

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

**EFFETS DES STRESS THERMIQUE ET METALLIQUE SEULS OU EN
COMBINAISON SUR LE METABOLISME MITOCHONDRIAL ET LA
SANTE DU MENE TETE-DE-BOULE (*PIMEPHALES PROMELAS*)**

Par
Isabelle Fournier

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Claude Fortin
INRS-ETE

Examineur externe

Élise David
UFR sciences exactes et naturelles
Université de REIMS Champagne-
Ardenne

Directeur de recherche

Patrice Couture
INRS-ETE

AVANT-PROPOS

Avant de commencer ma maîtrise, je voyais cette étape comme un passage obligé entre ce que j'avais déjà fait et ce que je voulais vraiment faire dans la vie : être professeure-chercheuse. Du haut de mes 22 ans, avec 3 ans d'université dans le corps, j'estimais que j'avais les connaissances nécessaires pour comprendre ce qu'il restait de la biologie à partir des livres de référence et des articles scientifiques. Toutefois, j'ai constaté qu'être étudiant au cycle supérieur c'est loin d'être juste une question de connaissances théoriques. J'ai appris à remplir des formulaires pour des demandes de bourse comme si j'étais la personne la plus exceptionnelle de la terre. J'ai appris à toujours prendre en note beaucoup plus de détails qu'il n'en semble nécessaire parce que notre mémoire est défaillante à plutôt court terme! J'ai confirmé que pour faire du travail de laboratoire, il faut vraiment aimer ça, parce que rien ne fonctionne jamais comme on veut. J'ai appris à apprivoiser le monde mystique des congrès et j'ai même donné une conférence en anglais!

J'ai appris tout ça et beaucoup plus durant ces deux années, mais j'ai surtout appris qu'il me reste encore beaucoup à apprendre.

Merci à tous ces gens qui, de près ou de loin, ont contribué au succès de ma maîtrise par leur soutien moral, académique ou technique :

Aglaé Adam, Audrey Moffett, Bernadette Mainville, Caroline Fournier, Cédric Beaubien, Cindy Cormier, Claude Fortin, Claire Laperruque, Élise David, Jean-Claude Fournier, Jean-Daniel Bourgault, Johanne Bolduc, Julie Perreault x2, Louis-Philippe Thérout, Marcel Bolduc, Marie-Anne Bergeron, Mariem Fadhlou, Marjorie Allaire-Verville, Ophélie Drevet, Patrice Couture, Pierre Blier, Pierre Masselot ♥, Renée Sénéchal-Huot et Richard Morin.

RESUME

Les organismes aquatiques sont exposés de façon chronique à plusieurs sources de stress simultanément. Celles-ci peuvent être naturelles (ex. hypoxie, parasitisme) ou anthropiques (ex. contaminants). Toutefois, les études toxicologiques prennent rarement en compte cette information. L'objectif de ce mémoire est d'éclaircir les effets combinés d'une exposition chronique au cadmium (Cd) et à un stress thermique sur le métabolisme mitochondrial du mené tête-de-boule (*Pimephales promelas*). Pour ce faire, ce dernier a été exposé pendant 8 semaines au laboratoire aux deux stressseurs seuls (6 µg Cd/L ou 25°C) ou en combinaison. Après cette exposition, divers paramètres ont été mesurés ou calculés soit, l'indice de Fulton, l'indice hépatosomatique, la respiration mitochondriale hépatique, l'activité de la pyruvate déshydrogénase hépatique, le dosage du Cd hépatique total et mitochondrial et les concentrations de protéines hépatiques et musculaires.

L'exposition au Cd seul n'a influencé aucun des paramètres ci-dessus. Le stress thermique seul a diminué l'indice de Fulton et augmenté la respiration mitochondriale. L'exposition combinée, pour sa part, a mené à une diminution des indices hépatosomatique et de Fulton ainsi que du pourcentage de protéines hépatiques et à une augmentation de l'activité de la pyruvate déshydrogénase et de la respiration mitochondriale. De plus, il y avait une synergie au niveau de la mortalité. Ces résultats suggèrent qu'une exposition à une faible dose de Cd est un stress que les poissons peuvent gérer en modulant leur production d'énergie, surtout s'il y a absence d'autres sources de stress. Toutefois, lorsque les concentrations de Cd augmentent et qu'il y a addition d'un stress thermique, les poissons font face à une carence énergétique qui les oblige à utiliser leurs réserves et menace leur survie.

Mots clés : Cadmium ; température ; stressseurs combinés ; mitochondrie ; poissons

ABSTRACT

Aquatic organisms chronically face numerous stressors simultaneously, including natural (eg. hypoxia, parasitism) and anthropogenic (ex. contaminants) stressors. However, the effects of combined stressors are rarely studied. This study was designed to evaluate chronic effects of a combined exposure to cadmium (Cd) and thermal stress on mitochondrial metabolism of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Fish were exposed for 8 weeks to both stressors alone or in combination. After exposure, several biomarkers were assessed: Fulton and hepatosomatic indices, hepatic mitochondrial respiration, hepatic pyruvate dehydrogenase activity, hepatic total and mitochondrial Cd concentrations and hepatic and muscular proteins concentrations.

Exposure to Cd alone influenced none of the biomarkers examined. Exposure to thermal stress alone led to a decreased Fulton index and increased mitochondrial respiration. The combined exposure to both stressors resulted in a synergistic effect on mortality. Furthermore, it also led to a decrease in hepatosomatic and Fulton indices as well as hepatic protein concentrations and to an increase in pyruvate dehydrogenase activity and mitochondrial respiration. These results suggest that fish are able to manage Cd with an increased energy production when the concentration of Cd is low and in the absence of other stressors. However, when Cd concentrations increases and in the presence of another stressor, fish face an increased energy demand leading to energy store depletion that threatens their lives.

Keywords: Cadmium; temperature; combined stressors; mitochondria; fish

TABLE DES MATIÈRES

Avant-Propos	iii
Résumé.....	v
Abstract.....	vii
Liste des figures	xi
Liste des abréviations.....	xiii
[REVUE DE LA LITTÉRATURE]	1
1 Rappels sur le métabolisme énergétique ou cours 101 pour les téméraires parcourant mon mémoire	3
1.1 <i>La glycolyse</i>	4
1.2 <i>Le cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique</i>	5
1.3 <i>La phosphorylation oxydative</i>	6
1.3.1 <i>Le cycle-Q</i>	7
1.4 <i>Le découplage mitochondrial</i>	8
2 Écotoxicologie	11
3 Toxicité du cadmium	13
3.1 <i>Effets sur des systèmes isolés</i>	13
3.2 <i>Accumulation et effets sur des organismes entiers</i>	15
3.2.1 <i>Accumulation dans les tissus et répartition subcellulaire</i>	15
3.2.2 <i>Le stress oxydant</i>	17
3.2.3 <i>La croissance et le métabolisme énergétique</i>	19
3.3 <i>Résumé de la section Cadmium</i>	22
4 Effets négatifs liés à une hausse de la température	23
4.1 <i>Le cycle reproducteur, un effet confondant</i>	23
4.2 <i>Le stress oxydant</i>	25
4.3 <i>Le métabolisme énergétique</i>	27
4.4 <i>Résumé de la section température</i>	29
5 Effets combinés du cadmium et de la température	31
[PROJET DE RECHERCHE]	35
6 Objectifs	37
7 Matériel et méthode.....	39
7.1 <i>Soins aux animaux et conditions d'exposition</i>	39

7.2	<i>Isolation des tissus</i>	40
7.3	<i>Respiration mitochondriale</i>	41
7.4	<i>Détermination du contenu en protéines</i>	42
7.5	<i>Indices morphométriques</i>	42
7.6	<i>Dosage du Cd</i>	43
7.7	<i>Statistiques</i>	43
8	Résultats.....	45
8.1	<i>Concentrations de Cd</i>	45
8.2	<i>État de santé général</i>	46
8.3	<i>Métabolisme mitochondrial</i>	47
9	Conclusions.....	51
10	Perspectives futures.....	53
	[ARTICLE]	55
11	Présentation de l'article.....	57
12	Résumé français de l'article.....	59
13	Article.....	61
	[RÉFÉRENCES]	87

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Schématisation de la glycolyse.....	4
Figure 2 Schématisation du cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique.....	5
Figure 3 Schématisation de la chaîne de transport d'électrons.....	6
Figure 4 Schématisation du cycle-Q.....	8
Figure 5 Cycle du GSH.....	18
Figure 6 Accumulation de Cd dans (A) foie et (B) mitochondries du foie de <i>Pimephales promela</i>	45
Figure 7 Effet du Cd et de la température sur (A) l'Indice de Condition de Fulton et (B) l'Indice Hépatosomatique de <i>Pimephales promelas</i>	46
Figure 8 Effet du Cd et de la température sur la concentration de protéines (% w/w, p.h.) (A) hépatique et (B) musculaire de <i>Pimephales promelas</i>	47
Figure 9 Effet du Cd et de la tempéraure sur la respiration mitochondriale hépatique de <i>Pimephales promelas</i> . (A) CICIIOXPHOS, (B) CIOXPHOS et (C) CIIOXPHOS	48
Figure 10 Effet du Cd et de la température sur l'activité hépatique de la pyruvate déshydrogénase chez <i>Pimephales promelas</i>	49

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADP : Adénosine diphosphate

ATP : Adénosine triphosphate

B_H : Cytochrome b-562

B_L : Cytochrome b-566

BMR : Basal metabolic rate

C₁ : Cytochrome 1

CAT : Catalase

CL₅₀ : Concentration létale 50 %

CsA : Cyclosporine A

DTT : Dithiothréitol

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FADH : flavine adénine dinucléotide oxydée

FADH₂ : Flavine adénine dinucléotide réduite

FCCP : P-trifluoromethoxyphenylhydrazone

FeS : Ferredoxine

G6PDH : Glucose-6-phosphate déshydrogénase

GPx : Glutathion peroxydase

GR : Glutathion réductase

GSH : Glutathion réduit

GST : Glutathion-s-transférase

GTP : Guanosine triphosphate

SQ : Semi-ubiquinone

HSP : Protéines de choc thermique

MDA : Malondialdéhyde

MDH : Malate déshydrogénase

MTs : Métallothionéines

NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotides oxydée

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotides réduite

PDH : Pyruvate déshydrogénase

P_i : Phosphate inorganique

pTPM : Pore de transition de perméabilité membranaire

Q : Ubiquinone

QH₂ : Ubiquinol

SOD : Superoxyde dismutase

[REVUE DE LA LITTERATURE]

1 RAPPELS SUR LE MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE OU COURS 101 POUR LES TÊMÉRAIRES PARCOURANT MON MÉMOIRE

Le métabolisme énergétique correspond à l'entièreté des réactions menant à la production d'énergie. Les réactions de catabolisme (dégradation des molécules) sont couplées aux réactions d'anabolisme (synthèse des molécules) afin que l'énergie libérée par l'un soit récupérée par l'autre. Dans les cellules animales, le siège du métabolisme énergétique est la mitochondrie, puisque la phosphorylation oxydative ayant lieu en son sein est la principale source d'adénosine triphosphate (ATP) de la cellule. L'ATP est un nucléotide (adénine) associé à un glucide (ribose) et à trois phosphates (PO_4). C'est une molécule qui peut emmagasiner beaucoup d'énergie dans ses liaisons phosphates (l'hydrolyse de l'ATP en ADP et en phosphate inorganique (P_i) libère 30,5 kJ/mol) et qui est assez stable pour que l'hydrolyse d'un groupement phosphate ne survienne pas spontanément, mais dont l'énergie d'activation est facilement atteignable à l'aide d'enzymes.

Un des principaux buts du métabolisme énergétique est de transférer l'énergie apportée par les aliments vers les liaisons phosphates de l'ATP. Pour ce faire, les aliments sont digérés en plus petites fractions, notamment en acides gras et en glycérol (produits de dégradation des lipides ingérés surtout sous forme de triglycérides), en glucides simples comme le glucose et le fructose et en acides aminés (constituants des protéines). Ces constituants élémentaires de la nourriture servent ensuite de substrats à diverses voies métaboliques dont la voie aérobie (c.à.d. nécessitant la présence d'oxygène, qui sera détaillée dans les prochains paragraphes) qui comprend la glycolyse (partie non-aérobie de la voie), le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique) et la phosphorylation oxydative. Bien que les glucides soient, en temps normal, les principaux substrats utilisés par le corps pour la production d'énergie, il est à noter que, tout comme la glycolyse, les voies d'oxydation des lipides (β -oxydation des acides gras) et des protéines (désamination oxydative) forment des intermédiaires qui rejoignent le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. En résumé, la glycolyse transforme le

glucose en pyruvate, en ATP et en cofacteurs. Le cycle de Krebs utilise ensuite le pyruvate en conjugaison avec l'oxaloacétate pour engendrer plus de cofacteurs et du guanosine triphosphate (GTP), un analogue moins répandu de l'ATP dont la base nucléique est la guanine. Enfin, la phosphorylation oxydative utilise les cofacteurs produits par les deux voies précédentes pour générer de l'ATP en grande quantité.

1.1 La glycolyse

La glycolyse (Figure 1) est une série de neuf étapes permettant d'extraire une petite quantité d'énergie du glucose en absence d'oxygène. C'est une voie métabolique qui a lieu à l'extérieur des mitochondries et qui permet de générer deux ATP, deux NADH et deux pyruvates par molécule de glucose.

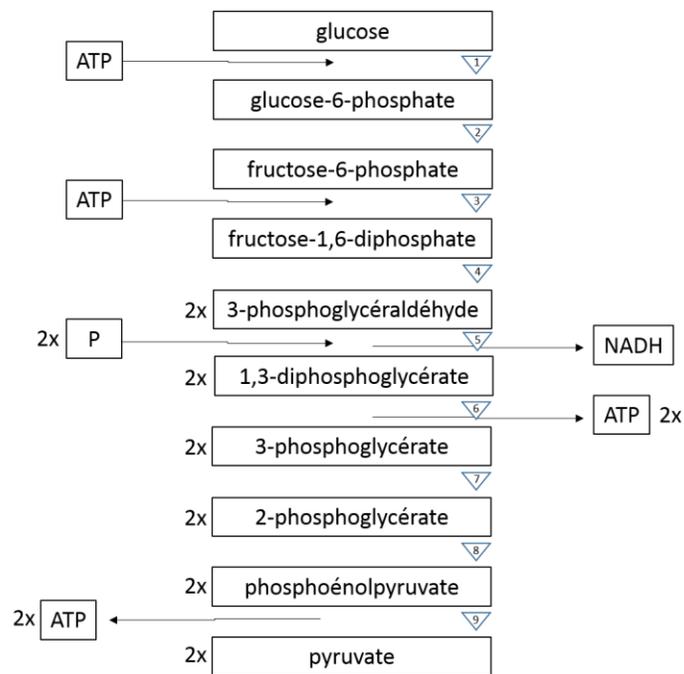


Figure 1 Schématisation de la glycolyse. ATP : Adénosine triphosphate, NADH : nicotinamide adénine dinucléotides, P : phosphate inorganique, 1 : hexokinase, 2 : glucose-6-phosphate isomérase, 3 : phosphofruktokinase-1, 4 : fructose-bisphosphate aldolase et triose-phosphate isomérase, 5 : glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase, 6 : phosphoglycérate kinase, 7 : phosphoglycérate mutase, 8 : énoïase et 9 : pyruvate kinase. Inspirée de Alberts *et al.*, 1989.

1.2 Le cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique

Comme son nom l'indique, le cycle de Krebs, ou cycle de l'acide citrique (Figure 2) est un cycle qui modifie puis régénère l'oxaloacétate après sa liaison avec l'acétyl-CoA afin de permettre la réduction de divers cofacteurs et l'entreposage d'un peu d'énergie sous la forme de GTP. L'acétyl-CoA est une molécule émergeant de la modification du pyruvate par la pyruvate déshydrogénase (PDH) à son entrée dans la mitochondrie. Les enzymes du cycle de Krebs sont donc des enzymes mitochondriales. Le cycle de Krebs permet la production de deux GTP et la réduction de deux NAD^+ et de deux FADH_2 par molécule de glucose.

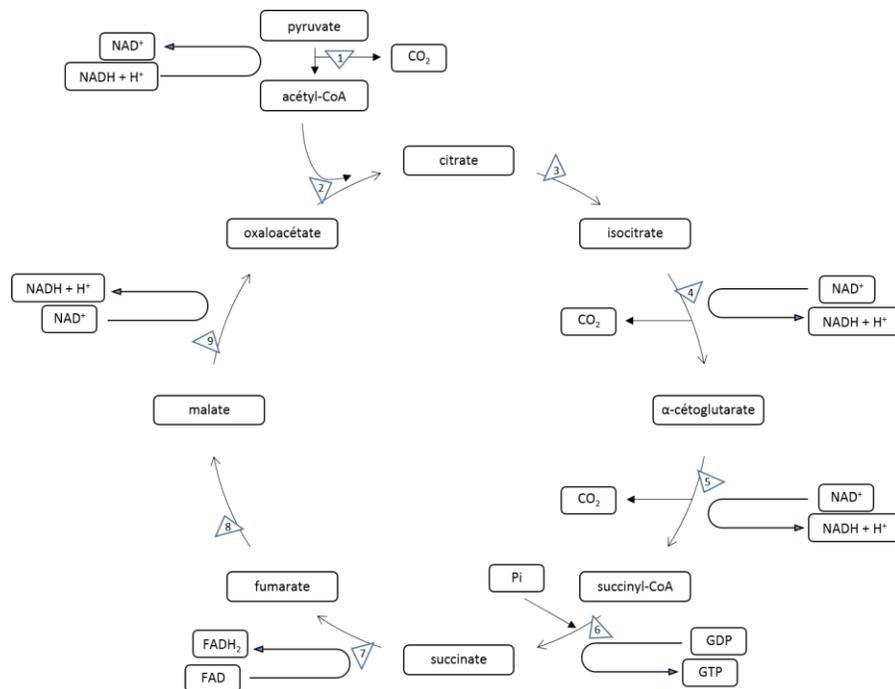


Figure 2 Schématisation du cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique. NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduite, NAD^+ : nicotinamide adénine dinucléotide oxydée, Pi : phosphate inorganique, FADH_2 : flavine adénine dinucléotide réduite, FAD : flavine adénine dinucléotide oxydée, GTP : guanosine triphosphate, GDP : guanosine diphosphate, CO_2 : dioxyde de carbone, 1 : pyruvate déshydrogénase, 2 : pyruvate carboxylase et citrate synthase, 3 : aconitase, 4 : isocitrate déshydrogénase, 5 : α -cétoglutarate déshydrogénase, 6 : succinyl-CoA synthétase, 7 : succinate déshydrogénase, 8 : fumarase, 9 : malate déshydrogénase. Inspirée de Alberts *et al.*, 1989.

1.3 La phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative (Figure 3) est la dernière étape du métabolisme énergétique menant à la production d'ATP. Elle comprend la chaîne de transport d'électrons et l'ATP synthase. Des électrons provenant des cofacteurs réduits dans les voies en amont (NADH et FADH₂) sont transférés à travers les différents complexes (I, II, III et IV) jusqu'à l'oxygène, leur accepteur final. Leur transfert permet de pomper des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire où ils s'accumulent, formant un gradient électrochimique utilisé au complexe V pour former l'ATP en favorisant la liaison d'un troisième phosphate à l'ADP. C'est de loin la voie la plus rentable puisqu'elle permet la production de 28 ATP par molécule de glucose. Elle régénère aussi les cofacteurs oxydés afin qu'ils puissent être de nouveau réduits dans les voies en amont.

Le cycle-Q, qui permet le passage des électrons à travers le complexe III, est détaillé ci-dessous puisqu'une de ses composantes est un site de liaison du Cd dans les mitochondries d'où il inhibe la chaîne de transport d'électrons et favorise la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO).

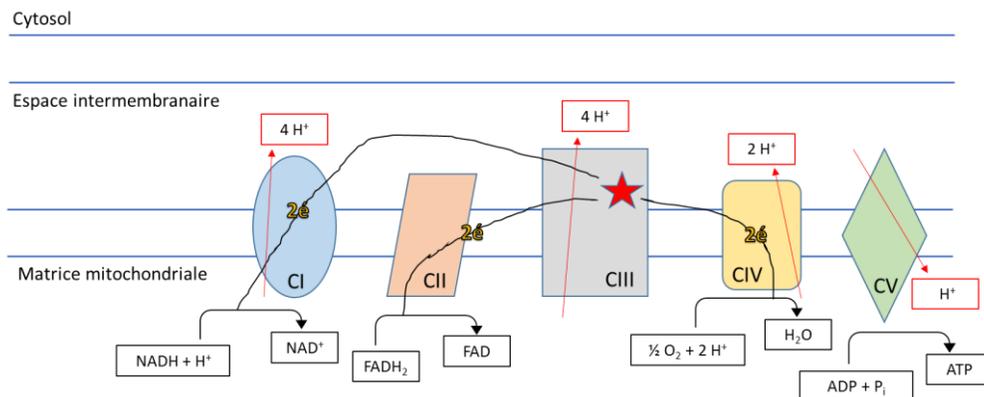


Figure 3 Schématisation de la chaîne de transport d'électrons. NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduite, NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide oxydée, FADH₂ : flavine adénine dinucléotide réduite, FAD : flavine adénine dinucléotide oxydée, H₂O : eau, Pi : phosphate inorganique, ADP : adénosine diphosphate, ATP : adénosine triphosphate, O₂ : oxygène gazeux, CI : NADH-ubiquinone oxydoréductase, CII : succinate-ubiquinone oxydoréductase, CIII : ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase, CIV : cytochrome c oxydase, CV : ATP synthase. L'étoile rouge correspond au site de liaison du Cd au CIII. Inspirée de Alberts *et al.*, 1989.

1.3.1 Le cycle-Q

Le cycle-Q (Figure 4) est un cycle en deux étapes permettant le passage d'électrons et le pompage de protons à travers le complexe III à l'aide de cytochromes et de ferrédoxines ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$). Ce cycle fait appel à l'oxydoréduction de la coenzyme Q_{10} dont la forme réduite est l'ubiquinol (QH_2) et la forme oxydée est l'ubiquinone (Q). Il est à noter que la réduction complète de la coenzyme Q_{10} nécessite deux électrons et que la forme de transition, appelée semi-ubiquinone (SQ), est très instable et donc particulièrement réactive.

Dans la première partie du cycle, un ubiquinol et une ubiquinone se lient au cytochrome b, respectivement aux sites Q_0 (oxydant) et Q_i (réducteur). L'ubiquinol est oxydé en ubiquinone et les deux électrons sont redirigés vers la ferrédoxine (FeS) et l'hème b-566 du cytochrome b (B_L). Le premier continue son chemin vers le cytochrome C_1 (C_1), puis vers le complexe IV, tandis que le deuxième est transféré à l'hème b-562 du cytochrome b (B_H), puis accepté par l'ubiquinone qui s'en trouve réduite en semi-ubiquinone. Au passage, deux protons sont pompés dans l'espace intermembranaire.

Dans la deuxième partie du cycle, un nouvel ubiquinol prend place au site oxydant et est oxydé en ubiquinone. Les deux électrons ainsi libérés parcourent le même trajet que dans la première partie du cycle à la différence que le deuxième électron est cette fois-ci accepté par la semi-ubiquinone qui s'en trouve réduit en ubiquinol. Deux nouveaux protons sont pompés dans l'espace intermembranaire.

Le Cd se lie à l'hème b-566 du cytochrome b, empêchant le deuxième électron de quitter l'ubiquinol, provoquant ainsi l'accumulation de coenzymes semi-réduites. Celles-ci étant très réactives, elles sont promptes à quitter la chaîne de transport d'électrons et à aller causer des dommages oxydants dans la mitochondrie.

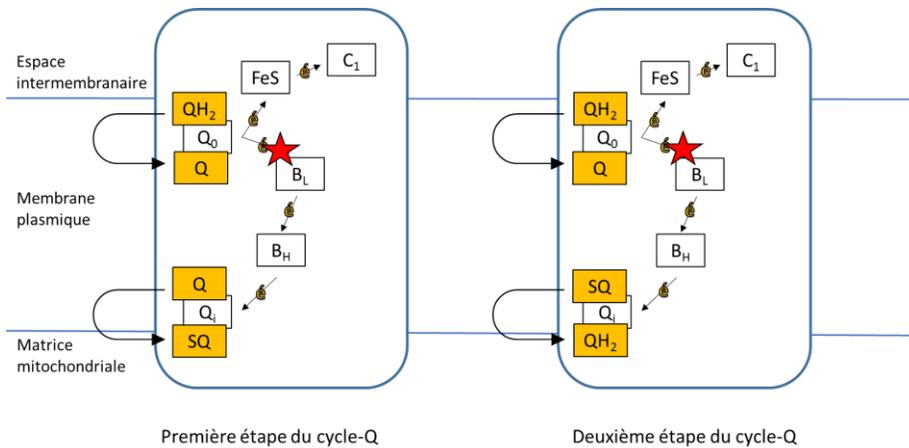


Figure 4 Schématisation du cycle-Q. Q : ubiquinone, SQ : semi-ubiquinone, QH₂ : ubiquinol, Q₀ : site oxydant du cytochrome b, Q_i : site réducteur du cytochrome b, B_L : cytochrome b-566, B_H : cytochrome b-562, FeS : ferredoxine (protéine Rieske), C₁ : cytochrome C₁. L'étoile rouge correspond au site de liaison du Cd au CIII. Inspirée de Alberts *et al.*, 1989.

1.4 Le découplage mitochondrial

Le découplage mitochondrial est un concept qui comprend tout ce qui empêche l'énergie libérée par l'oxydation des substrats d'être emmagasinée dans le gradient de protons (entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale) et ce dernier d'être utilisé pour la phosphorylation de l'ADP en ATP. Il existe plusieurs textes décrivant ce mécanisme physiologique. La section qui suit est basée sur les travaux de Brookes (2005), de Mailloux et ses collègues (2014) et de Sokolova (2004). Le découplage peut avoir lieu via un changement de perméabilité membranaire (perméabilité de la membrane face à diverses molécules), des protéines solubles de transport d'ions (ionophores) comme certains acides faibles ($A^- + H^+ \rightarrow AH$, ex. p-trifluorométhoxyphénylhydrazone (FCCP)) ou acides gras libres ($ROO^- + H^+ \rightarrow ROOH$) ou via des protéines membranaires de transport comme les ANT (ATP/ADP translocases), les AGC (transporteurs aspartate-glutamate) et les UCP (protéines découplantes). Dans tous les cas, le découplage est causé par la fuite de protons, c'est-à-dire par la diminution du gradient électrochimique entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Dans une cellule saine, la fuite de protons représente environ 25 % du taux métabolique standard et on pense que la fuite de protons se

produit principalement (au moins 90 %) à travers les protéines ou à l'interface lipides/protéines. Il est à noter cependant que le découplage n'est pas toujours une mauvaise chose dans une cellule. Par exemple, le tissu adipeux brun possède des protéines découplantes utilisées pour produire de la chaleur dans un but de thermorégulation.

La mitochondrie est une des sources les plus importantes d'ERO de la cellule, notamment sous la forme de superoxyde (O_2^-) produit aux complexes I et III, et cela est important pour plusieurs raisons concernant le découplage mitochondrial. Premièrement, les lipides sont une des cibles favorites des ERO, causant leur peroxydation. Il a été montré qu'en contexte d'oxydation des lipides, ni un inhibiteur du pore de transition de perméabilité membranaire (pTPM) ni un inhibiteur des protéines de transport membranaire ne venait à bout de diminuer la fuite de protons, suggérant une importante fuite causée directement par les dommages aux membranes. Deuxièmement, la fuite de protons pourrait être définie par un ratio entre le nombre de protons véritablement pompés par le système dans l'espace intermembranaire et le nombre de protons supposés être pompés par rapport au nombre d'électrons qui sont passés dans la chaîne de transport. Avec cette définition, il est possible d'inclure dans la fuite de protons non seulement ceux qui s'échappent de l'espace intermembranaire, mais aussi ceux qui n'y sont jamais arrivés. Cela est possible si un complexe qui est supposé pomper des protons dans l'espace intermembranaire ne le fait pas, comme dans le cas d'un court-circuit du cycle-Q. Dans ce cas, des deux électrons de l'ubiquinol donnés au site Q_0 , un atteint sa cible habituelle ($FeS \rightarrow C_1 \rightarrow CIV$), alors que l'autre est intercepté par l'oxygène. L'oxygène accepteur devient superoxyde et peut directement aller porter ce deuxième électron au C_1 , réagir avec les membranes ou être transformé en peroxyde par la superoxyde dismutase (SOD). Dans tous les cas, le cycle est complété sans passer par sa deuxième phase et aucun proton n'est donc pompé durant celle-ci; sur les quatre protons supposés être pompés par le complexe III pour ces deux électrons, il n'y en a que deux qui le sont vraiment. Ce cas de figure, et autres court-circuit similaires prenant place dans la mitochondrie, peuvent expliquer une partie de la fuite de protons apparente

durant le fonctionnement normal d'une cellule et pouvant être exacerbée dans le cas d'une contamination. Le Cd, par exemple, par sa liaison avec l'hème b-566 du complexe III peut mener à une augmentation de ce court-circuit du cycle-Q. Finalement, la production d'ERO par la mitochondrie est importante pour la fuite de protons parce que les deux sont interreliés. En effet, plus la respiration mitochondriale est élevée, plus il y a d'ERO produits. Toutefois, ces ERO causent une fuite de protons qui diminue l'efficacité de la respiration et donc diminue la production d'ERO et ainsi de suite.

2 ÉCOTOXICOLOGIE

La toxicologie est une discipline étudiant les effets de substances toxiques au niveau des organismes ou en-deçà (organes, tissus, etc.). L'écotoxicologie, pour sa part, combine l'écologie et la toxicologie de sorte que les effets des substances toxiques soient étudiés dans un contexte environnemental. Ces études considèrent ainsi que les substances toxiques interagissent avec l'environnement et que cet environnement peut à son tour avoir un impact sur leur toxicité. De plus, l'écotoxicologie prend en compte l'effet de stressseurs naturels ou de d'autres substances toxiques présents dans le même environnement sur la toxicité d'un produit donné. Il y a plusieurs effets possibles à l'ajout de sources de stress supplémentaire sur la toxicité d'un contaminant, mais seulement trois types d'interaction, soit additif, synergique ou antagoniste (Coors & De Meester, 2008). Les effets additifs sont ceux observés lorsque les stressseurs ne s'influencent pas mutuellement. Un organisme exposé aux deux stressseurs simultanément présentera donc les effets cumulés des deux stressseurs appliqués de façon individuelle. Par exemple, une population exposée au produit A a subi 3 % de mortalité, 4 % lorsqu'elle a été exposée au produit B et 7 % lorsqu'elle a été exposée aux deux en même temps. Les effets synergiques désignent une interaction conjointe des stressseurs avec l'organisme qui se manifeste par une réponse plus importante que l'addition. Dans l'exemple précédent, cela se traduirait par une mortalité supérieure à 7 % et signifierait qu'au moins un des deux stressseurs augmentent les effets néfastes de l'autre. Les effets antagonistes, au contraire, désigne une interaction conjointe des stressseurs avec l'organisme qui diminue l'intensité de la réponse observée, soit par exemple, une mortalité de moins de 7 %. Il est important de noter que l'exemple donné ci-haut est un effet négatif (la mortalité), mais que le même type d'interaction s'applique de la même manière pour les effets positifs (ex. la croissance) (Berenbaum, 1978; Crain *et al.*, 2009; Preston *et al.*, 2000).

Déterminer le type d'interaction entre plusieurs sources de stress est important puisque cela peut mettre en évidence une réponse des organismes à des niveaux

plus ou moins élevés qu'à ceux observés lors d'expositions individuelles. Par exemple, Coors et De Meester en 2008 n'ont observé aucune mortalité de *Daphnia magna* suite à des expositions individuelles à plusieurs stressseurs (parasites, pesticide, prédation), mais une importante mortalité lors de l'exposition combinée aux parasites et au pesticide. Ils proposent comme explication que le pesticide diminuerait le système immunitaire du petit crustacé, le rendant moins apte à résister au parasitisme. Une preuve que les effets néfastes d'un contaminant sont exacerbés par une autre source de stress (qu'il s'agisse d'un facteur anthropique ou environnemental) peut aussi faire un changement au niveau de la réglementation. Les sections suivantes relatent la littérature sur la toxicité du Cd, les effets néfastes reliés à une hausse de la température et sur les effets d'une combinaison de ces deux facteurs sur les organismes aquatiques. L'article décrit les travaux de laboratoire effectués dans le cadre de ma maîtrise ayant pour but d'éclaircir le type d'interaction qu'il y a entre le Cd et la température sur le métabolisme mitochondrial d'un poisson d'eau douce, le mené tête-de-boule.

3 TOXICITÉ DU CADMIUM

Le Cd est un métal non-essentiel dont la présence dans les cours d'eau est principalement une conséquence de l'activité humaine. En effet, ce métal naturellement séquestré en faible quantité dans la roche mère est mis en circulation dans l'environnement par les activités minières, l'agriculture et les rejets industriels. Au Québec, il fait l'objet de normes pour la protection des consommateurs régies par plusieurs règlements sous la *Loi sur la qualité de l'environnement* (Chapitre Q-2) dont le *Règlement sur la protection et la réhabilitation des terrains* (Chapitre Q-2, r.37) (5 mg Cd/Kg sol poids sec (p.s.) pour l'usage résidentiel, 20 mg Cd/Kg sol p.s. pour l'usage industriel et commercial et 5 µg Cd/L pour l'eau souterraine) et le *Règlement sur la qualité de l'eau potable* (Chapitre Q-2, r.40) (5 µg Cd/L pour l'eau destinée à la consommation humaine). Dans les eaux naturelles, il existe des critères de qualité de l'eau qui varient selon la dureté de l'eau et qui permettent de calculer des objectifs environnementaux de rejets. Ces derniers permettent de déterminer la quantité de contaminants pouvant être rejetés dans les écosystèmes sans en compromettre l'intégrité. Pour le Cd, les critères varient de 0,2 à 8,7 µg Cd/L pour la toxicité aiguë et de 0,05 à 0,76 µg Cd/L pour la toxicité chronique (MDDELCC, 2015). Le Conseil canadien des ministres de l'environnement avait recommandé en 2008 des normes semblables (Conseil canadien des ministres de l'environnement 1999) afin de protéger les organismes aquatiques d'une exposition chronique au Cd, lequel induit des effets néfastes à de faibles concentrations. Les sections suivantes révèlent ce que diverses études de laboratoire et de terrain ont trouvé comme effets d'une exposition à ce métal toxique.

3.1 Effets sur des systèmes isolés

Le Cd, comme plusieurs métaux divalents, s'accumule dans les mitochondries, empruntant, entre autres, des canaux calciques voltages-dépendants pour y entrer. À l'intérieur de ces organites, le Cd cible certains récepteurs calciques et

les groupements thiols (-SH). Un des effets fréquemment rencontrés suite à l'entrée de ce métal dans les cellules est l'ouverture du pTPM qui est une protéine imbriquée à travers les membranes internes et externes de la mitochondrie, qui une fois ouverte, laisse passer de façon non-sélective toutes les molécules dont la taille est inférieure à 1,5 kDa. Une fois ouvert, le pore augmente de façon disproportionnée la perméabilité membranaire de la mitochondrie permettant, entre autres, i) aux protons de quitter l'espace intermembranaire réduisant ainsi la production d'ATP, ii) à plusieurs molécules d'entrer dans la mitochondrie, créant un appel d'eau qui va faire gonfler la mitochondrie et qui peut éventuellement mener à la rupture de ses membranes et iii) au cytochrome c de quitter la mitochondrie menant ainsi à l'apoptose de la cellule (Belyaeva *et al.*, 2011; Mailloux *et al.*, 2014). L'ouverture de ce pore se fait en réponse à la liaison d'un ligand au site de liaison calcique ou au site de liaison « thiol ». En effet, dans des mitochondries isolées de foie de rat, les effets négatifs du Cd à petites concentrations (< 10 µM) peuvent être annulés par l'ajout de cyclosporine A (CsA, un inhibiteur de l'ouverture du pTPM), de ruthénium (inhibiteur du canal calcique voltage-dépendant) et de dithiothréitol (DTT, un agent réducteur capable de protéger les groupements thiols). Toutefois, à des concentrations plus élevées (30-70 µM), le DTT et le ruthénium rétablissent les fonctions de la mitochondrie, mais pas le CsA, suggérant la liaison du Cd sur d'autres groupements thiols que ceux du pTPM (Zhang *et al.*, 2011). En effet, le Cd cible aussi les groupements thiols de protéines libres (par exemple les enzymes du cycle de Krebs), ceux de protéines membranaires et a aussi d'autres sites de liaison comme l'hème b-566 du CIII (section « cycle-Q »). Il est à noter que la diminution de l'activité du CIII par le Cd peut être annulée par l'ajout d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA, chélateur) (Wang *et al.* 2004). Les dommages causés par le Cd peuvent être prévenus si le Cd ne parvient pas à entrer dans la cellule, s'il est chélaté ou si l'ouverture du pTPM est bloquée, mais pas par l'ajout d'antioxydants (Kurochkin *et al.*, 2011). Ainsi, il peut être conclu que le plus gros des effets néfastes causés par le Cd résultent donc de sa liaison directe avec les composantes cellulaires. Outre l'ouverture du pTPM, on compte parmi les effets néfastes d'une exposition

au Cd au niveau cellulaire le gonflement de la mitochondrie (« swelling ») (Al-Nasser, 2000; Zhang *et al.*, 2011), la perte de potentiel membranaire (Zhang *et al.*, 2011), la fuite de protons (Kurochkin *et al.*, 2011), le découplage mitochondrial (Al-Nasser, 2000), l'inhibition de la respiration mitochondriale (Al-Nasser, 2000; Garceau *et al.*, 2010; Ivanina *et al.*, 2008; Kurochkin *et al.*, 2011; Sokolova *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004) et l'inhibition de diverses enzymes du cycle de Krebs (aconitase, NAD-isocitrate déshydrogénase, NADPH-isocitrate déshydrogénase, citrate synthase) (Ivanina *et al.*, 2008; Kurochkin *et al.*, 2011; Sanni *et al.*, 2008).

3.2 Accumulation et effets sur des organismes entiers

Les effets toxiques du Cd sur les cellules ne sont plus à démontrer. Toutefois, les êtres vivants étant des modèles dynamiques interagissant avec leur environnement, les effets observés sur des systèmes isolés, bien que servant de base à la compréhension de la toxicité du Cd, ne se généralisent pas directement aux organismes entiers. La section qui suit relate ce qui est observé lorsque des ectothermes aquatiques (ainsi que des rats pour quelques exemples) sont exposés au Cd, soit l'accumulation du Cd et sa distribution dans les tissus ainsi que sa répartition subcellulaire, les effets sur la balance oxydante et finalement les effets sur la croissance et le métabolisme énergétique.

3.2.1 Accumulation dans les tissus et répartition subcellulaire

Le Cd est un métal bioaccumulatif, mais non-essentiel, c'est-à-dire que les organismes l'accumulent dans leurs tissus, mais qu'on ne lui connaît pas de fonction biologique. Le Cd étant un élément, il ne peut pas être fractionné sous une autre forme moins nocive. De plus, la détoxification du Cd est énergétiquement coûteuse et son élimination est lente, si bien que la répartition tissulaire et cellulaire constitue la première et la plus efficace ligne de défense contre le Cd (Audet & Couture, 2003; Kim *et al.*, 2004; Kraemer *et al.*, 2005; McGeer *et al.*, 2000).

Lors de l'ingestion, les tissus récepteurs (c.-à-d. les branchies dans le cas d'une exposition aqueuse et l'intestin lorsque l'exposition est d'origine alimentaire) reçoivent le Cd et l'accumulent (Kim *et al.*, 2004). C'est généralement dans ces tissus que l'on retrouve le plus de Cd à court terme. Ensuite, lorsque leur capacité de rétention est atteinte, ou que l'entrée du Cd est plus rapide que sa prise en charge, le métal est dérivé vers d'autres tissus, soit des tissus capables de le gérer, comme le foie ou les reins, ou des tissus sensibles, comme les gonades ou le cerveau (De Conto Cinier *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004). Une étude ayant pour but de déterminer la CL₅₀¹ du Cd chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) a montré que lorsque la concentration de Cd était plus élevée que 10 mg/L, le métal s'accumulait seulement dans les branchies et les poissons mouraient rapidement d'insuffisance respiratoire. Toutefois, lorsque la concentration était plus faible et que le poisson vivait plus longtemps, le Cd était distribué dans l'organisme et on observait des dommages sur d'autres organes (Pascoe & Matthey, 1977). Dans le même ordre d'idée, Arini et ses collègues (2015) ont exposé des poissons-zèbres (*Danio rerio*) au Cd pendant 15 jours, puis ont observé la distribution tissulaire de ce métal pendant les 75 jours suivants. Durant cette phase de dépuración, la concentration de Cd a chuté dans les branchies, mais n'a pas changé dans le foie ni dans le cerveau. Une explication plausible est que le foie élimine le Cd durant cette phase, mais reçoit celui des branchies, menant à cette apparence de stabilité alors que le cerveau, tissu pratiquement dépourvu de mécanisme d'élimination du Cd, ne peut simplement pas s'en débarrasser. Plusieurs autres études arrivent aux mêmes conclusions (De Conto Cinier *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004; Kraemer *et al.*, 2005; Kumada *et al.*, 1980; Nunes *et al.*, 2014). Ainsi, il semblerait qu'il y ait une redistribution sélective du Cd vers le foie, qui avec les reins, constituent les principaux organes de détoxification de l'organisme. L'accumulation de Cd est proportionnelle au temps et à la concentration d'exposition (Arini *et al.*, 2015; Bervoets *et al.*, 2001; De Conto Cinier *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2004; Kraemer *et al.*, 2005; Matz *et al.*, 2007; Yeşilbudak & Erdem, 2014). Toutefois l'accumulation de Cd est limitée par une concentration

¹ La CL₅₀ est la concentration à laquelle 50 % de la population à l'étude meurt dans le temps imparti

maximale létale dans les tissus ou par une limite de prise en charge (De Conto Cinier *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004; Pascoe & Matthey, 1977).

Une fois dans les cellules, le Cd est pris en charge par des ligands dont le contenu en cystéine (un acide aminé contenant un groupement sulfhydryl/thiol) est élevé, notamment le glutathion réduit (GSH) et les métallothionéines (MTs). Sa liaison avec ces molécules empêche le Cd d'exercer ses effets néfastes dans la cellule (Cattani *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 2007; Cuypers *et al.*, 2010). Chez des poissons exposés depuis assez longtemps au Cd, la majorité de ce métal est retrouvé en liaison avec les MTs (Cattani *et al.*, 1996; Giguère *et al.*, 2006; Kraemer *et al.*, 2005). Le GSH, pour sa part, est une des molécules contenant un groupement sulfhydryl les plus abondantes de la cellule et on en observe souvent une déplétion dans l'organisme après une contamination au Cd, synonyme que le Cd y est lié (Cuypers *et al.*, 2010; Zirong & Shijun, 2007). La capacité de liaison de ces molécules clés n'est pas infinie et leur production n'est pas non plus instantanée. Il semblerait que la production de MTs ne soit seulement augmentée que lorsque la concentration en Cd dépasse un certain seuil variant selon les espèces (Arini *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2007; Chowdhury *et al.*, 2005; Hollis *et al.*, 2001; Roesijadi *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2012). De plus, la production de MTs est proportionnelle à la concentration de Cd, bien que l'augmentation par rapport au niveau de base soit plus importante lorsque la concentration de métal est faible que lorsqu'elle est élevée (George *et al.*, 1996; Rose *et al.*, 2014). Les MTs ont d'abord et avant tout un rôle dans la gestion des métaux essentiels en servant de ligands pour le cuivre et le zinc, ce qui peut entraîner une compétition avec le Cd aux sites de liaisons et réduire l'efficacité des MTs pour la détoxification du Cd, mais aussi pour sa fonction de base (Chowdhury *et al.*, 2005; Hollis *et al.*, 2001).

3.2.2 Le stress oxydant

La production d'ERO survient lors du fonctionnement normal de la cellule, majoritairement en raison de la respiration mitochondriale. Le problème lié aux ERO n'est donc pas leur production, mais un déséquilibre entre celles-ci et les antioxydants. Les antioxydants sont des molécules diverses permettant de

neutraliser les ERO ; Il peut s'agir de métabolites comme la vitamine E, l'acide ascorbique et le GSH ou d'enzymes comme la catalase (CAT), la SOD et la glutathion peroxydase (GPx) (Cuypers *et al.*, 2010; Kaur *et al.*, 2005; Zirong & Shijun, 2007).

Le GSH est d'une importance capitale lors d'une contamination au Cd, puisqu'il le piège aussi efficacement que les ERO, à l'aide de son groupement thiol et de la glutathion-s-transférase (GST), et qu'il est abondant dans la cellule. Bien que cela constitue une ligne de défense sans équivoque contre le Cd, la liaison de ce métal avec le GSH rend ce dernier indisponible pour ses fonctions antioxydantes, débalançant la cellule en faveur des ERO. Le Cd peut aussi mener à une déplétion du GSH réduit en inhibant l'activité d'enzymes impliquées dans sa régénération, comme la glutathion réductase (GR), la GPx, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et la malate déshydrogénase (MDH) (Ivanina *et al.*, 2008; Levesque *et al.*, 2002). Les deux premières sont directement impliquées dans la régénération du GSH, tandis que les deux autres régénèrent le NADPH (Figure 5). Le Cd ne pouvant pas directement générer des radicaux libres, la déplétion de GSH est une des façons par lesquelles il arrive à créer un stress oxydant dans les cellules. Parmi les autres, on compte i) le délogement du fer du cœur des protéines pouvant mener à des réactions de Fenton, ii) l'ouverture du pTPM, iii) le court-circuit du cycle-Q et iv) l'inhibition d'enzymes antioxydantes (Cuypers *et al.*, 2010; Dorts, Bauwin, *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2005).

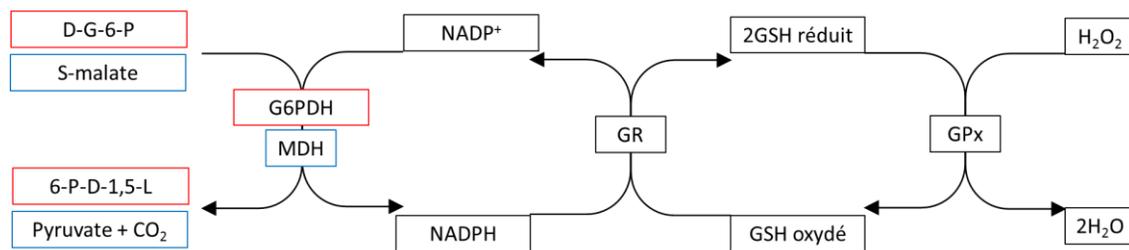


Figure 5 Cycle du GSH. D-G-6-P : D-glucose-6-phosphate, 6-P-D-1,5-L : 6-phospho-D-glucono-1,5-lactone, G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase, MDH : malate déshydrogénase, NADP⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé, NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit, GR : glutathion réductase, GSH : glutathion réduit, GPx : glutathion peroxydase, H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène et H₂O : eau. Inspirée de Alberts *et al.*, 1989.

Le Cd impose sans contredit un stress oxydant aux cellules, mais la présence de dégâts chez des individus exposés au Cd semble dépendre de la réponse des défenses antioxydantes. En effet, on observe une augmentation des dommages oxydatifs aux lipides (TBARS, diènes conjugués, hydroperoxydes lipidiques), à l'ADN (test des comètes) et aux protéines (protéines carbonylées) lorsqu'il y a une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes (GPx, CAT, GR, GST, SOD) (Choi *et al.*, 2007; Dorts, Bauwin, *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2011; Nigam *et al.*, 1999; Nunes *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2005; Vaglio & Landriscina, 1999). Par contre, aucun dommage oxydant n'est observé lorsque l'activité de ces enzymes (SOD) ou la concentration de leur ARN messager (SOD, GR) se trouvent augmentées (Dorts, Bauwin, *et al.*, 2012; Vergauwen *et al.*, 2013). Il est à noter, cependant, que toutes les études n'arrivent pas à cette même conclusion quant à la réponse du système oxydant à une contamination au Cd. En effet, des dommages aux lipides (*malondialdéhyde* ; *MDA*) et aux protéines (protéines carbonylées) sont parfois observés malgré l'augmentation de l'activité des enzymes (SOD, GST, CAT) (Jia *et al.*, 2011; Pretto *et al.*, 2011). La réponse pourrait varier selon les espèces, les tissus ou les conditions d'exposition (durée, concentration de Cd, source de Cd, etc.) (Cuypers *et al.*, 2010).

3.2.3 La croissance et le métabolisme énergétique

Les poissons exposés au Cd, *in vivo* ou *in vitro*, présentent presque tous une diminution de l'indice de Fulton (rapport entre la taille et le poids), de l'indice gonadosomatique (rapport entre le poids des gonades et le poids total) et des réserves hépatiques de glycogène et de triglycérides (Audet & Couture, 2003; Levesque *et al.*, 2002; Nigam *et al.*, 1999; Rajotte & Couture, 2002; Sandhu *et al.*, 2014). Des auteurs ont aussi remarqué une réponse anormale au stress chez ces poissons, soit une absence d'augmentation des niveaux de cortisol et de glucose sanguins à la suite d'un test de confinement (Levesque *et al.*, 2002; Sandhu *et al.*, 2014). Tout cela, combiné avec une hausse de l'activité d'enzymes impliquées dans le renouvellement des protéines « turnover » (nucléoside diphosphate kinase, protéine de choc thermique (Heat shock proteins ; HSP), protéases) et la

détoxication des xénobiotiques (NADP-cytochrome P450 réductase) suggère des dommages hépatiques importants (Couture & Kumar, 2003; Rajotte & Couture, 2002; Sandhu *et al.*, 2014; Sanni *et al.*, 2008; Sreenivasula Reddy & Bhagyalakshmi, 1994; Vaglio & Landriscina, 1999; Vergauwen *et al.*, 2013).

Malgré ces dommages au foie, les poissons parviennent parfois à augmenter leurs capacités métaboliques afin de compenser les nouvelles dépenses entraînées par une contamination au Cd. En effet, on observe une augmentation de l'activité des enzymes de la glycolyse (hexokinase (HK), glucokinase, pyruvate kinase), du cycle de Krebs (succinate déshydrogénase, NAD-isocitrate déshydrogénase, MDH) et de la β -oxydation des acides gras (β -hydroxyacyl coenzyme a déshydrogénase) (Gargiulo *et al.*, 1996; Levesque *et al.*, 2002; Rajotte & Couture, 2002; Sandhu *et al.*, 2014; Vaglio & Landriscina, 1999; Viselina & Luk'yanova, 2000). La respiration mitochondriale, quant à elle, est une voie métabolique importante, mais peu souvent mesurée et qui semble plus souvent inchangée ou inhibée qu'augmentée par une exposition au Cd (Cherkasov *et al.*, 2006; Lannig *et al.*, 2006; Modi & Katyare, 2009; Sokolova *et al.*, 2005; Sreenivasula Reddy & Bhagyalakshmi, 1994).

Cette augmentation des capacités aérobies dépend cependant du tissu et de la concentration de Cd. En effet, dans les tissus plus sensibles, comme le muscle blanc, le métabolisme énergétique est inhibé et il en est ainsi dans tous les tissus lorsque la concentration de Cd est élevée (Almeida *et al.*, 2001; Audet & Couture, 2003; Couture & Kumar, 2003). Dans certains cas, comme chez des poissons rouges (*Sparus auratus*) exposés à 20 mg/L de Cd pendant 40 jours et chez des rats auxquels on a injecté du Cd à 0,84 mg/Kg pendant 1 mois, on observe une augmentation du métabolisme aérobie dans le foie après quelques jours d'exposition (1 à 2 semaines), puis une inhibition après 30-40 jours, soit au fur et à mesure que le Cd et les dégâts qu'il engendre s'accumulent dans la cellule (Gargiulo *et al.*, 1996; Modi & Katyare, 2009; Viselina & Luk'yanova, 2000).

Quand les voies principales du métabolisme aérobie sont inhibées en présence de Cd, on observe une augmentation des voies secondaires comme celles des

pentoses-phosphates (G6PDH), de l'oxydation des acides aminés (alanine aminotransférase, aspartate aminotransférase), du métabolisme des purines (adénosine monophosphate désaminase, adénosine désaminase) et du cycle de l'urée (glutamate déshydrogénase, arginase), bien que la contribution de ce dernier à la production d'énergie soit très faible et que son augmentation soit plutôt une conséquence de la hausse d'ammoniac générée par le métabolisme des acides aminés (De Smet & Blust, 2001; Gargiulo *et al.*, 1996; Levesque *et al.*, 2002; Sreenivasula Reddy & Bhagyalakshmi, 1994).

La compensation observée au niveau du métabolisme énergétique, que ce soit par l'augmentation de certaines voies ou par l'utilisation de voies alternatives, permet aux organismes de survivre et de maintenir un taux de croissance similaire à celui du témoin (Hollis *et al.*, 1999; McGeer *et al.*, 2000). Cependant, les dommages observés au niveau de la santé globale et du foie signifient que les poissons ne compensent pas complètement l'élévation de la demande énergétique due à une exposition au Cd. Cela corrobore l'hypothèse évolutive exprimée par Sébastien Bélanger-Deschênes et ses collègues (Bélanger-Deschênes *et al.*, 2013) qui propose que comme la détoxification du Cd est lente et coûteuse, les poissons auraient tendance à ne compenser que le strict minimum afin de pouvoir se reproduire avant de mourir. Cette hypothèse a été émise suite à l'étude d'une population de perchaudes (*Perca flavescens*) soumise depuis plus de 80 ans à l'influence d'une fonderie de cuivre (présence de Cd et de d'autres métaux) au sein de laquelle des poissons ayant une maturation sexuelle et une mort hâtives ont été remarqués.

3.3 Résumé de la section Cadmium

Le Cd, de par sa liaison directe à plusieurs composantes cellulaires, dont les groupements thiols, a le potentiel de provoquer un stress oxydant et une défaillance de la respiration mitochondriale. Pour parer ces effets toxiques, la cellule doit séquestrer le Cd en le complexant avec les MTs ou le GSH. La concentration de Cd dans les tissus et la proportion du métal qui se trouve lié sont des indicateurs de possibles dommages dans la cellule. Lorsque les concentrations sont assez faibles, on observe peu de dommages oxydants et une augmentation du métabolisme aérobie. En revanche lorsque les concentrations sont élevées, on observe une augmentation des dommages oxydants ainsi qu'une inhibition du métabolisme oxydant qui est parfois compensée par une augmentation de voies alternatives de production d'énergie. Toutefois, les poissons s'en trouvent affectés d'une manière ou d'une autre, comme le suggèrent la baisse de condition générale et des réserves énergétiques ainsi que l'absence de réponse à un stress supplémentaire. Le Cd est sans contredit un métal toxique qui cible principalement le métabolisme énergétique.

4 EFFETS NÉGATIFS LIÉS À UNE HAUSSE DE LA TEMPÉRATURE

La hausse de la température de l'eau est une source de stress naturelle à laquelle les poissons sont confrontés de façon saisonnière dans les lacs de région tempérée. En effet, lorsque les lacs dégèlent, au printemps, ils se réchauffent progressivement jusqu'à la fin de l'été. À ce moment, si le lac est profond, il est stratifié thermiquement avec une eau plus froide au fond et une eau plus chaude en surface. Si le lac est peu profond, il aura une température à peu près similaire sur toute la colonne d'eau. Lors du brassage automnal, l'eau se refroidit et retourne progressivement à 4°C et éventuellement gèle en surface au début de l'hiver. Évidemment, ce schéma thermique n'est expliqué qu'à titre indicatif puisque la température de l'eau dépend de nombreux facteurs (température extérieure, vents, morphologie du lac, couverture végétale, situation géographique, etc.). De plus, les *maxima* ne surviennent pas nécessairement sur une longue période et dans certains cas, les poissons peuvent éviter les zones problématiques en se réfugiant dans des portions mieux adaptées de l'habitat. Toutefois, ce n'est pas toujours le cas et les prochains paragraphes décrivent ce qu'encourent les poissons, et autres ectothermes aquatiques, soumis à un stress thermique pour une plus ou moins longue période.

4.1 Le cycle reproducteur, un effet confondant

Un problème survenant lors d'études toxicologiques visant à déterminer les effets de la température est que celle-ci, en association avec la photopériode, joue un rôle de signalement dans la régulation du cycle de vie des plantes et des animaux, comme les poissons des régions tempérées (Wang *et al.* 2010). Il est souvent difficile, voire impossible, de discriminer les effets qui viennent du comportement reproducteur de ceux qui ne résultent que de la température (Vezina & Guderley, 1991).

Bien que pour certaines espèces la température et la photopériode doivent être toutes les deux adéquates afin de stimuler la reproduction (Koger *et al.*, 1999), des études chez les poissons confirment que d'autres espèces peuvent développer des caractéristiques sexuelles anatomiques, physiologiques et/ou comportementales après une exposition à des températures élevées, même si la photopériode ne correspond pas à la période de reproduction. C'est notamment le cas du poisson électrique *Brachyhypopomus pinnicaudatus* qui, soumis à une température élevée, développe un dimorphisme sexuel typique de la saison de reproduction sur le signal électrique qu'il émet (mâles) et présente des gonades matures (mâles et femelles) (Quintana *et al.*, 2004). De plus, l'exposition du poisson-paradis (*Macropodus opercularis*) à une température élevée ne correspondant pas à la période de reproduction a mené à la ponte d'œufs dont 66,5 % ont éclos (Haung & Cheng, 2006). Dans le même ordre d'idées, *Arenicola marina* (annélide marin) présente une modification du métabolisme énergétique en fonction du cycle reproducteur. En effet, des vers femelles prélevés avant le frai ont un métabolisme énergétique plus élevé que des femelles prélevées après le frai. Lorsque cette même espèce est exposée au laboratoire à des températures élevées semblables à celles observées juste avant le frai, une augmentation de la respiration mitochondriale est observée. Les auteurs ne distinguent pas l'effet de la température de celui du cycle reproducteur puisqu'ils pensent que l'augmentation du métabolisme énergétique sert d'une part à compenser la hausse de la température et d'autre part la croissance des gamètes (Keller *et al.*, 2004). Une trop grande élévation de la température mène cependant à une inhibition de la reproduction (Brian *et al.*, 2011; Dorts, Grenouillet, *et al.*, 2012) et chez certaines espèces, la hausse des températures mène au développement des gonades, mais seulement chez un sexe (Dorts, Grenouillet, *et al.*, 2012).

D'autres auteurs proposent aussi que même sans développer de caractéristiques sexuelles, les poissons pourraient avoir acquis, au fil de l'évolution, des comportements associés à une hausse de la température favorisant le succès reproducteur. Par exemple, il est possible que les mâles de l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) réduisent la quantité de nourriture qu'ils ingèrent

durant l'été afin de limiter l'énergie dépensée pour la digestion et l'investir plutôt dans la reproduction. Cette hypothèse découle du fait que les mâles de cette espèce exposés à des températures élevées (6 semaines à 20 °C) présentent un déclin de leur condition physique bien qu'ils soient nourris à satiété (Vezina & Guderley, 1991). Toutefois, d'autres auteurs ont observé des signes de sous-alimentation après une exposition à des températures élevées chez des espèces qui ne se reproduisent pas l'été comme la perchaude (*Perca flavescens*, (Grasset *et al.*, 2014; Landry *et al.*, 2000)) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*, (Behnke, 2002; McGeer *et al.*, 2000)).

Ces divers résultats rappellent qu'il faut être prudents lors de l'interprétation des résultats d'études sur les effets de la température et qu'il ne faut pas oublier que celle-ci peut être intimement liée à la période de reproduction qui est aussi un stress en soi, car elle demande un gros investissement d'énergie (Sokolova *et al.*, 2005).

4.2 Le stress oxydant

La hausse des températures provoque un stress chez les organismes, comme le suggère la hausse des HSP (Yadong Cui *et al.*, 2011; Lapointe *et al.*, 2011; Madeira *et al.*, 2013; Nakano *et al.*, 2014) ainsi que du cortisol et du glucose sanguins (Nakano *et al.*, 2014). Que ce soit dans des systèmes isolés (hépatocytes ou mitochondries) ou dans des poissons entiers, une hausse des températures provoque une augmentation de la production d'ERO (Yadong Cui *et al.*, 2011; Paital & Chainy, 2014) et des dommages oxydants aux lipides (Bagnyukova *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 2005; Nakano *et al.*, 2014; Paital & Chainy, 2014; Vinagre *et al.*, 2012).

La réponse du système antioxydant au stress thermique varie toutefois selon les conditions d'exposition (intensité et durée du choc thermique), les espèces et les tissus (Dorts, Bauwin, *et al.*, 2012). Par exemple, la réponse du système antioxydant semble proportionnelle à l'intensité du stress thermique. Chez des

juvéniles du bar commun exposés 30 jours à 18, 24 (témoin) ou 28 °C, il y a eu une augmentation de la peroxydation lipidique avec le temps pour les températures les plus faibles, mais une augmentation plus importante suivie d'une diminution à 28 °C. Ce même schéma a été observé au niveau de l'activité de la CAT (Vinagre *et al.*, 2012). En ce qui a trait aux différences interspécifiques, une étude effectuée sur plusieurs espèces de poissons a révélé des différences au niveau des enzymes corrélées avec la peroxydation lipidique. Pour certaines, il s'agissait de la CAT et pour d'autres, de la GST (Madeira *et al.*, 2013). La variation selon les espèces pourrait aussi être une conséquence de leurs différents optimaux thermiques puisque Vinagre *et al.* (2012) ont observé que le stress oxydant était plus important à mesure que la température s'éloignait de l'optimal, que ce soit à la hausse ou à la baisse. En ce qui a trait aux variations selon les tissus, chez des poissons rouges, une augmentation de la température a mené à une augmentation de l'activité de la CAT dans le cerveau, une diminution dans le foie et n'a engendré aucun changement dans les reins (Bagnyukova *et al.*, 2007).

La variation dans le temps de la réponse antioxydante pourrait aussi expliquer une partie des différences entre les études n'échantillonnant pas après le même temps d'exposition. En effet, la réponse du système antioxydant est parfois transitoire, survenant dans les heures suivant le stress thermique, puis s'amenuisant dans les quelques jours suivants. Par exemple, l'exposition du saumon coho à un stress thermique de 11 °C pendant 2 heures a induit une augmentation de la peroxydation lipidique, suivie d'une augmentation de la SOD et d'une diminution du GSH qui n'ont perduré que 24 à 48 heures après le choc (Nakano *et al.*, 2014). Dans le même ordre d'idée, des poissons rouges exposés entre 1 et 120 heures à un choc thermique de 20 °C ont présenté une augmentation du GSH, de la GPx, de la GST et de la G6PDH dans les premières heures, puis un retour à la normale après 12 à 24 heures et ce malgré l'absence de changement de température (Bagnyukova *et al.*, 2007). Dans les deux cas, toutefois, des dommages aux lipides ont persisté jusqu'à la fin de l'expérience.

4.3 Le métabolisme énergétique

Tout comme cela est le cas avec le Cd, les connaissances de l'impact d'une hausse de la température sur le métabolisme énergétique viennent à la fois d'études sur des mitochondries isolées, mais aussi sur des organismes entiers.

Sur des mitochondries isolées, une hausse de la température augmente la respiration mitochondriale maximale (stade 3) chez plusieurs organismes dont des vers à tabac (*Manduca sexta*), des crabes (*Scylla serrata*), des huîtres (*Crassostrea virginica*), des rats (*Rattus norvegicus*), des palourdes (*Mya arenaria*, *Laternula elliptica*) et plusieurs espèces de poissons (*Bellapiscis medius*, *Forsterygion malcolmi*, *Forsterygion varium*, *Notolabrus celidotus*, *Oncorhynchus mykiss*). Toutefois, plus la température est élevée, moins l'augmentation de la respiration est importante (en proportion) et une fuite de protons et un découplage mitochondrial sont observés. De plus, la respiration est inhibée au-delà d'une température critique. Autrement dit, plus la température augmente, moins la mitochondrie est efficace en termes de production d'énergie par molécule d'oxygène respirée (Abele *et al.*, 2002; Chamberlin, 2004; Cherkasov *et al.*, 2006; Heise *et al.*, 2003; Itikar & Hickey, 2013; Lemieux *et al.*, 2010; Paital & Chainy, 2014; Sappal *et al.*, 2014; Willis *et al.*, 2000).

Lorsque des individus entiers sont exposés, on observe un éventail de réponses. Par exemple : aucun changement dans la respiration, une augmentation (*Arenicola marina* 21-30 semaines à 10 °C) (Keller *et al.*, 2004), une augmentation lors d'un test aigu suivie par une diminution lors d'un test chronique (*Oncorhynchus mykiss* 2 mois à 11 °C, respiration mesurée à 20 °C vs deux mois à 20 °C respiration mesurée à 20 °C) (Sappal *et al.*, 2015), aucun changement ou une augmentation à court terme suivi par une diminution à long terme (*Oncorhynchus mykiss* trois jours ou deux semaines à 15 °C vs huit semaines) (Bouchard & Guderley, 2003; Kraffe *et al.*, 2007) et une augmentation avec la température jusqu'à un seuil au-delà duquel la respiration diminue drastiquement (*Haliotis* sp. quarante-deux jours à la température maximale de l'habitat) (Dahlhoff & Somero, 1993). Dans tous les cas, on observe une hausse de la perméabilité

membranaire et une baisse de l'efficacité de la respiration mitochondriale avec la température.

Les changements de la respiration mitochondriale pourraient découler de changements dans la composition des lipides membranaires (Bouchard & Guderley, 2003; Grim *et al.*, 2010; Kraffe *et al.*, 2007), de phosphorylations spécifiques de certaines protéines encore non-identifiées (Ulrich & Marsh, 2009) ou encore de changements dans les étapes en amont (comme l'oxydation des substrats) (Lemieux *et al.*, 2010).

L'augmentation de la respiration mitochondriale pourrait découler d'une compensation de l'augmentation des dépenses énergétiques ou encore d'une augmentation des enzymes qui peuvent contribuer au *pool* de NAD⁺ et de NADP (et donc de GSH) comme la G6PDH (Antonova, 2010; Grasset *et al.*, 2014), la CS, l' aspartate aminotransférase (Tomanek & Zuzow, 2010) et la NAD-isocitrate déshydrogénase (Antonova, 2010; Tomanek & Zuzow, 2010). Ces cofacteurs réduits sont importants lorsque la cellule est exposée à un stress oxydant, ce qu'impose sans contredit une exposition à des températures élevées.

Lorsque la température augmente trop, les cellules se trouvent endommagées ce qui mène à l'inhibition du métabolisme mitochondrial. En effet, lors d'une exposition à une température élevée, les membranes interne et externe des mitochondries sont endommagées (fibres cardiaques isolées) (Iftikar & Hickey, 2013) et on observe une augmentation des signes d'apoptose (test de WST-1, caspase-3, diablo ARNm, LDH plasmatique) (Antonova, 2010; Yanting Cui *et al.*, 2014; Grasset *et al.*, 2014) et de dommages aux protéines (nucléoside diphosphate kinase, HSP, protéasome) (Yadong Cui *et al.*, 2011; Yanting Cui *et al.*, 2014; Dorts, Bauwin, *et al.*, 2012; Lapointe *et al.*, 2011; Tomanek & Zuzow, 2010), sans compter les dommages oxydants précédemment énoncés.

4.4 Résumé de la section température

La hausse de la température est un stress naturel auquel doivent faire face les organismes aquatiques. Sur des systèmes isolés tout comme sur des individus entiers, cette augmentation mène à une perturbation du métabolisme énergétique causée majoritairement par un découplage des mitochondries et des dommages cellulaires menant à une diminution de la quantité d'énergie produite par les organismes. De plus, ces derniers subissent aussi un stress oxydant. Finalement, en région tempérée, la température et la photopériode jouent conjointement un rôle de signalement dans le cycle reproducteur des animaux. Une hausse des températures peut donc augmenter les dépenses énergétiques en stimulant un comportement reproducteur et/ou le développement des gonades.

5 EFFETS COMBINÉS DU CADMIUM ET DE LA TEMPÉRATURE

Le Cd et une température élevée sont deux stressseurs susceptibles d'être retrouvés en combinaison dans un milieu naturel, notamment l'été dans des lacs de régions minières. Lorsque des organismes sont exposés de façon combinée à ces deux stressseurs, on observe une hausse importante de la mortalité (Dorts, Bauwin, *et al.*, 2012; Lannig *et al.*, 2006; I. Sokolova & Lannig, 2008; Vergauwen *et al.*, 2013). Toutefois, les causes qui la sous-tendent sont encore incertaines puisque peu d'études se sont penchées là-dessus et que le Cd et la température induisent le même genre d'effets négatifs dont une perturbation du métabolisme énergétique et un stress oxydant. De plus, ils augmentent tous les deux les dépenses énergétiques, ce qui peut finalement mener à un déficit. La présente section décrit les connaissances à ce jour d'une exposition combinée au Cd et à une hausse des températures sur des mitochondries isolées ou des organismes entiers.

Sur des mitochondries isolées d'huîtres ou de truites arc-en-ciel, on observe une inhibition de la respiration mitochondriale (stade 3, activité des complexes I à IV et de la NAD-isocitrate déshydrogénase) proportionnelle à la température après une exposition au Cd (Cherkasov *et al.*, 2006; Ivanina *et al.*, 2008; Onukwufor *et al.*, 2015). De plus, on observe une augmentation de la fuite de protons, menant à un découplage qui augmente avec la température (Cherkasov *et al.*, 2006; Onukwufor *et al.*, 2015).

Ces auteurs, et d'autres, ont émis quelques hypothèses quant aux possibles causes au niveau cellulaire de cette augmentation de la toxicité du Cd avec la hausse des températures. Premièrement, une augmentation de la température perturberait le pH intracellulaire, le rendant plus acide, ce qui influencerait les liaisons entre le Cd et les composantes cellulaires. Par exemple, il a été montré que l'intensité de la liaison du Cd aux MTs diminuait avec une diminution du pH, ce qui pourrait augmenter la concentration biodisponible de Cd. Cette expérience n'a toutefois pas été reproduite avec des changements de pH d'ordre

physiologique (Cherkasov *et al.*, 2006). Deuxièmement, la température influençant peu le comportement chimique du Cd dans une plage physiologique, il a été avancé que des changements dans les macromolécules biologiques avec la hausse des températures seraient responsables de l'augmentation de la toxicité. Par exemple, une augmentation de la flexibilité des enzymes en réponse à une hausse de la température rendrait potentiellement leurs sites thiols plus exposés et donc plus vulnérables au Cd (Ivanina *et al.*, 2008; I. Sokolova & Lannig, 2008). Finalement, un changement dans l'énergie d'activation des enzymes en réponse à une exposition au Cd les rendrait moins aptes à répondre à un changement de température avec la bonne intensité, diminuant l'efficacité de la respiration mitochondriale (Ivanina *et al.*, 2008).

Lorsque des organismes entiers sont exposés, on observe une synergie entre les deux stressseurs qui mène à une augmentation de la mortalité (Dorts, Bauwin, *et al.*, 2012; Lannig *et al.*, 2006; I. Sokolova & Lannig, 2008; I. M. Sokolova, 2004) et tout comme au niveau cellulaire, la respiration mitochondriale est inhibée en réponse au Cd et davantage lorsque la température augmente. L'augmentation du découplage après une exposition combinée est aussi observée (Lannig *et al.*, 2006; I. Sokolova & Lannig, 2008; I. M. Sokolova, 2004). Dans le même ordre d'idées, des huîtres présentent une augmentation de leur métabolisme de base (BMR) en réponse à une augmentation de la température et à une exposition au Cd à faible température, mais aucun changement dans ce paramètre lorsque l'exposition est combinée, suggérant une limitation énergétique qui empêche une augmentation supplémentaire (Lannig *et al.*, 2006). La synergie ne semble pas causée par une augmentation du stress oxydant (Dorts, Bauwin, *et al.*, 2012; Vergauwen *et al.*, 2013).

Plusieurs causes sont avancées par ces auteurs pour expliquer la synergie lors d'une exposition combinée au Cd et à une hausse des températures, parmi lesquelles : une augmentation de la prise en charge de Cd avec la température à cause d'une augmentation de la ventilation/filtration en réponse à une hausse du BMR (I. Sokolova & Lannig, 2008; Vergauwen *et al.*, 2013), une modification des compartiments accumulant le Cd avec la température causée par exemple par une

diminution de la capacité de rétention des organes récepteurs (branchies et intestin) laissant plus de Cd pour les autres tissus (Vergauwen *et al.*, 2013) et une discordance entre la production et la demande d'énergie causée par une augmentation des coûts de maintenance et de détoxification, une diminution de la production d'énergie et une diminution de l'assimilation d'oxygène (Sokolova and Lannig 2008).

[PROJET DE RECHERCHE]

6 OBJECTIFS

Bien que les études sur les effets du Cd et de la température soient peu nombreuses, elles s'entendent pour dire que le Cd diminue la tolérance thermique des individus, les rendant moins aptes à répondre aux changements de température et qu'une hausse des températures augmente leur sensibilité au Cd. L'heure n'est donc plus à prouver que cette combinaison présente des effets synergiques sur les organismes, mais à trouver quelles en sont les causes qui ne sont pour le moment qu'au stade d'hypothèses. Avec cela en tête, l'objectif principal de ma maîtrise est d'élucider les effets d'une exposition combinée au Cd et à une température élevée sur le métabolisme énergétique hépatique du mené tête-de-boule (*Pimephales promelas*). Plus précisément, il s'agit de déterminer si les cinq complexes de la mitochondrie sont affectés de la même façon par ces deux stressseurs et si l'on peut y observer une synergie. Pour compléter le portrait, l'activité de la pyruvate déshydrogénase et des marqueurs d'état de santé général tels que l'Indice de Condition de Fulton et l'Indice Hépatosomatique seront également étudiés. L'hypothèse soutenue est qu'une exposition au Cd et à une température élevée va placer les poissons dans un état de carence énergétique puisque la demande en énergie sera plus élevée et la production diminuée. Cela pourrait se traduire par une inhibition de l'activité de certaines enzymes plus sensibles (comme le complexe II) et par une augmentation des autres dans un mécanisme de compensation.

7 MATÉRIEL ET MÉTHODE

7.1 Soins aux animaux et conditions d'exposition

Des menés tête-de-boule adultes (*Pimephales promelas*) venant d'*Aquatic Research Organisms* (Hampton, New Hampshire, États-Unis) ont été gardés deux semaines au laboratoire avant le début des expositions. Ils étaient maintenus à 25 °C dans des aquariums de 45 L (\approx 1 poisson/1,5 L) remplis d'eau reconstituée (35,3 mg/L CaCl₂, 32,8 mg/L MgSO₄, 51,2 mg/L NaHCO₃, 2,1 mg/L KCl, 0,55 mg/L NaBr et 3,4 mg/L CaSO₄ dans de l'eau déionisée, pH 7,5, dureté de l'eau 53 mg/L équiv. CaCO₃). La température de l'eau était la même que celle dans la pièce dans laquelle les aquariums se trouvaient et elle était vérifiée chaque jour. Durant toute l'expérience, les poissons ont été nourris *ad libidum* avec des flocons commerciaux et des artémies congelées.

Suite à la période d'acclimatation, les poissons ont été distribués aléatoirement dans huit aquariums présentant l'un des quatre traitements suivants, pour un total de deux aquariums par traitement : (1) 25 °C sans Cd, (2) 25 °C avec 6 µg Cd/L, (3) 15 °C sans Cd et (4) 15 °C avec 6 µg Cd/L. En ce qui concerne l'exposition à 15 °C, la température de l'eau, initialement à 25 °C, a été diminuée d'un degré chaque jour. Pour tous les traitements, il y a eu deux changements d'eau par semaine, renouvelant le tiers de l'eau chaque fois, et la concentration de Cd était ajustée à ce moment après un dosage à l'ICP-MS. Après huit semaines d'exposition, les poissons ont été sacrifiés et les tissus ont été utilisés pour effectuer les mesures de la respiration mitochondriale hépatique, de l'activité de la pyruvate déshydrogénase hépatique, de la concentration de protéines musculaire et hépatique ainsi que de la concentration totale et mitochondriale de Cd hépatique.

Ce protocole expérimental a été approuvé par le Comité Institutionnel de Protection des animaux de l'INRS.

Étant donné qu'il est curieux que la température du stress thermique soit la même que celle de l'acclimatation, j'ai décidé d'ajouter quelques précisions sur le choix

des traitements. Les poissons venant d'un élevage où ils étaient gardés à 25 °C pour favoriser leur reproduction, il devait au départ y avoir un témoin à 25 °C, un stress thermique froid à 15 °C et un stress thermique chaud à 30 °C. Toutefois, les tête-de-boule maintenus à 25 °C étaient déjà à la limite de leur tolérance thermique ; une défaillance d'un thermostat durant la nuit a fait grimper la température d'un aquarium de 30 à 32 °C et tous les poissons étaient morts au matin. De plus, les expositions combinées de ces mêmes poissons par une collègue à 30 °C avec du Cd ou du Ni présentaient un tel taux de mortalité qu'aucun poisson n'aurait survécu huit semaines. Conséquemment, il a été choisi de comparer une température élevée ne compromettant pas la possibilité d'avoir des échantillons à la fin de l'expérience (25 °C) avec une température plus faible (15 °C).

7.2 Isolation des tissus

Les poissons ont été assommés d'un coup à la tête, puis tués par le sectionnement de la colonne vertébrale. Suite à leur mort, ils ont été gardés sur la glace et toutes les manipulations subséquentes ont aussi été faites sur la glace. Les poissons ont été pesés, mesurés et disséqués. Le muscle a immédiatement été congelé à -80 °C pour la mesure de la concentration en protéines.

En ce qui concerne le foie, plusieurs ont été regroupés (entre 2 et 5 selon la quantité nécessaire pour obtenir 80 mg de foie). Le tissu a par la suite été fragmenté et perméabilisé dans le tampon MiR05 (109 mM sucrose, 59 mM k-lactobionate, 20 mM HEPES, 19 mM taurine, 10 mM phosphate de monopotassium (KH_2PO_4), 3 mM chlorure de magnésium (MgCl_2), 0,49 mM acide tétraacétique d'éthylène glycol (EGTA) et 1 g/L albumine de sérum bovin (BSA)) à l'aide de dix passages du piston lâche d'un homogénéisateur en verre de deux millilitres (Kimble-Chase, Querétaro, Qro., Mexico), d'après un protocole adapté de Kuznetsov *et al.* (2002). Les cellules perméabilisées de foie ont été séparées en plusieurs aliquots. Certains ont été congelés à -80 °C pour le dosage du Cd hépatique total et des protéines hépatiques, ainsi que pour la détermination de l'activité de la pyruvate déshydrogénase hépatique. Un aliquot a été utilisé immédiatement pour les mesures de la respiration mitochondriale et un dernier a

été réfrigéré jusqu'à l'isolation des mitochondries pour le dosage du Cd mitochondrial hépatique. L'isolation des mitochondries de l'homogénat de foie a été réalisée dans les heures suivant la dissection par deux centrifugations ; la première à 900 g pour 10 minutes à 4 °C pour retirer les débris cellulaires et une deuxième à 9000 g pour 10 minutes à 4 °C. Le culot de cette dernière centrifugation contenait les mitochondries et il a été resuspendu dans le tampon MiR05 ($\approx 1,6 \mu\text{L}$ tampon/mg de foie dans l'homogénat p.s.). Cette suspension a été congelée à -80 °C jusqu'au dosage du Cd.

7.3 Respiration mitochondriale

Les respirations mitochondriales ont été suivies par un polarographe à oxygène (Dual digital model 20, Rank Brothers, Bottisham, Cambridge, England) dont la température de la chambre était maintenue à celle de l'exposition par un bain circulaire thermostaté (Isotemp 4100R20, Thermo Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Juste avant les respirations, les cellules de foie perméabilisées (500 μL) ont été agitées sur de la glace pendant cinq minutes au vortex à faible vitesse. Suite aux cellules perméabilisées, du pyruvate (34,5 mM final), du malate (3,79 mM final) et de l'adénosine diphosphate (ADP, 9,19 mM final) ont été ajoutées dans le polarographe pour démarrer le cycle de Krebs et ainsi fournir des électrons au complexe I. La respiration enregistrée à ce moment se nomme CIOXPHOS et est une mesure approximative de l'apport du complexe I à la respiration. Par la suite, du succinate (0,33 mM final) a été ajouté et la respiration enregistrée correspond au CICIOXPHOS qui donne une idée de la capacité maximale de respiration que peut soutenir la chaîne de transport d'électrons (complexes I à IV). Durant la respiration maximale, du cytochrome C a été ajouté (0,4 μM final) afin de vérifier l'intégrité des membranes et d'ainsi valider la qualité de la préparation mitochondriale (Kuznetsov *et al.*, 2008). Seules les préparations dont la respiration dite CICIOXPHOS n'a pas augmenté de plus de 10 % suite à l'ajout du cytochrome c ont été considérées dans les analyses. Durant cette phase de respiration, du carbonyl cyanide-4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazone (FCCP, 5,0 μM final) a aussi été ajouté pour vérifier une possible limitation de la respiration

par la phosphorylation. Finalement, il y a eu l'ajout de roténone (inhibiteur du complexe I, 0,025 mM final) pour estimer l'apport du complexe II à la respiration, soit CIIOXPHOS.

Les substrats ont été dissous dans le tampon MiR05 sans BSA et les inhibiteurs ont été dissous dans de l'éthanol 95 %.

Les objectifs de ce projet de maîtrise incluait la mesure des cinq complexes de la mitochondrie, alors que le projet actuel n'a permis la mesure approximative que de deux d'entre eux. Ainsi, j'ai choisi d'ajouter des précisions sur le choix de la méthode utilisée pour la respiration mitochondriale. La mesure de la respiration des cinq complexes est possible avec la méthode classique de mesure de la respiration mitochondriale qui implique des mitochondries isolées. Ces dernières proviennent, comme mentionné ci-haut, de leur isolation à partir d'un homogénat de foie par des centrifugations successives. Ce protocole permet d'obtenir des mitochondries dites pures, c'est-à-dire une préparation mitochondriale qui n'est pas contaminée par des substrats et autres composantes cellulaires comme c'est le cas de la méthode utilisée dans ce projet. Toutefois, la méthode classique requiert une grande quantité de tissus au départ puisque le protocole d'isolation des mitochondries en endommage beaucoup. L'appareil de respiration mitochondriale dont dispose notre laboratoire n'a pas permis l'utilisation de la méthode classique avec la petite quantité de foie dont on disposait vu la taille des poissons.

7.4 Détermination du contenu en protéines

Les concentrations hépatique et musculaire de protéines ont été mesurées par la méthode de l'acide bicinchoninique (Smith *et al.*, 1985) utilisant du BSA comme standard.

7.5 Indices morphométriques

Deux indicateurs intégrateurs de la santé globale ont été examinés. L'Indice de Condition de Fulton, ($K=W/L^3$) où W est la masse et L la longueur, donne de l'information sur le statut nutritionnel du poisson (Robinson *et al.*, 2008). L'Indice

Hépatosomatique, qui est le ratio entre le poids du foie et le poids total de l'individu, est un bon indicateur des capacités de détoxification et d'accumulation de réserves énergétiques du foie (Tibbetts *et al.*, 2005).

7.6 Dosage du Cd

Le dosage du Cd a été fait sur les homogénats de foie et sur les mitochondries isolées resuspendues (comme décrit dans la section 7.2 *Isolation des tissus*) à l'ICP-MS suite à une digestion acide à froid. Les deux types d'échantillons ont été lyophilisés, puis digérés selon un protocole adapté de Borgmann et ses collègues (2001) : les échantillons secs ont été mélangés avec de l'acide nitrique 70 % (100 µL/mg p.s.) pendant 48 heures, puis avec du peroxyde d'hydrogène à 30 % (40 µL/mg p.s.) pendant 24 heures et finalement avec de l'eau déionisée (860 µL/mg p.s.). Les dosages ont été calibrés avec une courbe standard de chlorure de cadmium (CdCl₂). La potentielle contamination des échantillons durant leur préparation a été suivie à l'aide de témoins de digestion et de lyophilisation. Des échantillons certifiés (TORT-3 (hépatopancreas d'homard) et DOLT-4 (foie de squalidae), Conseil national de recherche Canada) ont permis de calculer un taux de recouvrement qui était de 95±3 % pour TORT-3 (n=2) et de 98±1 % pour DOLT-4 (n=3).

7.7 Statistiques

Des ANOVA ont été utilisées pour vérifier s'il existait des différences significatives entre les traitements. Lorsque de telles différences étaient détectées ($p < 0,05$), un test de comparaisons multiples de Tukey (HSD) a été utilisé pour déterminer lesquels des traitements différaient des autres. Les prémisses de normalité (Anderson-Darling test) et d'égalité des variances (F-test) ont été respectées. Les données sont présentées selon moyenne±erreur-type. Les analyses statistiques ont été réalisées sur R.

8 RÉSULTATS

8.1 Concentrations de Cd

Les deux traitements, soit la température élevée et le Cd, ont eu un effet sur l'accumulation du métal dans le foie (ANOVA $p < 0,001$). La concentration de Cd dans le foie et dans les mitochondries du foie a augmenté par rapport au témoin en présence de Cd et a encore augmenté lorsque la température était plus élevée ; l'augmentation était de l'ordre de cinq fois celle du témoin à 15 °C, alors qu'elle était de l'ordre de dix fois à 25 °C (Figure 6).

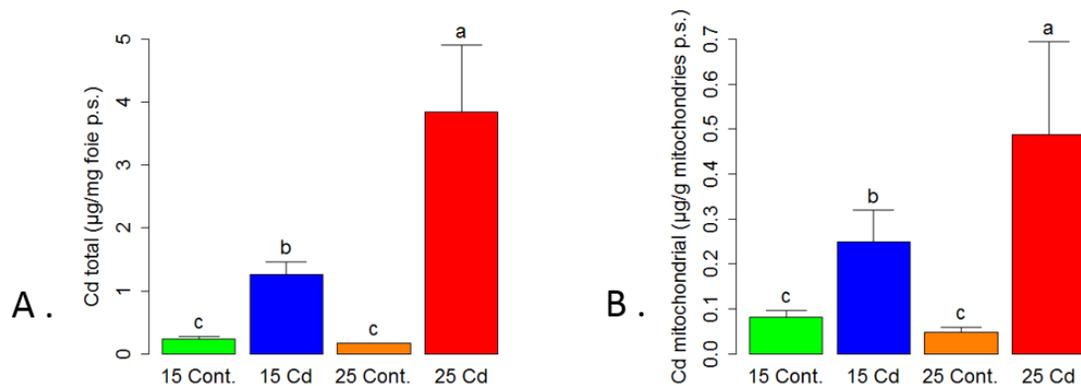


Figure 6 Accumulation de Cd dans (A) foie et (B) mitochondries du foie de *Pimephales promelas*. Différentes lettres représentent des moyennes significativement différentes ($p < 0,05$). Témoins et poissons exposés au Cd à 15 °C (N=15 et 12, respectivement) et à 25 °C (N=6 et 5, respectivement) (Tukey HSD $p < 0,05$).

8.2 État de santé général

L'exposition au Cd seul (c'est-à-dire à 15 °C) n'a mené à aucune modification des paramètres de l'état de santé globale mesurés dans cette étude, alors que le stress thermique seul a pu être associé avec une baisse de l'Indice de Condition de Fulton (Figure 7A). L'exposition combinée de *Pimephales promelas* au Cd et à une température élevée a engendré une importante mortalité (62,5 % versus 6,8 à 8,8 %), une diminution de l'Indice Hépatosomatique (Figure 7B, ANOVA $p=0,00153$) et une diminution de la concentration hépatique de protéines (Figure 8A, ANOVA $p<0,001$). Aucun des traitements n'a affecté la concentration musculaire de protéines (Figure 8B).

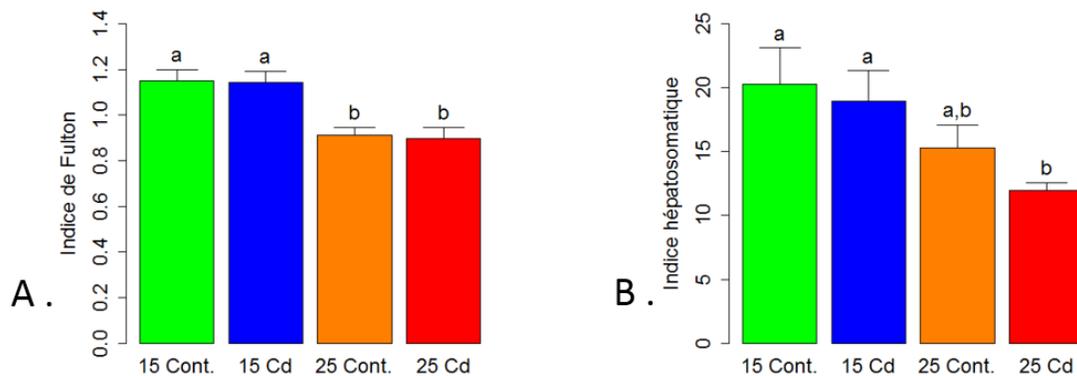


Figure 7 Effet du Cd et de la température sur (A) l'Indice de Condition de Fulton et (B) l'Indice Hépatosomatique de *Pimephales promelas*. Différentes lettres représentent des moyennes significativement différentes ($p<0,05$). Témoins et poissons exposés au Cd à 15 °C (N=15 et 12, respectivement) et à 25 °C (N=6 et 5, respectivement) (Tukey HSD $p<0,05$).

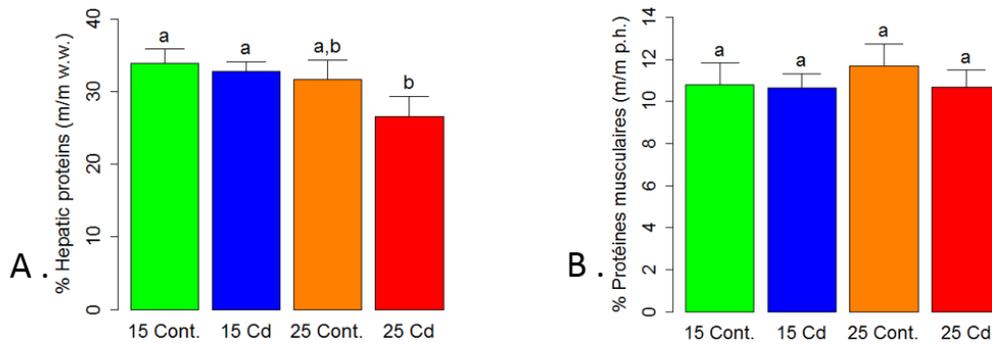


Figure 8 Effet du Cd et de la température sur la concentration de protéines (% w/w, p.h.) (A) hépatique et (B) musculaire de *Pimephales promelas*. Différentes lettres représentent des moyennes significativement différentes ($p < 0,05$). Témoins et poissons exposés au Cd à 15 °C (N=15 et 12, respectivement) et à 25 °C (N=6 et 5, respectivement) (Tukey HSD $p < 0,05$).

8.3 Métabolisme mitochondrial

Une augmentation de la respiration mitochondriale totale, exprimée par CICIOXPHOS (mesurée à 25 °C), a été observée chez les poissons exposés à la température élevée (25 °C), mais l'exposition au Cd n'a eu aucun effet sur ce paramètre (Figure 9A). Le fractionnement de la respiration entre les différents complexes a permis d'observer que le Cd n'influence pas la respiration mitochondriale lorsque la chaîne de transport d'électrons n'est alimentée que par le complexe I (CIOXPHOS), alors que la température élevée l'augmente (Figure 9B, ANOVA $p < 0,001$). Le stress thermique et l'exposition au Cd n'ont pas influencé la respiration mitochondriale alimentée par le complexe II (CIIOXPHOS). Il n'y a pas d'effets du Cd sur la respiration mitochondriale à 15 °C.

L'activité de la pyruvate déshydrogénase dans le foie des poissons exposés aux deux stress de façon combinée était plus élevée que dans tous les autres traitements (Figure 10, ANOVA $p < 0,001$). Encore une fois, il n'y a pas eu d'effet du Cd à 15 °C.

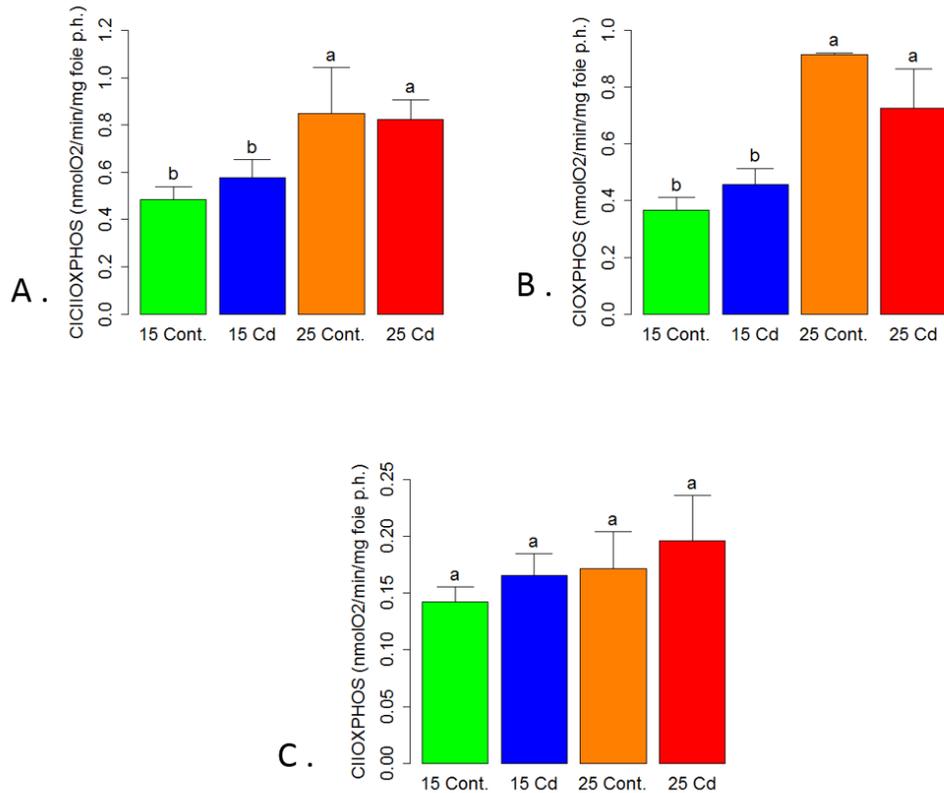


Figure 9 Effet du Cd et de la température sur la respiration mitochondriale hépatique de *Pimephales promelas*. (A) CICIOXPHOS, (B) CIOXPHOS et (C) CIIOXPHOS. Différentes lettres représentent des moyennes significativement différentes ($p < 0,05$). Témoins et poissons exposés au Cd à 15 °C (N=15 et 12, respectivement) et à 25 °C (N=5 et 4, respectivement) (Tukey HSD $p < 0,05$).

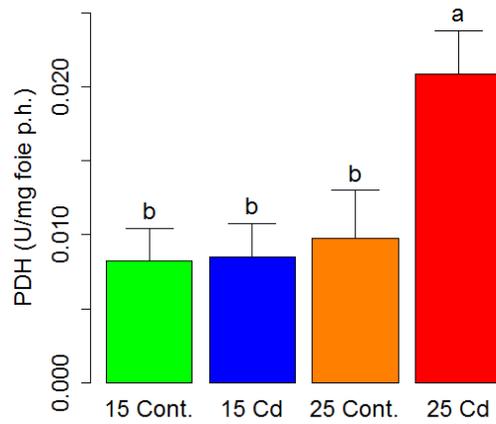


Figure 10 Effet du Cd et de la température sur l'activité hépatique de la pyruvate déshydrogénase chez *Pimephales promelas*. Différentes lettres représentent des moyennes significativement différentes ($p < 0,05$). Témoins et poissons exposés au Cd à 15 °C (N=15 et 12, respectivement) et à 25 °C (N=5 et 4,

9 CONCLUSIONS

Les individus exposés à un stress thermique (25 °C) présentent une diminution de l'indice de Fulton et une augmentation de la respiration mitochondriale. L'exposition des poissons au Cd seul (6 µg Cd/L, 15 °C) a mené à une accumulation du métal dans les tissus et dans les mitochondries, mais n'a perturbé ni leur métabolisme mitochondrial (respiration mitochondriale et activité de la PDH), ni leur santé. L'exposition combinée (6 µg Cd/L, 25 °C) a, pour sa part, mené à une synergie au niveau de la mortalité. Une baisse des indices hépatosomatique et de Fulton ainsi que des protéines hépatiques fut aussi observée chez ces poissons en plus de l'augmentation de l'activité de la pyruvate déshydrogénase. De plus, l'accumulation de Cd dans les tissus était plus importante qu'à la température plus faible.

Le stress thermique mène, entre autres, au découplage mitochondrial et à une hausse du stress oxydant. Seule, ou combinée à la photopériode, une hausse de la température peut aussi déclencher l'apparition de caractères sexuels, dont le développement des gonades. Ces deux effets augmentent de façon conséquente les dépenses énergétiques. Cela peut mener les poissons exposés à augmenter leur production d'énergie, comme cela a été le cas durant ce projet via l'augmentation de la respiration mitochondriale, notamment du complexe I. Toutefois, si la production ne comble pas toutes les dépenses, les poissons peuvent se voir obliger de puiser dans leurs réserves, ce qui pourrait expliquer pourquoi, dans ce projet, les poissons présentent un indice de Fulton diminué après une exposition à 25 °C.

L'exposition au Cd seul n'a pas engendré d'effets négatifs sur le métabolisme mitochondrial et la santé du mené tête-de-boule contrairement à ce qui était attendu dans la littérature. La concentration de Cd dans le foie des poissons exposés était trop faible pour induire des effets néfastes et la concentration dans les mitochondries l'était encore plus. De plus, le foie possède un bon système de détoxification des métaux. En effet, une augmentation des MTs et du GSH permet

de séquestrer le métal et de limiter les dégâts engendrés par sa liaison aux composantes cellulaires. Toutefois, lorsque la capacité de liaison de ses ligands riches en cystéine est dépassée, le métal est libre d'agir.

Lorsque les deux stress sont combinés, les poissons ont de plus en plus de mal à compenser la hausse des dépenses énergétiques et cela se fait sentir dans leurs réserves comme le suggèrent la baisse des indices hépatosomatique et de Fulton ainsi que la diminution des protéines hépatiques. Il s'agit ici d'une réponse aux deux stress cumulés en plus de leur interaction notamment sur la concentration de métal dans le foie qui a augmenté, excédant probablement la capacité de liaison des ligands riches en cystéine.

Ce travail montre que les poissons arrivent à gérer les différents stress de façon individuelle, mais que leur combinaison représente un défi plus important. En effet, l'exposition combinée au Cd et au stress thermique présente des effets plus importants que les expositions individuelles, parfois même de façon synergique, et cela met en péril la survie des individus.

10 PERSPECTIVES FUTURES

La première étape de travaux futurs serait de confirmer, comme suggéré dans ce mémoire, que l'importante mortalité observée à 25°C avec du Cd est bien causée par une diminution des réserves énergétiques. Cela pourrait être fait par un suivi temporel de la population à l'étude sur divers paramètres physiologiques tels que les réserves hépatiques et musculaires de glucides, de lipides et de protéines, les Indices Hépatosomatique, Gonadosomatique et de Condition de Fulton ainsi que sur la respiration mitochondriale et le BMR. Il serait souhaitable aussi de faire un suivi en parallèle des concentrations tissulaires de MTs ainsi que du GSH.

Par la suite, il pourrait être intéressant de vérifier l'hypothèse selon laquelle les enzymes du cycle de Krebs seraient plus sensibles au Cd que celles de la chaîne de transport d'électrons ce qui entraînerait une réponse des premières à des concentrations plus faibles de Cd.

Finalement, l'influence d'autres facteurs abiotiques sur la toxicité du Cd serait pertinente à vérifier. Le niveau d'alimentation et l'hypoxie seraient, selon moi, les facteurs les plus susceptibles de l'influencer puisque ce sont des paramètres importants en ce qui a trait au métabolisme énergétique. Un paramètre comme le parasitisme pourraient aussi être intéressant, puisqu'il augmente le niveau de stress des individus.

[ARTICLE]

11 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

Synergistic effects of combined cadmium and heat stresses on mitochondrial metabolism and health of fathead minnows (*Pimephales promelas*)

Effets synergiques d'une exposition combinée au cadmium et à un stress thermique sur le métabolisme mitochondrial et la santé du mené tête-de-boule (*Pimephales promelas*)

Isabelle Fournier¹, Mariem Fadhlaoui¹, Pierre U.Blier², Patrice Couture^{1*}

¹ Institut National de la Recherche Scientifique – Centre Eau Terre Environnement, Québec, Québec, Canada

² Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Québec, Canada

Isabelle Fournier

Réalisation de l'expérience rapportée dans cet article ainsi que de la rédaction de ce dernier

Mariem Fadhlaoui

Aide au maintien des poissons ainsi qu'au dosage du cadmium à l'ICP-MS

Pierre U.Blier

Soutien technique et académique pour mener à bien les respirations mitochondriales et leurs analyses

Patrice Couture

Direction des travaux de recherche d'Isabelle Fournier rapportés dans cet article et contribution au soutien financier par le biais d'une subvention du CRSNG à la Découverte

L'Article a été soumis à la revue *Aquatic Toxicology*, le 4 novembre 2015

12 RÉSUMÉ FRANÇAIS DE L'ARTICLE

Cette étude avait pour but de vérifier les effets synergiques d'une exposition combinée au cadmium (Cd) et à un stress thermique sur le métabolisme mitochondrial du mené tête-de-boule (*Pimephales promelas*). Les poissons ont été exposés 8 semaines à chaque stresser (6 µg Cd/L ou 25 °C) de façon individuelle ou combinée. Le stress métallique seul n'a pas eu d'effets négatifs sur les poissons, alors que le stress thermique a mené à l'augmentation de la respiration mitochondriale et à une diminution de l'Indice de Condition de Fulton. Cela pourrait être le résultat d'une modification du statut reproducteur qui augmente la demande énergétique à la température la plus élevée, en plus du stress déjà imposé par la température en soi. Les poissons exposés aux deux stressers en combinaison ont accumulé plus de Cd dans leur foie, ont subi une importante mortalité, ont vu leur Indice de Condition de Fulton, leur Indice Hépatosomatique et leur protéines hépatiques diminuer en plus d'une augmentation de l'activité de la pyruvate déshydrogénase hépatique. Malgré la hausse du Cd dans leur foie, les poissons ont réussi à gérer ce métal afin de limiter sa liaison avec des composantes sensibles de la cellule, prévenant ainsi des effets néfastes comme l'inhibition de la respiration mitochondriale. Nos données suggèrent que les poissons exposés aux deux sources de stress augmentent leur métabolisme oxydatif en vue de compenser l'élévation de la demande énergétique, ce qui résulte en une diminution des réserves énergétiques causée par une différence entre la demande énergétique et la capacité à accumuler des réserves. Notre étude supporte la théorie que les stress thermique et métallique agissent en synergie sur le métabolisme énergétique, mettant en évidence l'importance de considérer l'influence des paramètres naturels dans les études toxicologiques.

13 ARTICLE

Synergistic effects of combined cadmium and heat stresses on mitochondrial metabolism and health of fathead minnows (*Pimephales promelas*)

Isabelle Fournier¹, Mariem Fadhlou¹, Pierre U.Blier², Patrice Couture^{1*}

¹ Institut National de la Recherche Scientifique – Centre Eau Terre Environnement, Québec, Québec, Canada

² Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Québec, Canada

* Corresponding author: patrice.couture@ete.inrs.ca

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

Abstract

In this study we investigated the synergistic impacts of cadmium (Cd) and heat stress on mitochondrial metabolism in fathead minnows (*Pimephales promelas*). Fish were exposed for 8 weeks to each stressor (6 µg Cd/L or 25 °C) or to both in combination. The metallic stress on its own did not lead to adverse effects on the fish, while the thermal stress increased the mitochondrial respiration and decreased the Fulton Condition Index. That could be due, besides the known negative impact of temperature on ectotherms, to the reproductive status exerting energy demand at the higher temperature. Fish exposed to the combined stressors expressed a greater liver Cd concentration, an important mortality, a decrease of the Hepatosomatic Index and of liver protein concentration and an increase of liver pyruvate dehydrogenase activity. Despite their higher liver Cd concentrations, these fish may have managed to prevent inappropriate binding of the metal to sensitive parts of the cells and consequent negative consequences, such as inhibition of mitochondrial respiration. Our data suggests that fish exposed to both stressors combined increased their oxidative metabolism likely to cope with the elevated energy demands, which resulted in a decrease of energy reserves due to a mismatch between energy demand and capacity for accumulation. Overall, our study supports that heat stress and metal contamination act synergistically on energy metabolism, highlighting the importance of considering the influence of natural stressors in ecotoxicological studies.

Keywords: mitochondrial metabolism, cadmium, heat stress, fish

1. Introduction

Fish in the wild are exposed to a combination of numerous stressors including anthropogenic (eg. contaminants) and natural stressors (eg. hypoxia, dietary restrictions, predation and parasitism). Among these stressors, cadmium (Cd) and heat stress are likely to be encountered in combination in lakes surrounding mining regions (Dorts *et al.*, 2012; Sanni *et al.*, 2008). In these areas, Cd concentration is around 10-fold the background levels (that is around 0.5 nM) (Couture *et al.* 2008; Levesque *et al.* 2002; Pyle *et al.* 2005). Cadmium is a non-essential bioaccumulative metal (Sanni *et al.*, 2008) mostly toxic for its ability to enhance reactive oxygen species (ROS) production (Dorts *et al.* 2012; Vergauwen *et al.* 2013a) and its high affinity for sulfhydryl groups leading to inhibition of some enzymes (Dorts *et al.*, 2012). Mitochondria are an important intracellular target for Cd, leading to an *in vitro* inhibition of the state 3 respiration in a dose-dependent manner (Garceau *et al.* 2010; Ivanina *et al.* 2008; Lannig *et al.* 2006; Onukwufor *et al.* 2015; Wang *et al.* 2004).

Temperature influences the rate of all chemical reactions in ectotherms and increases energy demand (Blier *et al.* 2014; Dorts *et al.* 2012; Sanni *et al.* 2008). Temperature also leads to an increase in ROS production (Dorts *et al.* 2012; Vergauwen *et al.* 2013a) and to proton leak. In ectotherms, proton leak may account for 30-40 % of the standard metabolic rate and it could lead to mitochondrial uncoupling (Cherkasov *et al.* 2006b). Moreover, the uptake of metals by aquatic organisms increases with temperature (Dorts *et al.* 2012; Onukwufor *et al.* 2015; Sanni *et al.* 2008; Vergauwen *et al.* 2013a; Vergauwen *et al.* 2013b).

In combination, Cd and heat stress leads to an important increase of mortality, but the reasons underlying this synergy are not well understood although we know that these two

stressors induce several similar effects. The more widespread interpretation in the literature is that their synergistic effects involve the impairment of mitochondrial metabolism. In oysters (*Crassostrea virginica*), there was an increase of basal metabolic rate (BMR) with Cd exposure at low temperature, but not at high temperature, even though the latter stressor alone increased BMR, suggesting a limitation in energy production (Cherkasov *et al.* 2006a; Lannig *et al.* 2006). A decreased mitochondrial respiration rate along with mitochondrial uncoupling at high temperature provides additional evidence pointing towards mitochondrial impairment in these organisms (Cherkasov *et al.* 2006b; Cherkasov *et al.* 2006a; Sokolova *et al.* 2005).

Overall, literature suggests that synergistic effects on mitochondrial metabolism may cause the greater toxicity observed in a combined exposure to Cd and elevated temperatures. However, effects of chronic exposure to these combined stressors on mitochondrial metabolism are not well known for fish. There is one study on isolated mitochondria that corroborates the energetic limitation hypothesis (Onukwufor *et al.*, 2015), but to our knowledge this hypothesis has never been tested in whole-fish. However, we can expect a similar response as in oysters since there are synergistic interactions between Cd and temperature in fish, e.g. Cd exposure decreased thermal tolerance in *Notropis lutrensis* and *Pimephales promelas* (Carrier and Beitinger, 1988) and thermal stress increased Cd toxicity in *Galaxias maculatus* (Cassidy, 1975). Moreover, whole-fish exposure to Cd alone seems to lead to a mismatch between energy production and use. Indeed, Sandhu *et al.* (2014) observed an increase in glycolytic capacities of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), suggesting an elevated energy demand, but a decrease in liver glycogen content and an attenuation of their response to handling stress, suggesting energy

limitation. A similar trend was also observed in wild yellow perch (*Perca flavescens*) living in Cd-contaminated lakes, where carbohydrates and the activity of lipid metabolism enzymes increased and liver glycogen content decreased compared to fish from reference lakes. These fish were also unable to respond to an induced stress by increasing their glucose plasma levels (Levesque *et al.*, 2002).

The objective of this study was to investigate the potential synergistic effects of temperature and Cd on the mitochondrial metabolism of fathead minnows (*Pimephales promelas*) after chronic exposure of whole organisms. To this end, fish were exposed to environmentally realistic Cd concentrations and temperatures individually and in combination. At the end of the exposure, hepatic mitochondrial respiration, hepatic pyruvate dehydrogenase activity and endpoints of general health were assessed.

2. Materials and Methods

2.1 Animal care and exposure conditions

Adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) (mean weight 2.1 ± 0.7 g) were purchased from Aquatic Research Organisms (Hampton, New Hampshire, United States). They were maintained in the laboratory at 25 °C in 45 L tanks (≈ 1 fish/1.5 L) with reconstituted water (35.3 mg/L CaCl₂, 32.8 mg/L MgSO₄, 51.2 mg/L NaHCO₃, 2.1 mg/L KCl, 0.55 mg/L NaBr and 3.4 mg/L CaSO₄ in deionized water, pH 7.5, water hardness 53 mg/L equiv. CaCO₃) for two weeks before initiating exposure conditions. Water temperature was the same as the ambient room temperature and it was monitored daily. For the 15 °C exposure, water temperature was decreased from 25 °C to 15 °C by 1 °C each day. Water was changed

twice a week and Cd concentration was adjusted each time after an ICP-MS dosage. Fish were fed each day *ad libidum* with commercial flakes and frozen artemia.

After acclimation, fish were randomly distributed among eight tanks, which were allocated one of four treatments randomly, yielding two tanks per treatment, as follows: (1) 25 °C without Cd, (2) 25 °C with 6 µg/L Cd, (3) 15 °C without Cd and (4) 15 °C with 6 µg/L Cd. After eight weeks, fish were sacrificed and their tissues were used to measure hepatic mitochondrial respiration, hepatic pyruvate dehydrogenase activity, hepatic and muscular protein concentrations and mitochondrial and total hepatic Cd concentration.

All experimental protocols have been approved by an institutional committee for animal care.

2.2 Tissue isolation

Fish were stunned with a blow to the head and killed by severing their spinal cord. After sacrifice, fish were kept on ice and all the following manipulations were done on ice. Fish were weighed, measured and dissected. Muscle was frozen to -80 °C for the determination of protein concentrations.

A number of livers were pooled (between two and five depending on the number necessary to obtain 80 mg of liver). Tissue was then fragmented and permeabilized in MiR05 buffer (109 mM sucrose, 59 mM k-lactobionate, 20 mM HEPES, 19 mM taurine, 10 mM monopotassium phosphate (KH₂PO₄), 3 mM magnesium chloride (MgCl₂), 0.49 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) and 1 g/L bovine serum albumin (BSA)) with ten passes of a loose pestle in a 2 mL glass tissue grinder (≈25 µL buffer/mg liver w.w.) (Kimble-Chase, Querétaro, Qro., Mexico) based on a protocol modified from Kuznetsov

et al. (2002). These permeabilized liver cells were separated in multiple aliquots. Some were frozen at -80 °C for total Cd, protein concentration and pyruvate dehydrogenase activity. One aliquot of homogenate was immediately used for respiration measurement. A last aliquot was refrigerated until the isolation of the mitochondria for determination of mitochondrial Cd concentration. The isolation was done within hours following dissection from liver homogenates by a series of two centrifugations, the first one at 900 g for 10 min at 4 °C to remove cellular debris and the second one at 9000 g for 10 min at 4 °C. The pellet containing the mitochondria was resuspended in MiR05 buffer ($\approx 1.6 \mu\text{L}$ buffer/mg of liver in the homogenate w.w.). This suspension was frozen at -80 °C until measurement of Cd concentrations.

2.3 Mitochondrial respiration

Mitochondrial respiration was monitored using an oxygen polarograph (Dual digital model 20, Rank Brothers, Bottisham, Cambridge, England) whose chamber temperature was maintained at the exposure one by a temperature-controlled circulating bath (Isotemp 4100R20, Thermo Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Liver permeabilized cells (500 μL) were agitated 5 minutes on ice with a vortex at low speed before being added to the respiration chamber. Pyruvate (34.5 mM final), malate (3.69 mM final) and adenosine diphosphate (ADP) (9.19 mM final) were added to spark the Krebs's cycle so that complex I could receive electrons. The measured respiration is called *CIOXPHO*. After that, succinate² (0.33 mM final) was added and the measurement (*CICIIOXPHOS*) gives an approximation of maximal respiration capacity supported by electron transport system

² All the addition of substrate/inhibitor has been done after the stabilisation of the previous signal by the polarograph, being about 2 to 3 minutes

(ETS). During the maximal respiration, cytochrome c was added (0.4 μ M final) in order to check mitochondrial membrane integrity and ensure a high quality mitochondrial preparation (Kuznetsov *et al.*, 2008). Only cellular preparations for which CIIIOXPHOS respiration rate did not increase by more than 10 % following the addition of cytochrome c (mitochondria with high structural integrity) were kept for this study. Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP, 5.0 μ M final) was also added to quantify a possible limitation of maximal respiration by phosphorylation. Thereafter, rotenone (complex I inhibitor, 0.025 mM final) was added to estimate complex II respiration, CIIIOXPHOS. Substrates were dissolved in MiR05 buffer without BSA and inhibitors were dissolved in 95 % ethanol.

2.4 Determination of protein content

Hepatic and muscular protein concentrations were measured with the bicinchoninic acid method (P. K. Smith *et al.*, 1985) using BSA as a standard.

2.5 Morphometric indices

Two endpoints of general health were examined. The Fulton Condition Index ($K = W/L^3$), where W is mass and L is length, informs about the nutritional status of a fish (Robinson *et al.*, 2008). The Hepatosomatic Index, which is a ratio of liver weight to total weight, is a good indicator of hepatic energy storage and of detoxification capacity (Tibbetts *et al.* 2005).

2.5 Determination of Cd concentrations

Cd concentrations measurements were performed on liver homogenates and on resuspended isolated mitochondria (as describe in section 2.2) by ICP-MS after an acid-

cold digestion. Both types of samples were lyophilized, then digested following a protocol adapted from Borgmann *et al.* (2001): dry samples were mixed with 70 % nitric acid (100 $\mu\text{L}/\text{mg}$ d.w.) for 48 hours, then with 30 % hydrogen peroxide (40 $\mu\text{L}/\text{mg}$ d.w.) for 24 hours and finally with deionized water (860 $\mu\text{L}/\text{mg}$ d.w.). Assays were calibrated with a CdCl_2 standard curve. Digestion and lyophilisation blanks were used to monitor potential contamination during sample preparation. Certified materials (TORT-3 (lobster hepatopancreas) and DOLT-4 (dogfish liver), National Research Council of Canada) allowed calculation of recovery rates, which were 95 ± 3 % for TORT-3 (n=2) and 98 ± 1 % for DOLT-4 (n=3).

2.6 Statistics

ANOVA was used to examine significant differences among treatments. When significant differences ($p < 0.05$) were detected, Tukey's honest significant difference (HSD) test was used to identify differences among treatments. The assumptions of normality (Anderson-Darling test) and homogeneity of variances (F-test) were respected. Data are represented as $\text{mean} \pm \text{SE}$. Statistical analyses were performed using the R software.

3. Results

3.1 Cd concentrations

There was an effect of both the temperature and the metal treatments on the Cd concentration of the liver and the liver's mitochondria (ANOVA $p < 0.001$). The Cd concentration in liver and liver mitochondria increased in the presence of Cd and there was a further increase at the higher temperature; in the liver, there was about five times more Cd in the exposed fish at 15 °C than in the related control, while the increase was about 10-fold at 25 °C (Figure 1).

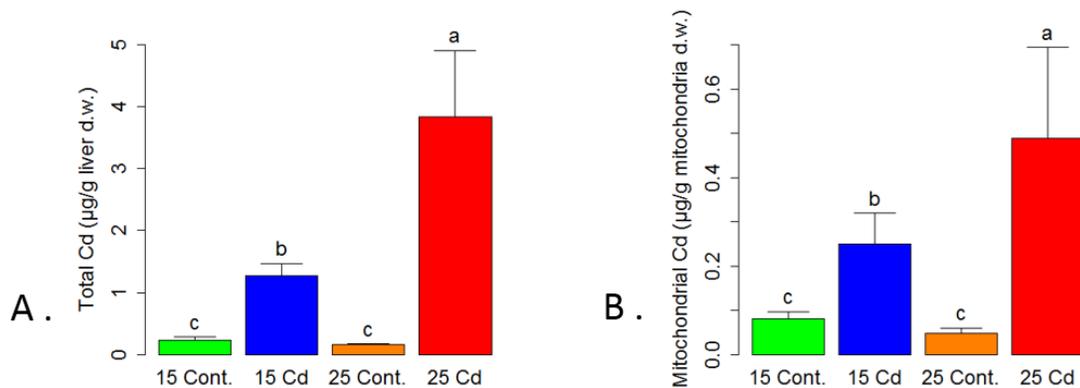


Figure 1. Cadmium accumulation in (A) liver and (B) liver mitochondria of *Pimephales promelas*. Different letters represent treatments that significantly differ. Control and Cd-exposed fish at 15 °C (N=15 and 12, respectively) and at 25 °C (N=6 and 5, respectively) (Tukey HSD $p < 0.05$).

3.2 General health condition

Exposure to Cd alone (that is at 15 °C) did not lead to modifications of the health condition of the fish, while exposure to the thermal stress alone caused a decrease of the Fulton Condition Index (Figure 2A). The combined exposure of *Pimephales promelas* to Cd and temperature led to an important increase in mortality (62.5 % versus 6.8 to 8.8 %), a decrease of the Hepatosomatic Index (Figure 2B, ANOVA $p = 0.00153$) and a decrease in

liver protein concentration (Figure 3A, ANOVA $p < 0.001$). Neither temperature nor Cd stress affected muscle protein content (Figure 3B).

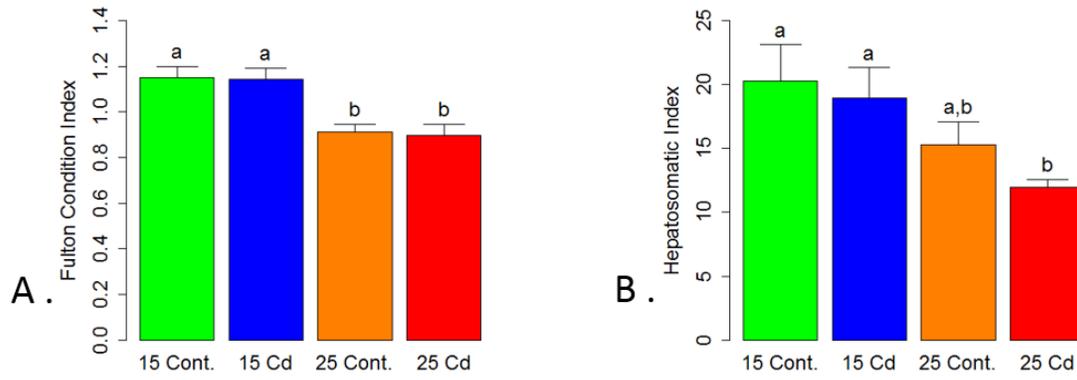


Figure 2. Effect of Cd and temperature on (A) Fulton Condition Index and (B) Hepatosomatic Index of *Pimephales promelas*. Different letters represent treatments that significantly differ. Control and Cd-exposed fish at 15 °C (N=15 and 12, respectively) and at 25 °C (N=6 and 5, respectively) (Tukey HSD $p < 0.05$).

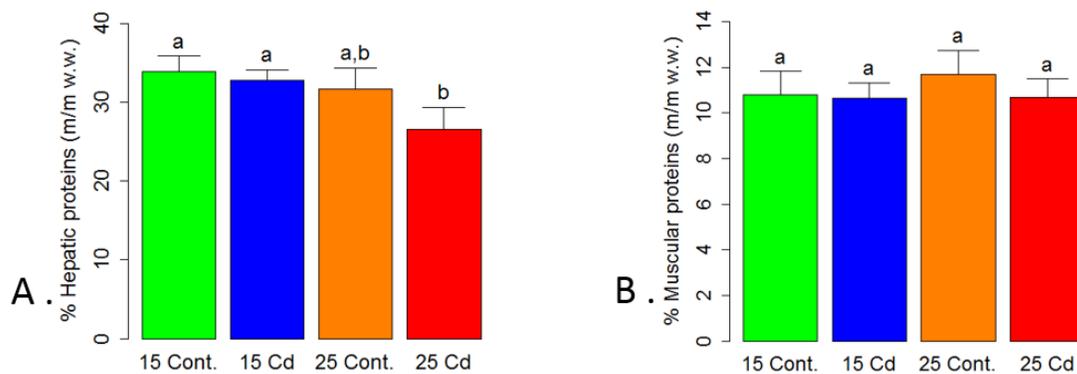


Figure 3. Effect of Cd and temperature on (A) hepatic and (B) muscular protein concentration (% w/w, w.w.) of *Pimephales promelas*. Different letters represent treatments that significantly differ. Control and Cd-exposed fish at 15 °C (N=15 and 12, respectively) and at 25 °C (N=6 and 5, respectively) (Tukey HSD $p < 0.05$).

3.3 Mitochondrial metabolism

Fish exposed to the highest temperature (25 °C) showed an increase in total mitochondrial respiration, expressed as CICIOXPHOS (measured at 25 °C), but there was no effect of Cd (Figure 4A). The partitioning of respiration between the mitochondrial complexes allowed demonstrating that Cd did not influence respiration when ETS is fed exclusively at the Complex I (CIOXPHOS) while temperature did increase it (Figure 4B, ANOVA $p < 0.001$). Neither the higher temperature nor Cd affected Complex II respiration, estimated by CIIOXPHOS. There was no effect of Cd at 15 °C.

Pyruvate dehydrogenase activity in the liver of the 25°C-Cd-exposed fish was higher than for the other treatments (Figure 5, ANOVA $p < 0.001$). Again, no effect of Cd was observed at 15 °C.

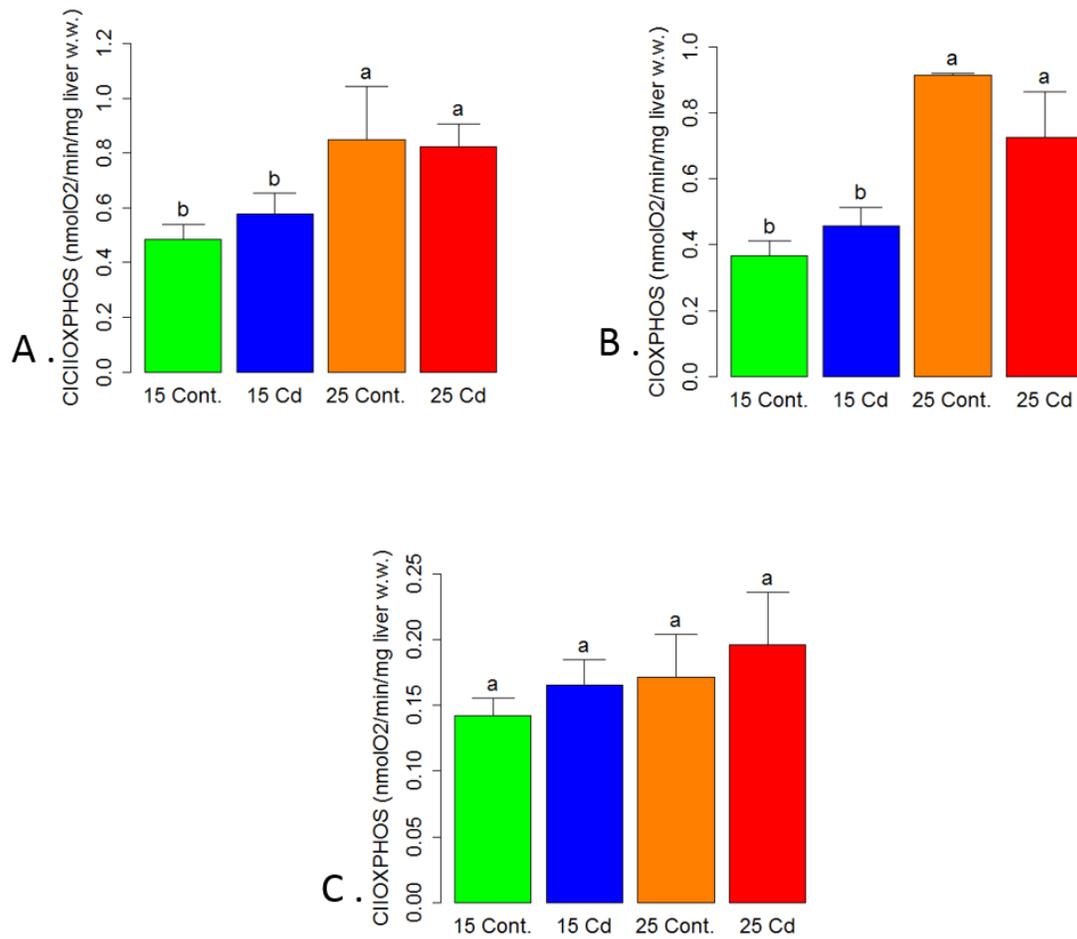


Figure 4. Effect of Cd and temperature on hepatic mitochondrial respiration of *Pimephales promelas*. (A) CICIOXPHOS, (B) CIOXPHOS and (C) CIIOXPHOS. Different letters represent treatments that significantly differ. Control and Cd-exposed fish at 15 °C (N=15 and 12, respectively) and at 25 °C (N=5 and 4, respectively) (Tukey HSD $p < 0.05$).

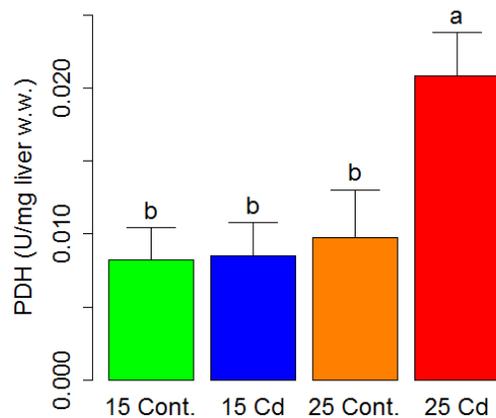


Figure 5. Effect of Cd and temperature on liver pyruvate dehydrogenase activity of *Pimephales promelas*. Different letters represent treatments that significantly differ. Control and Cd-exposed fish at 15 °C (N=15 and 12, respectively) and at 25 °C (N=5 and 4, respectively) (Tukey HSD $p < 0.05$).

4. Discussion

Exposure of *P. promelas* to heat stress alone led to a decrease of the Fulton Condition Index and to an increase of mitochondrial respiration in liver, suggesting an increased energy demand. An increase in mitochondrial respiration is commonly observed after exposure to elevated temperatures in various species of aquatic ectotherms such as crabs, fish, oysters and clams (Abele *et al.* 2002; Cherkasov *et al.* 2006; Hilton *et al.* 2010; Lemieux *et al.* 2010; Paital and Chainy 2014). There are numerous reasons underlying this increase energy demand, namely membrane fluidity and ion balance maintenance, oxidative stress, proton leak and mitochondrial uncoupling (Cherkasov *et al.* 2006b). Furthermore, in fathead minnows, and particularly in laboratory strains such as the one used in this study, elevated temperatures varying between 18 to 26 °C trigger sexual maturation and reproductive

behaviour, increasing the energetic demand (Brian *et al.*, 2011; Denny, 1987; Smith, 1978). In our experiment, fish exposed to 25 °C clearly exhibited a reproductive behaviour (nest guarding) and sexual characteristics (well-developed nuptial tubercles and bright colors in males), but by the end of the exposure, they lacked mature gonads and no eggs or fry were found in their aquaria (personal daily observations). However, it is possible that fish presented sexual behaviour in response to elevated temperature without developing their gonads, especially since, in our experiment, photoperiod was held constant in all exposure conditions. For example, Vezina and Guderley (1991) reported that when the temperature rises, even in a non-matching photoperiod, three-spined stickleback males, under selection for reproductive success, may have evolved to limit their food intake to increase the energy available to other functions than digestion. Therefore, it is likely that even in the absence of clear gonad development, the triggering of a reproductive behaviour in our fish could in part explain the response of the biomarkers examined at the higher temperature compared to the 15 °C control fish.

Exposure to Cd at 15 °C did not lead to any significant change in the parameters examined. The concentrations of Cd found in the liver of our contaminated fish (1.22 +/- 0.41 µg Cd/g liver d.w.) were of the same order of magnitude as concentrations reported from fish exposed to similar water Cd concentrations. For instance, McGeer *et al.* (2000) reported liver concentrations of 3 µg Cd/g d.w. in juvenile *Oncorhynchus mykiss* exposed for 65 days at 3 µg Cd/L; Chowdhury *et al.* (2005) reported concentrations of 2 µg Cd/g d.w. in the liver of *O. mykiss* exposed for 30 days at 3 µg Cd/L and values around 3.3 µg/g d.w. were observed for the same species exposed for 30 days at 3 µg Cd/L (Hollis *et al.*, 1999). As in this study, none of these found deleterious Cd effects on metabolism related

parameters such as critical swimming speed (U_{crit}) and ‘in-tank’ SMR. This is consistent with evidence from the literature suggesting that liver Cd concentrations reported to inhibit mitochondrial respiration are about 3 to 10 times higher than the one experienced by our fish (eg. 14 to 35 $\mu\text{g Cd/g liver d.w.}$ for goldfish isolated mitochondria (Garceau *et al.*, 2010), 100 $\mu\text{g Cd/g liver d.w.}$ for *O. mykiss* isolated mitochondria (Onukwufor *et al.*, 2015)) and that in our study, mitochondrial Cd concentrations were even lower ($0.24 \pm 0.12 \mu\text{g Cd / g mitochondria d.w.}$). Furthermore, liver possesses an efficient detoxification machinery for metals. As a non-essential metal, Cd elimination rate is slow and detoxification is costly. Rather than getting rid of it, it seems that fish have more efficient means to sequestering Cd in less sensitive compartments (McGeer *et al.* 2000); at the tissue level it implies accumulation in receptor (gills and gut) and detoxification organs (liver and kidney) rather than sensitive ones (eg. gonads and brain) (Arini *et al.* 2015; Hollis *et al.* 1999; McGeer *et al.* 2000; Vergauwen *et al.* 2013a). At the cellular level, binding to high cysteine content molecules, such as glutathione (GSH) and metallothioneins (MT), is the principal line of defense against Cd (Dang and Wang, 2009). Indeed, many studies report that in fish exposed to Cd, the metal is largely bound to MT (Giguère *et al.*, 2006; Podrug *et al.*, 2009), hence preventing it from accumulating in mitochondria. Nevertheless, mitochondria are an important target for Cd during accumulation in the cell (Sokolova *et al.* 2005), and there does not appear to be a threshold under which this metal is not found in sensitive subcellular fractions (such as enzymes and mitochondria), suggesting that even at low concentrations as in this study, fish only partially detoxify Cd (Campbell *et al.* 2008; Dang and Wang 2009). Campbell *et al.* (2008) proposed that fish chronically exposed to Cd may have developed a trade-off between detoxification costs and residual damage

resulting from an incomplete detoxification. According to this hypothesis, at low Cd concentrations and in the absence of other stressors, fish will tolerate and compensate Cd-induced cellular damage instead of investing in costly protective strategies. In our study, this scenario would correspond to fish exposed to Cd at 15°C.

In our fish exposed to the combined Cd and temperature stresses, although the mitochondrial Cd concentration was higher, there was still no significant impact of this metal on the CII OXPHOS respiration. As discussed above, the accumulation of Cd in the mitochondria of our experimental fish was not sufficient to induce an inhibition, in contrast to expectations from previous studies (Garceau *et al.*, 2010) and from the literature (Ivanina *et al.*, 2008; Lannig *et al.*, 2006; Onukwufor *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2004). However, there is non-significant reduction of the C1 OXPHOS that seems to corroborate the hypothesis that Cd inhibit mitochondrial respiration. Furthermore, as supposed from exposure of isolated mitochondria to Cd, the metal may have impacted parameters that were not measured such as proton leak, ROS production and uncoupling. As a result, our 25°C-Cd-exposed fish could have experienced a reduced ATP production for the same respiration rate. Nevertheless, the increase of PDH activity in 25°C-Cd-exposed fish compared to fish from all other conditions tested agrees with the literature, where Cd-induced increases in dehydrogenase activities are commonly reported: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (Rajotte and Couture, 2002), malate dehydrogenase (Levesque *et al.*, 2002; Vaglio and Landriscina, 1999), NAD-isocitrate dehydrogenase (Song *et al.*, 2014; Vaglio and Landriscina, 1999) and succinate dehydrogenase (Vaglio and Landriscina, 1999). All these dehydrogenases, including PDH, have in common to participate to mitochondrial respiration through reduction of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), the substrate

of Complex I, a mitochondrial enzyme of the electron transport system (ETS) (Nicholls and Ferguson, 2013). This absence of further increases of respiration in the 25°C-Cd-exposed fish in spite of an upstream step being increased suggests that something is limiting mitochondrial respiration. We can hypothesize from our study that this limitation unlikely originates from complexes II nor from the phosphorylation step (no increase of the respiration after FCCP addition, results not shown). Instead, it may be the result of a ROS-induced regulation (Mailloux *et al.*, 2014) caused by the high reducing capacity at the interface Krebs' cycle (PDH) and ETS (Complex I).

In spite of the absence of negative impacts of a combined exposure to Cd and heat stress on mitochondrial respiration, it resulted in a synergistic and major impact on mortality, as commonly reported in similar experiments (Dorts *et al.* 2012; Hollis *et al.* 1999; Lannig *et al.* 2006; Sokolova and Lannig 2008; Vergauwen *et al.* 2013a). As suggested previously, this synergy could be the result of a mismatch between energy production and use. Indeed, the increase in oxidative capacity (PDH activity) likely reflects the higher energetic demand resulting from the combined exposure to Cd and high temperature. Elevated proton leak, ROS management, greater protein turnover, detoxification costs (such as MT and antioxidant synthesis), reproductive status and membrane fluidity maintenance are only some examples of causes for higher energetic demand (Cherkasov *et al.* 2006b; Rajotte and Couture 2002). Furthermore, the increased mitochondrial Cd concentration that we observed in fish exposed to the two stressors combined may have its role to play in their higher mortality. When Cd concentrations exceed the binding capacity of MT and GSH, it is free to induce damage. For example, when sea bass (*Dicentrarchus labrax*) were exposed to a low Cd concentration, the metal toxicity was counteracted by MT binding, while at a

higher concentration, Cd bound to sensitive cell components (such as enzymes) and there was a decrease of energy stores (Cattani *et al.*, 1996). Similarly, in our study, the combined stressors led, in the 25°C-Cd-exposed fish, to a decrease of the Fulton and Hepatosomatic indices and of liver protein concentration, which suggests that the increase of energy demand induced by the combined stressors may have exceeded the energy intake, forcing fish to utilize their energy stores to survive. However, this starvation-like state did not reach a critical bioenergetic stage, at least for survivors, since muscle proteins, which are one of the last energy stores consumed (Black and Love, 1986; Guderley *et al.*, 2003), did not change in 25°C-Cd-exposed fish.

5. Conclusions

Cadmium and high temperature are two stressors leading to an elevated energy demand but also to an inhibition of the oxidative capacity in *in vitro* isolated systems. However, fish can direct Cd accumulation towards specific tissues, such as liver and kidneys, and prevent to some extent its accumulation in sensitive cell fractions. As a result, in our study in which fish were exposed to Cd at low, environmentally relevant concentrations, little impairment of oxidative metabolism was noticed. An interesting observation about the effect of Cd on the mitochondrial metabolism is that PDH activity increased as a result of the combined exposure, but not *CICII OXPHOS* activity, suggesting a limitation of the ETS. It would therefore be highly relevant to consider, in a further study, the combined effects of Cd and temperature on ROS production in a perspective of mitochondrial respiration regulation. Although negative effects on mitochondrial respiration were not observed, adding heat stress to Cd exposure led to a decrease of Hepatosomatic Index and of liver protein concentration, phenomena which may be associated with the increased mortality observed

in these fish. Overall, our study suggests that combined Cd and heat stresses increased energy demand leading to energy store depletion, with life-threatening consequences.

6. Acknowledgements

This study was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, Ottawa, ON, Canada; Discovery grants program).

7. References

- Abele, D., Heise, K., Pörtner, H. O., Puntarulo, S., 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *The Journal of Experimental Biology*, 205, 1831–1841.
- Arini, A., Gourves, P. Y., Gonzalez, P., Baudrimont, M., 2015. Chemosphere Metal detoxification and gene expression regulation after a Cd and Zn contamination : An experimental study on *Danio rerio*. *Chemosphere*, 128, 125–133.
- Black, D., Love, R. M., 1986. The sequential mobilisation and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding. *Journal of Comparative Physiology B*, 156, 469–479.
- Blier, P. U., Lemieux, H., Pichaud, N., 2014. Holding our breath in our modern world : will mitochondria keep the pace with climate changes ? *Canadian Journal of Zoology*, 92, 591–601.
- Borgmann, U., Norwood, W. P., Reynoldson, T. B., Rosa, F., 2001. Identifying cause in sediment assessments: bioavailability and the Sediment Quality Triad. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58(5), 950–960.
- Brian, J. V., Beresford, N., Margiotta-Casaluci, L., Sumpter, J. P., 2011. Preliminary data on the influence of rearing temperature on the growth and reproductive status of fathead minnows *Pimephales promelas*. *Journal of Fish Biology*, 79(1), 80–88.
- Campbell, P.G.C., Kraemer, L. D., Giguère, A., 2008. Subcellular Distribution of Cadmium and Nickel in Chronically Exposed Wild Fish : Inferences Regarding Metal Detoxification Strategies and Implications for Setting Water Quality Guidelines for Dissolved Metals. *Human and Ecological Risk Assessment*, 14, 290–316.

- Carrier, R., Beitinger, T. L., 1988. Reduction in thermal tolerance of *Notropis lutrensis* and *Pimephales promelas* exposed to cadmium. *Water Research*, 22(4), 511–515.
- Cassidy, M., 1975. The acute toxicity of cadmium for the fish *Galaxias maculatus* and changes in acute toxicity with season and temperature. *Bulletin of the Australian Society for Limnology*, 6, 27–32.
- Cattani, O., Serra, R., Isani, G., 1996. Correlation between metallothionein and energy metabolism in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113(2), 193–199.
- Cherkasov, A. S., Biswas, P. K., Ridings, D. M., Ringwood, A. H., Sokolova, I. M., 2006. Effects of acclimation temperature and cadmium exposure on cellular energy budgets in the marine mollusk *Crassostrea virginica*: linking cellular and mitochondrial responses. *Journal of Experimental Biology*, 209, 1274–1284.
- Cherkasov, A. S., Ringwood, A. H., Sokolova, I. M., 2006. Combined effects of temperature acclimation and cadmium exposure on mitochondrial function in eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 25(9), 2461–2469.
- Chowdhury, M. J., Baldisserotto, B., Wood, C. M., 2005. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in rainbow trout chronically acclimated to waterborne or dietary cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(3), 381–390.
- Couture, P., Busby, P., Gauthier, C., Rajotte, J., Pyle, G., 2008. Seasonal and regional variations of metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. I. Factors influencing tissue metal concentrations. *Human and Ecological Risk Assessment*, 14(1), 97–125.
- Dang, F., Wang, W. X., 2009. Assessment of tissue-specific accumulation and effects of cadmium in a marine fish fed contaminated commercially produced diet. *Aquatic Toxicology*, 95(3), 248–255.
- Denny, J. S., 1987. Guidelines for the culture of fathead minnows' *Pimephales Promelas* for use in toxicity tests.
- Dorts, J., Bauwin, A., Kestemont, P., Jolly, S., Sanchez, W., Silvestre, F., 2012. Proteasome and antioxidant responses in *Cottus gobio* during a combined exposure to heat stress and cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 155(2), 318–324.
- Garceau, N., Pichaud, N., Couture, P., 2010. Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by *in vitro* exposure to Cd, Cu and Ni. *Aquatic Toxicology*, 98(2), 107–112.

- Giguère, A., Campbell, P. G. C., Hare, L., Couture, P., 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology*, 77(2), 178–189.
- Guderley, H., Lapointe, D., Bedard, M., Dutil, J., 2003. Metabolic priorities during starvation : enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 135, 347–356.
- Hilton, Z., Clements, K. D., Hickey, A.J.R., 2010. Temperature sensitivity of cardiac mitochondria in intertidal and subtidal triplefin fishes. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 180(7), 979–990.
- Hollis, L., McGeer, J. C., McDonald, D. G., Wood, C. M., 1999. Cadmium accumulation, gill Cd binding, acclimation, and physiological effects during long term sublethal Cd exposure in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 46(2), 101–119.
- Ivanina, A. V., Habinck, E., Sokolova, I. M., 2008. Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 148(1), 72–79.
- Kuznetsov, A. V., Strobl, D., Ruttmann, E., Konigsrainer, A., Margreiter, R., Gnaiger, E., 2002. Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. *Analytical Biochemistry*, 305, 186–194.
- Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F. N., Saks, V., Margreiter, R., Kunz, W. S., 2008. Analysis of mitochondrial function *in situ* in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature Protocols*, 3(6), 965–976.
- Lannig, G., Cherkasov, A.S., Sokolova, I. M., 2006. Temperature-dependent effects of cadmium on mitochondrial and whole-organism bioenergetics of oysters (*Crassostrea virginica*). *Marine Environmental Research*, 62(SUPPL. 1), 79–82.
- Lemieux, H., Tardif, J., Dutil, J., Blier, P.U., 2010. Thermal sensitivity of cardiac mitochondrial metabolism in an ectothermic species from a cold environment , Atlantic wolf fish (*Anarhichas lupus*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 384(1-2), 113–118.
- Lévesque, H.M., Moon, T.W., Campbell, P. G. C., Hontela, A., 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquatic Toxicology*, 60(3-4), 257–267.
- Mailloux, R.J., Jin, X., Willmore, W.G., 2014. Redox Biology Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions. *Redox Biology*, 2, 123–139.

- McGeer, J. C., Szebedinszky, C., Gordon McDonald, D., Wood, C. M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: Tissue specific metal accumulation. *Aquatic Toxicology*, 50(3), 245–256.
- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G., Wood., C.M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology*, 50(3), 231–243.
- Nicholls, D.G., Ferguson, S.J., 2013. *Bioenergetics*. (Elsevier, Ed.) (4th ed.). Academic press.
- Onukwufor, J.O., Kibenge, F., Stevens, D., Kamunde, C., 2015. Modulation of cadmium-induced mitochondrial dysfunction and volume changes by temperature in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 158, 75–87.
- Paital, B., Chainy, G.B.N., 2014. Effects of temperature on complexes I and II mediated respiration, ROS generation and oxidative stress status in isolated gill mitochondria of the mud crab *Scylla serrata*. *Journal of Thermal Biology*, 41(1), 104–111.
- Podrug, M., Raspor, B., Erk, M., Dragun, Z., 2009. Protein and metal concentrations in two fractions of hepatic cytosol of the European chub (*Squalius cephalus* L.). *Chemosphere*, 75(7), 843–849.
- Pyle, G.G., Rajotte, J.W., Couture, P., 2005. Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(3), 287–312.
- Rajotte, J., Couture, P., 2002. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59, 1296–1304.
- Robinson, M.L., Gomez-raya, L., Rauw, W.M., Peacock, M.M., 2008. Fulton's body condition factor K correlates with survival time in a thermal challenge experiment in juvenile Lahontan cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki henshawi*). *Journal of Thermal Biology*, 33, 363–368.
- Sandhu, N., McGeer, J.C., Vijayan, M.M., 2014. Exposure to environmental levels of waterborne cadmium impacts corticosteroidogenic and metabolic capacities, and compromises secondary stressor performance in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 146, 20–27.
- Sanni, B., Williams, K., Sokolov, E.P., Sokolova, I.M., 2008. Effects of acclimation temperature and cadmium exposure on mitochondrial aconitase and LON protease from a model marine ectotherm, *Crassostrea virginica*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 147(1), 101–112.

- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goetze, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85.
- Smith, R.J.F., 1978. Seasonal changes in the histology of the gonads and dorsal skin of the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Canadian Journal of Zoology*, 56(10), 2103–2109.
- Sokolova, I.M., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Research*, 37, 181–201.
- Sokolova, I.M., Ringwood, A.H., Johnson, C., 2005. Tissue-specific accumulation of cadmium in subcellular compartments of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia : Ostreidae). *Aquatic Toxicology*, 74, 218–228.
- Sokolova, I.M., Sokolov, E.P., Ponnappa, K.M., 2005. Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquatic Toxicology*, 73(3), 242–255.
- Song, Y.-F., Luo, Z., Pan, Y.-X., Liu, X., Huang, C., Chen, Q.-L., 2014. Effects of copper and cadmium on lipogenic metabolism and metal element composition in the javelin goby (*Synechogobius hasta*) after single and combined exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(2), 167–180.
- Tibbetts, S.M., Lall, S.P., Milley, J.E., 2005. Effects of dietary protein and lipid levels and DP DE⁻¹ ratio on growth, feed utilization and hepatosomatic index of juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. *Aquaculture Nutrition*, 11, 67–75.
- Vaglio, A., Landriscina, C., 1999. Changes in liver enzyme activity in the teleost *Sparus aurata* in response to cadmium intoxication. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43(1), 111–116.
- Vergauwen, L., Hagens, A., Blust, R., Knapen, D., 2013. Temperature dependence of long-term cadmium toxicity in the zebrafish is not explained by liver oxidative stress: Evidence from transcript expression to physiology. *Aquatic Toxicology*, 126, 52–62.
- Vergauwen, L., Knapen, D., Hagens, A., Blust, R., 2013. Hypothermal and hyperthermal acclimation differentially modulate cadmium accumulation and toxicity in the zebrafish. *Chemosphere*, 91(4), 521–529.
- Vézina, D., Guderley, H., 1991. Anatomic and enzymatic responses of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, to thermal acclimation and acclimatization. *The Journal of Experimental Zoology*, 258, 277–287.

Wang, Y., Fang, J., Leonard, S.S., Rao, K.M.K., 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(11), 1434–1443.

[RÉFÉRENCES]

- Abele, D., Heise, K., Pörtner, H. O., Puntarulo, S., 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *The Journal of Experimental Biology*, 205, 1831–1841.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Waston, J.D, 1989. *Biologie moléculaire de la cellule*. Médecine-sciences (2nd ed.). Flammarion.
- Almeida, J.A., Novelli, E.L., Dal Pai Silva, M., Júnior, R.A., 2001. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Environmental Pollution*, 114(2), 169–175.
- Al-Nasser, I.A., 2000. Cadmium hepatotoxicity and alterations of the mitochondrial function. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, 38(4), 407–413.
- Antonova, E.I., 2010. Short-term thermal compensatory-adaptive reaction mechanisms of the liver in *Carassius auratus gibelio*. *Contemporary Problems of Ecology*, 3(1), 57–62.
- Arini, A., Gourves, P. Y., Gonzalez, P., Baudrimont, M., 2015. Chemosphere Metal detoxification and gene expression regulation after a Cd and Zn contamination : An experimental study on *Danio rerio*. *Chemosphere*, 128, 125–133.
- Audet, D., Couture, P., 2003. Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 60(3), 269–278.
- Bagnyukova, T.V, Lushchak, O.V, Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2007. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23 °C. *Journal of Thermal Biology*, 32, 227–234.
- Behnke, R.J., 2002. Trout and Salmon of North America. In *Trout and salmon of North America* (The free p, pp. 68–72). New-York.
- Bélanger-Deschênes, S., Couture, P., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., 2013. Evolutionary change driven by metal exposure as revealed by coding SNP genome scan in wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Ecotoxicology*, 22(5), 938–957.
- Belyaeva, E.A., Korotkov, S.M., Saris, N.E., 2011. In vitro modulation of heavy metal-induced rat liver mitochondria dysfunction: A comparison of copper

and mercury with cadmium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25(SUPPL. 1), S63–S73.

- Berenbaum, M.C., 1978. A method for testing for synergy with any number of agents. *The Journal of Infectious Diseases*, 137(2), 122–130.
- Bervoets, L., Blust, R., Verheyen, R., 2001. Accumulation of metals in the tissues of three spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) from natural fresh waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48(2), 117–127.
- Black, D., Love, R. M., 1986. The sequential mobilisation and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding. *Journal of Comparative Physiology B*, 156, 469–479.
- Blier, P. U., Lemieux, H., Pichaud, N., 2014. Holding our breath in our modern world : will mitochondria keep the pace with climate changes ? *Canadian Journal of Zoology*, 92, 591–601.
- Bouchard, P., Guderley, H., 2003. Time course of the response of mitochondria from oxidative muscle during thermal acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *The Journal of Experimental Biology*, 206(Pt 19), 3455–3465.
- Borgmann, U., Norwood, W. P., Reynoldson, T. B., Rosa, F., 2001. Identifying cause in sediment assessments: bioavailability and the Sediment Quality Triad. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58(5), 950–960.
- Brian, J.V., Beresford, N., Margiotta-Casaluci, L., Sumpter, J.P., 2011. Preliminary data on the influence of rearing temperature on the growth and reproductive status of fathead minnows, *Pimephales promelas*. *Journal of Fish Biology*, 79(1), 80–88.
- Brookes, P.S., 2005. Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: An odd couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(1), 12–23.
- Campbell, P.G.C., Kraemer, L. D., Giguère, A., 2008. Subcellular Distribution of Cadmium and Nickel in Chronically Exposed Wild Fish : Inferences Regarding Metal Detoxification Strategies and Implications for Setting Water Quality Guidelines for Dissolved Metals. *Human and Ecological Risk Assessment*, 14, 290–316.
- Carrier, R., Beitinger, T. L., 1988. Reduction in thermal tolerance of *Notropis lutrensis* and *Pimephales promelas* exposed to cadmium. *Water Research*, 22(4), 511–515.

- Cassidy, M., 1975. The acute toxicity of cadmium for the fish *Galaxias maculatus* and changes in acute toxicity with season and temperature. *Bulletin of the Australian Society for Limnology*, 6, 27–32.
- Cattani, O., Serra, R., Isani, G., 1996. Correlation between metallothionein and energy metabolism in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113(2), 193–199.
- Chamberlin, M.E., 2004. Top-down control analysis of the effect of temperature on ectotherm oxidative phosphorylation. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(4), R794–R800.
- Cherkasov, A. S., Ringwood, A. H., Sokolova, I. M., 2006. Combined effects of temperature acclimation and cadmium exposure on mitochondrial function in eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 25(9), 2461–2469.
- Choi, C.Y., An, K.W., Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2007. Cadmium affects the expression of metallothionein (MT) and glutathione peroxidase (GPX) mRNA in goldfish, *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 145(4), 595–600.
- Chowdhury, M. J., Baldisserotto, B., Wood, C. M., 2005. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in rainbow trout chronically acclimated to waterborne or dietary cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(3), 381–390.
- Coors, A., De Meester, L., 2008. Synergistic, antagonistic and additive effects of multiple stressors : predation threat, parasitism and pesticide exposure in *Daphnia magna*. *Journal of Applied Ecology*, 45, 1820–1828.
- Couture, P., Busby, P., Gauthier, C., Rajotte, J., Pyle, G., 2008. Seasonal and regional variations of metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. I. Factors influencing tissue metal concentrations. *Human and Ecological Risk Assessment*, 14(1), 97–125.
- Couture, P., Kumar, P.R., 2003. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology*, 64(1), 107–120.
- Crain, C., Kroeker, K., Halpern, B.S., 2009. Interactive and cumulative effects of multiple stressors in marine systems. *Ecology Letters*, 11, 1304–1315.

- Cui, Y., Du, Y., Lu, M., Qiang, C., 2011. Antioxidant responses of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae exposed to thermal stress. *Journal of Thermal Biology*, 36(5), 292–297.
- Cui, Y., Liu, B., Xie, J., Xu, P., Habte-Tsion, H.M., Zhang, Y., 2014. Effect of heat stress and recovery on viability, oxidative damage, and heat shock protein expression in hepatic cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(3), 721–729.
- Cuyppers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A.R., Munters, E., Artois, T.J., Nawrot, T., Vangronsveld, J. Smeets, K., 2010. Cadmium stress: An oxidative challenge. *BioMetals*, 23(5), 927–940.
- Dahlhoff, E., Somero, G.N., 1993. Effects of temperature on mitochondria from Abalone (genus *Haliotis*) - adaptive plasticity and its limits. *Journal of Experimental Biology*, 185, 151–168.
- Dang, F., Wang, W.X., 2009. Assessment of tissue-specific accumulation and effects of cadmium in a marine fish fed contaminated commercially produced diet. *Aquatic Toxicology*, 95(3), 248–255.
- De Conto Cinier, C., Petit-Ramel, M., Faure, R., Garin, D., 1997. Cadmium bioaccumulation in carp (*Cyprinus carpio*) tissues during long-term high exposure: analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38(2), 137–143.
- De Conto Cinier, Petit-Ramel, M., Faure, R., Garin, D., Bouvet, Y., 1999. Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp, *Cyprinus carpio*, tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 122(3), 345–352.
- Denny, J. S., 1987. Guidelines for the culture of fathead minnows' *Pimephales Promelas*' for use in toxicity tests.
- De Smet, H., Blust, R., 2001. Stress responses and changes in protein metabolism in carp, *Cyprinus carpio*, during cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48(3), 255–262.
- Dorts, J., Bauwin, A., Kestemont, P., Jolly, S., Sanchez, W., Silvestre, F., 2012. Proteasome and antioxidant responses in *Cottus gobio* during a combined exposure to heat stress and cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 155(2), 318–324.
- Dorts, J., Grenouillet, G., Douxfils, J., Mandiki, S.N., Milla, S., Silvestre, F., Kestemont, P., 2012. Evidence that elevated water temperature affects the

reproductive physiology of the European bullhead *Cottus gobio*. Fish Physiology and Biochemistry, 38, 389–399.

Garceau, N., Pichaud, N., Couture, P., 2010. Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by *in vitro* exposure to Cd, Cu and Ni. Aquatic Toxicology, 98(2), 107–112.

Gargiulo, G., Arcamone, N., de Girolamo, P., Andreozzi, G., Antonucci, R., Esposito, V., Ferrara, L., Battaglini, P., 1996. Histochemical study of the effects of cadmium uptake on oxidative enzymes of intermediary metabolism in kidney of goldfish (*Carassius auratus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 113(2), 177–183.

George, S.G., Todd, K., Wright, J., 1996. Regulation of metallothionein in teleosts: Induction of MTmRNA and protein by cadmium in hepatic and extrahepatic tissues of a marine flatfish, the turbot (*Scophthalmus maximus*). Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology, 113(2), 109–115.

Giguère, A., Campbell, P. G. C., Hare, L., Couture, P., 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. Aquatic Toxicology, 77(2), 178–189.

Grasset, J., Bougas, B., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2014. Temperature, oxygen and diet modulate gene transcription and metabolic capacities in yellow perch. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 71, 1635-1641.

Grim, J.M., Miles, D.R.B., Crockett, E.L., 2010. Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. The Journal of Experimental Biology, 213(3), 445–452.

Guderley, H., Lapointe, D., Bedard, M., Dutil, J., 2003. Metabolic priorities during starvation : enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L . Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 135, 347–356.

Haug, W., Cheng, F., 2006. Effects of temperature and floating materials on breeding by the paradise fish (*Macropodus opercularis*) in the non-reproductive season. Zoological Studies, 45(4), 475–482.

Heise, K., Puntarulo, S., Pörtner, H.O., Abele, D., 2003. Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula*

elliptica (King and Broderip) under heat stress. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 134(1), 79–90.

- Hilton, Z., Clements, K. D., Hickey, A.J.R., 2010. Temperature sensitivity of cardiac mitochondria in intertidal and subtidal triplefin fishes. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 180(7), 979–990.
- Hollis, L., Hogstrand, C., Wood, C.M., 2001. Tissue-specific cadmium accumulation, metallothionein induction, and tissue zinc and copper levels during chronic sublethal cadmium exposure in juvenile rainbow trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(4), 468–474.
- Hollis, L., McGeer, J. C., McDonald, D. G., Wood, C. M., 1999. Cadmium accumulation, gill Cd binding, acclimation, and physiological effects during long term sublethal Cd exposure in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 46(2), 101–119.
- Iftikar, F.I., Hickey, A.J.R., 2013. Do mitochondria limit hot fish hearts? Understanding the role of mitochondrial function with heat Stress in *Notolabrus celidotus*. *PLoS ONE*, 8(5), e64120.
- Ivanina, A. V., Habinck, E., Sokolova, I. M., 2008. Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 148(1), 72–79.
- Jia, X., Zhang, H., Liu, X., 2011. Low levels of cadmium exposure induce DNA damage and oxidative stress in the liver of Oujiang colored common carp *Cyprinus carpio* var. color. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37(1), 97–103.
- Kaur, M., Atif, F., Ali, M., Rehman, H., Raisuddin, S., 2005. Heat stress-induced alterations of antioxidants in the freshwater fish *Channa punctata* Bloch. *Journal of Fish Biology*, 67(6), 1653–1665.
- Keller, M., Sommer, A. M., Pörtner, H.O., Abele, D., 2004. Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. *The Journal of Experimental Biology*, 207(Pt 14), 2529–2538.
- Kim, S.G., Jee, J.H., Kang, J.C., 2004. Cadmium accumulation and elimination in tissues of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, after sub-chronic cadmium exposure. *Environmental Pollution*, 127(1), 117–123.

- Koger, C.S., Teh, S.J., Hinton, D.E., 1999. Variations of light and temperature regimes and resulting effects on reproductive parameters in medaka (*Oryzias latipes*). *Biology of Reproduction*, 61(5), 1287–1293.
- Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Hare, L., 2005. Dynamics of Cd, Cu and Zn accumulation in organs and sub-cellular fractions in field transplanted juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Environmental Pollution*, 138(2), 324–337.
- Kraffe, E., Marty, Y., Guderley, H., 2007. Changes in mitochondrial oxidative capacities during thermal acclimation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: roles of membrane proteins, phospholipids and their fatty acid compositions. *The Journal of Experimental Biology*, 210(Pt 1), 149–165.
- Kumada, H., Kimura, S., Yokote, M., 1980. Accumulation and biological effects of cadmium in rainbow trout. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries*, 46(1), 97–103.
- Kurochkin, I.O., Etkorn, M., Buchwalter, D., Leamy, L., Sokolova, I.M., 2011. Top-down control analysis of the cadmium effects on molluscan mitochondria and the mechanisms of cadmium-induced mitochondrial dysfunction. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(1), R21–R31.
- Kuznetsov, A. V., Strobl, D., Ruttman, E., Konigsrainer, A., Margreiter, R., Gnaiger, E., 2002. Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. *Analytical Biochemistry*, 305, 186–194.
- Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F. N., Saks, V., Margreiter, R., Kunz, W. S., 2008. Analysis of mitochondrial function *in situ* in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature Protocols*, 3(6), 965–976.
- Landry, P.-L., Axelsen, F., Morin, R., 2000. Élevage de la perchaude.
- Lannig, G., Cherkasov, A.S., Sokolova, I. M., 2006. Temperature-dependent effects of cadmium on mitochondrial and whole-organism bioenergetics of oysters (*Crassostrea virginica*). *Marine Environmental Research*, 62(SUPPL. 1), 79–82.
- Lapointe, D., Pierron, F., Couture, P., 2011. Individual and combined effects of heat stress and aqueous or dietary copper exposure in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 104(1-2), 80–85.
- Le conseil canadien des ministres de l'environnement, 1999. Recommandations pour la qualité des eaux au Canada.

- Lemieux, H., Tardif, J., Dutil, J., Blier, P.U., 2010. Thermal sensitivity of cardiac mitochondrial metabolism in an ectothermic species from a cold environment , Atlantic wolf fish (*Anarhichas lupus*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 384(1-2), 113–118.
- Lévesque, H.M., Moon, T.W., Campbell, P. G. C., Hontela, A., 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquatic Toxicology*, 60(3-4), 257–267.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Vinagre, C., Diniz, M.S., 2013. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 166(2), 237–243.
- Mailloux, R.J., Jin, X., Willmore, W.G., 2014. Redox Biology Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions. *Redox Biology*, 2, 123–139.
- Matz, C.J., Treble, R.G., Krone, P.H., 2007. Accumulation and elimination of cadmium in larval stage zebrafish following acute exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(1), 44–48.
- McGeer, J. C., Szebedinszky, C., Gordon McDonald, D., Wood, C. M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: Tissue specific metal accumulation. *Aquatic Toxicology*, 50(3), 245–256.
- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G., Wood., C.M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology*, 50(3), 231–243.
- MDELCC 2015, Critères de qualité de l'eau de surface,
http://www.mdelcc.gouv.qc.ca/eau/criteres_eau/index.asp, page consultée le 4 janvier 2015
- Modi, H.R., Katyare, S.S., 2009. Effect of treatment with cadmium on structure-function relationships in rat liver mitochondria: Studies on oxidative energy metabolism and lipid/phospholipids profiles. *Journal of Membrane Biology*, 232(1-3), 47–57.
- Nakano, T., Kameda, M., Shoji, Y., Hayashi, S., Yamaguchi, T., 2014. Effect of severe environmental thermal stress on redox state in salmon. *Redox Biology*, 2, 772–776.

- Nicholls, D.G., Ferguson, S.J., 2013. Bioenergetics. (Elsevier, Ed.) (4th ed.). Academic press.
- Nigam, D., Shukla, G.S., Agarwal, K., 1999. Glutathione depletion and oxidative damage in mitochondria following exposure to cadmium in rat liver and kidney. *Toxicology Letters*, 106(2-3), 151–157.
- Nunes, B., Caldeira, C., Pereira, J.L., Gonçalves, F., Correia, A.T., 2014. Perturbations in ROS-related processes of the fish *Gambusia holbrooki* after acute and chronic exposures to the metals copper and cadmium. *Environmental Science and Pollution Research*, 3756–3765.
- Onukwufor, J.O., Kibenge, F., Stevens, D., Kamunde, C., 2015. Modulation of cadmium-induced mitochondrial dysfunction and volume changes by temperature in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 158, 75–87.
- Paital, B., Chainy, G.B.N., 2014. Effects of temperature on complexes I and II mediated respiration, ROS generation and oxidative stress status in isolated gill mitochondria of the mud crab *Scylla serrata*. *Journal of Thermal Biology*, 41(1), 104–111.
- Pascoe, D., Matthey, D.L., 1977. Studies on the toxicity of cadmium to the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. *Journal of Fish Biology*, 10.1111/j.1095-8649.1977.tb04114.x
- Podrug, M., Raspor, B., Erk, M., Dragun, Z., 2009. Protein and metal concentrations in two fractions of hepatic cytosol of the European chub (*Squalius cephalus* L.). *Chemosphere*, 75(7), 843–849.
- Preston, S., Coad, N., Townend, J., Killham, K., Paton, G.I., 2000. Biosensing the acute toxicity of metal interactions : are they additive, synergistic or antagonistic? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(3), 775–780.
- Pretto, A., Loro, V. L., Baldisserotto, B., Pavanato, M. A., Moraes, B. S., Menezes, C., Cattaneo, R., Clasen, B., Finamor, I.A., Dressler, V. , 2011. Effects of water cadmium concentrations on bioaccumulation and various oxidative stress parameters in *Rhamdia quelen*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(2), 309–318.
- Pyle, G.G., Rajotte, J.W., Couture, P., 2005. Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(3), 287–312.
- Quintana, L., Silva, A., Berois, N., Macadar, O., 2004. Temperature induces gonadal maturation and affects electrophysiological sexual maturity

- indicators in *Brachyhypopomus pinnicaudatus* from a temperate climate. *The Journal of Experimental Biology*, 207(11), 1843–1853.
- Rajotte, J., Couture, P., 2002. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59, 1296–1304.
- Robinson, M.L., Gomez-raya, L., Rauw, W.M., Peacock, M.M., 2008. Fulton's body condition factor K correlates with survival time in a thermal challenge experiment in juvenile Lahontan cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki henshawi*). *Journal of Thermal Biology*, 33, 363–368.
- Roesijadi, G., Hansen, K.M., Unger, M.E., 1997. Metallothionein mRNA accumulation in early developmental stages of *Crassostrea virginica* following pre-exposure and challenge with cadmium. *Aquatic Toxicology*, 39(3-4), 185–194.
- Rose, S., Vincent, S., Meena, B., Suresh, A., Mani, R., 2014. Metallothionein induction in fresh water catfish *Claria gariepinus* on exposure to cadmium. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 377–383.
- Sandhu, N., McGeer, J.C., Vijayan, M.M., 2014. Exposure to environmental levels of waterborne cadmium impacts corticosteroidogenic and metabolic capacities, and compromises secondary stressor performance in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 146, 20–27.
- Sanni, B., Williams, K., Sokolov, E.P., Sokolova, I.M., 2008. Effects of acclimation temperature and cadmium exposure on mitochondrial aconitase and LON protease from a model marine ectotherm, *Crassostrea virginica*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 147(1), 101–112.
- Sappal, R., MacDougald, M., Fast, M., Stevens, D., Kibenge, F., Siah, A., Kamunde, C., 2015. Alterations in mitochondrial electron transport system activity in response to warm acclimation, hypoxia-reoxygenation and copper in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*, 165, 51–63.
- Sappal, R., MacDougald, M., Stevens, D., Fast, M.D., Kamunde, C., 2014. Copper alters the effect of temperature on mitochondrial bioenergetics in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(3), 430–440.
- Shi, H., Sui, Y., Wang, X., Luo, Y., Ji, L., 2005. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of

Carassius auratus. Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology, 140(1), 115–121.

- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goetze, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry, 150(1), 76–85.
- Smith, R.J.F., 1978. Seasonal changes in the histology of the gonads and dorsal skin of the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Canadian Journal of Zoology, 56(10), 2103–2109.
- Sokolova, I.M., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. Climate Research, 37, 181–201.
- Sokolova, I.M., 2004. Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). The Journal of Experimental Biology, 207(15), 2639–2648.
- Sokolova, I.M., Ringwood, A.H., Johnson, C., 2005. Tissue-specific accumulation of cadmium in subcellular compartments of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia : Ostreidae). Aquatic Toxicology, 74, 218–228.
- Sokolova, I.M., Sokolov, E. P., Ponnappa, K. M., 2005. Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). Aquatic Toxicology, 73(3), 242–255.
- Song, Y.-F., Luo, Z., Pan, Y.-X., Liu, X., Huang, C., Chen, Q.-L., 2014. Effects of copper and cadmium on lipogenic metabolism and metal element composition in the javelin goby (*Synechogobius hasta*) after single and combined exposure. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 67(2), 167–180.
- Sreenivasula Reddy, P., Bhargyalakshmi, A., 1994. Changes in oxidative metabolism in selected tissues of the crab (*Scylla serrata*) in response to cadmium toxicity. Ecotoxicology and Environmental Safety, 29(3), 255–264.
- Tibbetts, S.M., Lall, S.P., Milley, J.E., 2005. Effects of dietary protein and lipid levels and DP DE⁻¹ ratio on growth, feed utilization and hepatosomatic index of juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. Aquaculture Nutrition, 11, 67–75.

- Tomanek, L., Zuzow, M.J., 2010. The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance limits and metabolic costs of thermal stress. *The Journal of Experimental Biology*, 213(20), 3559–3574.
- Ulrich, P.N., Marsh, A.G., 2009. Thermal sensitivity of mitochondrial respiration efficiency and protein phosphorylation in the clam *Mercenaria mercenaria*. *Marine Biotechnology*, 11(5), 608–618.
- Vaglio, A., Landriscina, C., 1999. Changes in liver enzyme activity in the teleost *Sparus aurata* in response to cadmium intoxication. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43(1), 111–116.
- Vergauwen, L., Hagenars, A., Blust, R., Knapen, D., 2013. Temperature dependence of long-term cadmium toxicity in the zebrafish is not explained by liver oxidative stress: Evidence from transcript expression to physiology. *Aquatic Toxicology*, 126, 52–62.
- Vergauwen, L., Knapen, D., Hagenars, A., Blust, R., 2013. Hypothermal and hyperthermal acclimation differentially modulate cadmium accumulation and toxicity in the zebrafish. *Chemosphere*, 91(4), 521–529.
- Vézina, D., Guderley, H., 1991. Anatomic and enzymatic responses of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aczdeatus*, to thermal acclimation and acclimatization. *The Journal of Experimental Zoology*, 258, 277–287.
- Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Diniz, M., 2012. Effect of temperature on oxidative stress in fish : Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological Indicators*, 23, 274–279.
- Viselina, T.N., Luk'yanova, O.N., 2000. Cadmium-induced changes in the activity of carbohydrate metabolism enzymes in mollusks. *Russian Journal of Marine Biology*, 26(4), 289–291.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S.S., Rao, K.M.K., 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(11), 1434–1443.
- Wang, N., Teletchea, F., Kestemont, P., Milla, S., Fontaine, P., 2010. Photothermal control of the reproductive cycle in temperate fishes. *Reviews in Aquaculture*, 2(4), 209–222.
- Willis, W.T., Jackman, M.R., Bizeau, M.E., Pagliassotti, M.J., Hazel, J.R., 2000. Hyperthermia impairs liver mitochondrial function *in vitro*. *American Journal*

of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 278(5), R1240–R1246.

Wu, S.M., Tsai, P.R., Yan, C.J., 2012. Maternal cadmium exposure induces mt2 and smtB mRNA expression in zebrafish (*Danio rerio*) females and their offspring. Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology, 156(1), 1–6.

Yeşilbudak, B., Erdem, C., 2014. Cadmium accumulation in gill, liver, kidney and muscle tissues of common carp, *Cyprinus carpio*, and Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 92(5), 546–550.

Zhang, Y., Li, J.-H., Liu, X.-R., Jiang, F.-L., Tian, F.-F., Liu, Y., 2011. Spectroscopic and microscopic studies on the mechanisms of mitochondrial toxicity induced by different concentrations of cadmium. The Journal of Membrane Biology, 10.1007/s00232-011-9361-y

Zirong, X., Shijun, B., 2007. Effects of waterborne Cd exposure on glutathione metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver. Ecotoxicology and Environmental Safety, 67(1), 89–94.