ Pollut* 111:189–198. doi:10.1016/S0269-7491(00)00076-2
- Canadian Environmental Protection Service (1992) Biological test method: test of larval growth and survival using fathead minnows. EPS 1/RM/22. Environment Canada, Ottawa, Ontario
- Chapman PM, Wang F (2000) Issues in ecological risk assessment of inorganic metals and metalloids. *Hum Ecol Risk Assess* 6:965–988. doi:10.1080/10807030091124392
- Chau YK, Kulikovskiy-Cordeiro OTR (1995) Occurrence of nickel in the Canadian environment. *Environ Rev* 3:95–120
- Cheam V (2001) Thallium contamination of water in Canada. *Water Qual Res J Can* 36:851–877
- Chowdhury MJ, Bucking C, Wood CM (2008) Pre-exposure to waterborne nickel downregulates gastrointestinal nickel uptake in rainbow trout: indirect evidence for nickel essentiality. *Environ Sci Technol* 42:1359–1364. doi:10.1021/es071889n
- Clearwater SJ, Farag AM, Meyer JS (2002) Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 132:269–313
- Couture P, Busby P, Gauthier C, Rajotte JW, Pyle GP (2008) Seasonal and regional variations of metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. I. Factors influencing tissue metal concentrations. *Hum Ecol Risk Assess* 14(1):97–125. doi:10.1080/10807030701790330
- Croisètière L, Hare L, Tessier A (2006) A field experiment to determine the relative importance of prey and water as sources of As, Cd, Co, Cu, Pb and Zn for the aquatic invertebrate *Sialis velata*. *Environ Sci Technol* 40:873–879. doi:10.1021/es0516209
- Dumas J, Hare L (2008) The internal distribution of nickel and thallium in two freshwater invertebrates and its relevance to trophic transfer. *Environ Sci Technol* 42:5144–5149. doi:10.1021/es800378j
- Fisher NS, Hook SE (2002) Toxicology tests with aquatic animals need to consider the trophic transfer of metals. *Toxicology* 181–182:531–536. doi:10.1016/S0300-483X(02)00475-4
- Giguère A, Campbell PGC, Hare L, Couture P (2006) Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquat Toxicol* 77:178–189. doi:10.1016/j.aquatox.2005.12.001
- Griscom SB, Fisher NS (2002) Uptake of dissolved Ag, Cd, and Co by the clam, *Macoma balthica*: relative importance of overlying water, oxic pore water, and burrow water. *Environ Sci Technol* 36:2471–2478. doi:10.1021/es0112689
- Griscom SB, Fisher NS, Luoma SN (2002) Kinetic modeling of Ag, Cd and Co bioaccumulation in the clam *Macoma balthica*: quantifying dietary and dissolved sources. *Mar Ecol Prog Ser* 240:127–141. doi:10.3354/meps240127
- Hare L, Tessier A, Borgmann U (2003) Metal sources for freshwater invertebrates: pertinence for risk assessment. *Hum Ecol Risk Assess* 9:779–793. doi:10.1080/713610009
- Lin T-S, Nriagu J (1999) Thallium speciation in the Great Lakes. *Environ Sci Technol* 33:3394–3397. doi:10.1021/es981096o
- Lin T-S, Nriagu J, Wang X-Q (2001) Thallium concentration in lake trout from Lake Michigan. *Bull Environ Contam Toxicol* 67:921–925. doi:10.1007/s001280209
- Luoma SN, Johns C, Fisher NS, Steinberg NA, OremLand RS, Reinfelder JR (1992) Determination of selenium bioavailability to a benthic bivalve from particulate and solute pathways. *Environ Sci Technol* 26:485–491. doi:10.1021/es00027a005
- Munger C, Hare L (1997) Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): implications for predicting Cd bioaccumulation in nature. *Environ Sci Technol* 31:891–895. doi:10.1021/es9606440
- Muyssen BTA, Brix KV, DeForest DK, Janssen CR (2004) Nickel essentiality and homeostasis in aquatic organisms. *Environ Rev* 12:113–131. doi:10.1139/a04-004
- Ptashynski MD, Klaverkamp JF (2002) Accumulation and distribution of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquat Toxicol* 58:249–264. doi:10.1016/S0166-445X(01)00231-4
- Pyle GG, Rajotte JW, Couture P (2005) Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient.

- Ecotoxicol Environ Safe 61:287–312. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.09.003
- Ralph L, Twiss MR (2002) Comparative toxicity of thallium (I), thallium (II) and cadmium (II) to the unicellular alga *Chlorella* isolated from lake Erie. *Bull Environ Contam Toxicol* 68:261–268
- Redeker ES, van Campenhout K, Bervoets L, Reijnders H, Blust R (2007) Subcellular distribution of Cd in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*, implications for trophic availability and toxicity. *Environ Pollut* 148:166–175. doi:10.1016/j.envpol.2006.10.031
- Reinfelder JR, Fisher NS (1991) The assimilation of elements ingested by marine copepods. *Science* 251:794–796. doi:10.1126/science.251.4995.794
- Roy I, Hare L (1999) Relative importance of water and food as cadmium sources to the predatory insect *Stalis velata* (Megaloptera). *Can J Fish Aquat Sci* 56:1143–1149. doi:10.1139/cjfas-56-7-1143
- Seebaugh DR, Goto D, Wallace WG (2005) Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain. *Mar Environ Res* 59:473–491. doi:10.1016/j.marenvres.2004.07.003
- Spry DJ, Hodson PV, Wood CM (1988) Relative contributions of dietary and waterborne zinc in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can J Fish Aquat Sci* 45:32–41
- Tallkvist J, Henriksson J, D'Argy R, Tjälve H (1998) Transport and subcellular distribution of nickel in the olfactory system of pikes and rats. *Toxicol Sci* 43:196–203. doi:10.1093/toxsci/43.2.196
- Twiss MR, Twining BS, Fisher NS (2004) Bioconcentration of inorganic and organic thallium by freshwater phytoplankton. *Environ Toxicol Chem* 23(4):968–973. doi:10.1897/02-643
- Vijver MG, Van Gestel CAM, Lanno RP, Van Straalen NM, Peijnenburg WJGM (2004) Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review. *Environ Sci Technol* 8(18):4705–4712. doi:10.1021/es040354g
- Wallace WG, Lopez GR (1996) Relationship between subcellular cadmium distribution in prey and cadmium trophic transfer to a predator. *Estuaries* 19:923–930. doi:10.2307/1352308
- Wallace WG, Luoma SN (2003) Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Mar Ecol Prog Ser* 257:125–137. doi:10.3354/meps257125
- Wallace WG, Lee BG, Luoma SN (2003) Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar Ecol Prog Ser* 249:183–197. doi:10.3354/meps249183
- Wang WX, Fisher NS (1999) Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: a synthesis. *Environ Toxicol Chem* 18:2034–2045. doi:10.1897/1551-5028(1999)018<2034:AEOCCI>2.3.CO;2
- WHO (1996) Thallium. *Environmental Health Criteria No. 182*. World Health Organization, Geneva
- Williams DR, Giesy JP Jr (1978) Relative importance of food and water sources to cadmium uptake by *Gambusia affinis* (Poeciliidae). *Environ Res* 16:326–332. doi:10.1016/0013-9351(78)90165-2
- Xu Y, Wang WX (2002) Exposure and potential food chain transfer factor of Cd, Se and Zn in marine fish *Lutjanus argentimaculatus*. *Mar Ecol Prog Ser* 238:173–186. doi:10.3354/meps238173
- Zhang L, Wang WX (2005) Effects of Zn pre-exposure on Cd and Zn bioaccumulation and metallothionein levels in two species of marine fish. *Aquat Toxicol* 73:353–369. doi:10.1016/j.aquatox.2005.04.001
- Zhang L, Wang WX (2006) Significance of subcellular metal distribution in prey in influencing the trophic transfer of metals in a marine fish. *Limnol Oceanogr* 51(5):2008–2017

9 2^e Article

Accumulation and effects of nickel and thallium in early life stages of
fathead minnows (*Pimephales promelas*)

Dominique Lapointe and Patrice Couture

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

Soumis à *Ecotoxicology and Environmental Safety* le 15 juin 2009



Accumulation and effects of nickel and thallium in early life stages of fathead minnows
(*Pimephales promelas*)

Dominique Lapointe and Patrice Couture

Institut National de la Recherche Scientifique – Centre Eau Terre Environnement (INRS-ETE), 490 rue de la Couronne, Québec, QC, G1K 9A9, Canada.

Corresponding author: Patrice Couture

INRS-ETE, Université du Québec, 490 de la Couronne, Québec, QC, G1K 9A9, Canada.

Patrice.couture@ete.inrs.ca

Tel: (418) 654-3825

Fax: (418) 654-2600

Abstract

Early-life stages of fathead minnows were exposed to environmentally relevant concentrations of aqueous and dietary nickel and thallium and metal accumulation was monitored from the embryo until the larvae reached 21 days after hatching. During and after metal exposure, 6 toxicity endpoints were measured: time to hatch, embryo survival rate, routine metabolic rate and the activity of key enzymes (lactate dehydrogenase, nucleoside diphosphate kinase (NDPK), cytochrome C oxidase (CCO)). Although both Ni and Tl bioaccumulation were significant in embryos and non-feeding larvae, water was the major source of Ni and Tl in feeding larvae. Exposure to aqueous Ni decreased time to hatch and increased aerobic and biosynthetic capacities (as indicated by a higher activity of CCO and NDPK, respectively), suggesting that aqueous Ni exposure stimulates metabolism in early-life stages of fathead minnows.

Keywords: fish, *Pimephales promelas*, nickel, thallium, routine metabolic rate, time to hatch, nucleoside diphosphate kinase.

Introduction

Anthropogenic sources of nickel (Ni) in natural ecosystems include mining, smelting, refining, metal reprocessing, fuel combustion and waste incineration (Chau and Kulikovskiy-Cordeiro, 1995) whereas thallium (Tl) can be released from the smelting of sulphuric ores, cement manufacturing, coal burning and high technology industries that produce optical glass, alloys, semiconductors, and photoelectric cells (WHO, 1996; Ralph and Twiss, 2002). Ecological risk assessment of trace elements, like Ni and Tl, requires key information including exposure and effects characterization (Chapman and Wang, 2000). One component of exposure characterization involves the identification of the sources of metal (i.e. water vs food). Fish living in impacted lakes are exposed to aqueous and dietary metals throughout their life-cycle and hence are prone to metal accumulation and toxicity from the embryo stage. Previous studies have demonstrated that both water (Griscom and Fisher, 2002; Hare et al., 2003; Couture et al., 2008a) and food (including organic detritus, vegetation, and prey) (Reinfelder and Fisher, 1991; Wang and Fisher, 1999; Hare et al., 2003) can be important sources of metals for aquatic organisms, including fish. Nevertheless, there is still little information on Ni and Tl sources and knowledge gaps remain to be addressed regarding metal accumulation in fish early-life stages.

Further to the characterization of exposure sources, effects of Ni and Tl in fish remain largely unknown and are important to investigate. Typically, metal toxicity varies among species, metals and physico-chemical conditions. In fish, embryos and young larval stages are the most sensitive to many pollutants (McKim, 1977; Macek and Sleight, 1977). In fathead minnows, adverse effects of aqueous Ni exposure may include decreased egg production, decreased hatching rate and decreased time to hatch (Pickering, 1974; Pyle et al., 2002), young stages being significantly more sensitive than adults (Hoang et al., 2004). Ptashynski et al. (2002) showed that dietary Ni induced histological alterations in kidney, increased metallothionein concentrations in the intestine and varied levels of plasma lipid peroxides in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). Acute exposure of fish to aqueous Tl is lethal in 72 h at concentrations of 10-60 mg L⁻¹ (Nehring, 1962) but Zitko et al. (1975) reported that Tl was much more acutely toxic than these values to Atlantic salmon (approximately equal to that of copper).

Although these studies suggested a metabolic cost associated to metal exposure, there is still a lack of information regarding exposure to environmentally relevant concentrations. Therefore, we chose to examine the effect of realistic Ni and Tl concentrations on metabolic capacities using various indicators. The use of oxygen consumption rate as an indicator of aerobic metabolism in fish as been described by Fry (1971). Routine metabolic rate (RMR) represents the mean metabolic rate observed in a fasted fish for which the rate of oxygen consumption is influenced by random activity under experimental conditions reducing its movements or limiting external stimuli (Fry, 1971). RMR determination was used to evaluate the impact of our experimental treatments on fathead minnow larvae metabolic requirements. Cytochrome c oxidase (CCO or complex IV) is the last enzyme of the electron transport chain in the mitochondria and also serves as an indicator of aerobic metabolism. By transferring electrons obtained from other the complexes to oxygen to form water, CCO translocates protons across the membrane, creating the electrochemical potential essential for ATP synthesis. NDPK was used to assess the influence of these contaminants on biosynthesis. NDPK catalyses the exchange of phosphate groups for the synthesis of nucleoside triphosphates required for biosynthetic activities (nucleic acid synthesis, lipid synthesis, polysaccharide synthesis, protein elongation). Finally, in absence of oxygen, lactate dehydrogenase (LDH) converts pyruvate (the final product of glycolysis) to lactate, and concomitantly NADH to NAD⁺, which is essential to maintain the glycolysis. Thus, lactate dehydrogenase serves as an indicator of anaerobic capacities.

The first objective of this study was to investigate the contribution of water and prey as metal sources for early-life stages of fathead minnows. Thus, we measured aqueous and dietary Ni and Tl bioaccumulation by exposing embryos to different treatments throughout development until the larvae reached 21 days after hatching. Our second objective was to evaluate the toxicity of environmentally realistic concentrations of Ni and Tl on fathead minnow embryos and larvae using time to hatch, survival rate, routine metabolic rate and the activity of key enzymes of aerobic (CCO), anaerobic (LDH) and biosynthetic (NDPK) capacities as sublethal toxicity endpoints.

Materials and methods

Test fish and experimental design

Fathead minnow embryos (24 h post fertilization) were purchased from Aquatic BioSystems Inc. (Fort Collins, Colorado, USA) and received in two lots within a period of 57 days during the Summer of 2007. Embryos originated from the same breeding colony. Handling and transport conditions as well as maintenance parameters at Aquatic BioSystems Inc. and in our facilities were also constant throughout this period. At their arrival, they were sorted to discard dead or unfertilized embryos and distributed in 30 groups of approximately 100 embryos into the experimental setup where they were kept in reconstituted water (CaCl_2 35.3 mg L⁻¹; MgSO_4 32.8 mg L⁻¹; NaHCO_3 51.2 mg L⁻¹; KCl 2.1 mg L⁻¹; NaBr 0.55 mg L⁻¹; CaSO_4 3.4 mg L⁻¹) having a nominal total hardness of 53 mg L⁻¹ as CaCO_3 . Experiments were conducted in a temperature controlled room (23°C) under a 16 h light and 8 h dark photoperiod. Embryos were kept in clean reconstituted water overnight prior to the beginning of the experiment. The experiments described below were approved by our local animal care committee.

Tests were conducted in 30 aerated 450-mL plastic beverage cups inserted into Styrofoam covers fitted on 45 L plastic temperature-controlled (23°C) water containers (15 cups to a container). The temperature of the incoming air was tempered by immersing the air lines in the containers. Fish were exposed to only one metal (either Ni or Tl), but exposures to both metals were performed concurrently. For each metal, the experiment included a total of six treatments to which fish were randomly assigned: control (C), water-low concentration exposure (WL), water-high concentration exposure (WH) prey (*Artemia salina*) exposure (P), prey and water-low concentration exposure (P+WL) and prey and water-high concentration exposure (P+WH). Each treatment had 5 replicates (5 individual cups). Nominal environmentally relevant concentrations of metals in water were 25 (low) and 250 (high) µg L⁻¹ for Ni (NiSO_4) and 0.1 (low) and 1.0 (high) µg L⁻¹ for Tl (TlNO_3). The low Ni concentration was chosen to represent the Ontario Provincial Water Quality Objective (25 µg L⁻¹; P.W.Q.O., 1994) whereas the high Ni concentration represented concentrations measured in contaminated lakes near Sudbury, Ontario (range from 52 to 338 µg L⁻¹; Pyle et al., 2005).

The low aqueous Tl concentration ($0.1 \mu\text{g L}^{-1}$) was approximately 10 times higher than the range of values reported for the Great Lakes, Canada (ranging from 0.008 to $0.014 \mu\text{g L}^{-1}$; Lin and Nriagu, 1999) but was lower than the mean concentration measured near coal mines and power plants in Eastern Canada ($1.38 \pm 0.5 \mu\text{g L}^{-1}$; Cheam, 2001) whereas our water high Tl concentration ($1.0 \mu\text{g L}^{-1}$) was similar to the mean concentration measured in Eastern Canada. Since we used Tl(I) to prepare the exposure medium, that Tl(I) is the redox stable form of Tl in oxic freshwaters and that Tl(I) is mainly oxidized to Tl(III) by planktonic bacteria (Twining et al., 2003), we supposed that the predominant form of Tl in our experiment was Tl(I).

Exposures were conducted in two series: treatments C, WL and WH (series 1) were followed by treatments P, P+WL and P+WH (series 2). At the beginning of the experiment, water in the cups was replaced and in treatments WL, WH, P+WL and P+WH, contaminated water was used instead of reconstituted water. Tests followed a static-renewal design and at least 80% of the exposure water was replaced daily. Water replacement was performed approximately 1 h after feeding to minimize the contribution of leaching metals from the prey to aqueous metal contamination (for treatments P, P+WL and P+WH) or the contribution of aqueous metal uptake by the prey to dietary exposure (for treatments WL, WH, P+WL and P+WH). Water samples were taken every 3 d, in three replicates for each concentration, after feeding and before water replacement but ensuring that samples were exempt of prey. Water samples were acidified (to 2% with concentrated trace metal grade HNO_3) and stored at 4°C for metal analyses. Throughout the exposure period, each replicate was examined daily, and deaths and hatching events were recorded for later calculation of survival rate and time to hatch.

Larvae were fed *ad libitum*, daily, with either clean (treatments C, WL and WH) or metal-contaminated (treatments P, P+WL and P+WH) prey starting 72 h after hatching. Prey were 24 h old nauplii of brine shrimps (*A. salina*) cultured in 35 ppt saltwater in our laboratory from cysts purchased from Mirdo Importations (Montreal, QC, Canada). Prey were filtered and rinsed with ultra pure water before being fed to the larvae. Contaminated *A. salina* were cultured in Ni (NiSO_4 ; $525 \mu\text{g L}^{-1}$) or Tl (TlNO_3 ; $1.35 \mu\text{g L}^{-1}$) contaminated saltwater. These concentrations were chosen to produce prey having environmentally relevant metal concentrations. Ni concentrations in contaminated prey ($14 \pm 2 \mu\text{g g}^{-1}$ d.w.;

Table 1) were in the range of concentrations measured for gut contents (7.2 ± 2.5 to 52.2 ± 7.5 $\mu\text{g g}^{-1}\text{d.w.}$) of yellow perch sampled in Ni contaminated lakes of the Sudbury region (P. Couture, INRS-ETE, unpublished data). To our knowledge, there are no fish stomach or gut content Tl concentrations published to date. However, the Tl concentration in contaminated prey (0.086 ± 0.006 $\mu\text{g g}^{-1}\text{d.w.}$; Table 1) was only 2- to 12-fold lower than Tl bioaccumulation values reported for *Hyaella azteca* exposed to sediment from Lake Ontario and surrounding areas ($0.16 - 1.02$ $\mu\text{g g}^{-1}\text{d.w.}$; Borgmann et al. 1998), suggesting that in natural ecosystems fish may indeed be exposed to levels of dietary Tl similar to the level of contamination we used.

Exposure lasted until larvae reached 21 d after hatching. One sample of ten embryos was taken in each replicate after 24 and 48 h of exposure and one sample of ten larvae was taken in each replicate after 1, 7, 14 and 21 d of exposure after hatching. Samples were stored at -80°C for metal analyses. Remaining larvae from each treatment were used to determine the routine metabolic rate and the enzymatic activities.

Routine metabolic rate determination

At the end of the experiment, the remaining larvae were starved for 24 h, separated in groups of 5 individuals (at least one group per replicate, depending on the number of larvae remaining) and placed into a 60 c.c. syringe for an acclimation period of 30 min. The syringes were modified to insert an oxygen electrode and two Tygon tubes (R-3603) for water circulation into the syringe. Water circulation was assured by a Masterflex LS peristaltic pump (model 7519-10; Cole and Parmer Canada Inc., Montreal, QC, Canada). After the acclimation period, the dissolved oxygen probe (model E101; Analytical Sensors & Instruments Ltd., Sugar Land, TX, USA) and the circulation tubing were inserted into the syringe and the junction between the syringe and the electrode was sealed. The oxygen concentration was monitored using an OM 200 oxygen meter (Cameron Instruments Inc., Guelph, ON, Canada) and were transferred to a computer using a Vernier LabPro interface and the Logger Pro 3.2 software (Qubit Systems, Kingston, ON, Canada). Oxygen consumption by the larvae was monitored during approximately 2 h. At the end of the oxygen consumption measurement, the larvae were immediately weighed, transferred into a

cryogenic tube and stored in a -80°C freezer for enzyme analysis. The routine metabolic rate (RMR) was calculated using the following equation:

$$\text{RMR (mg O}_2\text{ kg}^{-1}\text{ h}^{-1}) = \left(\frac{\text{slope} \times \text{volume}}{\text{weight}} \right)$$

where slope represents the change in oxygen concentration in mg O₂ L⁻¹ h⁻¹, volume represents the volume of water in the syringe in L and weight represents the total weight of the larvae in kg.

Enzyme analysis

The groups of five larvae kept at -80°C after the routine metabolic rate determination were thawed on ice, diluted in 9 volumes of cold homogenizing buffer (pH 7.5; 20 mM HEPES; 1 mM EDTA; 0.1% Triton X-100) and homogenized using a Kontes[®] cordless motor Pellet Pestle[®] (Kimble Chase Life Science and Research Products, Vineland, NJ, USA). Samples were kept on ice during the entire homogenisation process and enzyme assays. All enzyme assays were performed at 23°C, with an assay volume of 1 mL (including 10 µL of homogenate), using a temperature controlled ultraviolet and visible (UV/Vis) spectrophotometer (Varian Cary 100; Varian Inc., Palo Alto, CA). All assays were run in duplicate and the specific activities are expressed in IU (µmol of substrate converted to product per min) per mg of protein. Cytochrome *c* oxidase (CCO; E.C.1.9.3.1) activity was measured as described by Pelletier et al. (1994). Lactate dehydrogenase (LDH; E.C.1.1.1.27) activity was determined according to Pelletier et al. (1994) as adapted by Couture et al. (1998). Nucleoside diphosphate kinase (NDPK; E.C.2.7.4.6) activity was measured as in Couture et al. (1998) using 2.8 mM of thymidine diphosphate. Homogenate dilution factors were 100, 200, and 500 for LDH, CCO and NDPK assays, respectively. Protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid method according to Smith et al. (1985).

Metal analysis and quality control

Prey and fish samples were freeze-dried, weighed and digested at room temperature for one week in trace metal grade nitric acid followed by hydrogen peroxide according to the method described by Borgmann et al. (2001). Metal concentrations in water, prey and fish were analyzed by inductively coupled plasma – mass spectrometry (Model X-7; Thermo Electron Corp., Waltham, Massachusetts, USA). Method detection limits for Ni and Tl were lower or equal to 0.009 and 0.0005 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Samples with metal concentrations under the method detection limit were assigned a concentration equal to half the detection limit. A certified biological reference material (TORT-2, Lobster hepatopancreas; National Research Council, Ottawa, Ontario, Canada) was submitted to the digestion protocol described above. The recoveries of Ni in TORT-2 reference samples ($n=10$) was $88 \pm 1\%$ (mean \pm SE; range from 81 to 96%). To our knowledge, no certified biological reference material is available for thallium determination.

Statistical analyses and calculated parameters

Statistical analyses were performed on square root transformed data (data were transformed to improve their distribution). For each data set, we examined differences among our experimental treatments. When conditions of normality (using the Shapiro-Wilk test) and of homogeneity of variance (using the Levene test) were violated, we used the nonparametric Kruskal-Wallis test; otherwise one-way analysis of variance (ANOVA) or t-tests were performed. Multiple comparisons were examined with the Tukey-Kramer HSD test or the Student's t test ($p \leq 0.05$). Statistical analyses were performed using JMP IN 7.0 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA).

Time to hatch, expressed in hours, was determined using the following equation:

$$\text{Time to hatch (h)} = \frac{\sum L_t \times t}{\sum L}$$

where L_t represents the number of larvae that hatched in each replicate at a given time and t represents that time and L represents the total number of larvae obtained.

Survival rate of embryos was determined for each replicate of a given treatment using the following equation:

$$\text{Survival rate (\%)} = \left(\frac{\text{Embryos}_{\text{start}} - \text{Embryos}_{\text{sampled}} - \text{Embryos}_{\text{dead}}}{\text{Embryos}_{\text{start}} - \text{Embryos}_{\text{sampled}}} \right) \times 100$$

where $\text{Embryos}_{\text{start}}$ represents the number of embryos at the beginning of exposure, $\text{Embryos}_{\text{sampled}}$ represents the number of embryos sampled during exposure and $\text{Embryos}_{\text{dead}}$ represents the number of embryos which died during the exposure and excluded from the experiment.

Results

Ni and Tl in water and prey

The Ni concentrations measured in water from treatments P+WL and P+WH were nearly identical to concentrations measured in water from treatments WL and WH, respectively (Table 1). Although aqueous Ni concentration in the P (clean water + contaminated prey) treatment was slightly higher than for the C treatment, values remained very low and much (150-fold) lower than in the WL and P+WL treatments. The Ni concentration in our contaminated prey of series 2 ($13.8 \pm 2.0 \mu\text{g g}^{-1}$ d.w.) was 73-fold higher than in the uncontaminated prey of series 1 ($0.19 \pm 0.02 \mu\text{g g}^{-1}$ d.w.). The Tl concentrations measured in water from treatment WL and WH were also very similar to concentrations in water from treatments P+WL and P+WH, respectively (Table 1). As for Ni, aqueous Tl concentration in the P treatment was slightly higher than for the C treatment, but still much lower (about 40-fold) than Tl concentrations in WL and P+WL treatments. The Tl concentration in our contaminated prey of series 2 ($0.086 \pm 0.006 \mu\text{g g}^{-1}$ d.w.) was 4-fold higher than in the uncontaminated prey of series 1 ($0.021 \pm 0.001 \mu\text{g g}^{-1}$ d.w.). Ni and Tl concentrations measured in water were within 11% of our nominal concentrations.

Metal bioaccumulation

For Ni, in series 1, only embryos subjected to the WH treatment (for 24 or 48 h) accumulated significantly more metal than the embryos of the control group (Figure 1a). Similarly, in series 2, only embryos from treatment P+WH (comparable to WH) had Ni concentrations significantly higher than embryos from treatment P (comparable to C) after 24 or 48 h of exposure (Figure 1b). There were no significant differences in Ni accumulation among treatments P, P+WL and P+WH for larvae sampled less than 24 h after hatching (Figure 1b). For larvae exposed only to waterborne Ni (series 1), the Ni concentrations in larvae from treatments WL and WH were significantly higher than in the control group after 7, 14 or 21 days of exposure (Figure 1a), and the Ni concentration measured in larvae from the WH treatment was significantly higher than in larvae from the WL treatment 14 and 21 days after hatching (Figure 1a). For larvae fed Ni-contaminated prey (series 2), after 7 days of exposure, only larvae from treatment P+WH had a significantly higher Ni concentration than larvae from treatment P (Figure 1b). After 14 days of exposure, larvae from both P+WL and P+WH treatments had Ni concentrations higher than larvae of treatment P, and after 21 days of exposure, we observed the same pattern of Ni bioaccumulation as in series 1 (Figures 1a and 1b).

As for Ni, in series 1, only embryos of the WH treatment accumulated significantly more Tl than the the control group (C) after 24 or 48 h of exposure (Figure 2a). However, in series 2, embryos and larvae <24 h after hatching exposed to waterborne Tl (P+WL and P+WH) accumulated more Tl than fish from treatment P and the concentrations were significantly higher in those exposed to the highest Tl concentration compared to those exposed to the lowest concentration (Figure 2b). For larvae fed uncontaminated (series 1) or contaminated prey (series 2), all the larvae exposed to Tl from water (treatments WL and WH in series 1 and treatments P+WL and P+WH in series 2) accumulated more Tl than the larvae kept in uncontaminated water (treatments C and P for series 1 and 2, respectively), and the concentrations were significantly higher in larvae exposed to the highest Tl concentration compared to those exposed to the lowest concentration (Figures 2a and 2b).

Sublethal toxicity endpoints

Time to hatch (series 2) was significantly decreased in embryos exposed to aqueous Ni compared to unexposed embryos and the effect was more important at the highest Ni concentration compared to the lower concentration (Figure 3). Thallium had no effect on time to hatch (Figure 3).

Embryo survival (series 2) was not affected by the levels of metal exposure used here (survival rate ranged from 96 ± 1 to $99 \pm 1\%$).

There was no significant effect of metal exposure on routine metabolic rate (series 1 and 2), likely due to a high variability among individuals of a given treatment (Figure 4). In series 1, aqueous Ni exposure had no significant effect on CCO, LDH or NDPK activity (Figure 5a) whereas in series 2, larvae exposed to Ni under the P+WH treatment had higher CCO and NDPK activity than larvae of treatment P (Figure 5a). For both series, Tl exposure had no significant effect on enzyme activities (Figure 5b).

Discussion

Aqueous metal bioaccumulation in non-feeding fish (embryos and <24 h larvae) differed between Ni and Tl. Under our lowest Ni exposures (treatments WL and P+WL), Ni bioaccumulation was significant (compared to treatments C and P, respectively) only after 14 days of exposure and did not increase with time (no statistical differences between 14 and 21 days of exposure). These results suggest that under these conditions, aqueous or dietary Ni accumulation was not important for embryos or young larvae (7 days after hatching or less). However, exposure to the highest aqueous Ni concentration resulted in a significant Ni bioaccumulation for all our sampling times (compared to fish from treatment C in series 1 and to fish from treatment P in series 2), except for larvae sampled <24 h after hatching. The Ni concentrations in larvae of the WH treatment (series 1) exposed for 7, 14 and 21 days were significantly higher than the Ni concentrations measured in embryos of the same treatment exposed for 24 and 48 h, suggesting that Ni bioaccumulation (under elevated aqueous Ni concentrations), was more important in larvae than in embryos. Brix et al. (2004)

reported similar results for rainbow trout embryos, where 36, 63 and 1% of the accumulated Ni was associated with the chorion, the yolk and the embryo, respectively. The lower Ni concentrations in newly hatched larvae compared to embryos and older larvae support the protective role of the chorion against high dissolved Ni concentrations. Patterns of waterborne Ni accumulation we obtained for feeding larvae between 7 and 21 days after hatching suggest that a steady state was reached, since under our laboratory conditions, larvae exposed to both the low and high contamination level had constant Ni concentrations throughout the experiment (no statistical difference among samplings).

In contrast, Tl bioaccumulation was much higher in embryos exposed to the highest aqueous Tl concentration (treatment WH or P+WH) compared to the fish of the two other treatments (C and WL or P and P+WL, respectively). However, in series 2, embryos and larvae <24 h after hatching exposed to the lowest Tl aqueous concentration (treatment P+WL) also accumulated significantly more Tl than fish unexposed to dissolved Tl (treatment P). Moreover, Tl concentration in embryos and young larvae from both the P+WL and the P+WH treatment increased with time (24 h embryos < 48 h embryos < <24 h larvae; $p < 0.05$). These results suggest that a steady state was not reached after 72 h of exposure and that the chorion was not an effective barrier against Tl. This hypothesis is also supported by the absence of significant differences in the Tl concentrations measured in larvae <24 h or 7 days after hatching for treatments P+WL and P+WH. The patterns of waterborne Tl accumulation we obtained for larvae fed uncontaminated prey (21 days after hatching or less) suggest that a steady state was reached (no statistical difference among samplings performed at days 7, 14 and 21 after hatching for feeding larvae from treatments WL and WH). However, Tl concentration in larvae fed Tl-contaminated prey (treatments P and P+WL only) was significantly higher ($p < 0.05$) after 14 and 21 days of exposure compared to larvae exposed only for 7 days, which suggests that dietary Tl bioaccumulation tended to increase with time.

Under our laboratory conditions, for larvae (up to 21 days after hatching) feeding on contaminated prey (series 2), water was the most important source of metal. Regardless of the sampling time, metal bioaccumulation in larvae exposed only to dietary Ni or Tl (treatment P) was significantly lower compared to the bioaccumulation measured in larvae exposed from both sources simultaneously (treatments P+WL and P+WH; only after 14 days

for larvae exposed to the lowest Ni concentration). These results suggest that water was a greater source of Tl than prey for larvae of 21 days or less. These results contrast with those we obtained in a previous experiment where we examined the relative importance of water and prey as Ni and Tl sources in juvenile fathead minnows (Lapointe and Couture, 2009). In juvenile fathead minnows fed for 2 to 8 days with either Ni- or Tl-contaminated live *Tubifex tubifex* (10.0 ± 0.3 and $1.4 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ d.w. for Ni and Tl, respectively), both water and prey contributed significantly and almost equally to metal bioaccumulation. This difference in the relative contributions of water and prey to metal accumulation among fathead minnow life stages is likely at least partially explained by differences in digestive physiology complexity between < 21 day old larvae and juveniles, as assimilation efficiency may either improve during larval development or remain low until transformation to juveniles (Smith, 1989). However, differences in prey species (crustacean vs oligochaete) or in prey metal concentration (especially for Tl, for which the concentration in the oligochaete was 16-fold higher than the concentration in the prey of the present study) could also contribute to the difference observed. In addition, we hypothesize that the absence of metal accumulation in larvae fed with contaminated prey in uncontaminated water may also be caused by a lower feeding rate due to avoidance or refusal of contaminated prey. A lower feeding rate in larvae feeding on contaminated prey may also explain the apparently lower metabolic rate of this series of larvae compared to larvae fed clean prey (series 1). However, since feeding rate was not measured, this hypothesis remains to be tested.

Overall, the environmentally relevant Ni and Tl concentrations we used in our laboratory experiment had little impact on the toxicity endpoints we measured (time to hatch, survival rate, routine metabolic rate and enzyme activities). Exposure to aqueous Ni significantly decreased time to hatch compared to the C treatment (by approximately 6 and 20% for treatments WL and WH, respectively). This result is consistent with those of two earlier studies where fathead minnow eggs exposed to either waters from mill effluents (Ni concentrations ranging from 48 to 254 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Pyle et al. 2002) or to hard, Ni-spiked laboratory dilution water (Pyle, 2000) hatched earlier relative to controls (33-51% earlier in the case of Pyle et al., 2002). The activities of CCO and NDPK in 21 day old larvae were increased by simultaneous exposure to waterborne and dietary Ni in the P+WH treatment compared to larvae from treatment P. The shorter time to hatch and the higher activity of

these two enzymes suggest that Ni exposure cause an increase in metabolism in early-life stages of fathead minnows. Couture et al. (2008b) reported a positive relationship between tissue or gut content Ni concentrations and aerobic capacity indicators (CCO and citrate synthase) and between dietary Ni and muscle LDH activity in wild yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along two contamination gradients. They suggested that elevated Ni exposure and accumulation caused an increased energetic demand or metabolic cost. The decreased time to hatch as well as the increased CCO and NDPK activity we measured in fathead minnow larvae support their suggestion. However, we measured no significant effect of Ni exposure on LDH activity in fathead minnow larvae. Previous studies concluded that Ni had no effect on fish growth (Sayer et al., 1991; Pyle, 2000; Pyle et al., 2002) and Pickering (1974) demonstrated that a Ni concentration of $380 \mu\text{g L}^{-1}$, similar to the $250 \mu\text{g L}^{-1}$ in our WH treatment, had no significant effect on fathead minnows survival, growth or reproduction. However, our study showed that this level of waterborne contamination in combination with dietary Ni exposure can have subtle effects on metabolic capacities (CCO and NDPK activity; Figure 5a), but this does not translate into differences in RMR.

Conclusions

We demonstrated, in the laboratory, that under our environmentally relevant concentrations, both Ni and Tl were readily bioaccumulated by the embryos and non-feeding larvae and that water was the major source of Ni and Tl for fathead minnow larvae (<21 days after hatching). Only the highest aqueous Ni concentration we tested had an impact on the toxicity endpoints we selected: shorter time to hatch as well as higher CCO and NDPK activity suggest a metabolic cost associated to elevated Ni exposure. Since dietary metal accumulation was not important in larvae (up to 21 days after hatching; this study), but was as important as waterborne accumulation in juveniles (as shown in Lapointe and Couture, 2009), our results highlight the importance of considering every life-stages when assessing the ecological risk of metal contamination.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Metals in the Human Environment Strategic Network (MITHE-SN). We thank Nicolas Garceau for his help during the experiments and acknowledge the assistance of Pauline Fournier for the metal analyses.

References

- Borgmann, U., Cheam, V., Norwood, W.P., Lechner, J., 1998. Toxicity and bioaccumulation of thallium in *Hyalella azteca*, with comparison to other metals and prediction of environmental impact. *Environ. Pollut.* 99, 105-114.
- Borgmann, U., Néron, R., Norwood, W.P., 2001. Quantification of bioavailable nickel in sediments and toxic thresholds to *Hyalella azteca*. *Environ. Pollut.* 111, 189-198.
- Brix, K.V., Keithly, J., DeForest, D.K., Laughlin, J., 2004. Acute and chronic toxicity of nickel to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23(9), 2221-2228.
- Chapman, P.M., Wang, F., 2000. Issues in ecological risk assessment of inorganic metals and metalloids. *Human Ecol. Risk Assess.* 6(6), 965-988.
- Chau, Y.K., Kulikovskiy-Cordeiro, O.T.R., 1995. Occurrence of nickel in the Canadian environment. *Environ. Rev.* 3, 95-120.
- Cheam, V., 2001. Thallium contamination of water in Canada. *Water Qual. Res. J. Can.* 36(4), 851-877.
- Couture, P., Busby, P., Gauthier, C., Rajotte, J.W., Pyle, G.G., 2008a. Seasonal and regional variations of metal contamination and condition indicators in Yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. I. Factors influencing tissue metal concentrations. *Human Ecol. Risk Assess.* 14(1), 97-125.
- Couture, P., Rajotte, J.W., Pyle, G.G., 2008b. Seasonal and regional variations of metal contamination and condition indicators in Yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. III. Energetic and physiological indicators. *Human Ecol. Risk Assess.* 14(1), 146-165.

Couture, P., Dutil, J.-D., Guderley, H., 1998. Biochemical correlates of growth and condition in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) from Newfoundland. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55(7), 1591-1598.

Fry, F.E.J., 1971. The effect of environmental factors on the physiology of fish. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish physiology. Volume IV. Environmental Relations and Behavior*. Academic Press, New York, pp. 1-98.

Griscom, S.B., Fisher, N.S., 2002. Uptake of dissolved Ag, Cd, and Co by the clam, *Macoma balthica*: Relative importance of overlying water, oxic pore water, and burrow water. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2471-2478.

Hare, L., Tessier, A., Borgmann, U., 2003. Metal sources for freshwater invertebrates: Pertinence for risk assessment. *Human Ecol. Risk Assess.* 9, 779-793.

Hoang, T.C., Tomasso, J.R., Klaine, S.J., 2004. Influence of water quality and age on nickel toxicity to Fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23(1), 86-92.

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

Lin, T-S., Nriagu, J., 1999. Thallium Speciation in the Great Lakes. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3394-3397.

Lin, T-S., Nriagu, J., Wang, X.-Q., 2001. Thallium concentration in Lake trout from Lake Michigan. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 921-925.

Macek, K.J., Sleight, B.H., 1977. Utility of toxicity tests with embryos and fry of fish in evaluating hazards associated with the chronic toxicity of chemicals to fishes. In: Mayer, F.L.

and Hamelink, J.L. (Eds.), Aquatic toxicological hazard evaluation. ASTM, Philadelphia, pp. 137.

McKim, J.M., 1977. Evaluation of tests with early-life stages of fish for predicting long-term toxicity. J. Fish. Res. Board Can. 34, 1148-1154.

Nehring, D., 1962. Untersuchungen über die toxikologische Wirkung von Thallium-Ionen auf Fische und Fischnährtiere. Z. Fischerei. 11, 557-561.

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

Pickering, Q.H., 1974. Chronic toxicity of nickel to the fathead minnow. J. Water Pollut. Control Fed. 46(4), 760-765.

Ptashinsky, M.D., Pedlar, R.M., Evans, R.E., Wautier, K.G., Baron, C.L., Klaverkamp, J.F., 2002. Toxicology of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). Aquat. Toxicol. 58, 229-247.

P.W.Q.O., 1994. Provincial water quality objectives, Water management policies guidelines, Ministry of Environment and Energy, Ontario, Canada. ISBN 0-7778-8473-9.

Pyle, G.G., 2000. The toxicity and bioavailability of nickel and molybdenum to standard toxicity-test fish species and fish species found in the Northern Canadian lakes. Doctoral thesis, Department of biology, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada.

Pyle, G.G., Swanson, S.M., Lehmkuhl, D.M., 2002. Toxicity of uranium mine receiving waters to early life stage of fathead minnows (*Pimephales promelas*) in the laboratory. Environ. Pollut. 116, 243-255.

Pyle, G.G., Rajotte, J.W., Couture, P., 2005. Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 61, 287-312.

Ralph, L., Twiss, M.R., 2002. Comparative toxicity of thallium (I), thallium (II) and cadmium (II) to the unicellular alga *Chlorella* isolated from lake Erie. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 261-268.

Reinfelder, J.R., Fisher, N.S., 1991. The assimilation of elements ingested by marine copepods. *Science.* 251, 794-796.

Sayer, M.D.J., Reader, J.P., Morris, R. 1991. Embryonic and larval development of brown trout, *Salmo trutta* L.: exposure to trace metal mixtures in soft water. *J. Fish Biol.* 38, 773-787.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Porvenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using Bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.

Smith, L.S., 1989. Digestive functions in teleost fishes. In: Halver, J.E. (Ed), *Fish nutrition.* Academic Press Inc., pp. 331-385.

Twining, B.S., Twiss, M.R., Fisher, N.S. 2003. Oxidation of thallium by freshwater plankton communities. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2720-2726.

Wang, W.X., Fisher, N.S., 1999. Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: a synthesis. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2034-2045.

WHO., 1996. Thallium. *Environmental health criteria No. 182.* World Health Organization. Geneva.

Zitko, V., Carson, W.V., Carson, W.G., 1975. Thallium: Occurrence in the environment and toxicity to fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 13(1), 23-30.

Figure legends

Figure 1. Ni concentrations in embryos and larvae of fathead minnows (*Pimephales promelas*) of series 1 (a) and 2 (b). In (a), fish were exposed to clean water + clean prey (C), low metal concentration water + clean prey (WL) and high metal concentration water + clean prey (WH). In (b), fish were exposed to clean water + contaminated prey (P), low concentration water + contaminated prey (P+WL) or high concentration water + contaminated prey (P+WH). Data are shown as mean + standard error. For embryos sampled after 24 h for the C treatment (a), n=4. For the other groups, n=5. Significant statistical differences among treatments for a given sampling time are represented by different letters ($p \leq 0.05$). Note: In (b), for embryos and larvae sampled less than 24 h after hatching, treatments P, P+WL and P+WH are equivalent to treatments C, WL and WH in (a).

Figure 2. Tl concentrations in embryos and larvae of fathead minnows (*Pimephales promelas*) of series 1 (a) and 2 (b). In (a), fish were exposed to clean water + clean prey (C), low metal concentration water + clean prey (WL) and high metal concentration water + clean prey (WH). In (b), fish were exposed to clean water + contaminated prey (P), low concentration water + contaminated prey (P+WL) or high concentration water + contaminated prey (P+WH). Data are shown as mean + standard error (n=5). Significant statistical differences among treatments for a given sampling time are represented by different letters ($p \leq 0.05$). Note: In (b), for embryos and larvae sampled less than 24 h after hatching, treatments P, P+WL and P+WH are equivalent to treatments C, WL and WH in (a).

Figure 3. Time to hatch of fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos from series 2 exposed to three different treatments (clean water (C), low concentration water (WL) or high concentration water (WH)) of Ni or Tl. Data are shown as mean + standard error (for each bar, n=5). Significant statistical differences among treatments for a given metal are represented by different letters ($p \leq 0.05$).

Figure 4. Routine metabolic rate measured for groups of five larvae from the two series of experiments. Data are shown as mean + standard error. For treatments definitions refer to

Figure 1. In Ni-Series 1, n=7 for treatment C, n=8 for treatments WL and n=5 for treatment WH, whereas in Ni-Series 2, n=8 for treatment P, n=11 for treatment P+WL and n=7 for treatment P+WH. In Tl-Series 1, n=8 for treatment C, n=3 for treatment WL and n=6 for treatment WH, whereas in Tl-Series 2, n=10 for treatments P and P+WH and n=9 for treatment P+WL.

Figure 5. Activity of cytochrome C oxidase (CCO), lactate dehydrogenase (LDH) and nucleoside diphosphate kinase (NDPK) measured in fathead minnow (*Pimephales promelas*) larvae exposed to Ni (a) or Tl (b) in two experimental series (for treatment definitions refer to Figure 1). Data are shown as mean + standard error. Significant statistical differences among treatments for a given enzyme are represented by different letters ($p \leq 0.05$). In (a), for series 1, n=8 for treatment C and n=10 for treatments WL and WH, whereas in Series 2, n=8 for treatment P and n=9 for treatments P+WL and P+WH. In (b), for series 1, n=10 for treatment C, n=4 for treatment WL and n=5 for treatment WH, whereas in series 2, n=10 for treatments P and P+WL and n=9 for treatment P+WH.

Figure 1

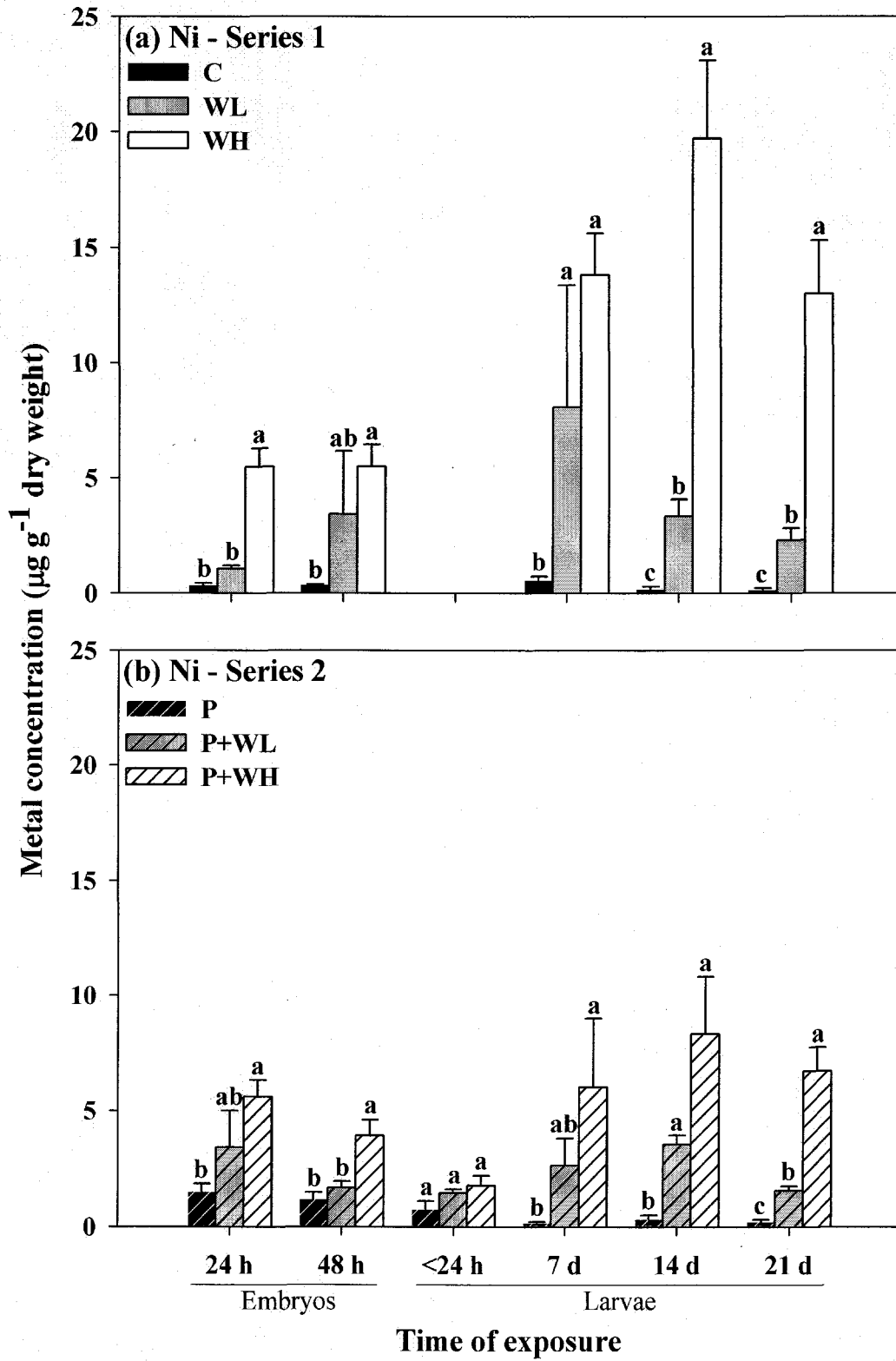


Figure 2

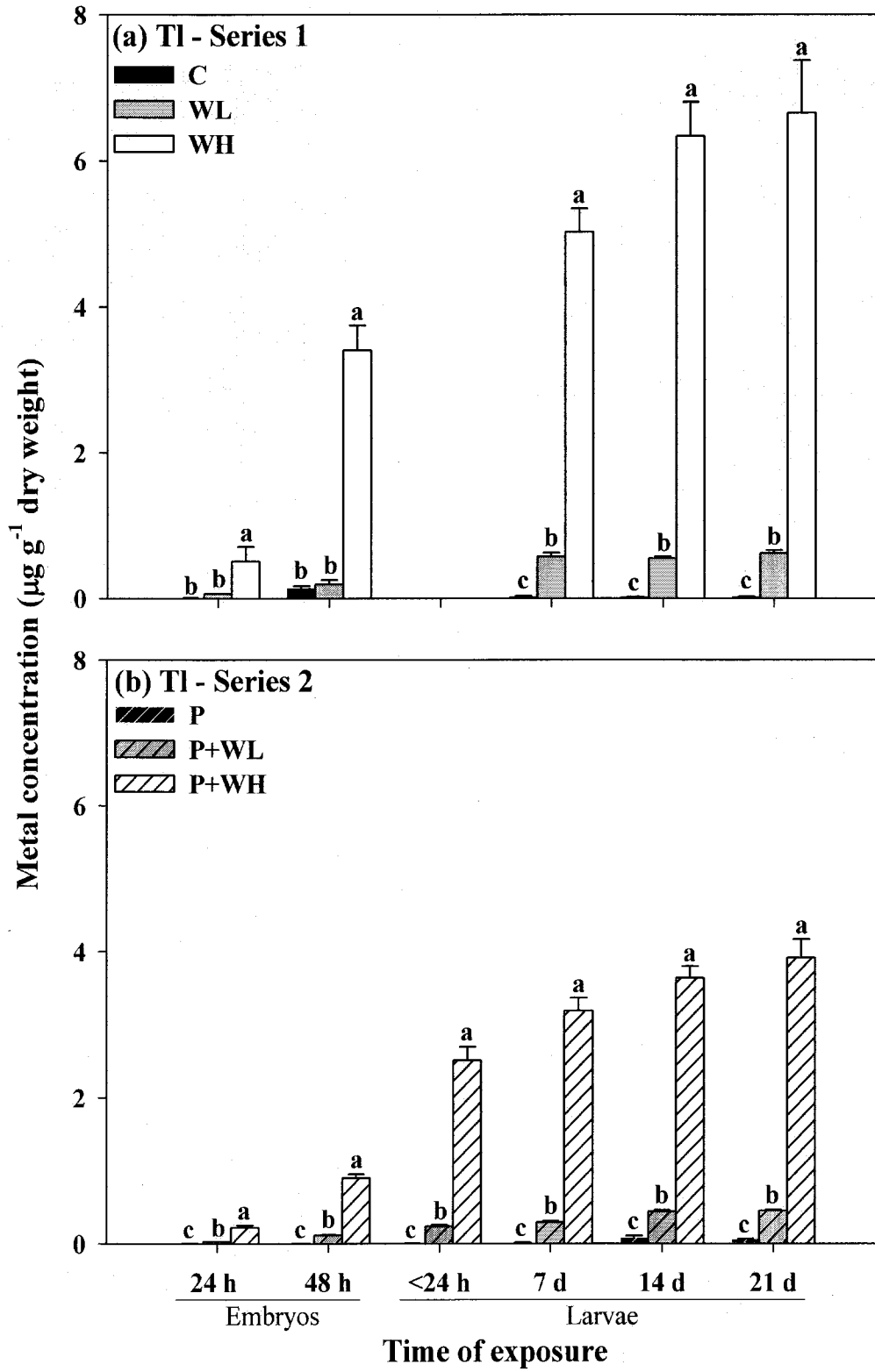


Figure 3

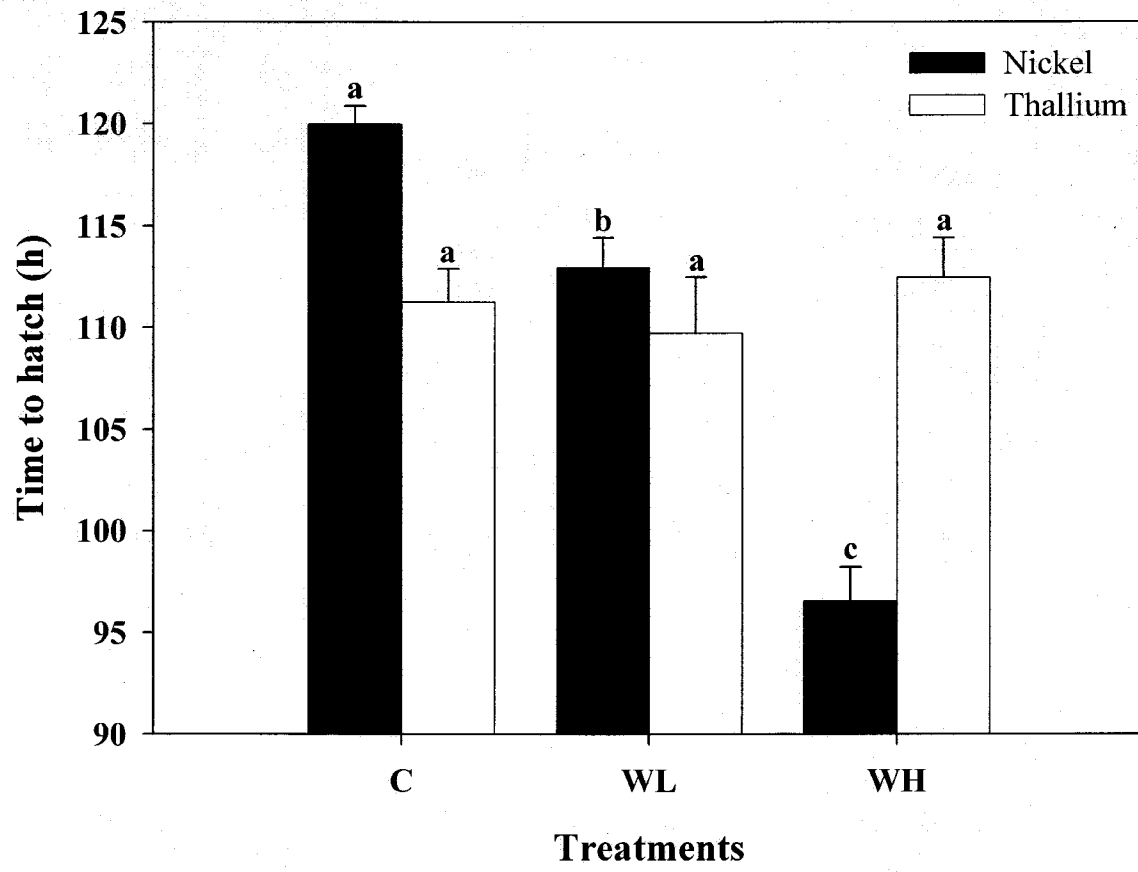


Figure 4

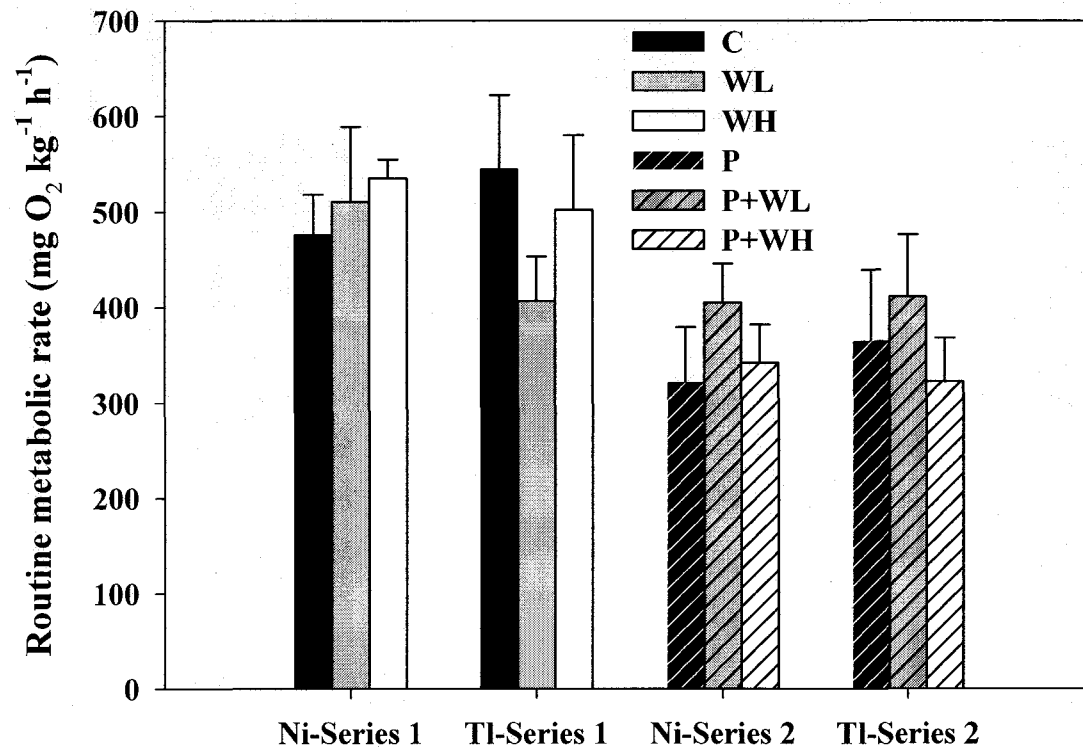


Figure 5

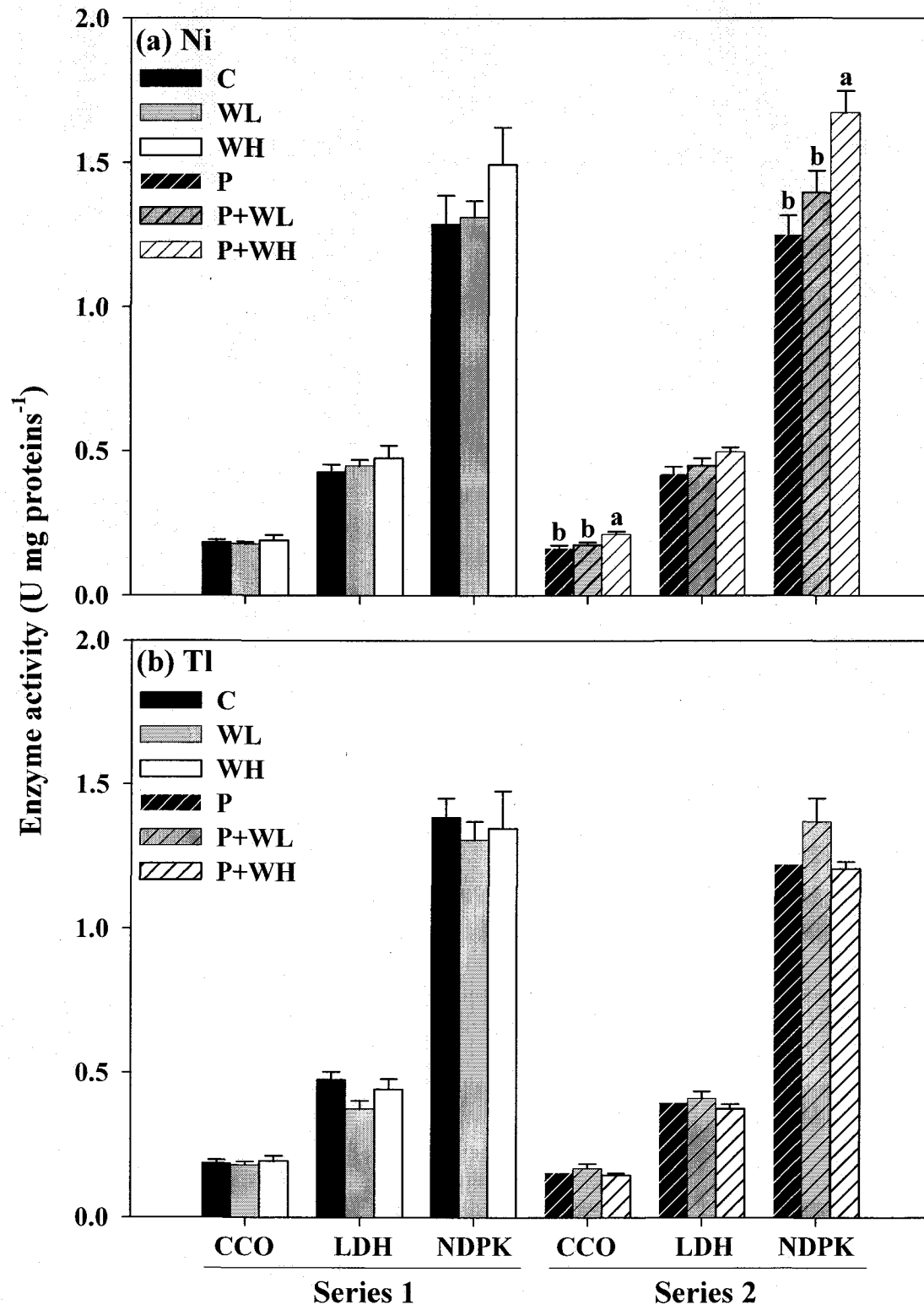


Table 1. Mean (\pm standard error) nickel or thallium concentrations measured in water ($\mu\text{g L}^{-1}$) for series 1 and 2. For Ni, $n = 21$ for C, WL and WH water, whereas $n = 24$ for P and $n = 27$ for P+WL and P+WH. For Tl, $n = 21$ for treatments C, WL and WH, whereas $n = 25, 24$ and 27 for treatments P, P+WL and P+WH, respectively.

	Series 1			Series 2		
	C	WL	WH	P	P+WL	P+WH
Ni	0.02 ± 0.01	24.8 ± 0.4	252 ± 2	0.17 ± 0.07	27.0 ± 0.8	256 ± 2
Tl	0.0017 ± 0.0003	0.091 ± 0.001	0.89 ± 0.01	0.00255 ± 0.00007	0.0878 ± 0.0005	0.902 ± 0.006



10 3^e Article

The influence of prey type on nickel and thallium assimilation,
subcellular distribution and toxicity in juvenile fathead minnows
(*Pimephales promelas*)

Dominique Lapointe, Sophie Gentès, Dominic E. Ponton, Landis Hare and Patrice Couture

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



Influence of Prey Type on Nickel and Thallium Assimilation, Subcellular Distribution and Effects in Juvenile Fathead Minnows (*Pimephales promelas*)

DOMINIQUE LAPOINTE, SOPHIE GENTES, DOMINIC E. PONTON, LANDIS HARE, AND PATRICE COUTURE*

Institut National de la Recherche Scientifique—Centre Eau Terre Environnement (INRS-ETE), 490 de la Couronne, Québec, QC, G1K 9A9, Canada

Received July 16, 2009. Revised manuscript received September 22, 2009. Accepted September 30, 2009.

Because fish take up metals from prey, it is important to measure factors controlling metal transfer between these trophic levels so as to explain metal bioaccumulation and effects in fish. To achieve this, we exposed two types of invertebrates, an oligochaete (*Tubifex tubifex*) and a crustacean (*Daphnia magna*), to environmentally relevant concentrations of two important contaminants, nickel (Ni) and thallium (Tl), and fed these prey to juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). We then measured the assimilation efficiency (AE), subcellular distribution and effects of these metals in fish. Fish assimilated dietary Tl more efficiently from *D. magna* than from *T. tubifex*, and more efficiently than Ni, regardless of prey type. However, the proportion of metal bound to prey subcellular fractions that are likely to be trophically available (TAM) had no significant influence on the efficiency with which fish assimilated Ni or Tl. In fish, the majority of their Ni and Tl was bound to subcellular fractions that are purportedly detoxified, and prey type had a significant influence on the proportion of detoxified Ni and Tl in fish. We measured higher activities of cytochrome C oxidase and glutathione S-transferase in fish fed *D. magna* compared to fish fed *T. tubifex*, regardless of the presence or absence of Ni or Tl in prey. However, we measured decreased activities of glutathione S-transferase and nucleoside diphosphate kinase in fish fed Tl-contaminated *D. magna* compared to fish from the three other treatment levels.

Introduction

Fish living in lakes impacted by trace metals are exposed to these contaminants via both aqueous and dietary routes. Because recent studies have shown that the diet can be an important source of metals for fish (1–4), it is important that risk assessments be based on a knowledge of the factors controlling metal transfer from prey to fish as well as the potential toxicity of dietary metals to these important consumers (5). The distribution of metals in the cells of prey is reported to be important in controlling their propensity for transfer to both predatory invertebrates (6–9) and fish (10, 11). Subcellular metal distributions in fish themselves

could be used to infer the potential for toxic effects on these predators (12, 13).

We set out to investigate these phenomena by exposing juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*) to either nickel (Ni) or thallium (Tl) contained in prey belonging to two major groups of freshwater invertebrates, oligochaetes (*Tubifex tubifex*), and crustaceans (*Daphnia magna*). We chose Ni and Tl because these metals are present at concentrations of concern in some fresh waters and because there has been little study of these metals in predators and their prey (8). Sources of Ni in aquatic ecosystems include mining, smelting, refining, metal reprocessing, fuel combustion, and waste incineration (14), whereas Tl sources include the smelting of sulfidic ores, cement manufacturing, coal burning and industries producing semiconductors, alloys, optical glass, and photoelectric cells (15, 16).

We determined the efficiency with which fish assimilated Ni and Tl from the two prey types, and compared these assimilation efficiencies with patterns of metal distributions in the cells of their prey. We also measured Ni and Tl subcellular distributions in fish to determine the potential for toxic effects from these metals on fish. Lastly, we assessed effects in contaminated fish by measuring the activities of several key enzymes including cytochrome c oxidase (CCO), an indicator of aerobic capacity; lactate dehydrogenase (LDH), an indicator of anaerobic capacity; nucleoside diphosphate kinase (NDPK), an indicator of biosynthetic capacity, and glutathione S-transferase (GST), an indicator of detoxification and oxidative stress.

Materials and Methods

Animal Culturing. Prey for juvenile fathead minnows were live *Tubifex tubifex* and *Daphnia magna*. *Tubifex tubifex* were purchased from Aquatic Research Organisms Inc. (Hampton, NH) and were maintained in the laboratory in clean sediment collected from Lake Saint Joseph (46°53' N, 71°38' W), a Canadian Shield lake located 40 km northwest of Québec City (Québec, Canada), at a depth of approximately 5 m using an Ekman grab. Reconstituted water ($[Ca^{2+}]$ 70 μ M, $[Cl^-]$ 129 μ M, $[K^+]$ 12 μ M, $[Mg^{2+}]$ 13 μ M, $[Na^+]$ 179 μ M, $[SO_4^{2-}]$ 63 μ M) was used as overlying water. *Daphnia magna* were obtained from either the Centre d'Expertise en Analyze Environnementale du Québec (CEAEQ, Québec, QC, Canada) or Aquatic BioSystems Inc. (Fort Collins, CO). They were cultured at 20 °C, in the same reconstituted water used for *T. tubifex* but with a nominal hardness of 150 mg L⁻¹ (as CaCO₃), and fed the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (cultured in Bristol medium; (17)). To prevent micronutrient deficiencies in *D. magna* (especially selenium), M4 culture medium (18) was added to the reconstituted water.

Juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*) were purchased from Aquatic BioSystems Inc. (Fort Collins, CO) either as embryos, for use in the *T. tubifex* experiment, or as juveniles, for use in the *D. magna* experiment. Fish were held in the reconstituted water described for *T. tubifex*, and were cultured and reared according to Canadian Environmental Protection Service Guidelines (19). Animal rearing and experiments were conducted in an environmental chamber at 23 °C under a 16–8 h day to night photoperiod.

Exposure of Prey to Metals. Lake St. Joseph sediment was contaminated by adding either NiNO₃ (1.1 M) or TlNO₃ (0.015 M) to 4 L of sediment to reach nominal Ni or Tl concentrations of 3.7 or 0.005 μ mol g dry weight⁻¹, respectively. This sediment was mixed and stored at 4 °C for 21 days to achieve partial chemical equilibration. *Tubifex tubifex* were exposed to this metal-spiked sediment and reconstituted

*Corresponding author phone: (418) 654-3825; fax: (418) 654-2600; e-mail: Patrice.couture@ete.inrs.ca.

overlying water for 3 weeks, after which time they were removed and held for ~5 h in clean sediment then ~19 h in reconstituted water to allow them to defecate contaminated gut contents. Control *T. tubifex* were held in uncontaminated reconstituted water for 19 h. Samples of control and contaminated *T. tubifex* were stored at -20°C prior to metal analyses.

Adult *D. magna* were placed in high density polyethylene (HDPE) containers filled with Ni or Tl contaminated artificial lakewater (900 nM $[\text{Ni}^{2+}]$ or 15 nM (Tl); free ion concentrations calculated using MINEQL⁺) where they were fed with Ni or Tl rich algae in excess. We presume that Tl(I) was the predominant form of Tl in our exposures because we used Tl(I) to prepare the exposure medium, Tl(I) is the redox stable form of Tl in oxic freshwaters and that Tl(I) is mainly oxidized to Tl(III) by planktonic bacteria (20). Contaminated algae to be used as food for *D. magna* were cultured in polycarbonate Erlenmeyer flasks containing Bristol medium and having either a $[\text{Ni}^{2+}]$ of 900 nM or a $[\text{Tl}^{+}]$ of 15 nM. A preliminary experiment showed that Ni and Tl concentrations in *D. magna* reached a steady state within ~6 h (data not shown) and thus we set the exposure duration as 24 h. Daphnids were then transferred to metal-free water with metal-free algae for 3 h to eliminate metal-contaminated gut contents (21) and metal adsorbed on the body surface. Every second day during the experiment, three samples of 10–30 *D. magna* were frozen at -20°C for Ni and Tl analyses.

Exposure of Fish to Metals. Fish were exposed to a given metal in 450 mL plastic containers held in position by Styrofoam sheets placed in 45 L coolers that were maintained at 23°C . At least 80% of the aerated reconstituted water was replaced daily, during which time fish feces were removed. Fish used in the *T. tubifex* experiment were 5 months old and weighed 0.32 ± 0.02 g, whereas those fed *D. magna* were 3 months old and weighed 0.34 ± 0.01 g (means \pm standard errors; $n = 42$ per experiment).

For each experiment, 14 fish were exposed individually, in uncontaminated water, to each of the three experimental treatments, that is, control (C), dietary nickel exposure (Ni) and dietary thallium exposure (Tl). The 42 fish used were not fed on the day of their transfer or for the first 24 h in the exposure medium. After this time, fish were fed 5% of their body weight (wet weight of prey to wet weight of fish) daily, for 7 days, with either uncontaminated (control) or metal-contaminated prey (Ni and Tl treatments). At the end of this time, fish were starved for 1 day to clear their gut (feces production ended by this time) and then sacrificed. Seven fish per treatment were used for subcellular fractionation and metal analyses, whereas the remainder ($n = 7$) were stored at -80°C for later enzyme activity analyses. Water samples collected throughout the experiment were acidified (2.5% HNO_3) and stored at 4°C for metal analyses.

Subcellular Fractionation. Depurated *D. magna* (~50 pooled individuals; $n = 10$) were placed in acid-washed, preweighed 1.5 mL polypropylene microcentrifuge tubes, weighed, placed on ice and homogenized in physiological buffer (25 mM TRIS; pH 7.4) (1:3, tissue to buffer, w/v ratio) using a Pellet Pestle (Kontes) for 2 s, at 30 s intervals, for 5 min. Data on subcellular fractionation in *T. tubifex* were obtained from Dumas and Hare (8). Seven depurated juvenile *P. promelas* of each treatment were chopped individually, using a surgical steel razor blade, and homogenized in sucrose (250 mM) and physiological buffer (10 mM TRIS; pH 7.4) (1:9, tissue to buffer, w/v ratio) using five low-speed passages on a motorized Potter–Elvehjem homogenizer.

To measure metal concentrations in whole animals, aliquots of the homogenate were placed in preweighed 1.5 mL polypropylene microcentrifuge tubes and frozen at -20°C . For *D. magna*, remaining homogenates were centrifuged three times at 800g. Following each centrifugation, the

supernatant was removed and the pellet was diluted again with physiological buffer (1–2, tissue to buffer, ratio). The three supernatants were combined into preweighed 1.5 mL polypropylene microcentrifuge tubes (final tissue to buffer ratio of 1:7). For *P. promelas*, remaining homogenates were centrifuged once at 800g and the supernatants were transferred to preweighed 1.5 mL polypropylene microcentrifuge tubes. The samples were then subjected to a centrifugation, digestion, and heat-treatment protocol (8, 22) that gave the following operationally defined subcellular fractions: cellular debris (includes membranes and unbroken cells), granules (and other NaOH resistant particles), organelles (microsomes, lysosomes, and mitochondria), heat-denatured proteins (HDPs; includes enzymes) and heat-stable proteins (HSPs; includes metallothionein, MT). In the cases of *D. magna* and *P. promelas*, the organelles fractionation was further separated, by centrifugation, into a mitochondrial fraction and one containing other organelles (23). Supernatants (cellular debris and HSP) were acidified using HNO_3 , diluted to 8.5% HNO_3 with 30% H_2O_2 and stored at 4°C for later metal analyses. Pellets (granules, mitochondria, organelles and HDP) were stored at -20°C for later metal analyses.

To assess the recovery of Ni and Tl in the subcellular fractions, we compared the total metal burden in the homogenate to the sum of metal obtained in all fractions ((sum of metal burdens in the subcellular fractions/metal burden in the aliquot) \times 100). Recoveries were high with average values (\pm SE) for Ni and Tl, respectively, being $153 \pm 15\%$ and $96 \pm 3\%$ for *D. magna*, $94 \pm 2\%$ and $96 \pm 4\%$ for *T. tubifex* (8), and $125 \pm 12\%$ and $101 \pm 3\%$ for *P. promelas*.

Metal Analyses and Quality Control. Sediment and biological samples were freeze-dried and digested at room temperature for 1 week in trace metal grade nitric acid followed by hydrogen peroxide, and then metal concentrations were measured by inductively coupled plasma–mass spectrometry (model X-7; Thermo Electron Corp., Waltham, MA). Method detection limits for Ni and Tl were ≤ 0.4 and 0.0078 nM, respectively. Samples with metal concentrations under the method detection limit were assigned a concentration equal to half the detection limit. A certified biological reference material (TORT-2, Lobster hepatopancreas; National Research Council, Ottawa, Ontario, Canada) was submitted to the same digestion protocol as the experimental samples. The recoveries of Ni in TORT-2 reference samples was $88 \pm 4\%$ (mean \pm SE; $n = 7$). To our knowledge, no certified biological reference material is available for thallium determination.

Enzyme Analyses. Fish were thawed on ice, chopped with a surgical steel razor blade, and homogenized in cold homogenizing buffer (pH 7.5; 20 mM HEPES; 1 mM EDTA; 0.1% Triton X-100) (1:9 tissue to buffer ratio) using an Ultra Turrax T25 homogenizer (Janke and Kunkel, IKA-labortechnik, Staufen, Germany). Samples were kept on ice during homogenization and enzyme assays. All enzyme assays were performed at 23°C , with an assay volume of 1 mL (including 10 μL of homogenate), using a temperature controlled ultraviolet and visible (UV/vis) spectrophotometer (Varian Cary 100 and 300; Varian Inc., Palo Alto, CA). All assays were run in duplicate and the specific activities are expressed in IU (μmol of substrate converted to product per min) per mg of protein. We measured the activities of cytochrome c oxidase (CCO) (24), lactate dehydrogenase (LDH) (24, 25), nucleoside diphosphate kinase (NDPK) (25) (using 2.8 mM of thymidine diphosphate) and glutathione S-transferase (GST) (26). Homogenate dilution factors were 1000, 100, 1000, and 200 for the LDH, CCO, NDPK, and GST assays, respectively. Protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid method (27).

Statistical Analyses and Calculated Parameters. For each data set, we tested for differences between our experimental

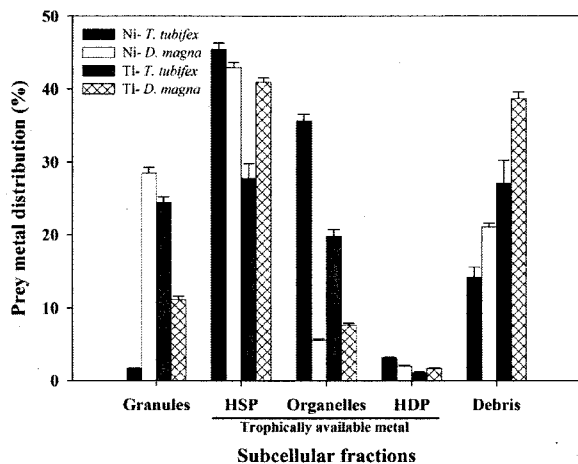


FIGURE 1. Distribution of Ni and Tl in subcellular fractions of *Tubifex tubifex* and *Daphnia magna* (means \pm SE; $n = 4-5$ for *T. tubifex* and $n = 10$ for *D. magna*). Data for *T. tubifex* are from Dumas and Hare (8). Underlined fractions represent trophically available metal.

treatments (prey and metal). When conditions of normality (using the Shapiro-Wilk test) and of homogeneity of variance (using the Levene test) were violated, we used the nonparametric Kruskal-Wallis test; otherwise a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed. Multiple comparisons were examined with the Tukey-Kramer HSD test ($p \leq 0.05$). Statistical analyses were performed using JMP 7.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Assimilation efficiency (AE, %) was calculated according to the following equation:

$$AE = \left[\frac{(M_{\text{Ni or Tl}} - M_{\text{control}})}{M_{\text{prey}}} \right] \times 100$$

where $M_{\text{Ni or Tl}}$ represents the metal burden in fish fed Ni or Tl contaminated prey, M_{control} represents the mean metal burden in fish fed uncontaminated prey, and M_{prey} represents the total amount of metal contained in the prey ingested.

Results and Discussion

Ni and Tl in Prey. Mean (\pm SE, $n = 7$) Ni concentrations in control *T. tubifex* ($0.019 \pm 0.005 \mu\text{mol g}^{-1}$) were much lower than those in Ni-contaminated worms ($0.38 \pm 0.09 \mu\text{mol Ni g}^{-1}$). This latter concentration is similar to those reported for *T. tubifex* ($\sim 0.3 \mu\text{mol g}^{-1}$) exposed to Ni-spiked sediments in the laboratory (8) and the crustacean *Hyalella azteca* exposed in the laboratory to sediment collected from metal-contaminated Canadian lakes ($\sim 0.7 \mu\text{mol g}^{-1}$; (28)). Likewise, mean (\pm SE, $n = 6-8$) Ni concentrations in control *D. magna* were much lower than those in Ni-contaminated individuals (0.014 ± 0.002 and $1.8 \pm 0.2 \mu\text{mol g}^{-1}$, respectively), and Ni concentrations in contaminated *D. magna* were similar to those reported for this species exposed to waterborne Ni ($\sim 0.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ giving $\sim 1.5 \mu\text{mol Ni g}^{-1}$ *D. magna*; (29)). Under our exposure conditions, Ni concentrations in the crustacean *D. magna* were ~ 4.5 times those in the oligochaete *T. tubifex*.

A previous study showed that Ni in *T. tubifex* was bound to cell fractions in the following order: HSP > organelles > debris > HDP > granules (black bars in Figure 1) and these differences were significant (8). Thus, in this oligochaete, the Ni theoretically available for trophic transfer (TAM; HDP + HSP + organelles) represented $84 \pm 3\%$ (SD) of the total (8). In *D. magna*, Ni was located in: HSP > granules > debris > organelles > HDP (white bars in Figure 1; differences were

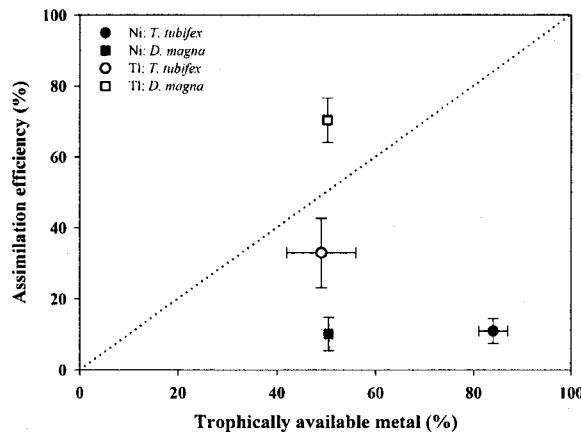


FIGURE 2. Relationship between Ni and Tl assimilation efficiency by *Pimephales promelas* and the proportion of Ni or Tl theoretically available for trophic transfer in *Tubifex tubifex* and *Daphnia magna* (means \pm SE, $n = 4-7$). The dashed line illustrates a 1:1 relationship.

significant) and $51 \pm 1\%$ of its total Ni was bound to the TAM compartment.

Mean (\pm SE, $n = 6$) Tl concentrations in control and contaminated *T. tubifex* were 0.29 ± 0.06 and $4.6 \pm 0.5 \text{ nmol g}^{-1}$, respectively, and values in contaminated individuals fell within the range of values reported for *H. azteca* exposed to unspiked sediments from Lake Ontario and adjacent Hamilton Harbour ($0.8-5 \text{ nmol g}^{-1}$; (30)). Values for Tl in control and contaminated *D. magna* were 0.11 ± 0.05 and $0.46 \pm 0.06 \text{ nmol g}^{-1}$, respectively.

In the cells of *T. tubifex*, Dumas and Hare (8) showed that Tl was distributed equally ($p > 0.05$) among the granules, organelles, debris and HSP fractions ($\sim 25\%$ each), whereas there was little Tl bound to the HDP fraction (gray bars in Figure 1). Their results indicate that fully $49 \pm 7\%$ (SD) of the total Tl in *T. tubifex* should be available for transfer up the food chain (8). Within the cells of *D. magna*, Tl was located in the: HSP > debris > granules > organelles > HDP (hatched bars in Figure 1; differences were significant) and $50 \pm 1\%$ of total Tl was potentially available for transfer to higher trophic levels.

Ni and Tl Assimilation by Fish. Overall, fish assimilated dietary Tl more efficiently ($p = 0.0002$) than Ni, regardless of prey type (Figure 2). Indeed, the subcellular distributions of Ni and Tl in prey had no significant influence on the efficiency with which fish assimilated these metals (Figure 2). Thus fish assimilated only 10–11% of the Ni in prey in spite of the fact that 50–85% of prey Ni should have been available to this predator (TAM, Figure 2). Previous studies on invertebrates have reported higher AEs for Ni (17–80%; 8, 31) than in our study, and Ni AEs by a predatory aquatic alderfly were shown to increase with increasing percentage TAM in its prey (8). The low and constant AEs obtained for fish, regardless of Ni availability in prey, suggest that fish regulate their concentrations of this possibly essential metal (32, 33) by controlling its uptake in the gut, whereas some aquatic insects do not. However, recent results for another type of aquatic insect (the dipteran *Chaoborus*) suggest that it too assimilates Ni in much lower proportions (mean 14%) than would be expected by measurements of TAM in its prey ($\sim 60\%$ TAM in *D. magna*; (17)). However, low mean Ni assimilation in this insect is reported to be a consequence of its rapid gut passage time (17). The much higher proportion of Tl compared to Ni that was assimilated by fish is consistent with the fact that Tl is a nonessential metal and thus its entry is not likely to be regulated by fish.

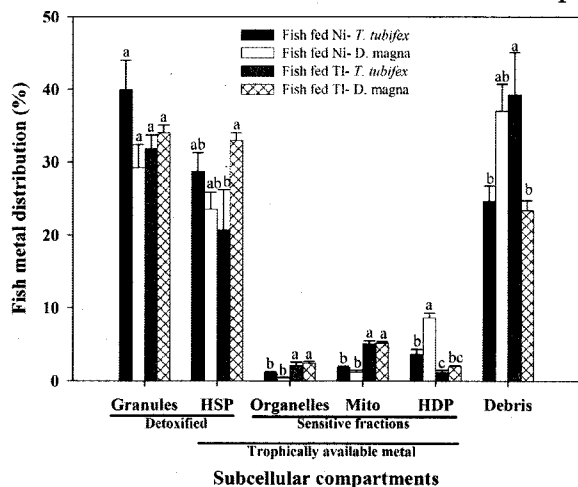


FIGURE 3. Distribution of Ni and Tl in subcellular fractions of *Pimephales promelas* fed either *Tubifex tubifex* or *Daphnia magna* (means \pm SE, $n = 6-7$). Significant statistical differences ($p < 0.05$) among the four treatments for a given subcellular fraction are indicated by different letters. Operationally defined subcellular compartments are indicated by underlining beneath the subcellular fractions.

In contrast to Ni, Tl was efficiently assimilated by fish from both prey types (Figure 2). Although there are no other published values for Tl AEs in fish, comparable values for copepods (40–50%; (34)) and an aquatic insect (~70%; (8)) fall within the range of values we measured for fish (33–75%, Figure 2). AEs for Tl were significantly higher ($p = 0.02$) when *D. magna* was the prey than when *T. tubifex* were eaten. This difference existed in spite of the fact that the proportions of trophically available Tl did not differ between these two prey types (TAM ~50%; Figure 2). However, the two prey types differed in their Tl concentrations ([Tl] in *T. tubifex* was ~15 times that in *D. magna*), which might explain in part the difference in Tl assimilation efficiencies. This hypothesis is supported by the fact that juvenile *P. promelas* assimilate only ~17% of the Tl when fed with more-highly Tl-contaminated *T. tubifex* (~6.9 nmol g⁻¹; (4)) and that a predatory insect assimilates Tl even more efficiently (~70%) when feeding on *T. tubifex* having lower Tl concentrations (1.5 nmol g⁻¹) than those used in our study (8). These trends suggest saturation of Tl transport sites with increasing Tl concentration in food.

Ni and Tl Subcellular Partitioning in Fish. Both Ni and Tl were bound mainly to the granules, HSP and debris fractions (Figure 3). Since the former two fractions are considered to be metal that has been detoxified (22) and because >50% of the Ni and the Tl was present in the sum of these two fractions, it stands to reason that the majority of the Ni and Tl present in fish had been detoxified. In a previous study, where we fed juvenile *P. promelas* with either Ni- or Tl-contaminated *T. tubifex*, both metals were also found mostly in the granules, HSP and debris fractions (4). The proportion of Tl in the HSP fraction was significantly higher in fish fed *D. magna* compared to fish fed *T. tubifex*, whereas there was no significant impact of prey type on the proportion of Ni found in the HSP fraction or on the proportion of either Ni or Tl bound to the granules fraction (Figure 3). However, prey type had a significant influence ($p = 0.002$) on the proportion of detoxified Ni and Tl in fish. Thus the mean (\pm SE) proportion of detoxified Ni was significantly higher in fish fed *T. tubifex* (69 \pm 3%) than in those fed *D. magna* (53 \pm 4%), whereas the proportion of detoxified Tl was significantly higher in fish fed *D. magna* (68 \pm 1%) compared to fish fed *T. tubifex* (52 \pm 5%). These differences

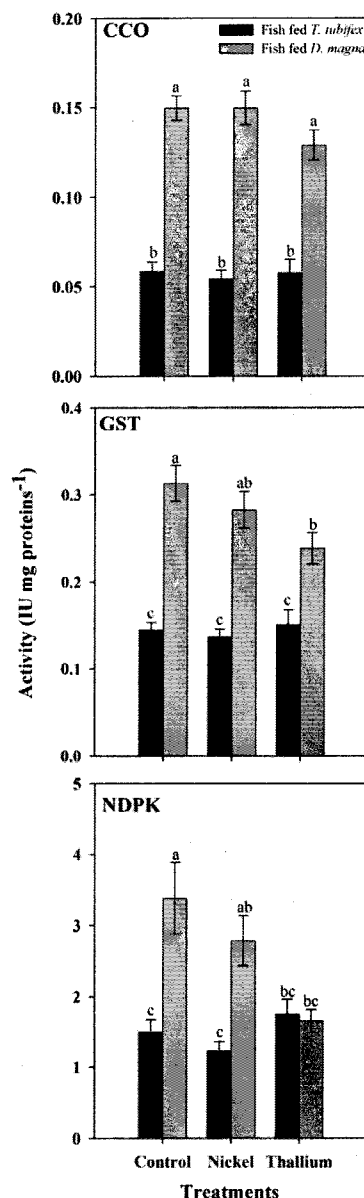


FIGURE 4. Enzyme activities measured in *Pimephales promelas* fed either uncontaminated or metal (Ni or Tl) contaminated *Tubifex tubifex* or *Daphnia magna* (means \pm SE; $n = 6-7$). Statistically significant differences ($p < 0.05$) between bars are represented by different letters.

could be explained by differences in prey metal concentrations (the same biomass of each prey type was consumed by fish). Thus fish fed with prey that were more contaminated, *D. magna* for Ni and *T. tubifex* for Tl, had a lower proportion of detoxified metal, suggesting that the fish's detoxification capacity had been exceeded such that metals had spilled over into other fractions.

For the purported metal sensitive fractions (organelles + mitochondria + HDP; (22)), we measured a significant influence ($p = 0.026$) of prey type only for Ni (Figure 3); that is, fish exposed to Ni from *D. magna* had a slightly higher proportion (10 \pm 1%) of Ni bound to metal sensitive fractions compared to fish fed Ni-contaminated *T. tubifex* (7 \pm 1%). Moreover, the proportion of Ni in the HDP fraction was significantly higher in fish fed *D. magna* compared to fish fed *T. tubifex* (Figure 3), likely reflecting differences in the Ni concentration of the two prey species (as discussed above).

Nevertheless, the presence of Ni and Tl in the metal sensitive fractions may cause pernicious effects in fish and thus we examined biochemical indicators of metal effects.

We observed no statistically significant effect of prey type or metal on the proportion of TAM in fish (29–41%), which suggests that similar percentages of fish Ni and Tl would be available for assimilation by a piscivore.

Metal Effects in Fish. In control fish, we measured a significant influence of prey type on the activities of three enzymes (Figure 4). This effect is likely explained by fish swimming activity; fish eating *D. magna* (small, active prey swimming in the water column) are likely more active than fish feeding on *T. tubifex* (large immobile prey). Fish feeding actively on *D. magna* are likely to have a higher aerobic capacity than those feeding on *T. tubifex*, which would explain the higher activities of CCO (Figure 4) measured in the former. Likewise, the higher level of GST activity, an indicator of detoxification and oxidative stress, in fish fed *D. magna* compared to fish fed *T. tubifex* (Figure 4), could be linked to increased aerobic capacity since mitochondria are an important source of reactive oxygen species in cells (35). Moreover, gene expression for CCO in yellow perch (*P. flavescens*; (36)) suggests a relationship between aerobic metabolism and oxidative stress. NDPK activity was also higher in fish fed *D. magna* compared to those fed *T. tubifex* (for controls and Ni-exposed fish) (Figure 4), suggesting higher biosynthetic capacities in juvenile *P. promelas* fed *D. magna* in order to support their more active swimming behavior. However, whereas mean weight did not differ between the two groups of fish, fish fed *T. tubifex* were 2 months older than fish fed *D. magna*. Hence, the apparent slower growth rate of the fish used in the *T. tubifex* experiment may be an alternative hypothesis explaining the difference in levels of enzyme activity between fish fed *T. tubifex* and fish fed *D. magna*.

There were no significant differences between control values and those for the Ni and Tl treatment levels in the case of fish eating *T. tubifex*, whereas differences were measured for fish eating *D. magna*. Fish fed Tl-rich *D. magna* had significantly decreased GST activity compared to controls or to Ni-exposed fish (Figure 4); although Tl can inhibit the glutathione-dependent antioxidant defense system in the rat brain (37), this is the first such report for fish. As was the case for GST, fish fed Tl-contaminated *D. magna* showed decreased NDPK activity (to a level similar to those fed *T. tubifex*; Figure 4). This effect of Tl on this indicator of biosynthesis suggests that Tl might impair the growth of juvenile *P. promelas* fed Tl-contaminated *D. magna*. To our knowledge, there are no previous reports of Tl impact on NDPK activity. The effects of Tl measured in fish feeding on *D. magna*, but not on those fed *T. tubifex*, cannot be explained by Tl concentrations in prey since they were lower in the former than in the latter. Neither metal nor prey type had a significant influence on LDH activity.

Our results highlight the importance of considering dietary exposure to metals and of characterizing predator-prey systems when assessing the risks associated with metal exposure in fish.

Acknowledgments

This study was funded by a grant from the Metals in the Human Environment Strategic Network (MITHE-SN) to L.H. and P.C. We thank B. Leclercq for her aid in the laboratory and P. Fournier for her assistance during metal analyses.

Literature Cited

- (1) Spry, D. J.; Hodson, P. V.; Wood, C. M. Relative contribution of dietary and waterborne zinc in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1988**, *45*, 32–41.
- (2) Clearwater, S. J.; Farag, A. M.; Meyer, J. S. Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2002**, *132*, 269–313.
- (3) Meyer, J. S.; Adams, W. J.; Brix, K. V.; Luoma, S. N.; Mount, D. R.; Stubblefield, W. A.; Wood, C. M. *Toxicity of Dietborne Metals to Aquatic Organisms*; SETAC Press: Pensacola, FL, 2005.
- (4) Lapointe, D.; Couture, P. Influence of the route of exposure on the accumulation and subcellular distribution of nickel and thallium in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2009**, *57*, 571–580.
- (5) Chapman, P. M.; Wang, F.; Janssen, C. R.; Goulet, R. R.; Kamunde, C. N. Conducting ecological risk assessments of inorganic metals and metalloids: current status. *Human Ecol. Risk Assess.* **2003**, *9*, 641–697.
- (6) Wallace, W. G.; Lopez, G. R. Relationship between subcellular cadmium distribution in prey and cadmium trophic transfer to a predator. *Estuaries.* **1996**, *19*, 923–930.
- (7) Wallace, W. G.; Luoma, S. N. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* **2003**, *257*, 125–137.
- (8) Dumas, J.; Hare, L. The internal distribution of nickel and thallium in two freshwater invertebrates and its relevance to trophic transfer. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 5144–5149.
- (9) Dubois, M.; Hare, L. Subcellular distribution of cadmium in two aquatic invertebrates: change over time and relationship to Cd assimilation and loss by a predatory insect. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 356–361.
- (10) Reinfelder, J. R.; Fisher, N. S. Retention of elements absorbed by juvenile fish (*Menidia menidia* and *Menidia beryllina*) from zooplankton prey. *Limnol. Oceanogr.* **1994**, *39*, 1783–1789.
- (11) Zang, L.; Wang, W. X. Significance of subcellular metal distribution in prey in influencing the trophic transfer of metals in a marine fish. *Limnol. Oceanogr.* **2006**, *51*, 2008–2017.
- (12) Vijver, M. G.; Van Gestel, C. A. M.; Lanno, R. P.; Van Straalen, N. M.; Peijnenburg, W. J. G. M. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: A review. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 4705–4712.
- (13) Campbell, P. G. C.; Hare, L. Metal detoxification in freshwater animals. Roles of metallothioneins. *Metal Ions Life Sci.* **2009**, *5*, 239–277.
- (14) Chau, Y. K.; Kulikovskiy-Cordeiro, O. T. R. Occurrence of nickel in the Canadian environment. *Environ. Rev.* **1995**, *3*, 95–120.
- (15) *Thallium*, Environmental health criteria No. 182; World Health Organization: Geneva, 1996.
- (16) Ralph, L.; Twiss, M. R. Comparative toxicity of thallium (I), thallium (II) and cadmium (II) to the unicellular alga *Chlorella* isolated from lake Erie. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2002**, *68*, 261–268.
- (17) Ponton, D. E.; Hare, L. Nickel dynamics in the lakewater metal biomonitor *Chaoborus*. *Aquat. Toxicol.* **2009**, in press.
- (18) Elendt, B. P.; Bias, W. R. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Res.* **1990**, *24*, 1157–1167.
- (19) Canadian Environmental Protection Service. Biological Test Method: Test of Larval Growth and Survival Using Fathead Minnows, EPS 1/RM/22; Environment Canada: Ottawa, Ontario, Canada, 1992.
- (20) Twining, B. S.; Twiss, M. R.; Fisher, N. S. Oxidation of thallium by freshwater plankton communities. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 2720–2726.
- (21) Munger, C.; Hare, L. Relative Importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): Implications for predicting Cd bioaccumulation in nature. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 891–895.
- (22) Wallace, W. G.; Lee, B.-G.; Luoma, S. N. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* **2003**, *249*, 183–197.
- (23) 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.* **2006**, *77*, 178–189.
- (24) Pelletier, D.; Dutil, J.-D.; Blier, P.; Guderley, H. Relation between growth rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod *Gadus morhua*. *J. Comp. Physiol. B* **1994**, *164*, 179–190.
- (25) Couture, P.; Dutil, J.-D.; Guderley, H. Biochemical correlates of growth and condition in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) from Newfoundland. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1998**, *55*, 1591–1598.

- (26) Guderley, H.; Lapointe, D.; Bédard, M.; Dutil, J.-D. Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Comp. Physiol. Biochem. A* **2003**, *135*, 347–356.
- (27) Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Porvenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goetze, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85.
- (28) Borgmann, U.; Norwood, W. P.; Reynoldson, T. B.; Rosa, F. Identifying cause in sediment assessments: Bioavailability and the sediment quality triad. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **2001**, *58*, 950–960.
- (29) Pane, E. F.; McGeer, J. C.; Wood, C. M. Effects of chronic waterborne nickel exposure on two successive generations of *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, *23*, 1051–1056.
- (30) Borgmann, U.; Cheam, V.; Norwood, W. P.; Lechner, J. Toxicity and bioaccumulation of thallium in *Hyalella azteca*, with comparison to other metals and prediction of environmental impact. *Environ. Pollut.* **1998**, *99*, 105–114.
- (31) Hédoïn, L.; Pringault, O.; Metian, M.; Bustamante, P.; Warnau, M. Nickel bioaccumulation in bivalves from the New Caledonia lagoon: seawater and food exposure. *Chemosphere* **2007**, *66*, 1449–1457.
- (32) Muysen, B. T. A.; Brix, K. V.; DeForest, D. K.; Janssen, C. R. Nickel essentiality and homeostasis in aquatic organisms. *Environ. Rev.* **2004**, *12*, 113–131.
- (33) Chowdhury, M. J.; Bucking, C.; Wood, C. M. Pre-exposure to waterborne nickel downregulates gastrointestinal nickel uptake in rainbow trout: indirect evidence for nickel essentiality. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 1359–1364.
- (34) Twining, B. S.; Fisher, N. S. Trophic transfer of trace metals from protozoa to mesozooplankton. *Limnol. Oceanogr.* **2004**, *41*, 28–39.
- (35) Wang, Y.; Fang, J.; Leonard, S. S.; Rao, K. M. K. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *36*, 1434–1443.
- (36) Pierron, F.; Bourret, V.; St-Cyr, J.; Campbell, P. G. C.; Bernatchez, L.; Couture, P. Transcriptional responses to environmental metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*) collected in lakes with differing metal levels (Cd, Cu, Ni). *Ecotoxicology* **2009**, *18*, 620–631.
- (37) Hanzel, C. E.; Villaverde, M. S.; Verstraeten, S. V. Glutathione metabolism is impaired in vitro by thallium(III) hydroxide. *Toxicology* **2005**, *207*, 501–510.

ES901929M

11 Annexe A

Liste des fournisseurs d'organismes :

Tête-de-boule (Pimephales promelas)

Mark Brisco
Paul Davis Systems of Chatham Kent
77 Ann Street
Thamesville (ON)
N0P 2K0

Aquatic Bio Systems Inc.
1300 Blue Spruce Drive, Suite C
Fort Collins, Colorado
80524, USA.

Cystes d'Artemia salina

Mirido Importations
6312, rue Notre-Dame Ouest
Montréal (QC)
H4C 1V4

Tubifex tubifex

Aquatic Research Organisms
1 Lafayette road, Building 7
Hampton, New Hampshire
03842, USA

Daphnia magna

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
Complexe Scientifique
2700, rue Einstein
Québec (QC)
G1P 3W8

Aquatic Bio Systems Inc.
1300 Blue Spruce Drive, Suite C
Fort Collins, Colorado
80524, USA.

12 Annexe B

Composition de l'eau reconstituée :

CaCl ₂	35.3 mg L ⁻¹
MgSO ₄	32.8 mg L ⁻¹
NaHCO ₃	51.2 mg L ⁻¹
KCl	2.1 mg L ⁻¹
NaBr	0.55 mg L ⁻¹
CaSO ₄	3.4 mg L ⁻¹

pH ~ 7.5

Dureté : ~ 53 mg L⁻¹ (équivalents de CaCO₃).

Concentration des ions :

[Ca ²⁺]	70 μM
[Cl ⁻]	129 μM
[K ⁺]	12 μM
[Mg ²⁺]	13 μM
[Na ⁺]	179 μM
[SO ₄ ²⁻]	63 μM

13 Annexe C

Description des différents traitements utilisés lors de l'exposition des têtes-de-boule. Pour les concentrations, valeurs moyennes \pm erreur type. N.D.= métal non détecté.

Stade de vie utilisé	Durée de l'exposition (jours)	Traitements	[Ni] dans l'eau (ug L ⁻¹)	[Ni] dans les proies (ug g ⁻¹ sec)
Embryons (chapitre 9)	1 et 2	Contrôle	0.02 \pm 0.01	
		Eau [faible]	24.8 \pm 0.4	
		Eau [élevée]	252 \pm 2	
		Proies	0.17 \pm 0.07	
		Eau [faible] + Proies	27.0 \pm 0.8	
		Eau [élevée] + Proies	256 \pm 2	
Larves (chapitre 9)	1, 7, 14 et 21	Contrôle	0.02 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02
	Eau [faible]	24.8 \pm 0.4	0.19 \pm 0.02	
	Eau [élevée]	252 \pm 2	0.19 \pm 0.02	
	Proies (<i>Artemia</i>)	0.17 \pm 0.07	13.8 \pm 2.0	
	Eau [faible]+Proies	27.0 \pm 0.8	13.8 \pm 2.0	
	Eau [élevée]+Proies	256 \pm 2	13.8 \pm 2.0	
Juvéniles (chapitre 8)	2, 4, 6 et 8	Contrôle	0.48 \pm 0.02	0.56 \pm 0.01
		Eau	16.0 \pm 0.5	0.56 \pm 0.01
		Proies (<i>Tubifex</i>)	0.48 \pm 0.02	10.0 \pm 0.3
		Eau+Proies	16.0 \pm 0.5	10.0 \pm 0.3
Juvéniles (chapitre 10)	7	Contrôle (<i>Tubifex</i>)	0.12 \pm 0.03	1.2 \pm 0.3
		Proies (<i>Tubifex</i>)	0.17 \pm 0.04	22 \pm 5
		Contrôle (<i>Daphnia</i>)	N.D.	0.8 \pm 0.1
		Proies (<i>Daphnia</i>)	0.5 \pm 0.1	108 \pm 14

Stade de vie utilisé	Durée de l'exposition (jours)	Traitements	[TI] dans l'eau (ug L ⁻¹)	[TI] dans les proies (ug g ⁻¹ sec)
Embryons (chapitre 9)	1 et 2	Contrôle	0.0017±0.0003	
		Eau [faible]	0.091±0.001	
		Eau [élevée]	0.89±0.01	
		Proies	0.00255±0.00007	
		Eau [faible]+Proies	0.0878±0.0005	
		Eau [élevée]+Proies	0.902±0.006	
Larves (chapitre 9)	1, 7, 14 et 21	Contrôle	0.0017±0.0003	0.021±0.001
		Eau [faible]	0.091±0.001	0.021±0.001
		Eau [élevée]	0.89±0.01	0.021±0.001
		Proies (<i>Artemia</i>)	0.00255±0.00007	0.086±0.006
		Eau [faible]+Proies	0.0878±0.0005	0.086±0.006
		Eau [élevée]+Proies	0.902±0.006	0.086±0.006
Juvéniles (chapitre 8)	2, 4, 6 et 8	Contrôle	0.0089±0.0009	0.166±0.006
		Eau	0.095±0.001	0.166±0.006
		Proies (<i>Tubifex</i>)	0.0089±0.0009	1.4±0.1
		Eau+Proies	0.095±0.001	1.4±0.1
Juvéniles (chapitre 10)	7	Contrôle (<i>Tubifex</i>)	N.D.	0.04±0.01
		Proies (<i>Tubifex</i>)	0.004±0.001	0.9±0.1
		Contrôle (<i>Daphnia</i>)	N.D.	0.03±0.01
		Proies (<i>Daphnia</i>)	0.0017±0.0005	0.09±0.01

14 Annexe D

Mise au point du protocole de fractionnement subcellulaire (chapitre 8)

Afin de séparer de façon opérationnelle les constituants cellulaires en six compartiments ou fractions, nous avons utilisé le protocole de centrifugation différentielle tel que décrit par Giguère et al. (2006). Nous avons investigué l'intégrité des organites suite à l'application de ce protocole en utilisant, comme indicateurs, deux enzymes mitochondriales : la cytochrome c oxidase (CCO), située dans la membrane des mitochondries, ainsi que la citrate synthase (CS), que l'on retrouve dans la matrice mitochondriale.

En principe, si la méthode d'homogénéisation s'avère adéquate, c'est-à-dire que les organites demeurent intacts suite à l'homogénéisation, nous devrions détecter une activité de la CCO uniquement dans le compartiment « mitochondrie ». De plus, l'activité mesurée pour la CS devrait être très faible considérant que l'enzyme est séquestrée dans la matrice mitochondriale et que l'on s'attend à ce que les mitochondries demeurent intactes. Une activité significative de la CS suggérerait que les mitochondries aient été lysées.

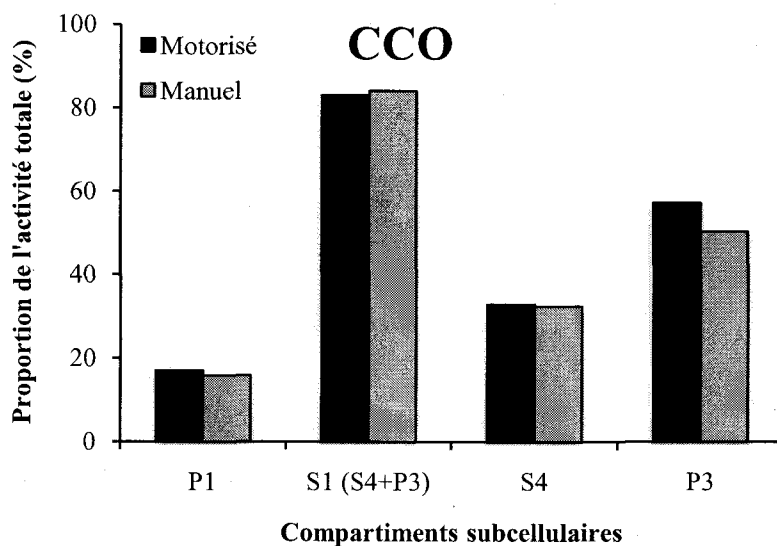
Dans un premier temps, nous avons comparé deux méthodes d'homogénéisation : le Potter-Elvehjem motorisé (basse vitesse) et le pilon de verre. La version initiale du protocole d'homogénéisation comprenait les étapes suivantes :

- 1- Sortir les poissons du congélateur -80 °C et les dégeler sur la glace
- 2- Peser les poissons
- 3- Couper les poissons en petits morceaux à l'aide d'une lame de rasoir
- 4- Homogénéiser à l'aide d'une des deux méthodes en faisant 5 passages. Les poissons sont homogénéisés dans 9 volumes de tampon KCl (140 mM; HEPES 20 mM; MgCl₂ 5 mM; EDTA 10 mM) (ratio 1/9 m/v)

Après l'homogénéisation, nous avons procédé aux premières étapes de centrifugation différentielle :

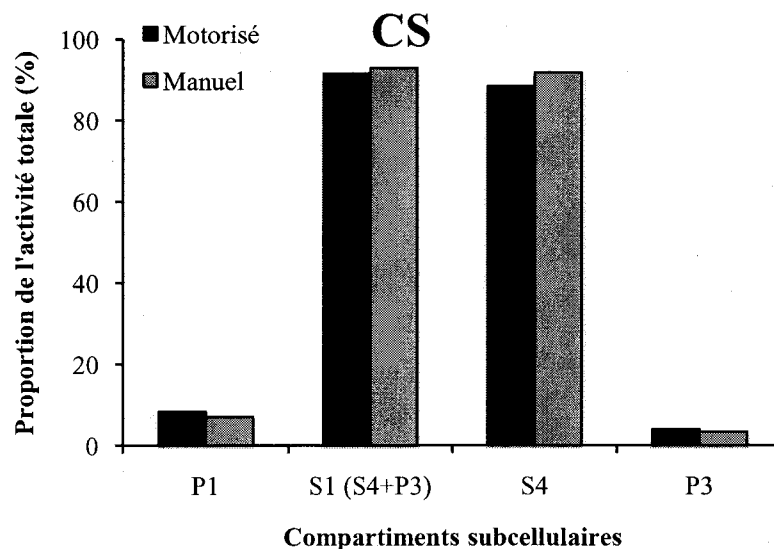
- 1- L'homogénat est centrifugé à 800 x g pendant 15 min à 4 °C afin de séparer les débris cellulaires (culot P1) du surnageant (S1)
- 2- Une partie du S1 est conservée pour les analyses enzymatiques, le reste est ensuite centrifugé à 10 000 x g pendant 30 min à 4 °C afin de séparer les mitochondries (culot P3) du cytosol contenant les autres organites (S4)

Les activités enzymatiques ont été mesurées dans les compartiments suivants : débris cellulaires (P1 resuspendu dans du tampon d'homogénéisation), S1, S4 et mitochondries (P3 resuspendu). La somme de l'activité mesurée dans P1 et S1 représente l'activité totale dans l'échantillon tandis que la somme de l'activité mesurée dans S4 et P3 devrait correspondre à l'activité mesurée dans un volume équivalent de S1.



La figure ci-dessus illustre les résultats obtenus pour la CCO (membrane mitochondriale) pour les deux méthodes d'homogénéisation. Les résultats démontrent que dans les deux cas, environ 80% de l'activité enzymatique est mesurée dans le surnageant S1 suite à la première centrifugation, ce qui suggère que les deux méthodes permettent une bonne extraction des mitochondries. Après la deuxième centrifugation, nous avons mesuré une activité importante

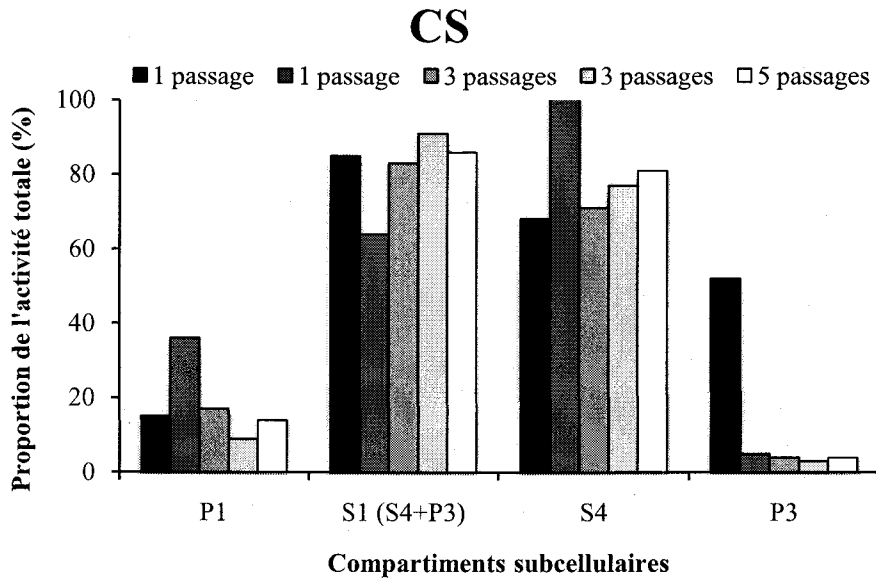
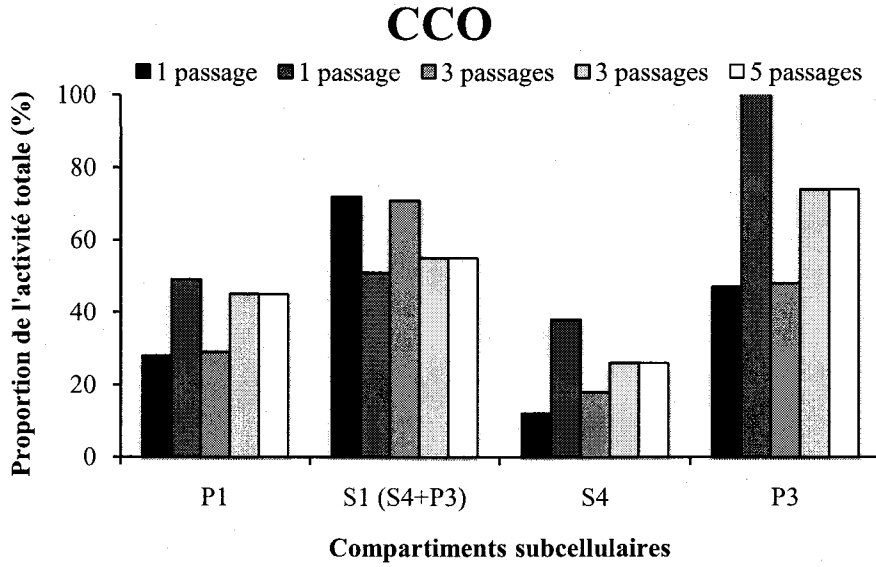
dans le surnageant S4 (cytosol), proportionnellement à l'activité mesurée dans le culot P3 (mitochondries), ce qui suggère qu'une proportion importante des mitochondries n'a pas précipité dans le culot P3 ou que des fragments de membranes mitochondriales sont présents dans le cytosol, et ce pour les deux types d'homogénéisation utilisés. Les résultats obtenus pour l'activité de la CS (matrice mitochondriale), présentés dans la figure ci-dessous, permettent de confirmer cette hypothèse. Dès la première centrifugation, nous avons mesuré une activité importante de la CS dans S1, ce qui suggère qu'une partie des mitochondries n'étaient pas intactes suite à l'homogénéisation car la matrice a été libérée dans le surnageant, résultat qui a été confirmé après la deuxième centrifugation car une activité importante de la CS fut mesurée dans le compartiment S4 (cytosol).



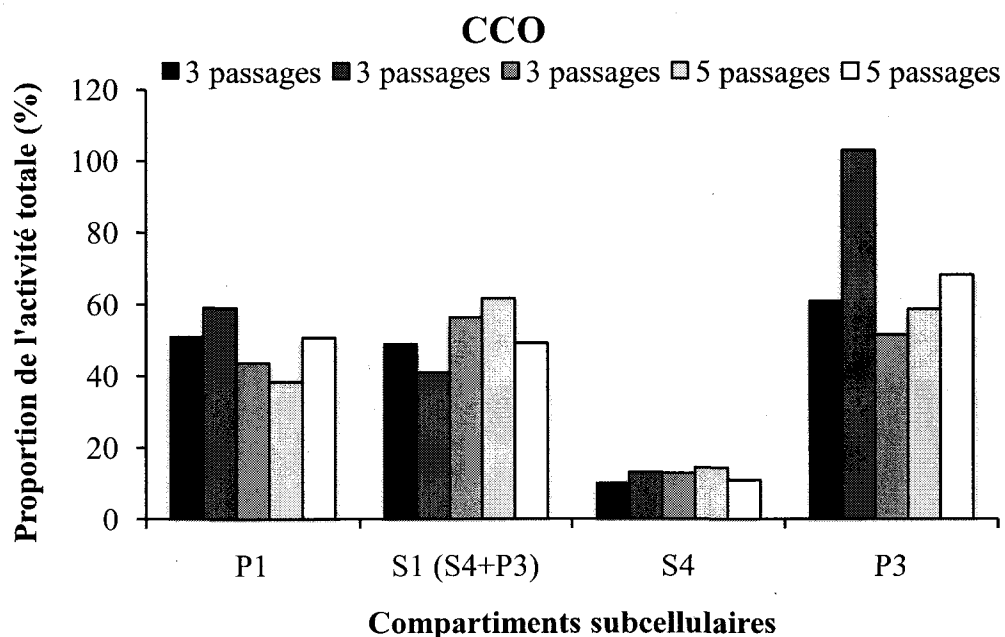
Suite à ces résultats, puisque les deux méthodes d'homogénéisation semblaient comparables, nous avons décidé d'utiliser l'homogénéisation à l'aide du Potter-Elvehjem motorisé car elle est plus constante et uniforme.

Afin de déterminer si le nombre de passages est la cause de l'éclatement des mitochondries, nous avons par la suite appliqué le même protocole d'homogénéisation et de centrifugation que précédemment, en comparant cette fois-ci 1, 3 et 5 passages sous l'homogénéisateur motorisé. Les résultats obtenus pour la CCO et la CS, présentés aux figures suivantes, ne

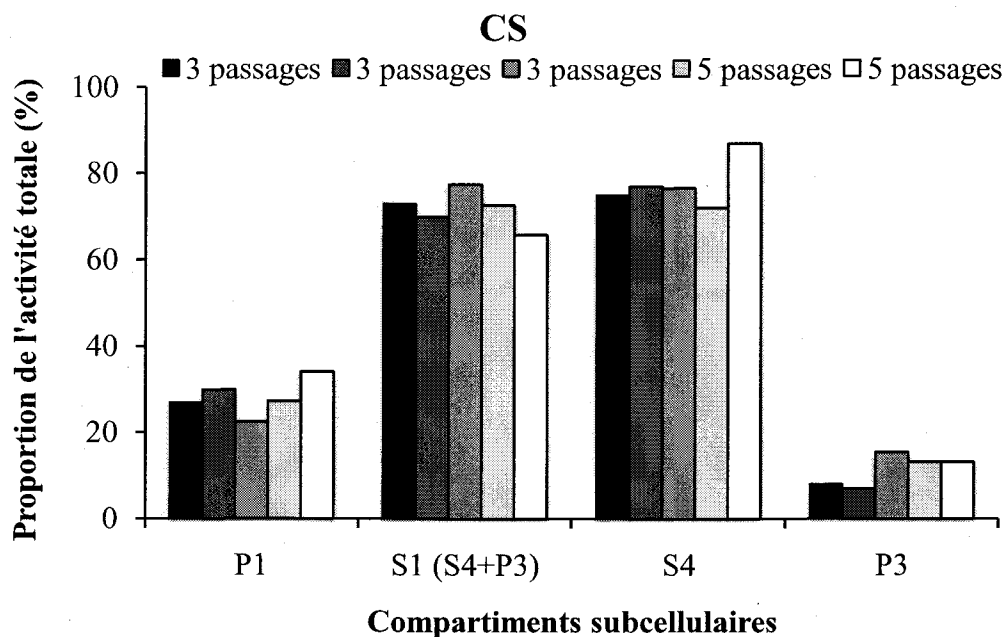
démontrent pas de différences importantes selon le nombre de passages effectués. Ainsi, le nombre de passages effectués lors de l'homogénéisation ne semble pas affecter l'intégrité des mitochondries (de 15 à 40% de l'activité de la CCO est mesurée dans le compartiment S4 plutôt que P3).



Nous avons tenté de réduire la proportion de mitochondries lysées en utilisant un tampon d'homogénéisation (250 mM Sucrose; 10 mM Tris; pH=7.4) dont la tonicité serait plus proche de celle de l'intérieur des cellules, mais en comparant 3 et 5 passages. Les résultats obtenus pour les deux enzymes ne montrent pas de différences importantes selon le nombre de passages effectués. Cependant, en ce qui concerne la CCO (figure ci-dessous), la proportion de l'activité mesurée dans le compartiment S4 avec le tampon sucrose est inférieure à 20%, ce qui est deux fois moins élevé qu'avec le tampon KCl (jusqu'à 40%). Ces résultats suggèrent qu'avec le tampon sucrose, nous obtenons une meilleure précipitation des mitochondries ou des fragments de membranes mitochondriales dans le culot P3.



Malheureusement, nous détectons toujours la CS dans le compartiment S4 (figure suivante), ce qui suggère que les mitochondries ne sont pas intactes malgré le changement de tampon.



Suite à l'ensemble des essais que nous avons effectués, il apparaît probable que l'intégrité des mitochondries (et probablement des autres organites) ait été compromise par la congélation plutôt que par la méthode d'homogénéisation.

Le protocole de fractionnement subcellulaire utilisé est le suivant :

- 1- Tampon sucrose (250 mM; Tris 10 mM; pH 7.4). Ratio tissu/tampon (1/9; m/v)
- 2- Homogénéisateur Potter-Elvehjem motorisé; 5 passages

Au moment de réaliser cette mise au point, les expositions du chapitre 8 étaient déjà complétées et les échantillons étaient conservés au congélateur -80 °C. Cependant, les expériences du chapitre 10 n'étaient pas encore effectuées. Dans le cadre du chapitre 10, nous avons donc procédé au fractionnement subcellulaire sur les échantillons frais, immédiatement après le sacrifice, afin d'éliminer l'impact de la congélation sur l'intégrité des mitochondries et autres organites.



