

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR
EVE BRILLANT
B.Sc. BIOLOGIE

EFFETS DE L'INTOXICATION AU CHLORURE DE CADMIUM CHEZ LA TRUITE
MOUCHETÉE, Salvelinus fontinalis, Mitchell

NOVEMBRE 1993



Mise en garde/Advice

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

RÉSUMÉ

La présente étude visait d'abord à caractériser la ou les protéines impliquées dans le métabolisme du cadmium lors d'une intoxication subaiguë chez la truite mouchetée, Salvelinus fontinalis, Mitchell. Trente et un jours après l'injection hebdomadaire intrapéritonéale de chlorure de cadmium, le tissu hépatique principalement, présente diverses protéines associées au cadmium. On distingue trois ordres de poids moléculaires, soit des protéines à très hauts poids moléculaires ($THPM \approx 45\ 000$) correspondant aux molécules de complexation primaire, des protéines à poids moléculaires élevés ($PME \approx 28\ 000$) pouvant être des apo-métallothionéines et des protéines à faibles poids moléculaires ($FPM \approx 15\ 000$) possiblement des métallothionéines ou des protéines similaires. On observe que le cadmium sature des sites autres que la métallothionéine ou le ligand de zinc lors d'intoxication sous-létale. Le cadmium cohabite alors avec le zinc. Lorsqu'il y a un déplacement métallique du zinc par le cadmium en situation de toxicité aigüe, le zinc se combine à d'autres particules et on constate un certain niveau de saturation du tissu hépatique en cadmium. Ceci est appuyé par les valeurs du facteur de bioconcentration.

Un deuxième objectif consistait à déterminer le niveau de contamination du cadmium et des métalloprotéines dans le tissu hépatique de la truite après un séjour de cinq mois dans les eaux du fjord du Saguenay où la concentration en métaux lourds et plus particulièrement en cadmium dépasse fréquemment la norme.

Nous avons noté un taux extrêmement faible de cadmium dans le tissu hépatique, et des valeurs plus élevées au niveau du rein et des branchies. Nous retrouvons aussi, quoiqu'en concentration plus faible, la présence des trois ordres de poids moléculaires associés au métal. Comme dans la première expérience, nous n'observons aucun effet biotique de la contamination, confirmant ainsi l'aspect chronique de cette expérience. Des aspects d'antagonisme métallique y sont discutés.

Finalement une troisième expérience visait à déterminer les caractéristiques métaboliques du tissu hépatique de la truite mouchetée dans une situation d'intoxication aiguë (dosage de CdCl₂ élevé, courte période d'exposition), plus particulièrement en relation avec les types moléculaires de métalloprotéines déjà identifiées . Nous observons ici une dominance des protéines à poids moléculaires élevés (PME) avec le cadmium prépondérant dans les protéines à très hauts poids moléculaires (THPM) .

Nous estimons ici que dans le cas d'une contamination massive au cadmium effectuée dans un très bref délai où cette même contamination dépasse la capacité de la cellule à s'acclimater au métal, la thionéine n'aurait pas suffisamment de temps pour être synthétisée avant que la cellule ne soit intoxiquée . De plus on sait que des protéines telle l'albumine sérique pourrait jouer un rôle important dans la complexation des ions métalliques et que les taux de dégradation et de resynthétisation des protéines s'effectuent rapidement .

Enfin du point de vue morphologique, on peut souligner que les cellules hépatiques présentent un réarrangement des membranes internes et que plusieurs altérations du noyau, des mitochondries et du réticulum endoplasmique rugueux, sont observables .

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier principalement mon directeur de maîtrise M. Denis Larrivée pour ses conseils judicieux et son encadrement ainsi que Mme Linda Bouchard pour sa précieuse aide technique.

Je remercie également M. Sylvain St-Gelais pour son support technique de culture en cage dans le Saguenay .

Je veux aussi remercier tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce projet .

TABLE DES MATIERES

Résumé	i
Remerciements	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux	
Liste des figures	viii
Chapitre 1: Introduction	1
Chapitre 2: Revue de la littérature	8
2.1 Métaux lourds dans l'eau	9
2.2 Effets des métaux lourds sur les poissons	11
2.3 Métallothionéine : caractéristiques et rôles	13
2.4 Cadmium, métallothionéine et salmonidés	21
Chapitre 3: Matériel et méthodes	27
3.1 Expérience 1	31
3.2 Expérience 2	34
3.3 Expérience 3	36
Chapitre 4: Résultats et discussion : Expérience 1	38
4.1 Résultats	39
4.1.1 Identification des fractions à haute teneur en cadmium	39
4.1.2 Cadmium et zinc	44
4.1.3 Analyse statistique	45
4.1.4 Toxicologie au cadmium et comportement	50
4.2 Discussion	50
4.2.1 Caractérisation des métalloprotéines	50
4.2.2 Compétition cadmium - zinc	59
4.2.3 Variation pondérale des organes et de la contamination au cadmium	63
4.2.4 Effets de la contamination sur le comportement	65

Chapitre 5: Résultats et discussion : Expérience 2	66
5.1 Résultats	67
5.1.1 Analyses élémentaires et biochimiques	67
5.1.2 Cadmium et zinc	72
5.1.3 Analyse statistique	73
5.2 Discussion	76
5.2.1 Caractérisation des métalloprotéines	76
5.2.2 Compétition cadmium - zinc	81
5.2.3 Variation pondérale des organes et de la contamination	83
Chapitre 6: Résultats et discussion : Expérience 3	85
6.1 Résultats	86
6.1.1 Identification des fractions à haute teneur en cadmium	86
6.1.2 Relation cadmium - zinc	93
6.1.3 Analyse statistique	94
6.1.4 Toxicologie au cadmium et comportement	98
6.2 Discussion	100
6.2.1 Caractérisation des métalloprotéines	100
6.2.2 Compétition cadmium - zinc	104
6.2.3 Variation pondérale des organes et de la contamination	106
6.2.4 Effet de la contamination sur le comportement	108
Chapitre 7: Changements morphologiques	109
7.1 Généralités	110
7.2 Considérations morphologiques fonctionnelles	111
7.3 Résultats	112
7.4 Discussion	121
Conclusion générale	124
Bibliographie	129
Glossaire	143

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Quelques caractéristiques de la métallothionéine comparées chez différents organismes	15
Tableau 2	Synthèse de la contamination au cadmium chez les salmonidés	22
Tableau 3	Contamination au CdCl ₂ , valeurs des moyennes de groupe	39
Tableau 4	Poids moléculaires des métalloprotéines associées aux pics de cadmium après élution du surnageant 100 000g du tissu hépatique, (moyennes de groupe)	43
Tableau 5	Présence relative du cadmium et du zinc dans le tissu hépatique (en ppm)	44
Tableau 6	Valeurs globales des tests de μ et du coefficient de Kendall, (expérience 1)	46
Tableau 7	Contamination au chlorure de cadmium et effets biotiques, (expérience 1)	47
Tableau 8	Test de régression simple dans les tissus entre témoins et expérimentaux	46
Tableau 9	Régression des diamètres cellulaires et des diamètres des noyaux ainsi que le coefficient de variation chez les témoins et les expérimentaux	49
Tableau 10	Contamination au CdCl ₂ , moyennes de groupe, Expérience 2	67
Tableau 11	Valeurs moyennes des métaux dans la colonne d'eau à St - Fulgence où ont séjourné les expérimentaux, Expérience 2	68
Tableau 12	Poids moléculaires des métalloprotéines associées aux pics de cadmium après élution du surnageant 100 000 g du tissu hépatique, Expérience 2	71
Tableau 13	Présence relative du cadmium et du zinc dans le tissu hépatique (ppm)	72

Tableau 14 En A, valeurs globales des tests de μ bilatéral et du coefficient de Kendall, et en B, Test de μ entre mâles et femelles	73
Tableau 15 Test de régression simple dans les tissus entre témoins et expérimentaux	74
Tableau 16 Contamination au chlorure de cadmium et effets biotiques en cage, Expérience 2	76
Tableau 17 Contamination au CdCl ₂ , 1 injection, 2 injections, et en solution dans l'eau, Expérience 3	87
Tableau 18 Poids moléculaire des métalloprotéines associées aux pics de cadmium après élution du surnageant 100 000g du tissu hépatique, Expérience 3	92
Tableau 19 Présence relative du cadmium et du zinc dans le tissu hépatique, (valeurs moyennes en ppm pour les 3 expériences)	93
Tableau 20 Valeurs globales des tests de μ et du coefficient de Kendall, Expérience 3	95
Tableau 21 Valeurs intragroupes des tests de μ et du coefficient de Kendall, Expérience 3	96
Tableau 22 Test de régression simple dans les tissus entre expérimentaux : 2 injections, 1 injection et exposé en solution dans l'eau	97
Tableau 23 Contamination au chlorure de cadmium et effets biotiques, Expérience 3	99
Tableau 24 Principaux changements morphologiques causés par la contamination au chlorure de cadmium (CdCl ₂)	113

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Scénario des principales voies de distribution du cadmium dans un organisme aquatique	6
Figure 2	Chromophores métal-thiolate de cystéine contenus dans Mtn - Cd	16
Figure 3	Structure proposée de la métallothionéine (Mtn)	16
Figure 4	Comparaison des types de regroupement	16
Figure 5	Séquence des acides aminés de la métallothionéine du rein du cheval	19
Figure 6	Echanges entre le cadmium et l'oxygène en solution aqueuse	19
Figure 7	Métabolisme du cadmium dans la cellule	20
Figure 8	Truite mouchetée, <u>Salvelinus fontinalis</u> , (Mitchill)	29
Figure 9	Protocole général	30
Figure 10	Site de culture en cage à St - Fulgence dans le Saguenay	35
Figure 11	Modèle de cage d'élevage de truites mouchetées utilisé au site de St-Fulgence, Saguenay	36
Figure 12	Distribution du cadmium total dans le foie, le rein et le muscle (expérience 1)	40
Figure 13	Profils d'élution des métalloprotéines extraites avec le cadmium associé aux fractions chromatographiques	41
Figure 14	Courbe standard des poids moléculaires des protéines servant de marqueurs (expérience 1)	42
Figure 15	Distribution du cadmium total dans 6 tissus : foie, rein, muscle, gonade, peau, branchie, Expérience 2	69
Figure 16	Profil d'élution des protéines extraites avec le Cd associé aux fractions chromatographiques, Expérience 2	70
Figure 17	Distribution du cadmium total dans 6 tissus : foie, rein, muscle, gonade, peau, branchie	88

Figure 18	Profil d'élution des protéines extraites du foie avec le Cd associé aux fractions chromatographiques	90
Figure 19	Réticulum endoplasmique concentrique, foie expérimental et foie témoin, Expérience 1	114
Figure 20	Déstructuration des mitochondries dans le foie expérimental, Expérience 3 et foie témoin, Expérience 1	112
Figure 21	Accumulations membranaires dans le foie expérimental, Expérience 2	118
Figure 22	Vacuolisation de l'hétérochromatine du noyau du foie expérimental, Expérience 1	118
Figure 23	Déstructuration des mitochondries dans le rein expérimental, Expérience 1	119
Figure 24	Augmentation du réticulum endoplasmique lisse dans le rein expérimental, Expérience 3	119
Figure 25	Désorganisation mitochondriale dans le muscle expérimental, Expérience 1	120
Figure 26	Réduction des organites dans le cytoplasme des gonades femelles expérimentales, Expérience 1	120

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Généralités

Le développement croissant des activités industrielles et domestiques a engendré de nombreux types de pollution. La pollution liée aux métaux lourds, particulièrement en milieu aquatique, suscite nombre d'inquiétudes tant pour la santé des populations aquatiques que sur celle des humains. Nous savons que les métaux lourds sont persistants dans l'environnement et peuvent aussi s'accumuler dans les organismes vivants et être toxiques même à de très faibles concentrations.

Plusieurs chercheurs ont étudié les effets de certains métaux lourds sur la faune aquatique (Bouquegneau, *et al.*, 1983; Bryan, 1971; Cairns, *et al.*, 1984; Frausto da Silva et Williams, 1976; Rand et Petrocelli, 1985). La plupart des informations traitant des effets des contaminants sur les organismes aquatiques sont liées aux études de mortalité (DL50) qui n'offrent qu'un indice de la réponse de l'organisme aux fortes concentrations toxiques et ne permettent pas, le plus souvent, de saisir l'état réel de la situation et sa dynamique.

Les études basées sur la contamination sous-létale et sur l'analyse des altérations morphologiques, physiologiques ou biochimiques (Cherian et Norberg, 1983; Förlin, *et al.*, 1985; Haux et Larsson, 1984; Neff, 1985; Vernberg, *et al.*, 1982; Webb, 1979b) présentent davantage de possibilités pour l'interprétation des effets des contaminants métalliques en situation réelle. Toutefois ces analyses ne sont pas assez nombreuses et ne permettent pas actuellement une interprétation exhaustive.

En toxicologie on stipule que toute molécule chimique peut devenir nocive si elle intervient pour altérer l'homéostasie du système. Les facteurs qui déterminent le potentiel toxique de cette molécule sont évidemment liés à sa nature mais aussi à sa concentration et à la durée d'exposition (Rand et Petrocelli, 1985).

L'homéostasie repose sur le maintien d'un environnement interne stable qui permet aux processus vitaux de se manifester de façon optimale.

L'homéostasie par rapport aux ions métalliques a été discuté par Frausto da

Silva et Williams (1976). Lorsque les métaux essentiels sont en concentration sous-optimale, les processus ne se manifestent pas pleinement. S'il y a excès, on se trouve à inhiber ces mêmes processus. Par exemple, lorsqu'on interfère avec l'activité enzymatique on obtient soit un déplacement d'ion métallique essentiel ou on modifie la structure moléculaire.

Les toxiques exercent principalement leurs actions en mobilisant le métabolisme d'une grande variété d'enzymes capables d'utiliser les xénobiotiques comme substrat. Le métabolisme de xénobiotique s'effectue, de façon générale, en deux étapes :

a) Un groupe réactif polaire (xénobiotique) est introduit dans la molécule, ce qui le rend plus accessible et permet à l'enzyme ciblée de jouer un rôle de ligand et/ou de transporteur.

b) Les enzymes subséquemment favorisent la conjugaison avec divers substrats tels les sucres, les acides aminés, les protéines et autres agissant comme transporteur et ligand et formant ainsi des produits solubles dans l'eau et qui peuvent être facilement excrétés.

En milieu naturel les animaux terrestres sont généralement exposés aux métaux lourds à travers leur diète ou par l'air qu'ils respirent, alors que les animaux aquatiques en plus de leur diète sont exposés aux métaux dissous et particulaires dans les milieux où ils évoluent. Comme les surfaces d'absorption en milieu aquatique sont plus grandes, conséquemment l'introduction des métaux y est de beaucoup facilitée et les quantités de métaux accumulés sont donc susceptibles d'être plus importantes.

Dans les habitats aquatiques, les effets des variables environnementales sur l'introduction des métaux lourds sont souvent considérables par rapport aux autres habitats puisque des variations de salinité, de pH, de conditions rédox et autres peuvent affecter à la fois la spéciation chimique du métal et la physiologie de l'animal (Bouquegneau, *et al.*, 1983).

Nous pouvons distinguer quatre classes d'éléments biologiques d'importance capitale; soit les éléments de structure de base : H, C, N, O, P, S; les éléments inorganiques majeurs : Na, K, Ca, Mg, Si, Cl; les éléments essentiels en trace : Co, Cr, Cu, I, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Zn, V et finalement les éléments considérés comme contaminants : As, Ag, Au, Cd, Hg, Pb. Pour ces derniers une stratégie a été développée par la cellule pour l'introduction, le transport et l'emmagasinage. Cette stratégie se traduit par l'utilisation de protéines liantes dont la capacité de complexer le métal et de le rendre plus soluble à l'eau favorisent une certaine détoxication.

Parmi les molécules susceptibles de former un complexe avec le métal, il y a les métallothionéines. Ce sont généralement des polypeptides de poids moléculaire d'environ 10 000 daltons et qui contiennent jusqu'à 7 atomes de métal par molécule (Azeez, *et al.*, 1985; Stone et Overnell, 1985; Cairns, *et al.*, 1984; Webb, 1979a). Ces polypeptides sont synthétisés suite à la présence d'ions métalliques et jouent un rôle de régulateur dans l'équilibre des ions métalliques cellulaires.

On observe deux effets majeurs caractérisant la toxicité des métaux lourds :

1) Le premier effet consiste en l'induction ou la modification des métalloenzymes (intracellulaires ou membranaires) qui sont impliquées dans la biosynthèse ou qui interviennent dans la mobilisation de l'énergie. D'autres métalloprotéines telles les métallothionéines seront synthétisées et seront impliquées dans la régulation homéostasique des métaux.

2) En deuxième lieu le ligand spécifique au noyau métallique de l'enzyme perdra son affinité et l'activité enzymatique en sera modifiée. Même une modification partielle des mécanismes enzymatiques, réduira la capacité d'adaptation enzymatique et conséquemment l'acclimatation de l'animal à des stress environnementaux.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la contamination naturelle et expérimentale de la truite mouchetée par les métaux lourds, Salvelinus

fontinalis, Mitchill. Nous avons choisi comme toxique métallique le cadmium, à cause de ses propriétés, et parce qu'il nous permet l'observation d'une réponse à des concentrations relativement faibles.

Le cadmium est un métal relativement rare mais présent dans la plupart des minéraux de zinc, un élément avec qui il partage certaines caractéristiques. On le trouve habituellement sous forme ionique et il est toxique pour la majorité des organismes. Le cadmium est facilement absorbé par le tractus gastro-intestinal et tend à être persistant puisqu'il s'accumule dans les organes, surtout dans le foie et le rein.

Nous présentons dans la figure 1, un scénario des principales voies de distribution du cadmium dans un organisme aquatique en situation naturelle et en situation expérimentale sur lequel nous nous sommes basés pour notre expérimentation.

Peu d'expériences de contamination expérimentale par les métaux lourds ont été effectuées sur la truite mouchetée et particulièrement en eau salée, où les caractéristiques de transport transmembranaire sont susceptibles de différer de celles en eaux douces.

Nous avons procédé à trois expériences visant à caractériser l'adaptation de la truite mouchetée au cadmium en eau salée :

- 1) Une première expérience de toxicité subaigüe visait à générer la synthèse de métalloprotéines (métallothionéine entre autres) spécifiques suivant l'injection intrapéritonéale de chlorure de cadmium et à caractériser ces molécules.
- 2) Une deuxième expérience de toxicité chronique touchait à la détermination des concentrations en cadmium dans divers tissus de la truite mouchetée ayant séjournée en cage dans le Saguenay et cherchait à identifier la présence de métalloprotéines et à les caractériser.
- 3) Une troisième expérience (DL50) tentait de suivre la cinétique du contaminant ainsi que la réponse physiologique du tissu hépatique dans le contexte d'une expérience à forte dose de cadmium.

Toxicité naturelle

Toxicité expérimentale

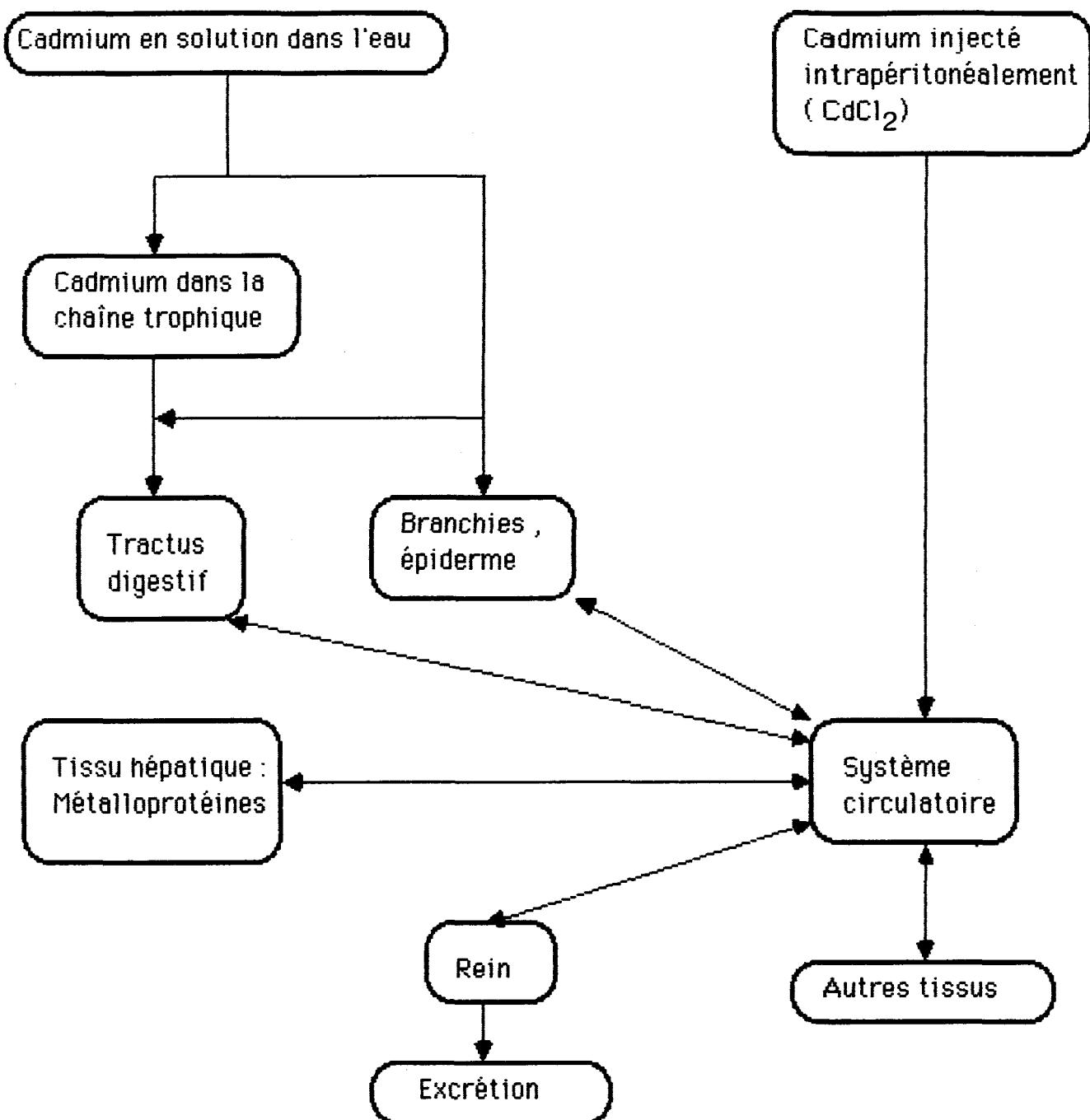


Figure 1. Scénario des principales voies de distribution dans un organisme aquatique (Modifié d'après Larrivée, 1991)

En utilisant la métallothionéine comme facteur de réponse de détoxicification, nous envisagions de suivre de façon plus sensible l'évolution des effets de la contamination au cadmium tant sur le terrain qu'en laboratoire. En effet le cadmium possède une grande affinité pour la métallothionéine. Celle-ci étant engagée dans la régulation (tri et débordement) des ions métalliques, on peut penser qu'elle est aussi impliquée dans l'établissement d'un nouvel équilibre (homéostasie).

De plus Loring, *et al.*, 1983, ont montré qu'au site de St-Fulgence, où se faisait l'élevage en cages des truites, le cadmium présente des valeurs de 3 à 6 fois plus élevées que les valeurs trouvées en mer soit de $0,14 \mu\text{g l}^{-1}$ en surface, $0,11 \mu\text{g l}^{-1}$ en profondeur intermédiaire et $0,13 \mu\text{g l}^{-1}$ au fond et que selon Freeman et Sangalang (1976), une concentration de 1 ng l^{-1} de cadmium dans l'eau suffit à altérer le métabolisme hormonal et à nuire à la reproduction de l'omble de fontaine.

1.2 Objectifs

Les objectifs de cette étude ont été de :

- 1) Générer expérimentalement dans le tissu hépatique chez la truite mouchetée, Salvelinus fontinalis, Mitchell, la synthèse de métalloprotéines en utilisant des doses subaigües de chlorure de cadmium et de tenter de caractériser ces protéines.
- 2) Déterminer la concentration du cadmium dans divers tissus de la truite mouchetée élevée en cage dans le Saguenay au niveau de St-Fulgence où la concentration en métaux lourds est supérieure au bruit de fond naturel, et de vérifier la teneur en métalloprotéine du tissu hépatique.
- 3) Tester les réactions cellulaires et tissulaires liées aux toxicités aigües et subaigües causées par le chlorure de cadmium et étudier spécialement en situation de dose aigüe la cinétique de la synthèse de métalloprotéines, plus spécifiquement en ce qui regarde le déplacement du zinc et la bioconcentration.

CHAPITRE II

REVUE DE LA LITTÉRATURE

2-1 Les métaux lourds dans l'eau

La contamination des eaux par les métaux lourds se fait principalement par les éléments suivant : le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le plomb (Pb) et le mercure (Hg) . En réaction, le cadmium, peut perdre jusqu'à 2 électrons pour former un cation . Ceci se manifeste par une augmentation de l'énergie d'ionisation . De par son rayon ionique et d'un plus grand nombre d'électrons disponibles, les ions métalliques Cd+2 sont caractérisés par une forte polarité . L'effet de polarisation des composés de cadmium et particulièrement avec les ligands polarisables entraîne le passage de la liaison ionique à une liaison à caractère plus covalent (Aylett, 1979) .

En solution le cadmium a tendance à former facilement des hydroxydes (Cd-OH ou $[Cd(H_2O)_6]^{2+}$) puisqu'il est électropositif et qu'il réagit avec les ions hydrogène et oxygène . L'eau permet sa solubilité à cause de sa facilité à faire des liens hydrogènes avec les groupes hydroxyles (Mahan, 1967; Aylett, 1979). De par leur caractère polaire, ces molécules sont donc plus solubles dans l'eau . Ainsi le cadmium devient-il plus biodisponible et plus sujet à la bioaccumulation .

Depuis qu'il a été démontré que les métaux lourds peuvent être toxiques pour les organismes aquatiques, leur présence est généralement considérée comme indésirable . A titre d'exemple, le cadmium se concentre dans la chaîne alimentaire et son temps de résidence dans un organisme peut être relativement long soit de 204 jours chez la pie, voire à plusieurs années chez les mammifères .

L'ion Cd+2 réagit fortement avec de nombreuses molécules organiques telles les protéines, phospholipides, purines , porphyrines , acides nucléiques et enzymes (Aylett, 1979) . En plus d'effectuer des liens covalents, le cadmium possède une grande affinité pour les groupes sulphydryles (thiol déprotonaté) . A l'aide de ses propriétés il accroît sa solubilité lipidique, sa bioaccumulation, et favorise la toxicité envers les tissus cibles. Il s'accumule surtout dans le foie et le rein en se liant aux résidus de cystéine des protéines et plus particulièrement des métalloprotéines .

Le métabolisme du cadmium est proche de celui du zinc qu'il déplace aisément dans les enzymes impliquées dans les réactions vitales (Moore et Ramamoorthy, 1984).

La majorité des expériences de contamination au cadmium ont été réalisées avec un complexe halide : CdCl₂, dont la solubilité est d'environ 7,7 moles l⁻¹ à 20 °C ou 140g/100g H₂O avec une stabilité modérée (Cotton et Wilkinson, 1980; Seiler, *et al.*, 1988). En eau salée 90 % du cadmium est sous forme de chlorure et la combinaison CdCl₂ comprend 50 % de ces composés.

Certains métaux tels le cuivre et le zinc jouent, en petite concentration un rôle essentiel dans le métabolisme des tissus. Par contre des métaux non-essentiels comme le cadmium et le mercure, à faible concentration, peuvent interférer avec le métabolisme des métaux essentiels et tout particulièrement en les déplaçant. Il semble que les ions métalliques non complexés soient mieux assimilés par les organismes que les formes complexées. Par rapport à d'autres éléments inorganiques (tels Zn, Cu, Fe, Se, Ca, Mn) le cadmium interfère en compétitionnant pour les sites de liaison et cause une déficience d'éléments essentiels. Cette interférence peut se manifester au niveau du site d'absorption de la membrane, dans le transport transmembranaire ou encore dans la cellule elle-même (Webb, 1979a).

Il existe trois mécanismes différents en milieu aquatique pour l'entrée du cadmium dans les organes; soit par diffusion, par adsorption ou encore par transport actif ou facilité :

1- La diffusion : La plupart des toxiques xénobiotiques pénètrent à travers les membranes (épithélium de la bouche et du tractus digestif) par diffusion passive. Ce type de transport ne requiert aucune dépense d'énergie de l'organisme.

Selon la loi de Fick, la force d'entrée dans les membranes est directement proportionnelle à la différence entre les concentrations de part et d'autre de la membrane ($F = KC$).

2- L'adsorption : Il s'agit d'un processus par lequel la membrane attire et retient les atomes ou molécules qui viennent en contact avec elle .

L'adsorption affecte les fonctions de l'épithélium mais ne contribue pas directement à la toxicité interne de l'animal (Spacie et Hamelink, 1985) .

3- Le transport actif ou facilité : Dans ce type de transport, le métal forme un complexe réversible avec une molécule de transport (transporteur).

Si nous nous référons au processus biologique, la voie commune passe par la complexation avec un récepteur entraînant la migration de transporteur . Il faut donc noter que ce processus peut être complexe .

Le cadmium utilise préférablement les voies d'entrée suivantes (Coombs, 1979) :

- soit le système membranaire $\text{Na}^+ \text{K}^+$ _ dépendant
- soit l'association avec les phospholipides
- soit l'endocytose .

Selon Sprague (1985) certains facteurs modifient la toxicité du contaminant surtout s'ils impliquent un changement dans la forme chimique ayant pour effet de faciliter ou diminuer la biodisponibilité .

Ainsi les caractéristiques du milieu telles la température, la concentration en hydrogène (pH), l'oxygène dissout, la salinité peuvent affecter la toxicité chez les organismes aquatiques .

Même les caractéristiques propres des organismes tels l'espèce, la taille des individus, leur stade de développement, leur état nutritionnel et de santé, la constitution interne de l'organisme et le sexe influencent significativement la toxicité du contaminant .

2-2 Les effets des métaux lourds sur les poissons

Les organismes aquatiques sont généralement extrêmement vulnérables face aux effets toxiques résultant de l'absorption par voie orale, puisque

l'eau est un solvant polaire très efficace pour plusieurs composés chimiques (Mehrle et Mayer, 1985).

Les effets décelés des métaux lourds sur la faune aquatique se révèlent être surtout de nature physiologique ou biochimique. Les comportements modifiés par ces métaux se présentent lors de toxicité aigüe et le plus souvent en situation expérimentale.

Actuellement nous ne disposons pas de test standard pour évaluer les effets comportementaux de la toxicité en milieu aquatique (Rand, 1985).

Chez le méné (Phoxinus sp.) le cadmium cause une scoliose de la colonne (Bengtsson, *et al.*, 1976). Selon Benoit, *et al.* (1976) la truite mouchetée présente une hyperactivité huit semaines après le début des tests et des déformations après trois générations. Chez la truite arc-en-ciel on note des pertes d'appétit qui revient graduellement à la normale (Leland et Kuwabara, 1985). Pour la plie, le cadmium semble provoquer une hypersensibilité, des mouvements natatoires non coordonnés, la perte d'équilibre, une léthargie et un déséquilibre ionique (Larsson, *et al.*, 1981).

Förlin, *et al.* (1985) ont analysé l'entrée du cadmium par injection intrapéritonéale ou en solution dans l'eau chez la truite arc-en ciel. Ils observent diverses réactions touchant directement le métabolisme de l'organisme soit : une augmentation du nombre de vacuoles, l'altération des mitochondries, une augmentation du nombre d'inclusions, une intensification de l'activité des lysosomes, l'hypertrophie du complexe de Golgi, un détachement des ribosomes, une dilatation du réticulum endoplasmique rugueux ainsi qu'une altération de l'efficacité des enzymes du foie et du rein.

Sangalang et O'Halloran (1973) ont constaté l'effet adverse du cadmium sur les testicules de la truite mouchetée. Larsson et Haux (1982) avancent que des doses sous-létales de cadmium altèrent le métabolisme des sucres.

Suite à une exposition au cadmium, Olsson et Haux (1985) rapportent une altération du foie chez la perchaude; Azeez, *et al.* (1985) y observent la néphrotoxicité.

Chez les espèces aquatiques, de façon générale, on remarque des dommages aux membranes respiratoires. De plus, la toxicité par des sels de métaux lourds chez les poissons conduit à une asphyxie provoquée par la réaction des ions métalliques avec les constituants du mucus secrété par les branchies (Leland et Kuwabara, 1985).

Le cadmium interfère donc avec un ensemble de composantes et de processus cellulaires. L'effet toxique est obtenu lorsque l'interférence bloque à un certain niveau les processus (Samarawickrama, 1979). Ceci signifie que la toxicité est proportionnelle à la quantité de complexes (ion métallique-substrat : enzymes, protéines etc.) formés au cours de la contamination; qu'elle dépend des concentrations de l'ion métallique en fonction de la disponibilité des sites récepteurs (enzymes, protéines) et que l'intensité des réactions amène des conditions variables dans les réponses toxicologiques. En se rapprochant des concentrations critiques, il se produit un affaiblissement des fonctions cellulaires allant même jusqu'à la mort des cellules et / ou de l'organisme. Cette concentration critique dans un organe cible représente le point déterminant la survie ou le développement de pathologie chez l'animal en partant de la dose provoquant l'accumulation du contaminant jusqu'à l'effet d'intoxication chez un individu contaminé. Ainsi l'effet adverse ou l'interférence désigne un changement biologique significatif causé par une exposition donnée à un toxique.

2-3 La métallothionéine : Caractéristiques et rôles

Les organismes sont capables de s'acclimater à certains contaminants en deçà d'un seuil de concentration sur une certaine période de temps. Selon le type de contaminant, l'animal devient soit plus tolérant soit plus vulnérable dépendant du mode d'action du toxique et des mécanismes de détoxication propres à l'animal (Sprague, 1985).

Les poissons présentent un certain degré de tolérance suite à une exposition aux métaux lourds. Les mécanismes de tolérance aux métaux lourds se classent en deux catégories :

- 1- l'exclusion cellulaire;

2- les modifications intracellulaires .

L'exclusion cellulaire caractérise d'avantage les algues et les plantes aquatiques . L'induction des modifications intracellulaires semble mieux représenter les poissons et se rattache aux trois mécanismes de détoxication suivant :

- 1- l'oxydation, la réduction ou l'hydrolyse du métal en produit plus soluble et plus acide .
- 2- l'incorporation du métal dans des macromolécules à forte affinité métallique telle la métallothionéine .
- 3- la séquestration du toxique dans des tissus ou des organelles qui en rendent l'accès difficile aux tissus plus vulnérables (Leland et Kuwabara, 1985).

Nous retenons ici le mécanisme d'incorporation du métal dans des macromolécules à fortes affinité pour les métaux, par exemple la métallothionéine, car elle présente des caractéristiques physiologiques et biochimiques spécifiques dans la défense de l'organisme contre les toxiques inorganiques .

L'acquisition de la tolérance aux métaux lourds peut résulter en une augmentation de la synthèse de la métallothionéine, plus particulièrement lorsqu'il y a exposition aux métaux divalents comme le cadmium, le mercure, le cuivre et le zinc .

Les caractéristiques physico-chimiques de la métallothionéine sont décrites ci-bas :

- Il s'agit d'une protéine de faible poids moléculaire : 6 500 à 11 000 daltons dépendant des systèmes et des types d'analyse (Hunziker et Kägi, 1984) .
- Cette protéine contient environ 30% de résidus cystéiniques et possède une grande affinité à une grande quantité de métaux divalents (Cu, Zn, Hg, Cd, Pb) .
- Elle ne contient aucun acide aminé aromatique ni de lien disulphide .
- Cette protéine est aussi capable de lier 7 cations métalliques; ces cations sont liés aux groupes thiols ou sulphydrylés en proportion de 3 thiolates pour 1 ion de métal (figures 2 et 3) . Il s'agit ici d'une moyenne globale .

- De plus ,elle présente une structure tétraédrique (Weser et Rupp, 1979) (figure 3).
- Elle est thermostable .
- On signale sa présence comme protéine intracellulaire et son absence dans le liquide extracellulaire .
- Sa localisation se situe dans le cytoplasme et dans le noyau (Cherian et Goyer, 1978; Engel et Roesijadi, 1987) .
- Comme caractéristique spectrale ,elle possède un pic d'absorption maximale autour de 250 nm (Aylett, 1979) .

Cette protéine se retrouve généralement emmagasinée comme constituant soluble dans le cytoplasme des cellules hépatiques et rénales; et en proportion plus faible dans d'autres tissus tel le muscle (Leland et Kuwabara, 1985) .

Si nous comparons quelques propriétés de la métallothionéine (Mtn) des mammifères et des poissons, nous pouvons présenter le tableau suivant (tableau 1):

TABLEAU 1. Quelques caractéristiques de la métallothionéine comparées chez les mammifères et les poissons

Caractéristiques	Mtn Mammifères	Mtn Poissons
- % de cystéine	< 25	> 30
- Isomère	2	1, 2 ou 3 en fonction des espèces ou du procédé d'extraction
- Contenu en Cu, Zn	faible	élevé
- Protéine spécifique pour les métaux	stable	variable
(Klaverkamp, <i>et al.</i> , 1984)		
Mtn = metallothionein		

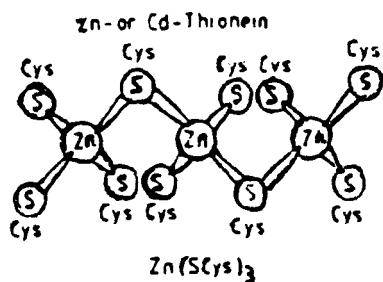


FIGURE 2. Chromophores métal-thiolate de cystéine contenus dans la Mtn-Cd (Weser et Rupp, 1979).

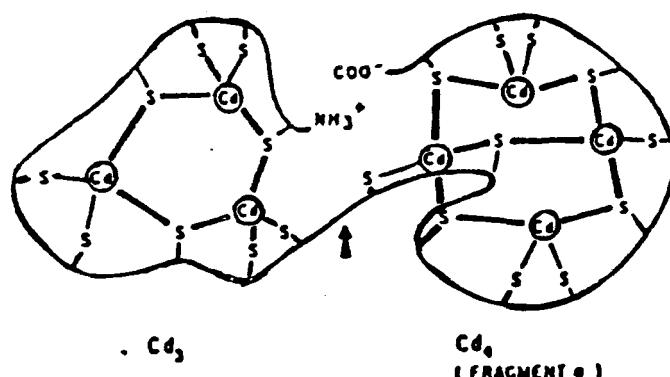


FIGURE 3. Structure proposée de la métallothionéine (Mtn) (Hunziker et Kägi, 1984).

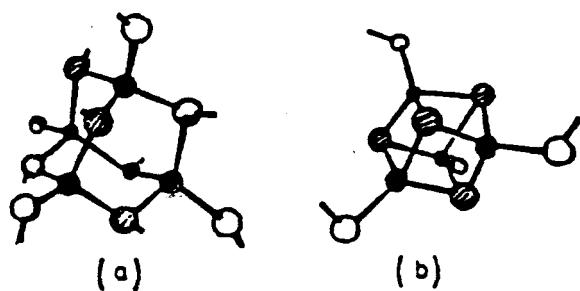


FIGURE 4. Comparaison des types de regroupement
 a) métal-thiolate et b) métal-souffre
 cercle plein = métal; cercle vide = soufre terminal du ligand;
 cercle rayé = pont soufre vs ligand
 (Hunziker et Kägi, 1984).

Autres que les caractéristiques physico-chimiques, la métallothionéine présente aussi des fonctions biologiques que voici :

- 1- Tout d'abord les cellules hépatiques et rénales accumulent progressivement l'ion Cd+2. Elles assurent ensuite une protection contre le toxique en permettant à l'ion cadmium Cd+2 de prendre dans les métalloprotéines la place de l'ion zinc Zn+2 qui est moins toxique.
- 2- Comme l'activité de la métallothionéine est liée à son potentiel rédox, elle sert dans l'absorption, le transport et la régulation du métabolisme du zinc. Le nombre de résidus cystéiniques prévient l'oxydation et conserve ainsi le potentiel rédox. Ainsi, la synthèse de la métallothionéine (Mtn) dans le foie, contrôle l'entrée et l'accumulation des réserves de zinc et dans la muqueuse intestinale, la Mtn a la fonction de se lier au zinc et régularise ainsi le transport du métal dans le sang (Webb, 1979a).

Lorsque les toxiques inorganiques se complexifient avec la métallothionéine, il en résulte habituellement une réduction de toxicité en ce sens que l'ion métallique n'est pas accessible ailleurs. Il est donc bloqué à un endroit en étant complexé, en conséquence toute augmentation de la thionéine n'influencerait pas la toxicité du cadmium (Webb, 1979a). Ainsi la métallothionéine jouerait un rôle de détoxication et de protection contre les toxiques inorganiques. Ce n'est cependant pas son seul rôle. Elle est fondamentalement impliquée dans le rôle de métabolisme et de régulation des métaux essentiels. Elle intervient dans le transport et le stockage des métaux et elle possède en plus la capacité de réponse immunitaire (Cherian et Goyer, 1978).

On pourrait présenter la coordination des ions métalliques versus les sites donneurs dans une situation de contamination comme suit:

- 1- On suggère que les cations du Cd+2 ou Zn+2, s'associent à la molécule de Mtn et y sont rattachés via les groupes thiols (sulphydryles) (figures 2 et 3). Ceci est représenté par l'association de 3 groupes SH- (moyenne globale) pour chaque ion métallique impliqué et les acides aminés de base sont combinés au métal via leur site donneur N. Donc l'abondance des résidus de cystéine et leur arrangement dans des séquences de polypeptides (figure 5,

Cys-X-Cys et Cys-X-Y-Cys), prédisposent la Mtn à se lier aux métaux . Les métaux sont liés à la protéine du côté de la chaîne où le zinc joue un rôle actif dans l'insertion du cadmium; c'est-à-dire où la cystéine est déprotonatée à travers les liens thiolates (mercaptides) (Hunziker et Kägi, 1984) .

2- De plus, il se produit un échange rapide entre le Cd+2 et le donneur et par ce fait cette réaction se trouve favorisée .

3- Dans ce processus ,on considère qu'il existe aussi un échange avec l'oxygène protéinique en solution aqueuse (figure 6) .

Du point de vue de l'adaptation cellulaire ,on peut distinguer deux types de processus concernant la gestion des métaux toxiques (Cherian et Nordberg, 1983; Banerjee, *et al.*, 1982) :

1-Un processus cytoplasmique impliquant une protéine spécifique (une ou plusieurs métalloprotéines) . Ce processus se reflète par des changements lysosomiques .

2- Un processus nucléaire où les métaux se lient aux protéines nucléaires (non-histoniques) . Il y a ici formation d'inclusions ou d'agglomérats .

On a même comparé la réponse de la métallothionéine aux métaux lourds à la réponse immunitaire de synthèse d'anticorps (Azeez, *et al.*, 1985 ; Petering et Fowler, 1986) . Ceux-ci ont tenté une interprétation du métabolisme et de la toxicité du cadmium dont voici le résumé schématique (figure 7) :

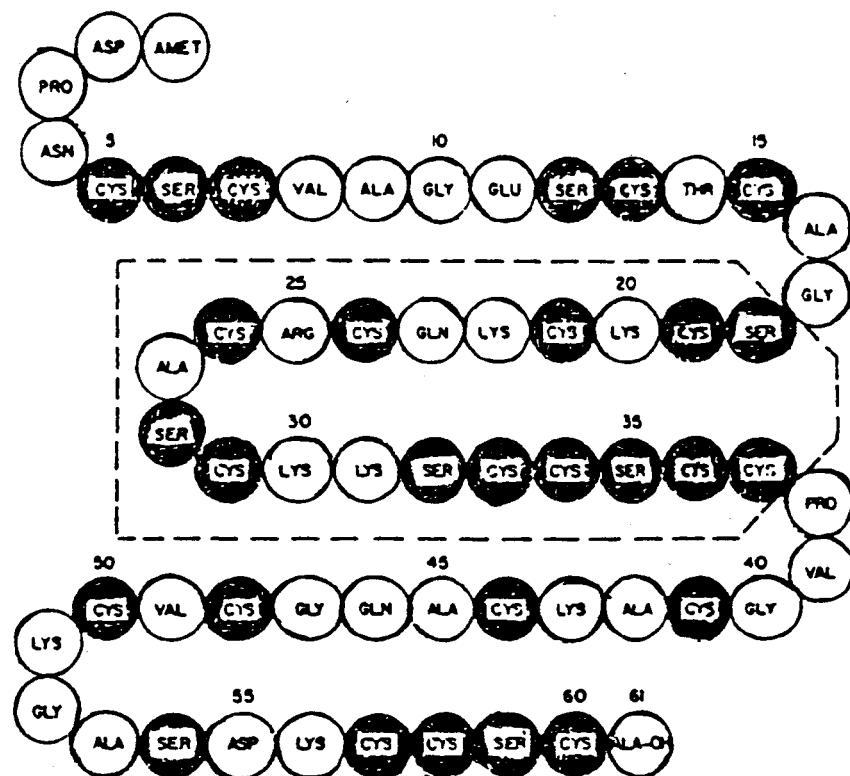


FIGURE 5. Séquence d'acides aminés de la métallothionéine du rein du cheval (Webb, 1979b).

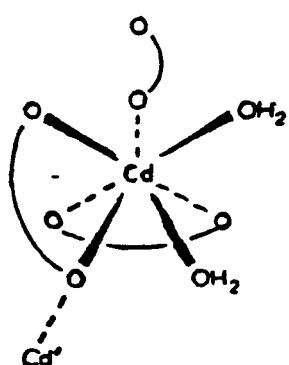


FIGURE 6. Echange entre le cadmium et l'oxygène en solution aqueuse (Aylett, 1979).

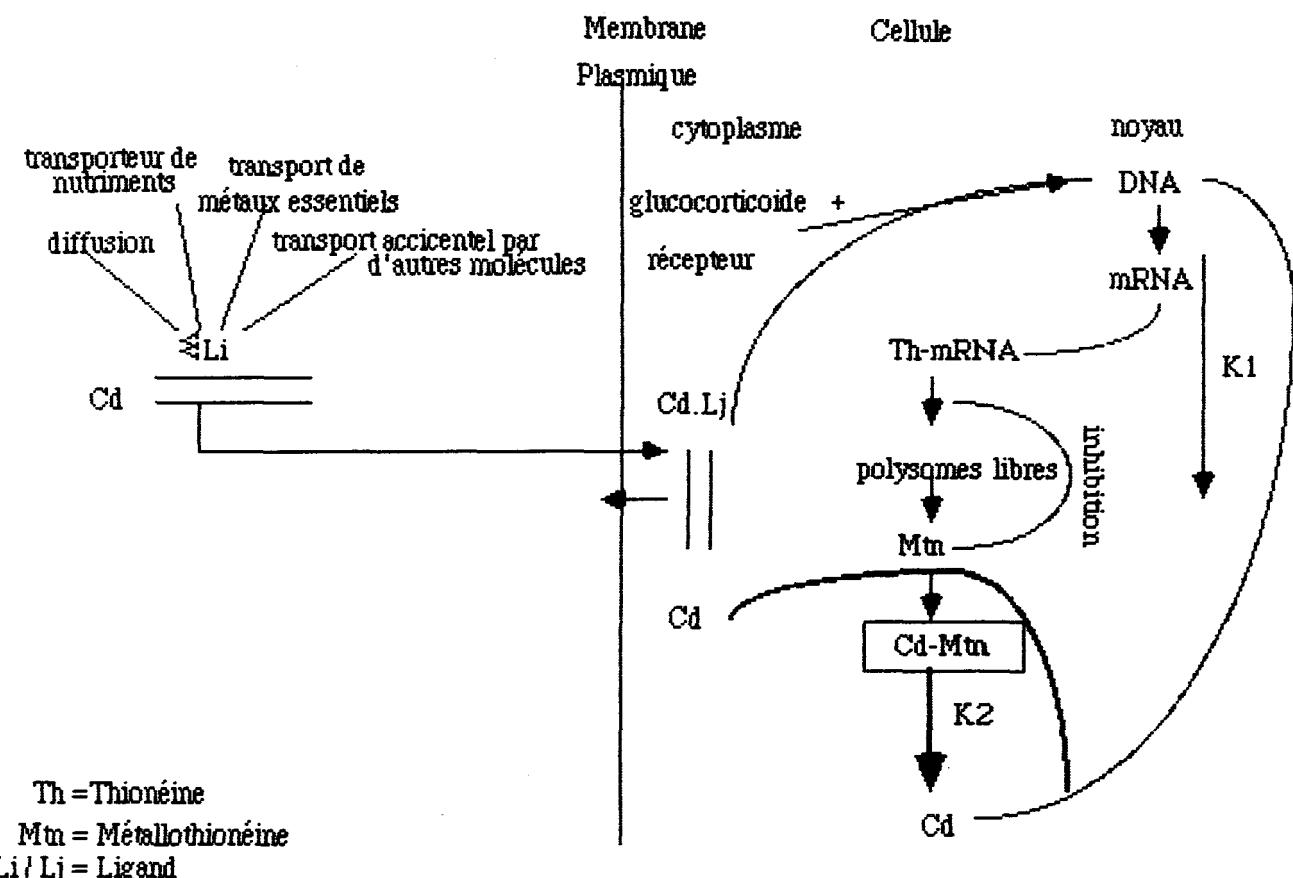


Figure 7. Métabolisme du cadmium dans la cellule :

$K2 [Cd-Mtn] > K1 [Cd + Mtn]$. (Modifié d'après Petering et Fowler, 1986 et Azeez, *et al.*, 1985).

En premier lieu, hors de la cellule ou de l'organisme, le métal toxique interagit par chélation pour former un complexe métal-ligand (Cd-Li). Le métal doit ensuite être diffusé ou transporté dans la cellule cible et se distribue selon les sites disponibles. Le métal réagit avec les différents constituants cellulaires (enzymes, protéines, organelles, etc.) ayant une affinité envers les métaux.

Le métal induit ensuite la synthèse de thionéine m-RNA, laquelle conduit à la synthèse de la Mtn. Lorsque la protéine se dégrade, le cadmium est libéré et il réinduit la synthèse de la Mtn.

Apparemment il y aurait deux conditions permettant au cadmium d'être toxique : c'est -à-dire (1) avant, l'induction initiale de la Mtn lorsque le cadmium est complexé (Cd-Li), ceci semble perturber une certaine quantité de processus biochimiques et (2) lorsqu'il y a un surplus de cadmium accumulé dans la cellule ($K_2 > K_1$) et qu'il est lié à la Mtn précisément au moment où le taux de biodégradation et de libération du Cd de la protéine excède le taux de synthèse (K_1) de la Mtn et des complexes similaires, qui ont pour but de protéger la cellule.

Ce modèle s'applique seulement dans le cas où les tissus comme le foie et le rein peuvent accumuler suffisamment de cadmium (toxicité aigüe). Pour les cas de toxicité chronique ou de contamination à faible concentration son utilisation est à reconsidérer ou à modifier car les Mtn-similaires liées au cadmium semblent être plus abondantes que les Mtn, même s'il y a peu de métal entrant dans le tissu et que le seuil d'induction de la Mtn n'est pas atteint. Ceci correspond tout particulièrement aux organismes non-mammaliens.

2-4 Le cadmium, la métallothionéine et les salmonidés

Ici nous présentons en un tableau récapitulatif (tableau 2, ci-dessous), les travaux effectués sur les salmonidés contaminés soit expérimentalement par injection de cadmium, soit par exposition au cadmium ou à un mélange de toxiques en milieu naturel.

Tableau 2. Synthèse de la contamination au cadmium chez les salmonidés

Espèces	Toxiques	Types d'expérience	Thèmes	Chercheurs
<u>Salvelinus fontinalis</u>	Cd	Test létal en eau douce	Testicules	Sangalang et O'Halloran, 1973
Truites sp.	---	---	Ultrastructure du rein	Bettina et Loewen, 1975
<u>Salvelinus fontinalis</u>	Cd	Test sous-létal	Foie, rein, etc 3 générations	Benoit, <i>et al.</i> , 1976
<u>Salmo gairdneri</u>	Cd	Test létal	Plasma sanguin	Roch et Maly, 1979
<u>Salmo gairdneri</u>	Cd	Injection létale	Mtn: 6 700	Beattie et Pascoe, 1979
<u>Salmo gairdneri</u>	---	---	Ultrastructure du foie	Chapman, 1981
<u>Salmo gairdneri</u>	Cd	Test létal, eau saumâtre	Hydrate de C	Larsson et Haux, 1982
<u>Salmo gairdneri</u>	Cd-Cu	Milieu naturel	Mtn, indicateur de pollution, P.M.	Roch, <i>et al.</i> , 1982
<u>Salmo gairdneri</u>	Cd	Test sous-létal, en eau douce	Foie, rein, sang glycogène	Haux et Larsson, 1984
<u>Salmo gairdneri</u>	Cd	Injection intrapéritonéale	Foie, rein, branchie	Thomas, <i>et al.</i> , 1983

Espèces	Toxiques	Types d'expérience	Thèmes	Chercheurs
<u>Salmo</u> <u>gairdneri</u>	Cd	Eau douce en laboratoire	2 types de Mtn	Thomas, <i>et al.</i> , 1983
<u>Salmo</u> <u>gairdneri</u>	Zn,Cd Hg,Cu	Létale 7 jours	Mtn: 10 000	Haux , <i>et al.</i> , 1984
<u>Salmo</u> <u>gairdneri</u>	Zn,Cu Cd	Létale	Ratio,toxicité additive	Roch et McCarter, 1984 a
<u>Salmo</u> <u>gairdneri</u>	Zn,Cu Cd	Milieu naturel	Mtn du foie	Roch et McCarter, 1984 b
<u>Onchorynchus</u> <u>tshawytscha</u>	Cu, Zn,Cd	Milieu naturel, en cages	Mtn-hépatique	Roch et McCarter, 1984 c
<u>Salmo</u> <u>gairdneri</u>	Cd	Létale en eau douce	Inhibition d'enzymes	Förlin, <i>et al.</i> , 1985
<u>Salmo</u> <u>gairdneri</u>	Cd	Injections	P-450,foie	Förlin et Anderson, 1985
<u>Salmo</u> <u>gairdneri</u>	Cd,Zn	Létale en eau douce	Iso - Mtn (2)	Thomas, <i>et al.</i> , 1985
<u>Salmo</u> <u>gairdneri</u>	Zn,Cu Cd	Milieu naturel	Corrélation - Mtn,truitelle	Roch et McCarter, 1986
<u>Salmo</u> <u>gairdneri</u>	Cd,Pb	Létale,15 et 30 jours (orale)	Rein,foie,rate	Crespo, <i>et al.</i> , 1986

Espèces	Toxiques	Types d'expérience	Thèmes	Chercheurs
<u>Salvelinus</u> <u>fontinalis</u>	Cd	Létale en eau douce	Conflit de novo synthesis, indicateur de stress	Hamilton, <i>et al.</i> , 1987 a
<u>Salvelinus</u> <u>fontinalis</u>	Cd	Test de 30 jours	Mesure de Mtn	Hamilton, <i>et al.</i> , 1987 b
<u>Salmo</u> <u>gairdneri</u>	Cd, La+3	Test létal 16 h.	Inhibition Ca+2 transport Cd et Ca via La+3 dans les branchies	Verbost, <i>et al.</i> , 1987

Toutes ces expériences visent à mieux connaître le fonctionnement et la capacité des organes vitaux impliqués tels le foie et le rein.

Il apparaît tout d'abord qu'une métallothionéine ou une protéine équivalente intervient par affinité pour le toxique afin de maintenir la balance ionique et régulariser la quantité de métal. Il semble aussi que cette métallothionéine soit aussi considérée comme un indicateur de pollution autant en habitat naturel qu'en laboratoire.

Nous tirons de ce tableau que la majorité des tests utilisés portent sur des études de mortalité (DL50) sur de courtes périodes et sont généralement effectués en eau douce. On préfère donc utiliser une intoxication sévère afin d'obtenir une réponse rapide. L'interprétation de ces auteurs reste incomplète car le plus souvent elle s'éloigne de la situation réelle des mécanismes employés par l'animal. Par conséquent il est souvent nécessaire d'extrapoler aux espèces aquatiques les résultats obtenus à partir des mammifères terrestres. Toutefois on commence à obtenir des résultats pour différentes espèces aquatiques. D'autre part ces recherches confirment aussi le manque de connaissance au niveau de la cinétique du cadmium. Même dans la littérature on constate qu'il existe un conflit avec la "spill hypothesis". Ceci implique que le test de toxicité aigüe (létale) ne

permet pas d'obtenir une réponse claire sur les mécanismes cellulaires et tissulaires .

D'ailleurs dans le tableau 2 on ne relève que peu d'analyses ultrastructurales qui permettraient une meilleure visualisation de la dynamique cellulaire . Kawahara, *et al.* (1974) suggèrent que le cadmium se répartit autant dans le noyau que dans le cytoplasme . Le cadmium et le zinc se retrouvent liés dans les réactions et on peut les détecter dans les lysosomes du foie et du rein .

Pour d'autres espèces que les salmonidés, on retrouve des phénomènes similaires . Pour Viarengo, *et al.* (1989) la métallothionéine riche en cuivre est insoluble dans les lysosomes de l'hépatopancréas de la moule . Lorsque la solubilité augmente, la toxicité augmente parallèlement . Ceci serait également valable pour le cadmium .

Georges, 1982, précise aussi que pour la faune aquatique la plupart des métaux lourds accumulés dans les tissus se retrouvent dans le noyau, les mitochondries et les lysosomes .

Chez les mollusques bivalves on observe que suite à une exposition de 100 ppb de cadmium radioactif, 93% du cadmium total accumulé dans le sang se situe dans le plasma et seulement 7% dans les hémocytes . Ce qui suggère que le plasma est le principal vecteur du métal (Robinson et Ryan, 1988) tout comme dans l'expérience de Roch et Maly ,1979 .

Finalement ,pour évaluer la toxicité, le critère le plus utilisé se réfère au mode d'action du polluant . Cependant il n'est pas toujours facile de faire l'adéquation entre le taux de survie de l'animal et l'altération des processus biochimiques et physiologiques . Lors d'évaluation d'une substance toxique, le comportement moléculaire (spéciation) serait une référence importante pour bien saisir les effets produits par des composés chimiques . Il est toutefois difficile de bien comprendre ce comportement moléculaire (Rand, 1985) mais une meilleure connaissance des composantes cellulaires et de leur évolution dans le temps en situation de contamination permettrait de

mieux saisir les mécanismes impliqués dans la toxicologie liée aux métaux lourds .

CHAPITRE III

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pour répondre aux objectifs de l'étude nous avons utilisé la truite mouchetée, Salvelinus fontinalis, Mitchell (figure 8). Les truites employées pour fins expérimentales, provenaient de deux piscicultures soit celle de A. Duguay à St-Fulgence et celle d'Aquaculture Saguenay Manicouagan à ville de La Baie. Un total d'environ 200 truites de 30 cm de longueur en moyenne ont servi à effectuer trois expériences. Un protocole général (figure 9) souligne les conditions d'échantillonnage et d'analyse pour les expériences présentées ci-bas.

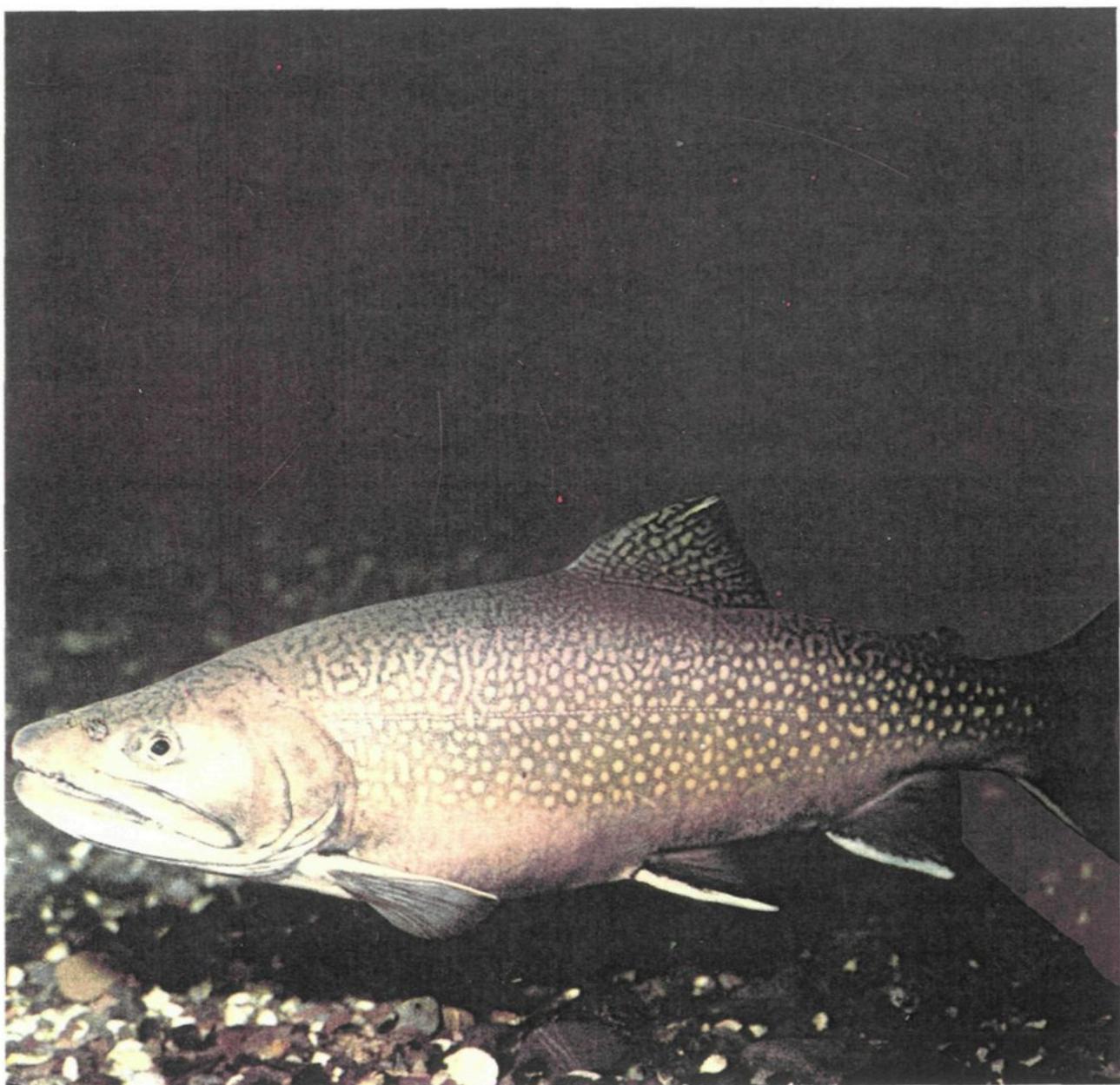


Figure 8. Truite mouchetée, Salvelinus fontinalis, Mitchell

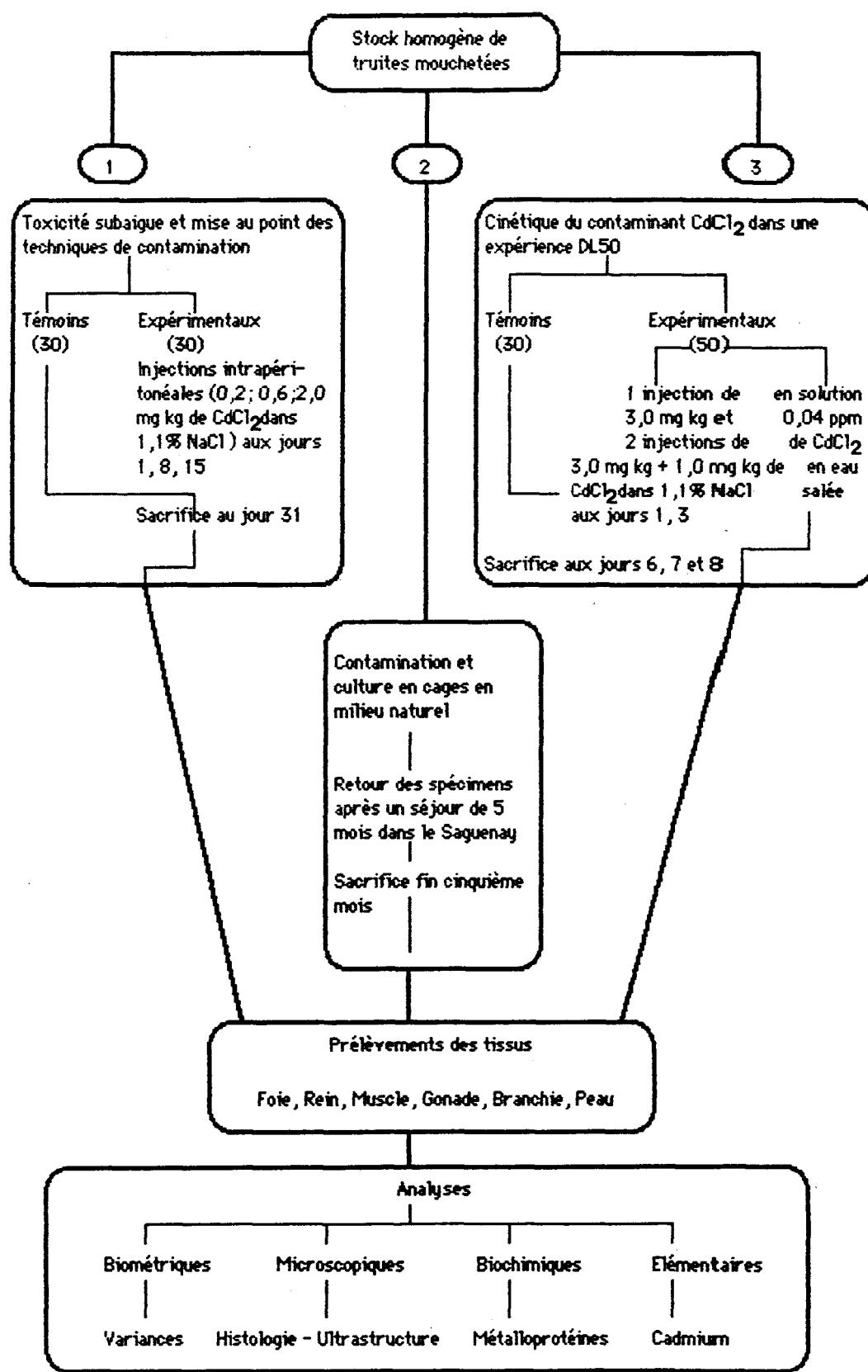


FIGURE 9. Protocole général

Afin de réaliser les trois objectifs de cette recherche, trois situations expérimentales ont été élaborées :

3-1 Expérience 1:

3-1.1 Elevage :

Nous avons utilisé trois bassins : un d'eau douce à circulation ouverte permettant le stockage des truites en condition optimale et deux autres bassins d'eau salée à circulation fermée dont le premier contenait 570 l et servait aux expériences d'intoxication expérimentale et un deuxième de 950 litres était réservé pour les témoins. La salinité de l'eau était maintenue à 25 %, correspondant aux conditions du milieu naturel à St-Fulgence.

On alimentait les truites à satiété deux fois par jour avec de la moulée Saint-Martin sous forme de particule de 1,5 cm.

3-1.2 Contamination Expérimentale :

Trente individus (Salvelinus fontinalis, Mitchell) dont la longueur et le poids, avaient préalablement été mesurés, ont été contaminés par des injections intrapéritonéales de 0,2; 0,6 et 2,0 mg kg⁻¹ de chlorure de cadmium (CdCl₂) dans 1,1 % NaCl (solution isotonique) au jour 1, 8 et 15 respectivement à partir du début de l'expérience. Au jour 31 les poissons étaient mesurés, pesés et sacrifiés et les tissus prélevés étaient aussi pesés et traités selon le type d'analyse prévue.

Une partie des tissus était congelée pour l'extraction ultérieure de métalloprotéines et le reste des mêmes tissus était fixé pour les analyses cellulaires et pour fin d'examens morphologiques et ultrastructuraux.

Dans cette expérience, nous avons concentré nos travaux sur trois tissus soit le foie, le rein et le muscle.

3-1.3 Analyses Biométriques :

Des mesures de poids, de longueur, d'indices hépatosomatiques et gonadosomatiques, de facteur de condition (K = P / L³) ont été faites sur les échantillons expérimentaux et témoins. D'autre part des comptes cellulaires

(diamètres : cellules et noyaux) étaient effectués exclusivement sur le tissu hépatique .

Afin de mieux évaluer les résultats nous les avons soumis à divers tests statistiques . Nous avons vérifié l'homogénéité des variances, le coefficient de variation et les propriétés d'une distribution normale .Nous avons posé la question à savoir s'il existe une différence significative entre les poids des tissus des truites témoins (T) et ceux des truites expérimentales (E) : (T > E) donc $H_0 = T = E$ et $H_1 = T > E$. Ceci nous permettrait de vérifier si la contamination subaiguë exerce une influence réelle sur le poids des organes des poissons . Aussi nous avons choisi d'utiliser le test de μ (Mann - Whitney) qui est un test de comparaison équivalent au test de student pour les données non-paramétriques (Sherrer, 1984) . Au test de μ est aussi associé le coefficient de Kendall .

Nous avons aussi utilisé des tests de comparaison ainsi que le facteur de bioconcentration (FBC), nous permettant de noter la majoration de l'accumulation du cadmium dans les tissus étudiés .

Le facteur de bioconcentration c'est le rapport de la concentration du toxique dans les tissus sur la concentration dans l'eau ou dans l'injection . Spacie et Hamelink (1985) traitent du FBC pour des expériences de courtes durées .

3-1.4 Analyses Microscopiques

Les analyses microscopiques ont porté principalement sur le tissu hépatique . Pour les observations morphologiques de routine, les tissus sont fixés à la formaline 10 % dans un tampon phosphate di-sodium et enrobés dans la paraffine selon les méthodes standards. Des sections ont été obtenues à l'aide d'un microtome (American Optical, modèle 820) et colorées au Trichrome de Masson (Gabe, 1968) .Les sections ont ensuite été examinées sous un microscope photonique (Carl Zeiss Inc.) pour fin de comptes cellulaires .

Les échantillons servant aux analyses ultrastructurales sont en premier lieu fixés à la glutaraldéhyde (3,5 %) et transférés dans un tampon cacodylate (0,2 M, ph 7,2) et finalement post-fixés au tétroxide d'osmium (1%) dans

l'eau distillée. Ultérieurement ces spécimens sont enrobés dans la préparation Spurr selon les méthodes standards. On obtient des sections ultrafines au moyen de l'ultramicrotome (Reichert modèle OM-U2) et celles-ci sont contrastées par coloration différentielle au citrate de plomb et à l'acétate d'uranyl. Nous avons par la suite étudié en détail ces coupes ultrafines au microscope électronique à transmission (Philips EM-201) pour approfondir les analyses morphométriques qualitatives et quantitatives déjà faites en microscopie photonique.

3-1.5 Analyses Biochimiques

L'extraction des métalloprotéines et plus particulièrement de la métallothionéine a été réalisée principalement sur le foie. Nous avons procédé selon la méthode d'Overnell et Coombs (1979) et l'avons modifiée comme suit :

1- Les tissus individuels ou en groupe de 10 sont pesés et homogénéisés à 4 °C dans une solution saline de NaCl 1,1 % (p/v) pendant environ 30 s.

2- L'homogénat est ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 30 minutes à 4 °C (centrifugeuse Sorval, Superspeed RC2-B). Le surnageant (10 000 g) recueilli est de nouveau centrifugé à 100 000 g durant une heure (ultracentrifugeuse Beckman, L2-75B). C'est le surnageant de cette dernière centrifugation qui sert aux analyses chromatographiques sur colonne et aux analyses élémentaires.

3- On applique le surnageant (0,5 cc) sur une colonne de gel Séphadex G-75 de dimension de 10 * 1,2 cm et on procède à l'élution à une vitesse de 36 cc h⁻¹ dans un tampon de 20 mM Tris-HCl, pH 8,6. Quatre-vingt fractions de 0,75cc chacune sont récoltées dans un collecteur automatique, donnant un total de 60 cc pour un temps d'élution complet de 1h40. L'eluat est aussi évalué par rapport à son absorption à 250 et à 280 nm en spectrophotométrie (Gilford 2400-S) selon le type d'échantillon.

3-1.6 Analyses Elémentaires

Les échantillons du surnageant 100 000 g et les fractions chromatographiques sont analysés pour détecter la présence du cadmium au

moyen d'un appareil d' absorption atomique (Perkin Elmer à émission avec flamme *100) .

Les échantillons du surnageant ainsi que les éluats sont aspirés directement dans la flamme air / acétylène et permettent ainsi de quantifier instantanément les métaux lourds (Cd, Zn) des échantillons .

3-2 Expérience 2:

Milieu d'élevage et contamination naturelle :

Le site choisi pour l'évaluation de la contamination de la truite mouchetée en milieu naturel se situe à l'Anse aux Pins à St-Fulgence dans la rivière Saguenay (figure 10). Ce site présente plusieurs avantages pour les fins de cette étude :

- Les conditions physico-chimiques sont propices pour la culture en cage
- Les lieux sont facilement accessibles et à l'abri des conditions météorologiques extrêmes
- Il y a une bonne circulation d'eau
- La teneur en métaux lourds dans l'eau dépasse fréquemment les normes d'Environnement Canada .

Le type de cage utilisé pour l'élevage des poissons à St-Fulgence est celui mis au point par Saint-Gelais et Larrivée (1986) basé sur le modèle norvégien . Le collier flottant de forme octogonale mesure environ six mètres de largeur et le filet de nylon traité au créosote, descend à 10 mètres sous la surface constituant ainsi un volume effectif de 283 m³ (figure 11) .

Les truites sont nourries de la même façon que dans le cas de l'expérience 1. Après un séjour en cage de 5 mois, 30 poissons sont échantillonnés au hasard et amenés au laboratoire pour être pesés, mesurés et sacrifiés . Les procédures utilisées pour prélever les tissus, les traiter et les analyser sont les mêmes que celles de l'expérience 1 . Toutefois dans cette expérience nous avons tester six tissus : foie, rein, muscle, gonade, peau, branchie .

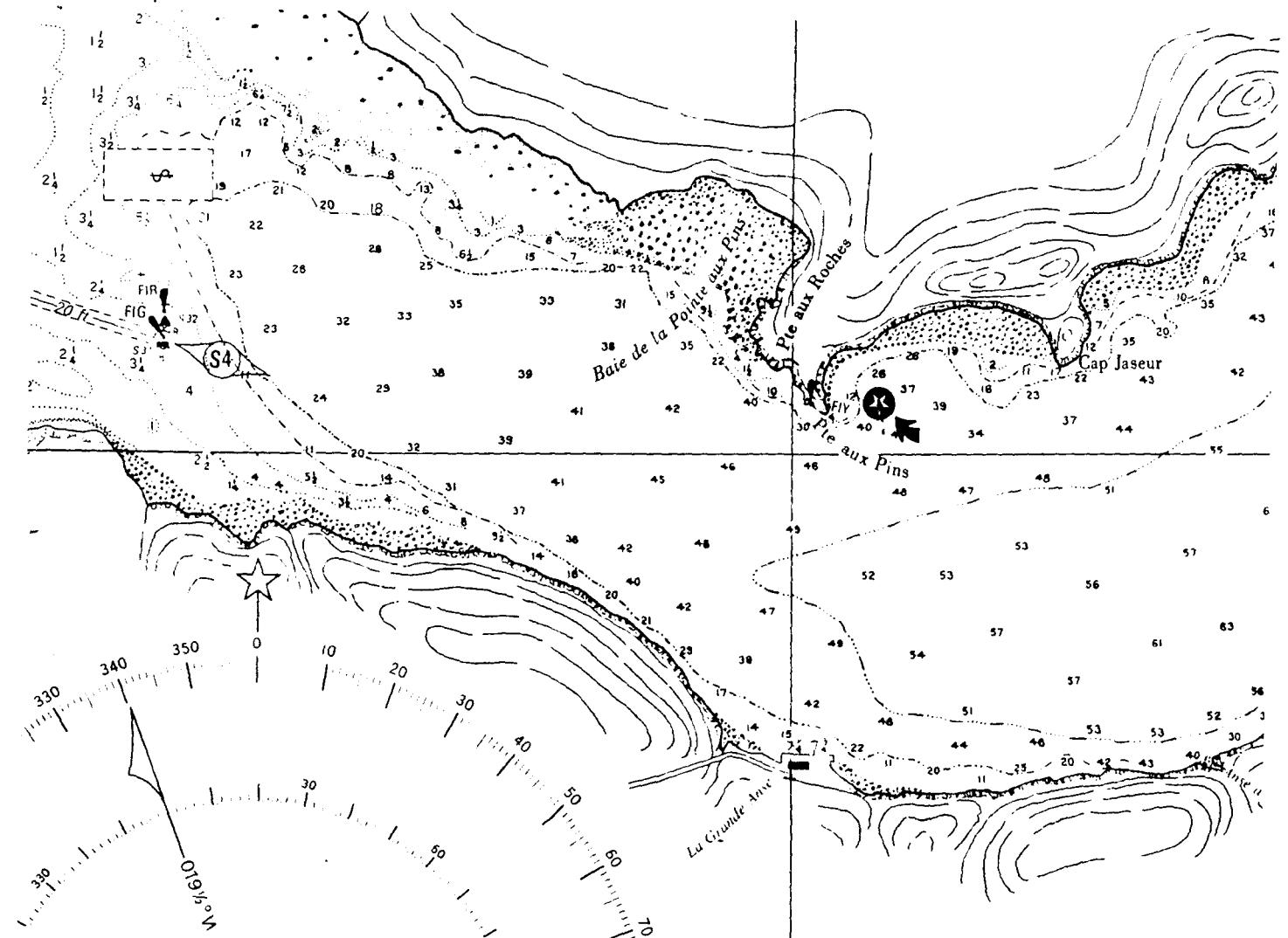


Figure 10. Site de culture en cage à St - Fulgence dans le Saguenay



Figure 11. Modèle de cage d'élevage de truites mouchetées utilisé au site de St-Fulgence, Saguenay .

3-3 Expérience 3:

Contamination expérimentale :

L'expérience 3 visait à suivre la cinétique du cadmium (Cd) dans le cadre d'une expérience DL50, et noter les effets physiologiques sur les tissus selon trois échantillonnages distincts . Il s'agit ici d'une expérience DL50 (192 h) puisque les spécimens ont été récoltés lorsque se manifestait la mortalité et ce jusqu'au 8^e jour .

1- Un premier groupe de truites subissait une seule injection intrapéritonéale de 3 mg kg^{-1} de CdCl_2 dans une solution saline de 1,1 % NaCl. Les truites étaient pesées, mesurées et sacrifiées au jour 7 et 8 suivant l'injection.

2- Un deuxième groupe recevait deux injections intrapéritonéales, une première de 3 mg kg^{-1} au tout début de l'expérience et la deuxième au troisième jour, soit de 1 mg kg^{-1} de CdCl_2 en solution saline. Les poissons étaient alors pesés, mesurés et sacrifiés au jour 6.

3- Un troisième et dernier groupe était tout simplement mis au contact de l'eau contaminée par le CdCl_2 (0,04 ppm). Les poissons étaient aussi pesés, mesurés et sacrifiés au jour 8.

Les procédures utilisées pour prélever les tissus, les traiter et les analyser sont les mêmes que celles de l'expérience 1. En plus nous avons tester six tissus dans cette expérience : foie, rein, muscle, gonade, peau, branchie.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS ET DISCUSSION : EXPÉRIENCE 1

4.1 Résultats

4.1.1 Identification des fractions à haute teneur en cadmium

Le tableau 3 présente les valeurs des moyennes de groupe du cadmium total mesuré dans le surnageant 100 000 g du foie, du rein et du muscle chez les témoins et les expérimentaux.

Considérant les résultats obtenus dans l'intoxication au chlorure de cadmium, il apparaît clairement que le tissu hépatique est le principal organe d'accumulation et de transformation et que les expérimentaux se distinguent nettement des témoins. Ces derniers ne tendent jamais à dépasser la concentration de 1 ppm de cadmium alors que les truites expérimentales exibent des valeurs moyennes allant jusqu'à 8,643 ppm dans le foie, 0,433 ppm pour le rein et des quantités plus ou moins équivalentes au témoin pour le muscle. Les valeurs moyennes utilisées sont celles de l'extraction comprenant un mélange de dix échantillons regroupés ensemble. Le bruit de fond détecté chez le témoin, peut-être dû à la contamination de départ (étangs d'où les poissons proviennent) ou à la limite de détection des appareils utilisés.

Nous observons une graduation dans l'accumulation du cadmium dans les tissus expérimentaux qui se traduit sous forme d'histogramme à la figure 12.

TABLEAU 3. Contamination au CdCl₂, valeurs des moyennes de groupe

	Témoin	Expérimental
Foie	0,127 (δ = 0,152)	8,643 (δ = 3,183)
Rein	0,217 (δ = 0,201)	0,433 (δ = 0,330)
Muscle	0,083 (δ = 0,195)	0,100 (δ = 0,018)

δ = écart-type (exprimée en ppm)
 N = 10 ; échantillons regroupés pour faire 1 extraction

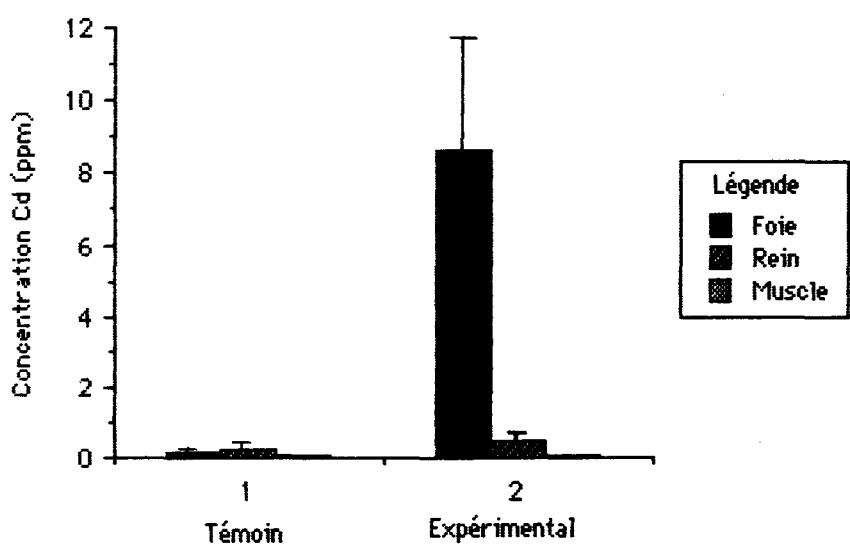


Figure 12. Distribution du cadmium total dans le foie, le rein et le muscle .
(Expérience 1)

Dans les extractions et les purifications de protéines capables de se lier au cadmium, nous avons choisi le foie car ce tissu accumule le cadmium de façon préférentielle . Lorsque le surnageant 100 000 g contenant les métalloprotéines solubles est mis sur colonne chromatographique (G-75), on peut voir l'importance relative des fractions associées au cadmium dans le foie des truites injectées . (figure 13 A et B).

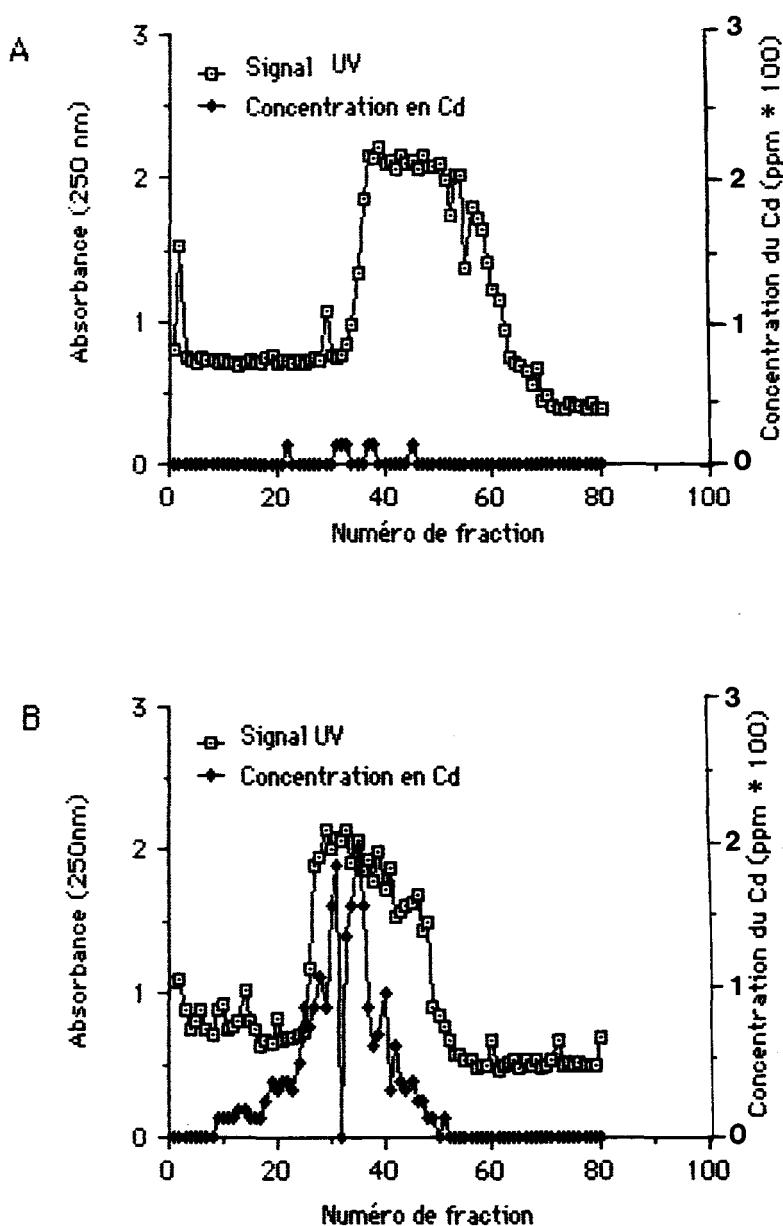


Figure 13. Profils d'élution des métalloprotéines extraites avec le cadmium associé aux fractions chromatographiques. En A, chromatogramme du témoin de groupe; en B, chromatogramme de l'expérimental de groupe.

A l'aide des extraits hépatiques d'échantillons expérimentaux de groupe représentés à la figure 13 B, nous observons que les courbes d'absorbance forment des pics d'absorption principalement entre les fractions 25 à 50.

On constate la présence du cadmium surtout au niveau des fractions 30 à 35. Le cadmium est aussi décelé plus faiblement dans les fractions 15 à 20. Les pics de cadmium correspondent aux pics d'absorbance maximale à 250 nm. Chez les témoins (figure 13 A), nous obtenons aussi des pics d'absorbance à 250 nm à l'intérieur des fractions 25 à 50, toutefois la présence du cadmium n'y est que très faiblement détectée, soit au niveau de la fraction 35.

Lorsque nous nous référons à une courbe standard calibrée (figure 14) pour la détermination des poids moléculaires, les protéines semblent s'associer au cadmium selon 3 types de poids moléculaires soit :

- THPM :Très haut poids moléculaire \approx 45 000 daltons
- PME :Poids moléculaire élevé \approx 28 000 "
- FPM :Faible poids moléculaire \approx 15 000 "

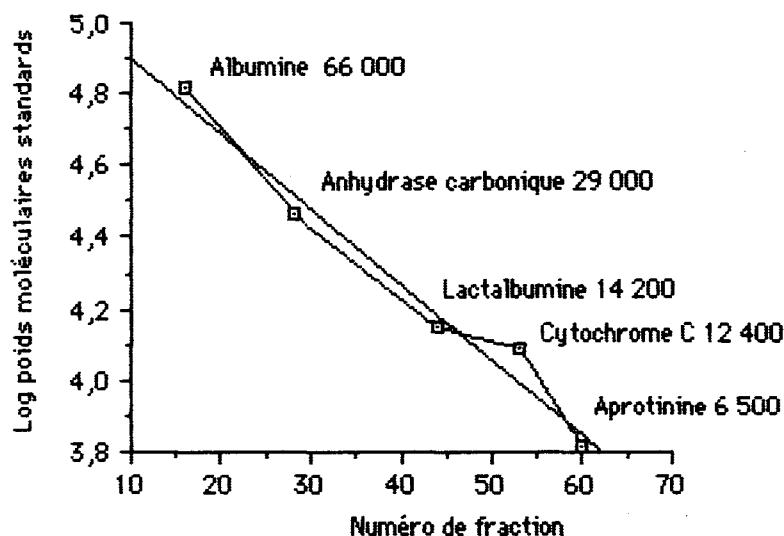


Figure 14. Courbe standard des poids moléculaires des protéines servant de marqueur.

Afin de délimiter la taille des catégories de ces molécules, nous nous sommes fiés à la taille des marqueurs utilisés. Ainsi le THPM correspond à l'albumine de bovin (66 000 daltons), les PME sont identifiés par l'anhydrase carbonique (29 000), les FPM correspondent à la lactalbumine (14 200) et au cytochrome C (12 400).

Le tableau 4 montre le détail de ces pics pour les échantillons de groupe. Les résultats sont exprimés sous forme de molécules associées au cadmium avec leur poids moléculaire approximatif.

Nous constatons que les molécules à PME et THPM prédominent en ce sens qu'elles exibent les pics les plus importants sur les courbes d'absorbance. Les molécules à FPM sont représentées aux fractions 45 à 55 sur l'éluat chromatographique.

TABLEAU 4. Poids moléculaires des métalloprotéines associées aux pics de cadmium après élution du surnageant 100 000 g du tissu hépatique (moyennes de groupe).

	THPM	PME	FPM
Témoin	44 668	28 183	15 135
Expérimental	50 118	28 183	16 595

THPM = Très haut poids moléculaire

PME = Poids moléculaire élevé

FPM = Faible poids moléculaire

4.1.2 Cadmium et zinc

Nous avons mesuré la quantité présente de zinc dans les échantillons du surnageant 100 000 g et de l'eluat. Nous avons voulu vérifier si le cadmium amenait un déplacement métallique dans les fractions de métalloprotéines car on sait que la métallothionéine joue un rôle important dans le métabolisme des métaux essentiels et plus particulièrement en tenant compte que le cadmium entre en compétition avec le zinc dans ces processus.

TABLEAU 5. Présence relative du cadmium et du zinc dans le tissu hépatique (en ppm).

	*	Cd Total	Zn Total	Cd / Zn	Ecart-type (δ)
Expérimental	E-Gr	8,64	8,58	1,007	0,151
Témoin	T-Gr	0,120	6,93	0,017	0,006

En comparant les témoins et les expérimentaux au tableau 5, on constate que le rapport Cd / Zn change de façon assez visible dans une situation de toxicité subaiguë ou sous-létale. On remarque aussi que les concentrations en zinc et en cadmium sont relativement équivalentes chez les expérimentaux car le rapport se rapproche de 1, alors que chez les témoins, le zinc semble occuper tous les sites de liaison. Ceci est particulièrement important si nous considérons le rôle critique que joue le zinc dans le fonctionnement de certains enzymes tel l'anhydrase carbonique.

4.1.3 Analyse statistique

Il en résulte que la population ne se situe pas dans la normalité, nous avons donc opté pour l'utilisation de tests non-paramétriques .

Le test μ appliqué aux données de poids totaux du foie et du rein (témoin, expérimental) révèle une différence . Cependant lorsque nous effectuons un test supplémentaire unilatéral entre individus de sexe femelle comprenant la majorité des spécimens (tableau 6), il apparaît sauf pour le rein , que les différences préalablement observées ne sont pas significatives .

L'hypothèse nulle H_0 est donc acceptée .

Ainsi le poids des gonades, la longueur du poisson, les rapports gonado-somatiques et hépato-somatiques et le facteur K ne présentent pas de différences significatives .

Le tableau 7 nous permet de confirmer l'effet des doses subaiguës de cette contamination puisqu'au bout d'un mois (31 jours) aucun effet biotique permanent ne semble se présenter et qu'il ne semble pas exister de relation significative entre le poids des tissus et la contamination au cadmium .

TABLEAU 6. Valeurs globales des tests de μ et du coefficient de Kendall, expérience 1.

Tissu	Test μ Z_{obs} =	Cf.Kendall Z_t =
F	1,628	0,554
R	3,167	-2,041
G	1,456	-0,740
Pds	1,365	1,369
L	0,683	1,218
G/S	1,155	-1,182
H/S	0,700	-0,891
L/Pds	1,592	
FK	2,065	0,821

H_0 = Témoins = Expérimentaux

H_1 = T > E

| Z_{obs} | $\geq Z_{\alpha}^0$ \Rightarrow rejet de H_0

Valeurs critiques Z_{α}^0 = 1,64 pour α 5% et 2,33 pour 1%

TABLEAU 7. Contamination au chlorure de cadmium et effets biotiques,
Expérience 1.

Effets biotiques de la contamination		
	Témoin	Expérimental
Poids	-	-
Longueur	-	-
H/S	-	-
G/S	-	-
FK	-	-
Alimentation	-	+*
Nage	-	-
Mortalité	-	-

+ Effet apparent
- Aucun effet apparent
* Arrêt au début puis retour à l'alimentation normale

Le coefficient de corrélation de Kendall tient compte des différences entre le rang de chacune des unités et celui de toutes les autres, prises une à une (Sherrer, 1984). Ce coefficient exprimé au tableau 6, n'offre aucun rejet de l'hypothèse nulle indiquant l'indépendance des variables. Ceci est en accord avec les résultats du test μ déjà cité. Les résultats du test de régression apparaissant au tableau 8 confirment à nouveau l'indépendance des variables et l'on s'aperçoit que la variation est assez élevée à l'intérieur des données sur les tissus analysés. Les valeurs du coefficient de variation expriment la variation de chacun des tissus.

Lorsque nous examinons les données de diamètre cellulaire hépatique et de diamètre du noyau en comparant les témoins avec les expérimentaux, nous ne pouvons y établir à nouveau de corrélation car le coefficient de variation

est très élevé (tableau 9). L'indépendance des variables est appuyée par les valeurs critiques de F et t où F_c et t_{ac} sont plus petites que les valeurs des tables : $F_c = 0,181 < F = 1,29$ avec α de 5% pour le noyau et $t_{ac} = 1,373$ et $0,426 < t = 1,649$ avec α de 5% pour la cellule et le noyau respectivement. Ceci nous permet d'accepter H_0 , l'hypothèse nulle. Les différences obtenues au niveau de la cellule seraient attribuables à la variation individuelle des tissus et à la maturité sexuelle.

TABLEAU 8. Test de régression simple dans les tissus entre témoins et expérimentaux.

Régression simple :Témoins vs Expérimentaux

	R	Erreur standard	Test-F	t	cf variation T	cf variation E
Foie	0,159	1,660	0,542	0,736	31,63	31,98
Rein	0,131	0,459	0,365	0,604	40,41	32,09
Gonade	0,221	0,909	1,078	1,038	86,72	77,31
Poids	0,019	43,637	7,287E-3	0,085	28,04	18,10
Longueur	0,312	1,355	2,257	1,502	8,44	4,99
G/S	0,194	0,378	0,818	0,905	99,90	74,72
H/S	0,094	0,456	0,189	0,434	28,22	20,93
Facteur K	0,205	0,115	0,924	0,961	12,64	10,64

R = coefficient de corrélation de la régression

TABLEAU 9 . Régression des diamètres cellulaires et des diamètres des noyaux ainsi que le coefficient de variation chez les témoins et les expérimentaux .

	Nb	R	Erreur standard	Test F	Cf variation	t
Cellule	199	0,097	1,197	1,886		1,373
Témoin					22,659	
Expérim.					50,979	
Noyau	199	0,03	0,372	0,181		0,426
Témoin					26,074	
Expérim.					23,812	

Nb = nombre d'échantillons

R = coefficient de corrélation de la régression

Nous obtenons en moyenne un facteur de bioconcentration du cadmium (FBCCd) chez la truite mouchetée de 7,105 pour le foie; 1,531 pour le rein et 0,14 dans le muscle . Nous remarquons que les poissons possédant un FBCCd élevé sont également les plus contaminés et que les trois tissus étudiés (foie > rein > muscle) nous montrent bien leur pouvoir respectif de bioconcentration de contamination .

Ainsi le facteur de bioconcentration dans les tissus confirme l'association du cadmium à la contamination des tissus contrairement aux analyses des poids des tissus ne révélant aucun effet apparent de la contamination au bout d'un mois d'expérimentation .

4.1.4 Toxicologie du cadmium et comportement

Quoique nous n'ayons point tenté de quantifier ces observations, il est possible de noter que les truites injectées au cadmium ont manifesté un refus de nourriture au début de l'expérience (2 ou 3 ième jour) pour subséquemment se nourrir à nouveau et revenir à une alimentation normale.

En se référant à nouveau au tableau 7, les effets biotiques apparents ne sont pas permanents. Ce qui implique que nous sommes bien en situation de contamination subaiguë.

4.2 Discussion

4.2.1 Caractérisation des métalloprotéines

Comme nous pouvons le constater les concentrations en cadmium total dans les tissus de truites expérimentales sont élevées et plus particulièrement dans le cas du tissu hépatique.

Ainsi les lectures des valeurs obtenues faisant suite aux extractions et aux élutions en spectrométrie et en absorption atomique, révèlent une nette dominance des protéines à poids moléculaire élevé (PME) associées au cadmium alors que l'on s'attendait plutôt à obtenir une grande quantité de protéines à faible poids moléculaire (FPM) qui sont susceptibles d'être représentées par les métallothionéines (Mtn).

En principe pour qu'il y ait synthèse de Cd-thionéine, il faut d'abord que la concentration du cation soit élevée dans le noyau pour que soit enclenchée la séquence mARN. Une dose seuil initiale permettrait d'accroître la capacité du foie en synthèse de Mtn, et cela exige une dose minimale de 30 µg/g de poids humide chez le rat selon Webb (1979a). Si toutefois la concentration hépatique initiale en ion métallique est faible, cela nécessite une seconde dose. Ceci suggère que la concentration de mARN doit être maintenue pour le remplacement de la Mtn.

La 1/2 vie ou temps de résidence de l'apoprotéine métal-thionéine (précurseur de la Mtn) dans le foie (pour le rat) dépend du statut en Zn+2 de l'animal pour qu'on puisse la détecter dans un intervalle de poids moléculaire déterminé (PM 10 000-12 000). Pour le foie comme pour le rein la concentration en métal dans le tissu s'accroît lentement et tend à atteindre un maximum aux environs de 8 jours (Webb, 1979a). Aussi on suppose, lorsque le Cd+2 assimilé est lié à la Mtn existante et est en relation avec les concentrations cytoplasmiques de mARN, que ce soit suffisant pour la transcription d'une protéine additionnelle sans délai pour continuer le cycle si la contamination se poursuit.

Il existe aussi une demi-vie biologique de l'apoprotéine du Cd-thionéine qui est environ de 5 jours. Alors on peut proposer qu'après une ou plusieurs injections de cadmium dans les tissus et ayant atteint un équilibre, il y ait une décroissance ou une perte d'environ 40% en une semaine et après une seule dose la concentration de la protéine diminue de 33% en 17 jours. Ceci est applicable pour le rein du rat selon Webb (1979a) et fort probablement équivalent pour le foie. Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi on ne détecte que des petites quantités de protéines à faible poids moléculaire (FPM).

La présence de ces métalloprotéines à FPM nous indique tout de même qu'il y a eu complexation du cadmium dans les tissus, en particulier dans le foie.

Selon Stowe, *et al.* (1972) il apparaît que l'entrée du cadmium dans des conditions expérimentales comparables à celles que nous avons utilisées, soit linéaire et que le caractère du taux d'accumulation dans les tissus dépend du type de tissu et décroît dans cette ordre : foie > rein > muscle. Nous basons notre argumentation sur la comparaison que nous pouvons faire avec les témoins qui ne présentent pas de contamination.

Dans la littérature (Probst, *et al.*, 1977; McCarter, *et al.*, 1982; Bremner, 1974; Overnell et Coombs, 1979) on présente habituellement 2 à 3 pics d'absorbance à 250 nm associés aux pics métalliques d'absorption atomique.

Les valeurs du poids moléculaire des protéines varient en fonction du type de colonne utilisé et de l'origine du tissu. Ainsi chez le rat contaminé (Zn, Cd), le tissu hépatique présente 3 pics d'absorption correspondant aux poids moléculaires suivants : 65 000, 35 000 et 12 000 daltons respectivement (Hoekstra, *et al.*, 1974). Chez l'oursin de mer (Cd, Cu, Zn) les poids moléculaires sont de 70 000, 12 000, 10 000 (Jenkins, *et al.*, 1982) et chez la plie (Cd, Zn) les poids moléculaires sont de 150 000, 40 000 à 50 000 et de 10 000 à 15 000 en moyenne (Shears et Fletcher, 1985).

On croit que la métallothionéine liée aux métaux se situerait aux environs de 11 000 PM par analyse chromatographique sur gel. Selon Noël-Lambot, *et al.* (1978) la quantité de cadmium liée à la métallothionéine serait proportionnelle à la quantité de cadmium dans le foie. Ainsi une faible quantité de cadmium aurait pour conséquence un faible contenu en métallothionéine. Dans notre expérience sur la truite mouchetée, nous remarquons la présence de protéines liées au cadmium possédant un poids moléculaire se situant dans l'ordre de valeurs déjà citées. Cependant après élution l'absorbance n'est pas uniformément élevée et il en est de même pour le cadmium.

Bremner et Davies (1974) rapportent que la métallothionéine agit comme agent de détoxification en se liant aux métaux lourds. Ainsi lorsque la concentration en métal diminue, le niveau de métallothionéine tend à diminuer et à retourner à un niveau normal où elle assure l'équilibre des ions métalliques. Il est possible que la métalloprotéine détectée, soit revenue à son niveau d'équilibre basal ou de stabilisation en ce qui concerne notre expérience en se référant à la perte de 40% dans le rein après une semaine, ou bien la Mtn est toujours restée à un niveau basal.

Hoekstra, *et al.* (1974) précise que la quantité de cadmium présente dans la fraction métallothionéine augmente avec la durée de l'intoxication. Notre intoxication expérimentale était de nature plutôt ponctuelle et s'effectuait en 3 injections sur 31 jours comme la pratique expérimentale le recommandait. Nous pensons que des injections plus fréquentes maintiendraient à un niveau plus haut la synthèse de la métallothionéine ou de cette métalloprotéine en question et un prélèvement d'échantillons après

chaque injection assurerait un meilleur suivi de la progression des protéines à FPM .

Dans la littérature on constate que les caractéristiques reliées à la métallothionéine, dont celle où l'absorption des chromophores mercaptides des métaux lourds varie grandement entre le zinc, le cuivre et les autres métaux . En utilisant par exemple le cadmium , dont l'absorbance maximale se situe à 250 nm (Webb, 1979b; Cherian et Goyer, 1978; Hunziker et Kägi, 1984; McCarter, *et al*, 1981), la métallothionéine ou Cd-Thionéine absorbe préférentiellement à 250 nm et peu ou pas à 280 nm . Toutefois d'après Hoekstra, *et al* (1974) une absence d'absorption ne signifie pas nécessairement que la thionéine n'y est pas . Cette absence d'absorbance pourrait révéler une certaine compétition des sites d'interaction .

Cherian et Goyer (1978) avancent que la métallothionéine se retrouve normalement en quantité extrêmement faible dans les tissus. Sa synthèse et son accumulation seraient dues à une exposition à des doses sous-létales de cadmium , mercure, cuivre et autres . Le fort taux d'absorbance à 250 nm est dû au lien Cd-mercaptides et cette absorbance diminue lorsque le cadmium (Cd) est remplacé par d'autres métaux (Zn, Hg, Cu) .

Köhler et Riisgard (1982) nous propose une explication alternative de l'effet de contamination, c'est-à-dire lorsque le cadmium se lie à la métallothionéine, la conformation de la molécule changerait et entraînerait ou stimulerait la synthèse de nouvelles molécules de métallothionéine de façon à maintenir le fonctionnement vital de la régulation des métaux essentiels . En faible concentration, il appert que les métaux ne se lient pas nécessairement à la métallothionéine (Mtn) (Jenkins, *et al*, 1982) .

Il faut se rappeler que celle-ci (Mtn), joue un rôle dans l'équilibre des ions métalliques à l'intérieur de la cellule et se lie aux métaux pour préserver une délicate balance . Ceci pourrait expliquer qu'à de faibles concentrations de métal on ne verrait peu ou pas de synthèse et d'accumulation de métallothionéine .

Stillman, *et al* (1987) rapportent que dans quelques cas la biosynthèse de la Mtn est induite mais pas le ligand ou le transporteur, c'est-à-dire que le

ligand serait libéré du complexe métal-ligand et le métal échangé sur les sites d'interaction. La protéine à ce moment se lie aux autres métaux essentiels tels le cuivre et le zinc. Comme nous l'avons mentionné précédemment le métal en se liant avec la protéine en change la structure. Dans la contamination expérimentale que nous avons effectué, le cadmium est prédominant dans la fraction à poids moléculaire élevé (PME) et à un moindre taux dans la fraction de faible poids moléculaire (FPM). Il est aussi possible que la contamination ne soit pas suffisante pour obtenir un fort taux de synthèse de métalloprotéine et qu'après 31 jours, le cadmium entre en compétition avec d'autres métaux. L'absorbance se trouve ainsi réduite donc l'animal s'acclimaterait plus facilement aux doses de $CdCl_2$ reçues.

Thomas, *et al.* (1983; 1985) avancent que le cadmium présent dans le milieu n'est pas accumulé par la métallothionéine dans la truite arc-en-ciel et la truite brune après 3 mois d'exposition à une concentration de $9 \mu\text{g l}^{-1}$. Le cadmium y est associé seulement à la fraction à PME ($\approx 77\ 000$) et rien ne lui indique que le cadmium soit lié aux molécules à FPM. Il précise que les concentrations doivent aller jusqu'à $54 \mu\text{g l}^{-1}$ au minimum pour obtenir des composantes de métallothionéines (Mtn). On constate en plus que dans tous les organes le cadmium n'est aucunement associé avec la Mtn mais il est plutôt séquestré à 99% dans le foie et le rein. Le patron cadmium - protéine liante (Cd-BP) est détectable et se présente lorsque les truites sont exposées à $1\ 000 \mu\text{g ml}^{-1}$, et la Mtn se trouve alors responsable d'une proportion seulement de la séquestration du métal. Le foie et le rein de par leurs fonctions, sont des organes de protection et de filtration, ce qui impliquerait qu'une accumulation plus importante au niveau de ces tissus empêcherait le cadmium de s'accumuler dans des organes vitaux ne pouvant remplir cette fonction de détoxification.

Il apparaît que la métallothionéine ne peut séquestrer tout le cadmium si le métal présente des concentrations élevées. Aussi le rôle de protection de la Mtn n'est pas nécessairement celui de séquestrer tout le métal toxique du foie et du rein puisqu'il existe des Mtn similaires (iso-Mtn) qui semblent partager la séquestration du métal. Il est aussi question d'équilibre association-dissociation dans la cellule, et dans le comportement des systèmes moléculaires, il existe une nette tendance à chercher à atteindre

l'état d'énergie le plus bas possible (Mahan, 1967). Selon Thomas, *et al.* (1983) l'élution à partir du gel (G-75) ne permet pas de distinguer le type de protéine à FPM soit Mtn ou iso-Mtn qui séquestre le cadmium; il serait nécessaire de reconcentrer et de refiltrer l'échantillon.

Il semble que pour les organismes qui subissent une faible intoxication, le métal s'accumule dans la fraction à PME. Roch, *et al.* (1982) observent que le cadmium est toujours dominant dans les protéines à PME et à FPM. Leur importance est évidemment fonction de la concentration à la source et de la labilité du métal. C'est cependant l'accumulation du métal dans le tissu qui stimulera la synthèse de la métallothionéine. Il se produit aussi le même effet pour le cuivre (Roch, *et al.*, 1982).

D'après Hamilton et Mehrle (1986) dans les mesures de truites arc-en-ciel injectées au cadmium, on détecte la présence de cuivre et de zinc en addition au cadmium même si le matériel utilisé pour l'injection ne contenait que du cadmium. En fait si la cellule est agressée, elle se protège en accumulant les métaux essentiels et effectue soit un déplacement d'ions ou permet une cohabitation des ions en occupant tous les sites disponibles. Nous pensons que le même phénomène se produit dans notre expérience car les métaux essentiels sont déjà en quantité suffisante dans le milieu cellulaire.

Il reste que l'habileté du zinc à induire la synthèse de la métallothionéine lorsque le cadmium se lie seulement à l'apoprotéine (thionéine) dépend de l'habileté ou de l'inhabileté du cadmium d'induire la synthèse de la Mtn ou tout simplement de déplacer le zinc et le cuivre de la Mtn.

Ceci suggère le mécanisme suivant : si le cadmium peut être lié à la métallothionéine seulement sous sa forme apothionéine c'est-à-dire par la séquestration des ions métalliques comme protéine naissante nouvellement synthétisée, le cadmium lui-même, à la concentration utilisée se trouve donc incapable d'induire la synthèse de la nouvelle apothionéine nécessitant une exposition subséquente au métal toxique pour favoriser la Mtn sous sa forme connue sinon il se produit une inhibition de la synthèse par compétition des sites avec d'autres molécules et d'autres métaux.

En toxicologie aquatique on réfère souvent à l'hypothèse de débordement ("spill hypothesis") qui tient compte d'un déversement possible de métaux en excès. Ceci suggère tout d'abord une préexposition à un métal lourd (ex: Cd), suivi d'une exposition à fortes doses pour que le cadmium déplace le zinc et le cuivre de la métallothionéine.

Winge, *et al.* (1974) observent que chez le rat contaminé au cadmium à des concentrations plus élevées que minimales, le cadmium se déverse dans des fractions de d'autres protéines que la Mtn. Ce qui implique que lorsque la Mtn est saturée par un métal, l'excès va se déverser dans d'autres compartiments cellulaires et ceci coïncide avec un changement pathologique dans l'organisme.

À de fortes doses de contaminant, il est probable que la synthèse de la thionéine soit plus lente que le taux d'entrée du métal, aussi la métallothionéine va protéger les tissus selon sa capacité. La Mtn semble séquestrer plusieurs métaux selon leur disponibilité dans l'équilibre ionique cellulaire et est fonction de leur abondance et de leur affinité et ceci change la conformation des molécules. À titre d'exemple, des toxiques comme le mercure et le cadmium interagissent avec les groupes sulphhydryles que l'on retrouve dans certains acides aminés. Winge, *et al.* (1974) explique que l'effet du cadmium chez le rat apparaît au moment où le métal se déverse dans la fraction à PME des protéines.

Le complexe métallothionéine serait constitué de 2 iso-protéines (Jenkins, *et al.*, 1982) et les isomères peuvent varier selon les groupes. On en retrouve 3 chez les mammifères, 3 chez le saumon coho et 1 chez la plie (Klaverkamp, *et al.*, 1984). Puisque nous pouvons observer 2 plateaux il est possible que chez la truite mouchetée la métalloprotéine (ou Mtn) soit composée de 2 iso-protéines. Le fait d'obtenir plusieurs pics à FPM, semble suggérer qu'il existe des protéines comparables à la Mtn et qui peuvent se lier aux métaux lourds. Comme le poids moléculaire de la métallothionéine diffère selon la méthode d'analyse, nous avons peut-être un cas de dimérisation de métalloprotéine. Selon Ley, *et al.*, 1983; Hamilton et Mehrle, 1986; Azeez, *et al.*, 1985; Stone et Overnell, 1985), on estime que certains tissus dimérisent la Mtn (ex: le placenta) mais cependant qu'un

poids moléculaire plus grand que 10 000 n'implique pas nécessairement la dimérisation de la Mtn. Ceci semble un peu controversé. Ce qui est déterminant, c'est l'analyse de la séquence des acides aminés même si le % de cystéine est élevé. Il faut regarder le % des autres acides aminés et vérifier les autres caractéristiques. Comme nous n'avons pas effectué la séquence d'acides aminés de ces protéines nous ne pouvons affirmer qu'il y a eu dimérisation de la Mtn dans nos poids moléculaires.

Deux iso-formes de non-Mtn ont été trouvées ayant un poids moléculaire (PM) de 13 500 et 14 000 (Thomas, *et al.*, 1983) pour le zinc et le cuivre dans le foie, le rein et les branchies. Les non-Mtn existent (Azeez, *et al.*, 1985) et il semblerait qu'elles ne sont pas suffisamment caractérisées en raison des petites quantités de métal disponible. Ceci ressemble à nos résultats de Mtn similaires répertoriées. D'après Stone et Overnell (1985) il se peut que cela soit relié à la route d'exposition plus qu'aux faibles valeurs de cadmium impliquées. Ils attribuent la majeure partie des espèces liantes appartenant à la classe non-Mtn seulement au fait de l'inefficacité de se lier dans l'échange anionique du séphadex au moment de l'analyse; il y aurait dissociation des molécules.

Il existe d'autres problèmes techniques qui peuvent fortement affecter les résultats. Selon Webb (1979b) dans les préparations la Mtn se présente en une grande hétérogénéité de protéines, à moins qu'elle ne soit purifiée par une élution chromatographique préalable. La Mtn est habituellement contaminée par plusieurs protéines non liées aux métaux. Il peut alors se produire une adhésion non spécifique entre ces molécules et la Mtn. Plusieurs procédures utilisées sont inadéquates pour enlever les protéines non spécifiques dans la purification de la Mtn si on veut éviter d'altérer la molécule. Il n'existe cependant pas de méthode directe pour identifier la Mtn dans le tissu animal. Nous avons tenter de développer une telle méthode basée sur la mise en évidence des groupes S-S et S-H mais sans succès. Nous avons constaté que même après purification nous obtenions toujours une fraction hétérogène.

Plusieurs chercheurs ont rapporté que l'inhibition de l'activité protéase était essentielle afin de retrouver intactes les protéines liantes (Cd-BP)

qui autrement seraient hydrolysées durant l'homogénéisation par libération de la protéase (Overnell, *et al.*, 1979). Aussi l'activité de la protéase peut changer la configuration de la Mtn et le comportement chromatographique de la molécule. Il semble que même si on prend beaucoup de soin pour éviter l'hydrolyse, (ex : homogénéiser à 4°C, etc), il subsiste toujours un risque. De plus, conserver de larges volumes dilués de la fraction de la Mtn sous des conditions aérobiques comporte aussi des risques d'oxydation entraînant la polymérisation et la précipitation moléculaire (Webb, 1979b).

Dans cette expérience nous visions à générer et à caractériser les métalloprotéines, si possible la métallothionéine par contamination expérimentale au cadmium chez la truite mouchetée. Aussi nous avons mesuré de façon sous-létale le degré de changement intervenu dans l'organisme contrairement aux indices de dose létale 50 (DL50) que la majorité des auteurs utilisent. Il a été démontré (Bremner, 1979; Winge, *et al.*, 1974; Webb, 1979; Roch, *et al.*, 1982) qu'en pénétrant dans la cellule, le métal (ex : Cd) se complexifie à des protéines de poids moléculaires élevés (PME) en premier lieu et qu'après 5 à 50 heures la métallothionéine (Mtn, FPM) est synthétisée et à son tour se complexifie avec le cadmium (Cd). Nous savons que la Mtn devient saturée avec le cadmium, le cuivre ou le zinc; après saturation ce métal déborde dans la fraction de protéine à PME. Ce phénomène sera dépendant de la dose et du statut nutritionnel. Ce débordement se manifeste plus probablement après de courtes expositions à fortes doses qu'après de longues expositions à faibles doses.

Ce qui ressort de tout cela, c'est que dans une intoxication au cadmium, le foie répond par ce qui semble être la complexation avec surtout 3 types de protéines ayant les poids moléculaires de 45 000, 28 000 et 15 000. Aussi nous avons formulé les hypothèses suivantes et les rôles probables de ces types de protéines.

1- Il nous semble que la fraction de 45 000 pourrait représenter les molécules de complexation primaire avant la formation de la métallothionéine.

- 2- En ce qui concerne le groupe de poids moléculaire autour de 28 000 , deux hypothèses peuvent se présenter à partir de la transformation des PME vers les FPM : a) Il s'agit d'un cas de déplacement métallique ou de cohabitation des ions métalliques sur les sites libres; b) Cette molécule pourrait représenter un précurseur de la métallothionéine .

3- Quant aux molécules dont le poids moléculaire se situe autour de 15 000 daltons, elle pourraient représenter les Mtn elles-mêmes ou Mtn – similaires .

4.2.2 Compétition cadmium-zinc

Comme la chimie du cadmium ressemble de très près à la chimie du zinc, il n'est pas surprenant de retrouver de grandes quantités de zinc avec le cadmium . Ainsi lorsque le zinc est disponible il pourrait ainsi signaler la présence de la métallothionéine . D'après Noël-Lambot, *et al.* (1978) leur groupe témoin contiendrait de grandes quantités de zinc et de cuivre et très peu de cadmium . Ceci correspond sensiblement à nos résultats et cela signifie donc qu'il y a compétition pour les sites d'interaction chez les expérimentaux et les témoins . Jenkins, *et al.* (1982) retrouvent de grandes quantités de zinc et de cuivre liées à la fraction à PME et par conséquent le métal en excès serait alors lié à la Mtn ou à une protéine à FPM et sinon, il risque de se produire une toxicité bien visible .

Comme nos résultats proviennent d'une contamination sous-létale, nous ne pouvons espérer obtenir du cadmium en excès . Toutefois la fraction à PME est dominante ,et nous suggérons que le zinc soit lié aux PME et le cadmium à la fraction à FPM . Il est à noter que nos résultats ressemblent davantage aux résultats d'une préexposition et ne permettent pas d'obtenir une synthèse complète de métalloprotéine .

Lorsque la synthèse de la Mtn est induite mais pas le ligand, la protéine se lie de préférence au zinc ou au cuivre qu'au cadmium. Si on se réfère au zinc, nos résultats témoignent d'une interaction entre ces deux métaux. Il semble que le niveau de zinc dans la cellule règle le niveau de la Mtn. Lorsque le zinc est en faible quantité, la métallothionéine se dégrade rapidement (Karin, 1985). Théoriquement d'après la littérature, puisque nos échantillons contiennent de fortes quantités de zinc nous devrions pouvoir observer des quantités appréciables de métallothionéine tout comme nous pensions en trouver par rapport aux concentrations de cadmium mesurées. Cependant après purification sur gel, les concentrations de Mtn ou d'iso-Mtn sont relativement faibles. Il faudrait soit exposer à nouveau les truites aux métaux lourds afin d'obtenir une nouvelle synthèse de métalloprotéine ou concentrer davantage les échantillons avant de les injecter dans la colonne de séphadex. Aussi nous nous demandons s'il est possible que la purification nous empêche de voir les protéines liées au zinc car il reste toujours une fraction non analysée.

Selon Hamilton et Mehrle (1986) l'absorption atomique révèle la présence du zinc en relation avec le cadmium. On y trouve parallèlement 2 protéines de FPM séquestrant le cadmium, qui sont considérées comme des métalloprotéines de zinc (Zn-Mtn). D'autres auteurs trouvent des concentrations en cuivre anormalement élevées et du zinc aussi pour des poissons non injectés et possédant la Mtn contenant du cuivre et du zinc. Il semblerait que ces observations soient le reflet des différences de mécanismes homéostatiques entre la truite et les mammifères lors de la régulation des nutriments dans les organes et les tissus (Ley, *et al.*, 1983).

En se référant au tableau 5, on constate que le zinc est en concentration élevée autant chez le témoin (6,93 ppm) que chez l'expérimental (8,58 ppm). La distribution sur les sites semble équivalente chez les truites traitées au cadmium puisque le rapport Cd/Zn ≈ 1 contre 0,017 chez les témoins. Le zinc prédomine dans les sites de liaison chez le témoin.

D'après Day, *et al.* (1984) le mercure et le cadmium déplacent le zinc de la Mtn basale (normale ou élevée) et ceci indique que la "synthèse de novo" n'est pas requise pour un court terme d'incorporation du cadmium dans la

métallothionéine chez le foie de rat après quelques heures d'exposition. Toutefois dans ce cas le déplacement du zinc est facilité à cause d'une préexposition au zinc c'est-à-dire de la préexistence de la Zn-Thionéine 18 hrs avant. Ainsi la quantité de Mtn serait due à l'habileté du zinc à induire la synthèse de la métalloprotéine où seulement la fraction thionéine est accessible au cadmium. Le zinc faciliterait l'insertion du cadmium. Il est possible que la truite mouchetée résidant en eau salée présente un métabolisme ionique un peu plus variable entraînant ainsi des modifications au niveau des métalloprotéines.

Selon Ley, *et al.* (1983) le cuivre se lie plus fortement à la Mtn que le cadmium et le zinc. Ceci pourrait entraîner des manifestations de toxicité hépatique en synergie avec le zinc et le cadmium.

D'après Takeda et Shimizu (1982) des molécules semblables à la Mtn contiennent plus de cuivre ou de cadmium que de zinc. Roch, *et al.* (1982) notent aussi que le cuivre est toujours dominant dans les fractions à PME et à FPM et peu importe que l'organisme provienne d'un endroit pollué ou non. La concentration en zinc demeure stable mais élevée. Ce qui est prévisible considérant son intervention dans les métalloprotéines tandis que la concentration du cadmium tend à fluctuer avec celle du milieu et du métabolisme.

Nous suggérons plutôt que la concentration des protéines à PME agit comme régulateur de molécules capables de synthétiser la Mtn et que ces protéines (PME) permettent à l'animal de s'accommoder des métaux en surplus avant la formation de la Mtn. Ainsi en supposant que notre niveau de contamination ait été trop faible, nous n'obtiendrons pas suffisamment de synthèse de Mtn ou encore il se produira trop de dégradation de la molécule pour permettre une augmentation de la fraction à PME liée au cadmium en proportion avec la fraction contenant la Mtn, qui est sensée démontrer l'effet de contamination.

Roch, *et al.* (1982) ont analysé des foies de truites arc-en-ciel provenant de lacs contaminés à divers degrés. Ils ont constaté que le niveau de contamination se reflétait lors de la présence de protéine à PME et à FPM et que la filtration sur séphadex G-75 permettait de voir que la concentration diminue en fonction de la distance de la source de contamination. De plus la

concentration en zinc dans les PME excédait celle dans la Mtn . Ils suggèrent que la concentration en métal (Cu, Zn etc) dans les protéines à PME et à FPM s'accroît parallèlement . Ainsi la relation des concentrations des métaux dans les protéines à PME serait reliée aux manifestations toxiques . Donc lorsqu'on accroît le niveau d'un métal dans la fraction à PME ce serait le signal du seuil tolérable de l'animal à séquestrer le métal et à maintenir l'homéostasie .

Thomas, *et al.* (1983) ont détecté 2 types de métallothionéines à FPM lorsque le zinc est lié à la Mtn . La fraction à FPM lié au cadmium n'est identifiable qu'après plusieurs purifications . Les faibles volumes que nous avons récoltés après une première purification nous ont empêchés de nous engager en des purifications subséquentes .

Stillman, *et al.* (1987) avancent qu'il n'y a aucun remplacement isomorphique ou stochiométrique entre l'ion zinc et l'ion cadmium . Ce serait plutôt la force du lien au site de chélation avec l'ion cadmium qui crée une force de regroupement car le zinc et le cadmium occupent des sites de symétrie tétrahédrique et semblent avoir le même ratio stochiométrique . Il y aurait effet de regroupement des ions cadmium activés après passage sur séphadex . On suggère que les regroupements se forment seulement lorsqu'il n'y a pas d'autres zinc isolés qui peuvent être remplacé par le cadmium . Le signal du mécanisme débuterait après 4 moles équivalent de Cd + 2 ajouté . Comme les liens sulphhydriles avec le cadmium sont de taille 10% plus grande que les mêmes liens avec le zinc, cela implique une modification des thiolates pour que le zinc soit remplacé par le cadmium . Le zinc est intimement lié au cadmium . A cet égard sa position dans la métallothionéine peut modifier l'accessibilité au cadmium .

Thomas, *et al.* (1985) avancent que chez la truite arc-en-ciel exposée en-dessous des conditions physiologiques requises pour obtenir de la Mtn, lorsque le cadmium est en faible concentration, il ne peut déplacer le cuivre et le zinc dans la Mtn . Si on expose simultanément le poisson au zinc et au cadmium, le cadmium se lie à la Mtn sous sa forme apothionéine . La synthèse de la Mtn complète est dépendante de la présence du zinc et des concentrations en ions métalliques extrêmement élevées . Ainsi le zinc,

tout comme le cuivre d'ailleurs, jouerait un rôle prédominant dans l'incorporation du cadmium dans la métallothionéine du foie .

Si la quantité de matériel(Cd) est la même et que la quantité totale de zinc demeure au même niveau, on pense que trois possibilités peuvent jouer en faveur de ces conditions : 1) La quantité de métalloprotéine augmente; 2) Le cadmium ne déplace pas le zinc mais occupe des sites libres; 3) Le cadmium occupe des sites sur d'autres molécules que la métallothionéine ou ligand du zinc. Nous suggérons que 1) s'il y a déplacement, le zinc s'est alors combiné à d'autres particules et 2) s'il n'y a pas de déplacement le zinc et le cadmium cohabitent autour des mêmes sites .

4.2.3 La variation pondérale des organes et de la contamination au cadmium .

Dans la littérature on ne fait que rarement état des effets de la contamination sur le poids des organes . Durant notre expérience qui a duré 31 jours, le poids des organes n'a pas varié de façon significative par rapport à la contamination au cadmium .

D'après Samarawickrama (1979) le poids du foie des mammifères diminuera lorsque des symptômes de toxicité se manifesteront . Par exemple s'il y a nécrose dans le parenchyme, il y aura congestion et vacuolisation dans les cellules de Kupfer . D'une façon générale cependant on ne note pas d'effet sur le poids de l'organe . Les variations lorsqu'elles se produisent sont généralement liées à une intoxication aiguë . De plus lorsque l'acclimatation se produit et que le métabolisme revient à la normale, le poids se rétablit . Ainsi Haux et Larsson (1984) rapportent que chez la pie, la truite arc-en-ciel ou la souris, la taille du foie est initialement réduite mais on observe un retour aux conditions d'avant l'exposition après une contamination prolongée .

Selon Samarawickrama (1979) chez la souris après une injection de 3 mg kg⁻¹ de Cd⁺² sous cutanée, les poids des foie et rein décroissent simultanément; toutefois 18 à 21 jours après l'injection, on observe une complète régénération des organes et leurs poids ne diffèrent pas de ceux

des témoins. De plus après injections répétées, le cation Cd⁺² serait concentré à la périphérie du lobule du foie.

Ainsi lorsqu'on observe les coupes des tissus, les diamètres cellulaires ne présenteront donc aucun changement si la coupe n'est pas effectuée au niveau périphérique du lobule.

Comme nous pouvons le constater, même avec des concentrations appréciables en cadmium dans les tissus (tableau 3 et figure 12), il apparaît que l'effet du toxique sur le poids des tissus est difficile à évaluer avec précision après un mois. Cela exige une observation en continue afin de mieux suivre les effets du contaminant.

Nous avons évalué le facteur de bioconcentration à 7,10 pour le foie, 1,53 pour le rein et 0,14 pour le muscle. A ce niveau il est tout de même étonnant qu'on ne puisse observer d'effet sur le poids du foie. Bremner (1979) note que le foie accumule de grandes quantités de cadmium spécialement quand le métal est administré intrapéritonéalement.

Il faut cependant considérer que le foie représente un organe multifonctionnel où des modifications d'une seule fonction ne sont pas susceptibles d'amener des changements drastiques. Nous pouvons tout de même suggérer que les mécanismes de détoxication n'entraînent pas dans ce cas un bouleversement du métabolisme de base, du moins à l'état de contamination sous-létale.

Il serait intéressant d'effectuer un test de concentration létale 10 % (LC 10) ou moins, afin de mesurer la limite supérieure d'un toxique ayant un faible effet sur les poissons et d'en déterminer la concentration maximale sécuritaire pour un toxique donné. Ces applications paramétriques et non-paramétriques sont à développer en toxicologie aquatique.

4.2.4. Effets de la contamination sur le comportement

En l'absence de test standardisé pour la toxicité comportementale, il est difficile d'analyser et de quantifier les observations sur le comportement (Rand, 1985). Nous pouvons tout de même référer à nos observations d'inhibition alimentaire au début de la contamination. Ceci est suivi éventuellement d'un retour à l'alimentation normale, témoignant ainsi d'un processus d'acclimatation.

Comme la plupart des réponses comportementales sont basées sur l'intégration des fonctions physiologiques et biochimiques qui peuvent se manifester au niveau externe de façon subtile, il est plus important dans un premier temps de bien saisir les changements moléculaires et cellulaires résultant de la contamination.

CHAPITRE V

RÉSULTATS ET DISCUSSION : EXPÉRIENCE 2

5-1 Résultats

5-1.1 Analyses élémentaires et biochimiques

Les valeurs de contamination en cadmium dans les tissus apparaissent au tableau 10. La contamination dans les tissus se situe dans un intervalle de 0,067 à 0,400 ppm pour les échantillons de groupe et l'importance relative de la contamination se distribue ainsi : rein > branchie > peau > gonades > foie > muscle. Nous constatons que dans cette expérience où l'exposition aux contaminants inorganiques est variable, et à un bas niveau (Tableau 11), la contamination des poissons reste elle aussi à un bas niveau (Tableau 10). Nous remarquons aussi que les valeurs des surfaces d'absorption sont relativement constantes.

TABLEAU 10. Contamination au CdCl₂, valeurs moyennes de groupe, Expérience 2.

	Témoin	Expérimental
Foie	0,127 ($\delta = 0,152$)	0,100 ($\delta = 0,052$)
Rein	0,217 ($\delta = 0,201$)	0,400 ($\delta = 0,193$)
Muscle	0,083 ($\delta = 0,195$)	0,067 ($\delta = 0,014$)
Gonades	---	0,123 ($\delta = 0,179$)
Peau	---	0,175 ($\delta = 0,022$)
Branchie	---	0,200 ($\delta = 0,000$)

δ = Ecart - type (exprimée en ppm)

N = 10; échantillons regroupés pour faire 1 extraction

TABLEAU 11. Valeurs moyennes des métaux dans la colonne d'eau à St-Fulgence où ont séjourné les expérimentaux, Expérience 2.

Métal / Paramètre	Valeur minimale	Valeur maximale
Cadmium (ppm)	0,00033	0,0060
Cuivre	0,00240	0,0040
Fer	0,15000	0,4000
Mercure	0,00010	0,0006
Plomb	0,00500	0,0370
Zinc	0,00300	0,1000
Salinité (‰)	0,023	26,00
Température (°C)	-0,290	18,91

La figure 15 montre le patron de distribution du cadmium par voie d'intoxication naturelle dans les six tissus étudiés afin de mieux visualiser la contamination globale chez la truite mouchetée dans cette expérience. Nous observons que le rein prédomine avec en moyenne 0,400 ppm de Cd, suivi des surfaces d'absorption (branchies = 0,200 et peau = 0,175). Il semble qu'en milieu naturel, que ces trois tissus soient les cibles préférentielles lorsque la contamination est de longue durée et de faible intensité.

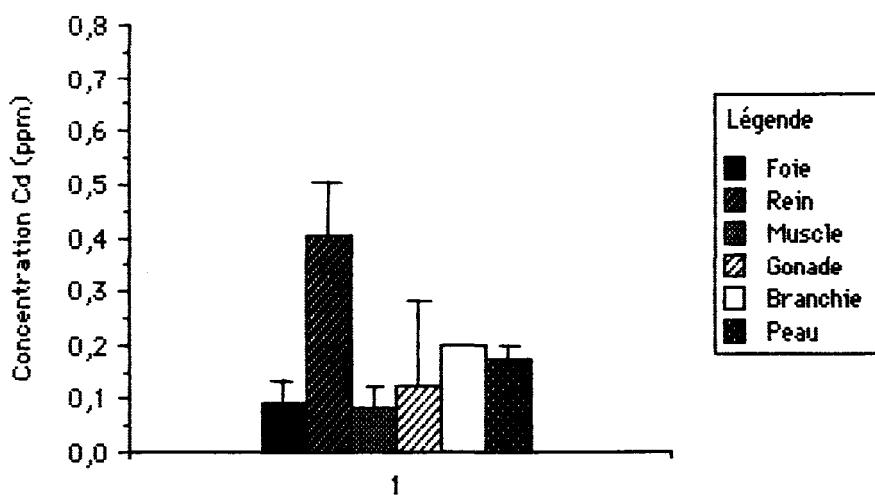


Figure 15. Distribution du cadmium total dans 6 tissus : foie, rein, muscle, gonade, peau, branchie . Expérience 2 .

Pour fin de comparaison avec l'expérience, nous avons procédé à l'extraction et à la purification des métalloprotéines du foie sur séphadex (G-75) afin d'identifier les fractions à teneur en cadmium. Les valeurs de groupe exhibent un plateau majeur d'absorbance dans l'intervalle des fractions 24 à 44 et quelques pics mineurs . De plus le plateau d'absorbance majeur est composé de multiples pics mineurs (figure 16) .

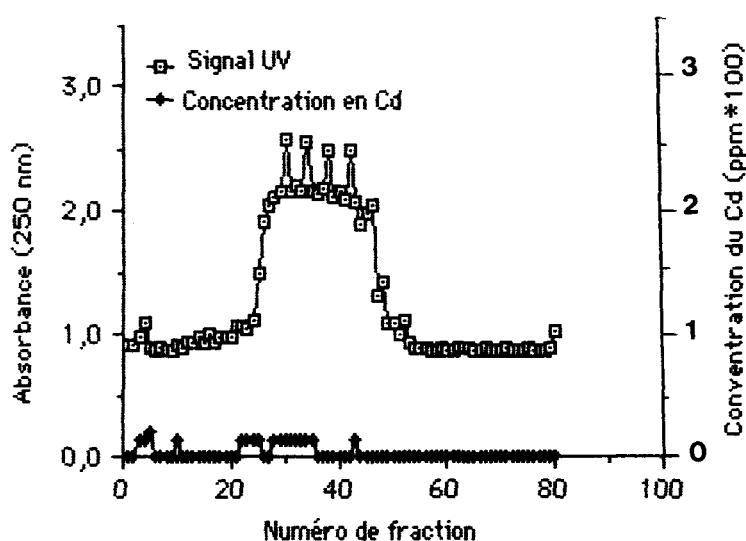


Figure 16 . Profil d'élution des protéines extraites avec le Cd associé aux fractions chromatographiques, Expérience 2 .

Le tableau 12 présente sous forme de classe les trois types de poids moléculaires obtenus, soit :

THPM :très haut poids moléculaire

PME :poids moléculaire élevé

FPM :faible poids moléculaire

TABLEAU 12. Poids moléculaire des métalloprotéines associées aux pics de cadmium après élution du surnageant 100 000 g du tissu hépatique, Expérience 2.

*	THPM	PME	FPM
Expérimental			
E-Gr	>60 256	23 988	16 982
T-Gr(Exp.1)	65 183	25 119	

Nous constatons que la contamination au cadmium est peu importante et ceci se traduit par une majorité de protéines détectées au niveau des PME et THPM. Les Mtn similaires ou iso-Mtn se répartiraient autour de 16 000 daltons et de façon peu importante, en considérant le cadmium qui y est associé.

5-1.2 Cadmium et Zinc

TABLEAU 13. Présence relative du cadmium et du zinc dans le tissu hépatique (ppm).

*		Cd Total	Zn Total	Cd / Zn	Ecart-type (Δ)
Expérimental	E-Gr	0,10	6,27	0,016	0,052
Témoin(Exp1)		0,12	6,93	0,017	0,006

Dans le tableau 13, nous constatons que les valeurs en cadmium total dans le tissu hépatique de ces truites en élevage dans le Saguenay sont supérieures à celles de la colonne d'eau. Quand au zinc, nous obtenons des valeurs passablement élevées par rapport à celles du cadmium. Le zinc ici semble occuper tous les sites de liaison disponibles.

Ce qui nous amène à dire qu'il y a peu de contamination et fort probablement très peu de métalloprotéines associées au cadmium.

Ceci se confirme par le rapport Cd / Zn moyen soit de 0,016, qui nous indique que la quantité d'ion métallique est nettement insuffisante pour engendrer une synthèse de type Métaallothionéine.

5-1.3 Analyse statistique

Les tableaux 14 et 15 affichent les résultats d'analyses.

TABLEAU 14. En A , Valeurs globales des tests de μ bilatéral et du coefficient de Kendall. En B, Test de μ entre mâles et femelles .

Tissus	A		Cf. Kendall
	Test μ Zobs =	Test μ Zobs =	
F	1,828	2,537	-0,764
R	0,507	2,137	-2,187
G	4,515	2,668	1,336
Pds	0,519	0,216	-0,923
L	0,486	0,405	-1,845
G/S	4,364	2,614	1,083
H/S	2,968	2,237	1,020
L/Pds	0,081		
FK	0,762	0,648	0,854

L'hypothèse nulle est la suivante :

H_0 = Témoins = Expérimentaux

H_1 = T \neq E

$| Z_{obs} | \geq Z_{\alpha/2} \Rightarrow$ rejet de H_0

Valeurs critiques $Z_{\alpha/2} = 1,96$ pour 5% et 2,57 pour 1%

$Z_{\alpha/2} = 1,64$ " 2,33 " , test unilatéral

lorsque $H_1 = T > E$

TABLEAU 15. Test de régression simple dans les tissus entre témoins et expérimentaux

	R	Erreur standard	Test - F	t	Cf variation
Foie	0,189	1,810	1,000	1,000	31,829
Rein	0,268	0,714	2,093	1,447	39,692
Gonade	0,143	19,186	0,566	0,752	100,604
Poids	0,238	67,624	1,615	1,271	22,663
Longueur	0,335	1,765	3,404	1,845	6,285
G/S	0,076	6,574	0,157	0,396	97,958
H/S	0,085	0,470	0,198	0,445	23,789
Facteur K	0,075	0,095	0,153	0,391	7,875

R = corrélation de la régression

Cf variation = coefficient de variation

Les résultats du tableau 14, nous indiquent que les gonades et les rapports gonadosomatiques (G/S) et hépatosomatiques (H/S) apparaissent significativement différents. Nous avons aussi constaté un développement des gonades nettement plus avancé que celui des témoins provenant de l'expérience 1 car ils comportaient de nombreux immatures.

Nous avons analysé les différences dans la maturité sexuelle chez les mâles et femelles entre les expérimentaux mêmes. Les gonades et l'indice G/S présentent toujours des différences significatives. Quant aux autres tissus, ils ne réflètent guère de différences significatives dans leurs poids.

Le coefficient de corrélation de Kendall confirme à nouveau que les échantillons sont indépendants et qu'il n'existe pas de relation entre

expérimentaux et témoins et entre individus mâles et femelles. Ce qui revient à dire qu'au niveau des poids, les tissus semblent similaires et n'offrent pas la possibilité de les utiliser comme indice révélateur de contamination interne chez la truite mouchetée.

Les tests de régression linéaire simple (tableau 15) renforcent les résultats du coefficient de Kendall et de l'analyse de variance. Le coefficient de variation démontre la grande variabilité dans les tissus analysés.

De façon générale les valeurs critiques de F_c sont inférieures au F de la table : 1,84 pour $\alpha = 5\%$. Il en est de même pour les valeurs de $tac < t$ de la table : 2,005 avec un α de 5%. Il y a exception pour le rein et la longueur. On sait que le rein en tant qu'organe de filtration, présente toujours de nombreuses variations et qu'il est possible que la maturité sexuelle puisse aussi influencer la capacité du rein.

Nous ne signalons pas d'effet majeur du facteur de bioconcentration puisque la contamination n'agit pas de façon efficace et visible. On le voit aussi par les valeurs de cadmium total (tableau 10) qui ne montrent qu'une faible majoration en particulier au niveau du rein. Nous remarquons que dans la peau et les branchies, il semble exister un équilibre.

Finalement il en ressort que la contamination du milieu dans le Saguenay, au niveau de St-Fulgence, ne présente aucun effet biotique négatif apparent sur les truites élevées en cage (tableau 16).

TABLEAU 16. Contamination au chlorure de cadmium et effets biotiques en cage, Expérience 2.

Effets biotiques de la contamination		
	Témoin	En cage
Poids	-	-
Longueur	-	-
H/S	-	-
G/S	-	-
Facteur K	-	-
Alimentation	-	-
Nage	-	-
Mortalité	-	-

+ Effet apparent
- Aucun effet apparent

5-2 DISCUSSION

5-2.1 Caractérisation des métalloprotéines

Dans la littérature (Rand et Petrocelli, 1985; Cairns, *et al.*, 1984) on souligne souvent que les expériences de contamination effectuées en laboratoire ne reflètent pas la réalité et on rappelle qu'il est hasardeux d'extrapoler. Toutefois ces modèles de laboratoire nous permettent quand même de suggérer un schéma d'explication sur la pollution en milieu naturel.

Dans l'expérience 2, la contamination naturelle provient d'origines multiples avec distribution et concentration variables dans le temps. Nous

devions nous attendre soit à un effet marqué (synergie) ou à un effet affaibli (antagonisme). D'après les concentrations en cadmium retrouvées dans les tissus de la truite mouchetée, et dont les données apparaissent au tableau 10, l'expérience 2 exprimerait un effet antagoniste. Les valeurs en cadmium mesurées dans la colonne d'eau sont relativement faibles comparées à celles rapportées par Loring, et al. (1983). Il y aurait une variation saisonnière dans la présence des contaminants (sédiments vs colonne d'eau). En effet ni la salinité, ni la température ne semblent avoir joué en faveur de l'intoxication.

Nous gardons une certaine réserve au niveau des effets internes même si cette expérience a été effectuée en continue car l'échantillonnage n'a été fait qu'au bout de 5 mois de séjours en cage. Nous pouvons tout de même noter une faible majoration du cadmium dans les tissus.

On doit prendre en considération que la voie d'incorporation du cadmium dans l'expérience 2 est différente de celle de l'expérience 1, en ce sens que l'intoxication par la matière dissoute et particulaire est nettement inférieure à celle produite par injection intrapéritonéale.

Cependant les processus biologiques d'accumulation et de bioconcentration sont les mêmes dans l'eau que lors d'injections et la bioconcentration serait en relation avec le type de d'entrée du contaminant. Par conséquent nous observons que le patron d'accumulation du cadmium dans les tissus se présente différemment : rein > foie > branchie \approx peau > muscle pour l'expérience 2 et foie > rein > muscle pour l'expérience 1.

Dans ce cas-ci, ce sont plutôt les épithéliums du conduit digestif qui sont modifiés que d'autres épithéliums ou tissus. Ainsi les ions seraient recyclés au niveau du rein ce qui permettrait au rein d'accumuler plus de cadmium que le foie.

Coombs (1979) explique qu'en eau salée 90 % du cadmium est lié aux ligands organiques. Le cadmium lié aux ligands dérive des protéines, alginates, polyphosphates, nucléotides, nucléosides et tissus brisés.

Une baisse de salinité faciliterait le taux d'entrée du cadmium dans les tissus et provoquerait une chute de la concentration en calcium d'où la compétition entre calcium et cadmium et autres métaux pour un site de transport commun. La hausse d'entrée du cadmium peut aussi dépendre de

l'osmolarité du médium aqueux et que la salinité et la température peuvent avoir un effet additif mais l'osmolarité peut aussi garder constant l'entrée du cadmium en eau salée .

Les organismes euryhalins, comme la truite mouchetée, semblent être plus résistants dans environ 12 % d'eau salée, ce qui est proche du niveau osmotique (Sprague, 1985) . En effet les valeurs obtenus pour les surfaces d'absorption sont relativement constantes . Ceci nous permet de supposer qu'il existe une protection pour la truite au niveau de l'épiderme de par sa faible absorption relative et par son adaptation au milieu marin. De façon générale, le cadmium en eau salée se retrouve sous forme soluble et à de très faibles concentrations sauf dans le cas de rejets industriels .

Au tableau 11, nous remarquons la grande variabilité de la salinité à St-Fulgence pouvant permettre autant un certain niveau de protection aux poissons qu'impliquer le risque de les rendre plus susceptibles à une intoxication .

Les faibles valeurs de concentrations des métaux dans la colonne d'eau (évaluation ponctuelle) pourraient suggérer de grandes variations accompagnées de dilutions non moins importantes. A cet égard, les truites seraient exposées périodiquement à des conditions facilitant l'incorporation des métaux et à des conditions inhibant cette incorporation . Sprague (1985) note que la majorité des changements dans le potentiel de toxicité d'un produit est causée par la modification des caractéristiques de dilution de l'eau et que la dissolution des métaux varie grandement durant les saisons en milieu naturel . Ceci facilite ou diminue la biodisponibilité du produit face aux organismes touchés .

D'après Leber et Miya (1976) la chélation du cadmium à des macromolécules en milieu naturel diminue la biodisponibilité , ce qui résulte en une diminution de la réponse toxique face au cadmium . La complexation d'un ion métallique modifie son comportement en terme d'interaction dans les phases du médium aqueux c'est-à-dire du transfert de l'eau => particules => sédiment ou vers l'organisme où il y a une capacité d'accumulation dans les tissus . La difficulté c'est la prédiction de la direction des effets soit en

haussant ou diminuant la disponibilité de l'ion métallique au système biologique .

Dans l'expérience 2, si nous considérons les valeurs du cadmium dans les truites et dans la colonne d'eau, on peut supposer plutôt l'effet d'une baisse de disponibilité du cadmium envers les truites .La complexation des ions métalliques aux particules organiques du milieu aquatique pourrait faciliter leur adsorption aux récepteurs cellulaires et enclencher une réponse cellulaire comparable aux mécanismes de transport régie par la communication cellulaire . Le cadmium serait alors transporté au travers de la membrane cellulaire pas comme un simple ion hydraté, mais comme complexe Cd-transporteur qui pourrait être la Mtn ou autre métalloprotéine ou bien à celui de la membrane cellulaire (Sprague, 1985) . Selon Webb (1979a), le premier mécanisme d'empoisonnement par le métal c'est l'interaction du cation (Cd+2) avec les phospholipides et les biomembranes .

Après avoir purifié les échantillons sur une colonne séphadex, nous constatons que les pics d'absorbance des expérimentaux présentent des similarités de positions avec les échantillons de l'expérience 1, mais les valeurs en cadmium trouvées dans le foie correspondent davantage à celles mesurées chez les témoins . Donc du point vue biochimique, les résultats de cette expérience en milieu naturel s'apparentent davantage à ceux du témoin de laboratoire parce que l'absorbance présente souvent des pics multiples, les protéines à PME dominent et les protéines à FPM sont très diffuses comme le montre le tableau 12 et la figure 16 .

Dans cette expérience, les truites sont exposées de façon chronique à plusieurs types de contaminants (tableau 11) tout en étant nourries sainement . Dans ces conditions on peut penser que les réponses biologiques seront altérées de façon différente que s'il n'y avait qu'un seul contaminant. Aussi, comme la concentration des contaminants n'est pas très élevée, les poissons ne semblent pas démontrer d'effets toxicologiques .

Le statut nutritionnel a une profonde influence sur la biochimie et sur la toxicologie du Cd+2, aussi des déficiences en zinc et en cuivre résultent d'interactions antagonistes entre le toxique et les cations essentiels .

A l'aide de la relation dose-réponse, nous pensons mesurer plus précisément les réactions biologiques du poisson. Selon Rand et Petrocelli (1985) un essai traitant de toxicité sous-létale permet d'indiquer le stress toxique à un stade bien avant la mort. Il nous apparaît dans cette expérience que les tests chroniques de toxicité présenteraient un outil de mesure de sensibilité de la toxicité d'un produit chimique.

Nous avons les poissons au stades adulte du cycle, mais en maturation sexuelle. Tous les spécimens ont effectué leur croissance dans les cages en eau salée. En analysant les valeurs du facteur de condition ($K = 0,99$ à $1,34$), du poids total et de la longueur, nous remarquons que leur croissance ne semble pas altérée.

En milieu naturel la taille, l'acclimation et l'élimination jouent un rôle important. D'après Sprague (1985), on peut s'attendre à ce que les gros poissons (taille adulte) soient beaucoup plus tolérants au produit toxicant. On pourrait donc s'attendre à plus de résistance des truites dans cette contamination (expérience 2). Les adultes possèdent plus de moyens de storage et d'élimination et devraient présenter un rapport protéine-métal (Cd-P) plus grand que chez les jeunes poissons car leur système de défense est mieux développé.

La toxicité et la bioaccumulation potentielles d'une substance étrangère sont grandement affectées par le taux d'élimination d'un organisme (Spacie et Hamelink, 1985). L'excrétion du cadmium se fait surtout dans les fèces lorsque l'animal est nourri et on en retrouve moins de 1% dans l'urine à cause de la réabsorption (Bremner, 1979). Nos poissons étaient nourris sainement. Cela implique que l'élimination des contaminants pouvait s'effectuer assez rapidement.

Même si nous notons des protéines à FPM, ici la Mtn ne semble pas caractérisée. Nous ne signalons sa présence qu'à titre indicatif afin de montrer que les poissons ont tout de même réagi à cette situation de contamination. Il est possible que les quantités de métaux soient trop faibles pour induire la Mtn de façon visible, surtout si l'élimination est

importante. Normalement la Mtn est à l'état de trace dans les tissus et elle semble rester à ce niveau dans cette expérience.

Hamilton (1985) rapporte que Thomas (1983) ne trouvait rien d'évident à ce que le cadmium soit lié au FPM après trois mois d'exposition des spécimens de truites brunes et arc-en-ciel et il n'obtenait que des protéines à PME liées au cadmium. Ceci semble correspondre aux résultats de l'expérience 2 dans le Saguenay.

Ainsi lorsque la concentration du cadmium est faible, le cadmium dans le foie s'attacherait davantage à la fraction à PME et ceci correspondrait au mode de complexation primaire avant la synthèse de la Mtn.

Cela semble une caractéristique de contamination à faible effet et ces résultats vont dans le même sens que rapporte Azeez, *et al.* (1985) où la plus grande partie des métaux accumulés sont liés à la fraction à PME.

Si les concentrations sont trop faibles, il n'y aura pas suffisamment de métal pour se lier à la Mtn et aux iso-Mtns présentes (Takeda et Shimizu, 1982).

L'expérience 2 pourrait correspondre à une expérience de préexposition et les truites seraient prêtes à supporter une nouvelle contamination à plus forte concentration.

5-2.2 Compétition Cadmium -Zinc et autres métaux

Noël-Lambot, *et al.* (1978) constatent qu'en absence de cadmium, c'est le zinc qui est le principal constituant de la métallothionéine (Mtn). Comme nous avons peu de cadmium et beaucoup de zinc dans les tissus, ce pourrait-être la Zn-Thionéine qu'on observerait et alors le cadmium occuperait d'autres sites disponibles puisque le zinc semble y avoir prédominance sur les sites de liaison. La Mtn ne serait pas liée à toutes les molécules de cadmium et de zinc, elle réagirait seulement lorsque les concentrations en métaux sont suffisantes pour induire sa synthèse.

Roch, *et al.* (1982) rapportent que la concentration en zinc ne change pas beaucoup peu importe le degré de contamination .Il est vrai que la concentration du zinc tissulaire dans les expériences 1 et 2 est forte (tableaux 3 et 13).

Le fer ,le cuivre et le zinc combinés empêcheraient certaines réactions avec le cadmium . Ainsi le métabolisme du cadmium est influencé par ces métaux et si on augmente leurs concentrations, on réduit le contenu en cadmium dans les tissus (Bremner, 1979). Coombs (1979) indique que le cadmium partage les sites communs de storage avec les autres métaux dans les organismes aquatiques . On remarque que de petites quantités en zinc et en cuivre sont toujours liées comme le cadmium avec la thionéine dans le foie même s'ils sont plus ou moins antagonistes au cadmium . On suggère que la thionéine serait un transporteur commun .

Dans plusieurs études on a signalé que le cadmium est toxique pour les organismes aquatiques . Ceux d'eau douce, semble-t-il, montrent une plus faible tolérance que les animaux marins ou estuariens .

Puisque le zinc est omniprésent dans l'environnement et qu'il est considéré comme un élément essentiel, il est donc normal qu'il fasse partie de nombreuses métalloenzymes et cofacteurs de régulation de l'activité spécifique Zn-enzymes et que ces liaisons favorisent une certaine stabilité structurale (Leland et Kuwabara, 1985) . Ainsi, l'animal en acquérant assez de zinc, peut être protégé contre les effets potentiels d'exposition au cadmium jusqu'au moment où le zinc peut devenir toxique à son tour .

Webb(1979a) souligne que le milieu aqueux est un solvant très efficace pour plusieurs composés chimiques polaires et conséquemment les organismes aquatiques sont extrêmement vulnérables aux effets toxiques résultants de l'absorption par voie orale dans l'environnement immédiat .

Lorsque les composés ou les complexes toxiques sont solubles dans l'eau ,ils peuvent être facilement absorbés dans le sang des poissons par contact direct de la cavité buccale . Même si cela ne cause aucune lésion, les toxiques peuvent cependant altérer l'homéostasie des organismes même dans

le cas où le zinc est antagoniste et que les quantités de cadmium relevées sont assez faibles .

Cependant, le rapport Cd / Zn moyen (0.016) nous indique qu'il y a eu probablement acclimatation puisque les concentrations des métaux semblent insuffisantes pour provoquer soit un déplacement de zinc, soit cohabiter sur les sites de liaisons pour favoriser la synthèse de la métallothionéine .

5-2.3 Variation pondérale des organes et contamination au cadmium

La variabilité en poids des tissus serait due au degré de maturation sexuelle des spécimens même si la taille était de même ordre . Les tests statistiques pour l'expérience 2 corroborent tout à fait ceux de l'expérience 1 quoique la voie d'introduction du cadmium est différente et que nous obtenions des valeurs nettement inférieures .

Le processus physiologique d'acclimatation doit être compensé métaboliquement (Sprague, 1985) . Aussi en utilisant une taille adulte et des poissons bien nourris, le poids des tissus ne varierait pas . Il se peut qu'il varie seulement à court terme et puis revienne à la normale . Il est évident qu'ici le poids des tissus n'est pas corrélé avec l'exposition au cadmium. Il en est de même pour l'expérience 1 . Cela dépend de l'habileté du poisson à s'acclimater avec les concentrations auxquelles il est soumis .

Webb (1979b) signale qu'il devient difficile d'appliquer des tests et des diagnostics puisqu'il n'y a pas de normes bien déterminées en toxicologie aquatique, permettant d'identifier les valeurs de base et des types de mesures standards à effectuer. On sait qu'il y a des variations dues à la diète, l'âge etc . Il faut relier ces changements à la santé du poisson ou à sa survie et lors d'étude sous-létale ou chronique, ceci est particulièrement difficile à prouver. De plus il faut toujours extrapolier les interprétations cliniques des mammifères aux réponses observées chez les poissons, ce qui n'est pas nécessairement adéquat .

Il faut se souvenir que l'altération des processus biochimiques et physiologiques ne diminue pas nécessairement la survie de l'animal et que les changements histologiques et histochimiques peuvent être subtils. Le facteur de bioconcentration ne semble pas intervenir de façon drastique puisque nous obtenons pour tous les tissus des valeurs minimes en cadmium avec un zinc prédominant.

Il apparaît clairement (tableau 16) que les effets biotiques de la contamination en milieu naturel (Saguenay) sont plus difficiles à mesurer que dans des conditions expérimentales en laboratoire.

CHAPITRE VI

RÉSULTATS ET DISCUSSION : EXPÉRIENCE 3

6-1 Résultats

6-1.1 Identification des fractions à haute teneur en cadmium

Cette expérience correspond donc à une expérience de DL50 (192 h) et les analyses ont été effectuées sur les survivants.

Le tableau 17 nous indique les valeurs moyennes de groupe en cadmium total dans les tissus pour les tests à 1 injection, 2 injections et suivant une exposition au cadmium en solution dans l'eau. En tout, six tissus ont été examinés. Nous les avons représentés à la figure 17 A, B et C sous forme d'histogrammes.

L'ordre de contamination des tissus pour le groupe à 2 injections nous apparaît comme suit : Foie : 7,176(ppm) > Rein : 2,160 > Gonades : 1,904 > Peau : 0,402 > Branchie : 0,333 > Muscle : 0,095 (figure 17 A). C'est le foie qui cumule le plus de cadmium, les gonades et le rein ont les mêmes tendances en ce qui concerne l'accumulation en cadmium tandis que les autres tissus laissent croire à une certaine homogénéité de part leur écart-type (Tableau 17).

Le test à 1 injection montre le patron de distribution du cadmium suivant : pour les mêmes tissus avec des moyennes de 7,18 (ppm) pour le foie > 1,334 pour les gonades > 0,96 pour le rein > 0,342 pour la peau \approx 0,273 pour les branchies et 0,076 ppm dans le muscle (figure 17 B). Les valeurs mesurées ici sont légèrement inférieures aux valeurs mesurées après 2 injections. Les résultats du tableau 17 suggèrent que la contamination est massive dans l'expérience à 1 injection, à 2 injections et qu'au niveau du foie on semble atteindre la saturation puisque 2 injections ne changent pas drastiquement le niveau de concentration. Nous remarquons aussi la grande variabilité dans le rein et une certaine homogénéité dans le muscle, la peau et les branchies. Ce qui sous-entend pour ces deux derniers que les truites présentent une faible absorption par les épithéliums.

TABLEAU 17. Contamination au CdCl₂, 1 injection, 2 injections et en solution dans l'eau , Expérience 3 .

Témoin	1 injection	2 injections	Cd en Solution dans l'eau	
	N = 10	N = 9	N = 8	
Foie	0,127 (0,152)	7,183 (6,922)	7,176 (7,198)	0,153 (0,042)
Rein	0,217 (0,201)	0,965 (0,666)	2,160 (1,166)	0,573 (0,266)
Muscle	0,083 (0,195)	0,076 (0,024)	0,095 (0,028)	0,098 (0,023)
Gonades		1,334 (1,800)	1,904 (2,272)	1,339 (1,945)
Peau		0,342 (0,132)	0,402 (0,147)	0,387 (0,104)
Branchie		0,273 (0,089)	0,333 (0,051)	0,305 (0,095)

δ = Ecart - type Exprimée en ppm

N = nombre d'échantillons

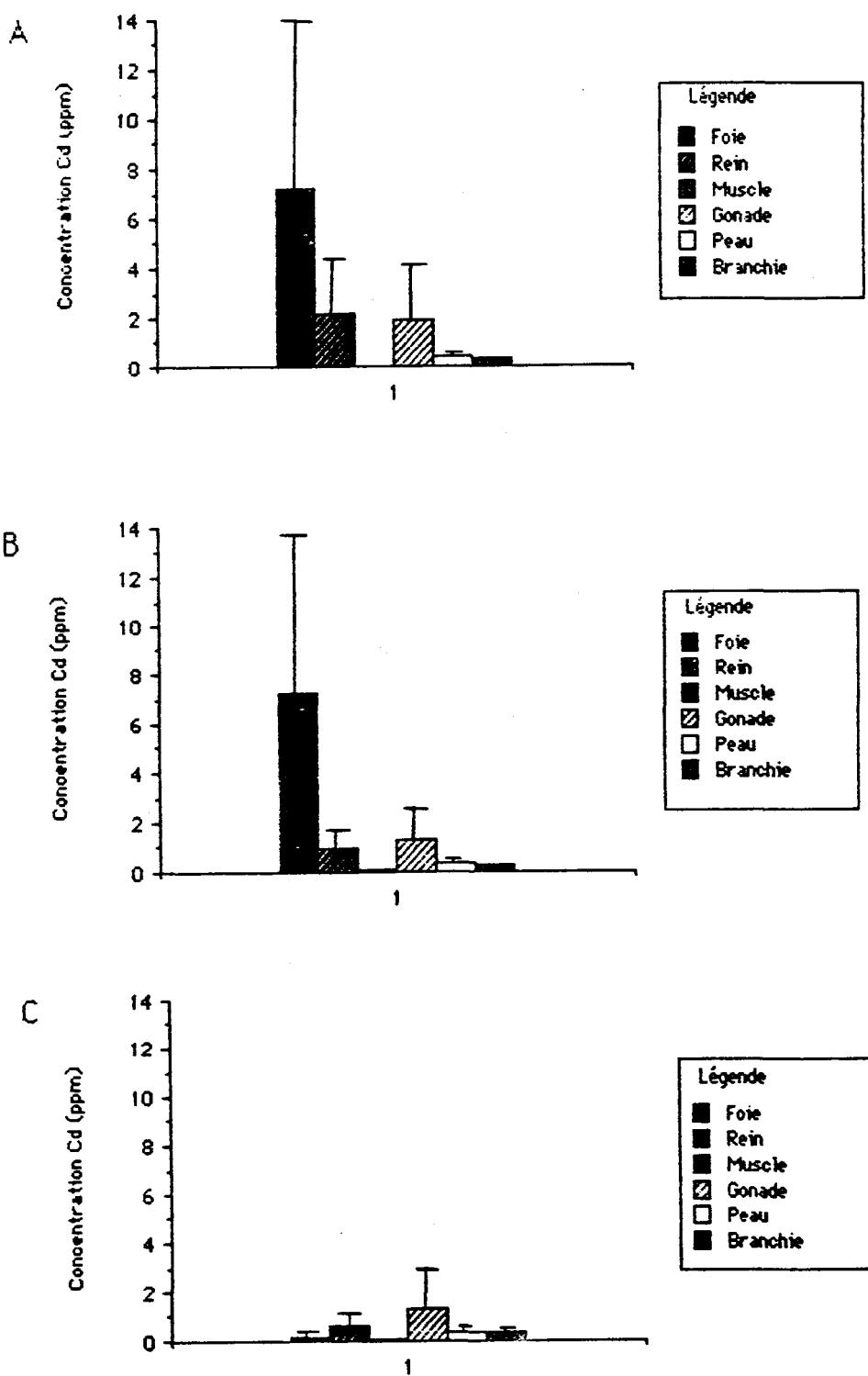


Figure 17. Distribution du cadmium total dans 6 tissus : foie, rein, muscle, gonade, peau et branchie. En A, 2 injection de Cd; en B, 1 injection de Cd et en C, exposé au cadmium en solution dans l'eau.

Les résultats de contamination pour le groupe exposé au cadmium en solution dans l'eau donne une distribution du cadmium pour les mêmes tissus dans un ordre tout à fait différent soit : Gonades : 1,339 (ppm) > Rein : 0,573 > Peau : 0,387 > Branchie : 0,305 > Foie : 0,153 > Muscle : 0,098 (figure 17 C). Nous observons que le rein et les surfaces d'absorption dominent et que le foie semble jouer un rôle beaucoup moins important ici pour le métabolisme du cadmium dans les tissus. Toutefois le Cd pourrait ici nous suggérer certains effets nocifs dans les gonades puisque les valeurs d'absorption atomique indiquent une accumulation de cadmium de l'ordre 1.3 (ppm) peu importe le mode d'entrée du contaminant. Nous remarquons d'ailleurs qu'on retrouve de hautes valeurs dans les gonades pour chacun des cas (2 injections, 1 injection, en solution) et il n'y a que la moyenne qui diffère.

L'absorbance de l'extrait à 1 injection (figure 18 B), présente une diminution de l'absorbance mais le plateau se situe dans les mêmes intervalles de fractions que pour l'extrait comportant 2 injections. On y observe de nouveau une accumulation de cadmium au niveau des fractions 10 à 30 comme dans le cas du groupe à 2 injections.

Quand au groupe des échantillons provenant du foie de poissons exposés au cadmium en solution dans l'eau (figure 18 C), il présente une absorbance moyenne à 250 nm sous forme d'un plateau. L'absorption atomique détecte faiblement le cadmium et ceci s'apparente sensiblement aux témoins de l'expérience 1 ainsi qu'à l'expérience en milieu naturel. Les chromatographies d'exclusion du surnageant du foie pour les tests à 2 injections, 1 injection et exposé au cadmium en solution dans l'eau, sont présentées à la figure 18 A, B et C.

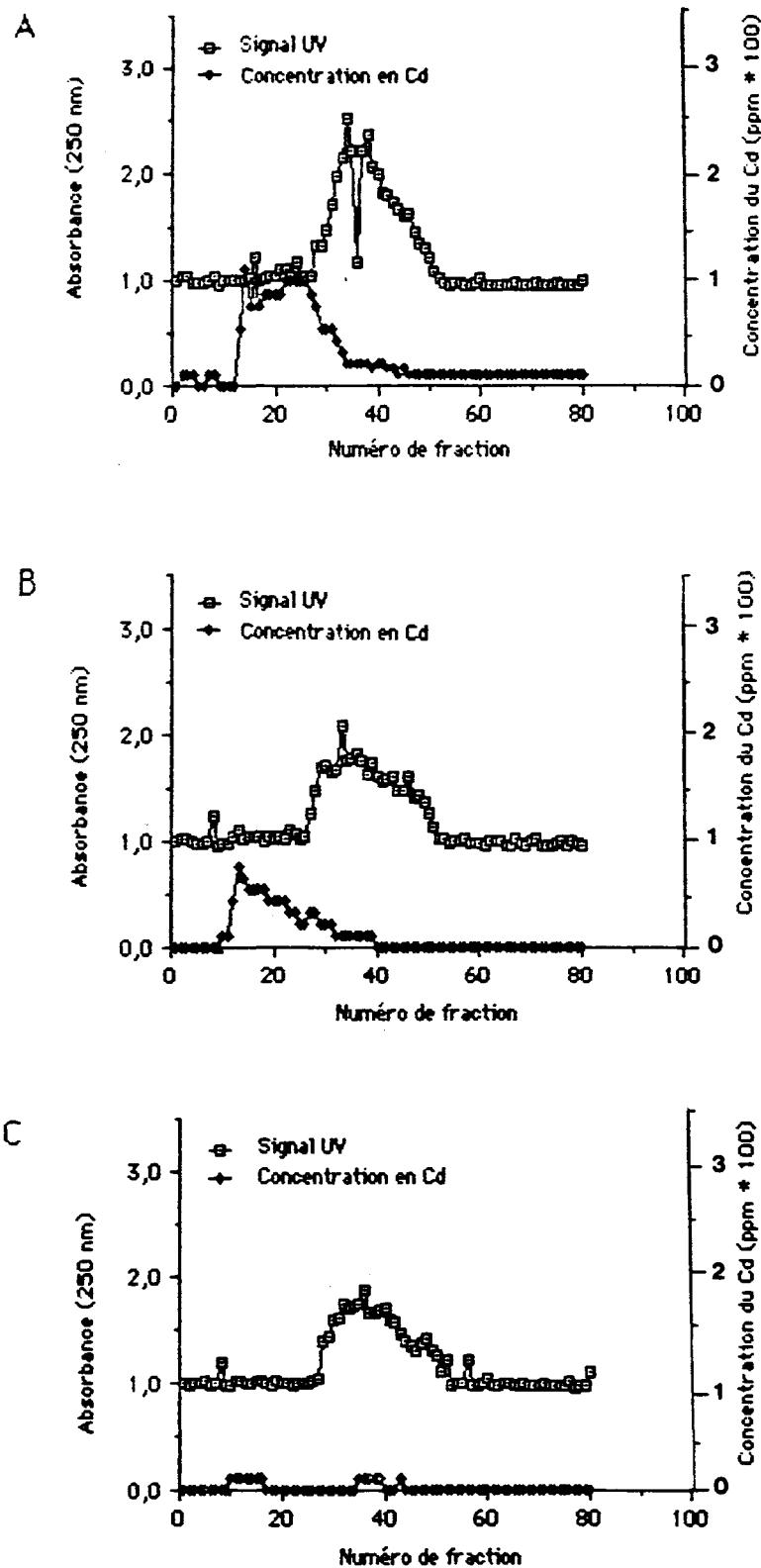


Figure 18 . Profils d'élution des protéines extraites du foie avec 1e Cd associé aux fractions chromatographiques . En A, *33 avec 2 injections; en B, *36 avec 1 injection et en C, *44 exposé au Cd dans l'eau .

A la figure 18 A, l'absorbance du groupe à 2 injections forme un plateau avec des pics multiples dans l'intervalle des fractions 25 à 40 et correspond aux intervalles de 25-50 et 24-44 déjà répertoriées dans les expériences 1 et 2 respectivement. Nous détectons une contamination variable et des pics de cadmium précédant les pics du plateau d'absorbance (250 nm) ce qui se traduit par une représentation majeure de fractions à poids moléculaires très élevées (THPM).

Le tableau 18 montre les poids moléculaires mesurés correspondants aux couple cadmium-protéines. La quasi totalité des poids moléculaires sont très élevés (THPM). Les FPM sont à peine visibles et sont à la limite des PME. En comparant ces résultats aux expériences précédentes, nous remarquons que dans l'expérience 2 et l'expérience 1 les poids moléculaires sont partagés entre les PME et les THPM avec dominance pour les PME dans l'ordre du poids moléculaire du marqueur "anhydrase carbonique". Nous pensions qu'avec des injections journalières mais équivalentes, on pourrait maintenir la synthèse de la Mtn à un niveau nettement repérable. Il est possible que la première dose donnée sur une courte période, ait été trop massive puisque nous sommes en situation de DL50 (192 h).

TABLEAU 18 . Poids moléculaire des métalloprotéines associées aux pics de cadmium après élution du surnageant 100 000 g du tissu hépatique, Expérience 3 .

#	THPM	PME	FPM
Expérimental			
2 injections			
E-33	69 183	30 199	16 754
1 injection			
E-36	69 183	36 307	19 952
Solution			
E-44	71 716	24 831	18 085
Témoin(exp1)	44 668	28 183	15 135

Il y a quatre phases dans la séquence de contamination décrites dans la littérature, (Azeez, *et al.*, 1985; Klaverkamp, *et al.*, 1984; McCarter *et al.*, 1982; Samarawickrama, 1979; Webb, 1975) soit :

- 1- Le cadmium est lié d'abord au PME
- 2- Il y a formation de la Mtn
- 3- Il y a saturation de la Mtn avec des métaux en excès (ex : Cd)
- 4- Il y a débordement dans la fraction à PME .

Les résultats obtenus nous portent à penser que nous sommes bien dans la phase 4 où le cadmium est associé surtout à la fraction THPM et PME, puisque les courbes de cadmium sont légèrement décalées vers la gauche lors de situation de contamination aiguë .

6-1.2 Relation Cadmium - Zinc

TABLEAU 19. Présence relative du cadmium et du zinc dans le tissu hépatique, (valeurs moyennes en ppm pour les 3 expériences).

	Cd Total	Zn Total	Cd / Zn	Ecart-type (δ)
Témoin	0,127	6,930	0,017	0,006
Expérience #1	8,640	8,580	1,007	0,151
Expérience #2	0,100	6,270	0,016	0,052
Expérience #3				
1 Injection	7,183	1,133	6,340	6,922
2 injections	7,176	1,100	6,524	7,198
Solution	0,153	0,539	0,321	0,042

Nous tirons du tableau 19 que le cadmium dans les tissus se présente en quantités importantes pour l'expérience 3 et que le zinc semble être en nette déficience. Ces valeurs nous montrent bien qu'il s'agit ici d'un déséquilibre ionique causé par le cadmium. Cette expérience est une expérience de dose létale 50 peu commune (192 h) et conséquemment le système de détoxification des poissons ne semble pas avoir eu le temps de s'acclimater aux doses reçues. Dans le test des poissons exposés au cadmium en solution dans l'eau, nous obtenons des valeurs légèrement supérieures en zinc par rapport au cadmium pour cette courte période d'exposition (8 jours). Les résultats de toxicité aigüe réflètent une situation de contamination excessive et spontanée et on s'attend à une

réponse exprimée par une situation de débordement tissulaire (situation en phase 4 décrite précédemment) .

Dans le cas d'expériences sous-létale (expérience 1) et en milieu naturel (expérience 2) le comportement du zinc et du rapport Cd / Zn semblent à dominer dans ces situations . Nous constatons que le rapport Cd / Zn moyen (calculé à partir des valeurs du tableau 19) pour les injections est $\approx 6,50$ pour le foie et change dramatiquement dans une situation de toxicité aiguë (expérience*3) par rapport à une expérience sous-létale (1,007) ou en milieu naturel (0,017) ou tout simplement exposé au Cd en solution dans l'eau (0,321) . Ici on peut supposer un déplacement du zinc par le cadmium puisqu'on observe une déficience importante en zinc dans les tissus comparativement aux expériences *1 et *2 ou il y avait plus une cohabitation des ions Cd-Zn . Nous pensons que les doses de cadmium ont altéré les mécanismes de régulation puisque nous obtenons une variation importante dans l'expérience 3 .

6-1.3 Analyse statistique

Nous avons traité les données de l'expérience 3 avec les tests de variance sur la variabilité du poids des tissus, régression simple, corrélation de Kendall, test du μ et facteur de bioconcentration comme dans le cas des expériences précédentes (expériences 1 et 2) .

TABLEAU 20 . Valeurs globales des tests de μ et du coefficient de Kendall,
Expérience 3 .

Tissus	Test μ $ Z_{obs} =$	Cf.Kendall $Z_t =$
F	5,249	-0,252
R	5,366	0,268
G	0,020	0,382
Pds	5,101	0,165
G/S	2,625	0,458
H/S	4,380	0,833
FK	3,524	0,550

H_0 = Témoins = Expérimentaux

H_1 = $T \neq E$

$|Z_{obs}| \geq Z_{\alpha/2} \Rightarrow$ rejet de H_0

Valeurs critiques $Z_{\alpha/2} = 1,96$ pour $\alpha = 5\%$ et $2,57$ pour 1% -bilatéral
 $1,64$ " $\alpha = 5\%$ et $2,33$ " 1% -unilatéral

TABLEAU 21. Valeurs intragroupes des tests de μ et du coefficient de Kendall, Expérience 3.

Tissus	2 inj / 1inj		2 inj / sln		1 inj / sln	
	Test μ	Cf.Kendall $ Z_{obs} =$	Test μ	Cf.Kendall $ Z_{obs} =$	Test μ	Cf.Kendall $ Z_{obs} =$
F	10,531	-1,178	10,927	-0,451	10,320	
R	10,877	0,577	11,173	0,162	10,800	
G	11,013	-0,128	10,174	0,462	11,381	
Pds	10,962	0,990	11,042	-0,451	10,265	
G/S	11,974	-0,742	10,116	1,051	12,013	
H/S	11,012	-0,742	10,810	-0,451	11,218	
K	10,481	-0,495	10,347	-0,751	10,265	

$H_0 = 2 \text{ injections (2 inj)} = 1 \text{ injection (1 inj)} = \text{solution (sol)}$

$H_1 = (2 \text{ inj}) \neq (1 \text{ inj}) \neq (\text{sol})$

$|Z_{obs}| \geq Z_{\alpha/2} \Rightarrow \text{rejet de } H_0$

Valeurs critiques $Z_{\alpha/2} = 1,96$ pour $\alpha = 5\%$ et $2,57$ pour 1%

* inj = injection , sln = solution

TABLEAU 22 . Test de régression simple dans les tissus, entre expérimentaux : 2 injections, 1 injection et exposé en solution dans l'eau .

	R	Erreur standard	Test - F	Coefficients de variation			
				t	2 inj	1 inj	sol
Foie	0,033	1,014	0,016	0,127	31,31	45,49	46,87
Rein	0,074	0,280	0,082	0,286	24,35	40,23	40,12
Gonade	0,165	0,796	0,420	0,648	73,73	59,26	89,06
Poids total	0,041	43,201	0,026	0,160	22,53	34,38	33,85
G/S	0,224	0,389	0,792	0,890	68,46	32,51	73,60
H/S	0,267	0,291	1,150	1,072	14,66	18,33	47,28
Facteur K	0,020	0,092	5,798E-3	0,076	10,84	6,41	7,48

R = corrélation de la régression

Le tableau 20 nous présente les résultats . Nous acceptons H_1 , l'hypothèse alternative où le Témoin > Expérimental, ce qui signifie que les poids des tissus témoins sont supérieurs à ceux des expérimentaux excepté pour le cas des gonades où il ne semble pas y avoir de différence significative . Les coefficients de variation du tableau 22 appuient le test de μ en ce qui concerne les variations intragroupes, par contre le coefficient de Kendall ne précise en rien ces différences.

Au tableau 21 nous pouvons distinguer la comparaison intragroupe entre les tissus des expériences à 2 injections, 1 injection et de cadmium en solution dans l'eau . Nous n'observons aucune différence significative entre les tissus des différents échantillons de l'expérience 3 excepté au niveau des gonades .

Le coefficient de Kendall (tableau 21) et la régression simple (tableau 22) nous indiquent que les tissus sont indépendants et ceci est confirmé dans l'analyse des tissus par des valeurs tac inférieures à la valeur critique de

la table $t = 2,043$, $\alpha = 5\%$; pareillement pour les valeurs de $F_c < F_{table} = 2,33$ pour $\alpha = 5\%$. Les coefficients de variations présentés (Tableau 22) appuient à nouveau l'indépendance des tissus.

Les résultats du facteur de bioconcentration dans les tissus des poissons ayant reçu 2 injections et 1 injection sont présentés comme suit :

$(FBC_{Cd}) = 2$ injections : foie : 15,6 > rein : 4,2 > gonades : 3,7 > peau : 0,7 > branchie : 0,6 > muscle : 0,1 .

$(FBC_{Cd}) = 1$ injection : foie : 18,6 > gonades : 3,4 > rein : 2,5 > peau : 0,8 > branchie : 0,7 > muscle : 0,1 .

Ainsi, lorsque qu'un tissu (ex.foie) est très contaminé, le facteur est élevé par rapport à d'autres tissus moins enclin à l'accumulation du cadmium (ex.muscle) . Le rein et les gonades semblent réagir fortement au cadmium. Il est probable qu'il se fait un transfert de l'ion métallique du foie vers le rein et les gonades . Le facteur de bioconcentration reste faible et constant pour les surfaces d'absorption ainsi que pour le muscle .

En comparant les résultats obtenus dans une expérience sous-létale (expérience 1) avec un (FBC_{Cd}) comme suit pour le foie : 7,1 > le rein : 1,5 > le muscle : 0,1 d'avec ceux de l'expérience #3 en situation de toxicité aigüe, nous constatons que le calcul du facteur de bioconcentration (FBC_{Cd}) confirme d'une part le niveau de saturation dans le tissu hépatique (expériences 3 vs 1); les variations au niveau du rein, la stabilité dans le muscle, les branchies et la peau (expérience #3). Finalement le FBC dans les gonades semble équivalent concernant l'expérience à injections (expérience #3).

6-1.4 Toxicologie au cadmium et comportement

En procédant à une expérience de DL_{50} (192 h)(expérience 3), nous obtenons des comportements nettement plus marqués car les poissons ne semblent pas avoir le temps de s'acclimater au contaminant (Cd) .

Les comportements observés étaient les suivants : 1) un refus d'alimentation au début de l'expérience 2) un semblant de retour à la

normale à mi-chemin 3) subséquemment un arrêt total de l'alimentation 4) une nage erratique et finalement 5) la mortalité.

Le tableau 23 montre bien que nous sommes en situation de DL50 (192 h) par la mortalité de 50% des spécimens et que les effets biotiques de la contamination sont apparents et permanents.

TABLEAU 23. Contamination au chlorure de cadmium et effets biotiques,
Expérience 3.

Effets biotiques de la contamination				
	Témoin	1 injection	2 injections	Solution
Poids	-	-	-	-
Longueur	-	-	-	-
H/S	-	-	-	-
G/S	-	-	+	-
Facteur K	-	-	-	-
Alimentation	-	+	++	-
Nage	-	+	++	-
Mortalité	-	+	++	-

+ Effet apparent
- Aucun effet apparent

6-2 DISCUSSION

6-2.1 Caractérisation des métalloprotéines

Dans une situation expérimentale de toxicité aigüe, DL50 (192 h) où 26 individus ont décédé en 4 jours sur un total de 50 spécimens, il nous apparaissait important de suivre la répartition du cadmium dans les tissus .

Selon Gelber, *et al* (1985), les tests de toxicité aiguë permettent de détecter facilement l'effet délétère d'un produit toxique sur des organismes pendant une courte période de temps dans des conditions contrôlées . La période de mortalité est un standard d'exposition à un contaminant requis pour démontrer l'action létale d'un contaminant, toutefois la durée du test varie . C'est précisément ce que nous avons constaté . Certains cas de mortalité peuvent être dûs ici en partie à la variation individuelle, car les plus petits poissons subissent un stress plus important et meurent plus rapidement .

Nous constatons que les gonades et le rein accumulent aussi beaucoup de cadmium, probablement par transfert à partir du tissu hépatique puisqu'il est le site préférentiel du cadmium . Lors de l'élaboration des gamètes femelles, une bonne partie des substances de réserves est formée dans le tissus hépatique et transportée dans les gonades par voie sanguine . Il est possible de penser que l'entrée du cadmium dans le foie et sa complexation avec des protéines présentes ou synthétisées dans le foie (protéine de réserve) qui éventuellement sont transportées dans les gonades, entraîneraient une accumulation du toxique dans celles-ci . Conséquemment la bioaccumulation du cadmium dans les gonades serait dépendante de l'état de gamétopréservation . Il est aussi possible de suggérer que la présence du cadmium dans le foie devrait diminuer si le trafic de ces protéines complexées au toxique vers les gonades est important . Si cela s'avérait le cas, on pourrait faire l'hypothèse que les mécanismes d'incorporation physiologique des substances de réserve dans les gamètes (récepteurs et transporteurs) pourraient être utilisés par les complexes protéines-cadmium favorisant ainsi l'entrée du toxique dans les gamètes .

Au niveau des parties comestibles comme le muscle, la contamination reste à un niveau basal ce qui équivaut à des valeurs contrôles.

Dans l'expérience 1 nous avions débuté l'expérimentation par de petites doses injectées de façon assez distancée et en augmentant les doses progressivement. Après quelques temps nous obtenions une sorte d'acclimation chez les poissons. Plusieurs études (Larsson et Haux, 1982; Thomas, *et al.*, 1985) sur les poissons ont montré qu'il existe un équilibre entre concentration de cadmium dans l'eau testée et les tissus. Elle s'effectue 1 à 2 mois après exposition.

Il semble que nous ayons aussi trouvé un seuil de concentration de saturation en cadmium pour le foie car les valeurs en ppm sont relativement égales (expérience 1, expérience 3) :

Expérience 1 μ = 8.643 ppm Cd

Expérience 3 μ = 7.183 1 injection

μ = 7.176 2 injections. Gelber, *et al.*, (1985) avancent que ces expériences de toxicité aigüe comportent des limites en ce sens que cela ne renseigne en rien sur les effets sous-létaux ni sur l'accumulation dans les divers tissus touchés. Toutefois à partir de cette expérience (expérience 3), nous avons déterminé un patron de distribution du cadmium dans les tissus effectivement différent des expériences précédentes. Ceci permet aussi de distinguer les tests de toxicité subaiguë et aiguë.

En milieu naturel (expérience 2) on obtient la distribution suivante du cadmium dans les tissus : Rein > Branchie > Peau > Foie > Gonade > Muscle. Dans l'expérience de toxicité exposé au cadmium dans l'eau, les tissus présentent un patron différent soit : Gonade > Rein > Peau > Branchie > Foie > Muscle. Les gonades semblent touchées en premier, le rein est important mais le foie ne présente pas de fortes concentrations. Il reste que lorsque les poissons sont exposés au cadmium en solution dans l'eau, le rein est l'organe prioritaire et les autres tissus sont inefficaces dans la séquestration du cadmium.

Si nous regardons les résultats pour une même contamination du foie, la concentration dans le rein n'est pas la même pour les expériences 1 et 3. On

pourrait penser plutôt à un débordement dans l'expérience 3, qui entraînerait au niveau de l'intestin ou du rein un recyclage du complexe protéine-cadmium qui n'est pas excrété et tend à s'accumuler au niveau du rein.

En chromatographie d'exclusion nous pensions obtenir de forts pics d'absorbance à 250 nm (Mtn) combinés à l'absorption atomique (Cd) en rapport avec la contamination et étant susceptible d'être représentés par des protéines à FPM. Nous obtenons à la place une nette dominance des protéines à PME avec un cadmium prépondérant dans les protéines à THPM. D'après Coombs (1979), les réactions enzymatiques changent au bout de 8 jours dans la cérouloplasmine, et après 14 jours elles diminuent dans le foie. Nous supposons donc que l'activité enzymatique était en phase de transition. Si nous avions continué d'injecter et de récolter des spécimens après le 8 ième jour, il est tout probable que la Mtn ou métalloprotéine en question se serait révélée importante dans le foie et dans les autres tissus selon l'ordre d'importance de la distribution du cadmium. Nous supposons aussi que dans cet état de transition, l'albumine dans le sérum jouerait un rôle important et l'anhydrase carbonique aussi. Bremner (1979) suggère plutôt que le cadmium est davantage lié à la gamma-globuline plus que l'albumine *in vivo*. Il semble aussi que l'induction est moins efficace lorsqu'on effectue la contamination avec des doses trop massives au départ.

Le système d'induction et de détoxification est moins efficace dans les poissons comparé à celui des mammifères. Il reflète le fait que les poissons vivent dans un environnement dans lequel les toxiques sont dilués. De ce fait cela réduit la réponse des enzymes au défi des xénobiotiques. Même sous des conditions optimales, les poissons démontrent des activités enzymatiques plus faibles que chez les mammifères. La signification réelle de la biotransformation des enzymes par les xénobiotiques dans les poissons n'a pas été étudiée intensivement. Dans quelques cas, le métabolisme des xénobiotiques par les poissons est connu comme affectant sa toxicité et il est possible que la basse activité des enzymes caractéristique des poissons soit suffisante pour la disposition des concentrations de toxiques que les poissons rencontrent normalement (Chambers et Yarbrough, 1976).

Des réactions d'inhibition au cadmium seraient dues à la fixation du métal sur des sites nucléophiles des enzymes. De nombreux effets biochimiques du cadmium résultent de sa capacité de se fixer sur des sites nucléophiles (groupes sulphydryles). D'un point de vue toxicocinétique, l'induction des enzymes de biotransformation devrait résulter en un taux plus rapide d'élimination et de diminution de la toxicité et de la bioaccumulation. En contraste, l'inhibition de ces enzymes résultent en une augmentation de la toxicité et en bioaccumulation des xénobiotiques. Le cadmium est un métal qui exerce cet effet dans les organismes aquatiques (Förlin, *et al.*, 1985).

Nous suggérons que la biosynthèse de la thionéine n'a pas eu le temps de se faire puisque la moitié des poissons sont morts mais plutôt d'autres protéines similaires (iso-Mtn) ont servi de site d'interaction. Nous observons une certaine constance à travers ces expériences c'est-à-dire que les protéines à PME sont dominantes partout. Leber et Miya (1976) soulignent qu'en utilisant un profile d'élution typique de G-75, que la majeure portion du cadmium soluble est lié à une macromolécule (Cd-P) de l'ordre de 69 000 PM dans une situation de LD50 chez la souris.

Les spécimens ayant séjourné dans l'eau en présence du cadmium en faible concentration et n'ayant reçu aucune injection de Cd, démontrent une réaction similaire à ceux du milieu naturel.

Selon Karin (1985), après une exposition à un métal toxique, le niveau basal de la Mtn devrait être relativement élevé si la Mtn a un rôle protecteur. La Mtn ici pour l'expérience 3 (exposition au Cd dans l'eau) est probablement restée à des concentrations minimes et par conséquent non induite.

Il est possible que les différences de réponses à l'exposition au cadmium soient dues surtout à l'abondance relative des protéines à fixation métallique (Cd) dans les organes du foie et du rein ou à une distribution inégale du cadmium dans l'organe ou à d'autres mécanismes. Les processus biologiques au niveau cellulaire aboutissent souvent aux mêmes résultats dans des conditions différentes car les cellules n'inventent pas de nouveaux mécanismes mais utilisent plutôt ceux qu'elles ont. La séquence des 4 phases dans saturation des poids moléculaires décrite en section 6-1.1(métal vs protéine), n'est pas donc exclusive à la toxicité aigüe.

Hamilton (1985) rapporte que dans les expériences de Thomas, *et al.* (1983-1985), le cadmium environnemental n'est pas séquestré ce qui implique la non-effectivité de la Mtn dans un rôle de protection selon leur condition de contamination. Par contre Bouquegneau, *et al.* (1983) confirment nos résultats, la prépondérance des métalloprotéines à PME et THPM et la probabilité de se situer dans la phase 4 de la séquence d'induction de métalloprotéines.

6-2.2 Compétition Cadmium - Zinc

Le tableau 19 présente des variations importantes de concentration en zinc pour l'expérience 3 par rapport aux expériences 1 et 2. La méthode de contamination (2 injections, 1 injection et ou en exposition au cadmium en solution dans l'eau) y jouerait un rôle. Ce qui est frappant c'est cette déficience en zinc. On sait que la Mtn joue un rôle dans le métabolisme intra et extra cellulaire dans le contrôle du zinc et du cuivre et que le niveau du zinc règle le taux de Mtn produite. Ainsi lorsque le zinc est en faible quantité la Mtn serait dégradée rapidement (Karin, 1985). Ceci pourrait réfléter en partie ce qui s'est produit au cours de cette contamination (2 injections, 1 injection).

Il aurait été intéressant de tester le cuivre en particulier pour cette expérience car Roch, *et al.* (1982) expliquent que le cuivre est toujours dominant dans les fractions à PME et à FPM. Il déplace fortement le zinc et doit compétitionner avec le cadmium pour les sites d'interaction.

Thomas, *et al.* (1985) rapportent que le cadmium dans la truite arc-en-ciel est incapable de déplacer le zinc et le cuivre provenant de la Mtn endogène, excepté lorsqu'on introduit de grandes quantités de cadmium. Ici les valeurs injectées ont dépassées la capacité des tissus et les spécimens n'ont toujours pas pu s'acclimater.

Aussi Day, *et al.* (1984) proposent que la "de novo thionein synthesis" n'est pas requise pour une courte période d'incorporation du cadmium et du mercure dans la Mtn. Toutefois, le déplacement du zinc s'effectue dans la

zinc-thionéine déjà existante. Il faut donc que les spécimens subissent une préexposition au cadmium ou au mercure où le métal doit saturer la Mtn existante. La synthèse de la thionéine n'est pas impliquée dans l'incorporation du cadmium au niveau basal. Si la zinc-thionéine est trop faible, il n'y a pas de synthèse de Mtn. Cela ne veut pas dire qu'il n'y a pas de cadmium dans l'animal car le zinc n'altère pas la distribution du cadmium dans les tissus. Ainsi les déplacements du zinc de la Mtn par le cadmium protègent la cellule durant les premières heures avant que l'induction de la Mtn atteigne un niveau élevé c'est-à-dire comportant la capacité de liaison et d'enlèvement de grandes quantités de métal exogène. La synthèse de la Mtn se produit lorsque le tout le zinc mobilisé est accrue dans le foie par l'intermédiaire d'enzymes hormonales.

Donc un changement dans la Mtn réflète son implication dans le contrôle général des processus de prolifération cellulaire et cela s'effectue à travers la régulation du zinc intracellulaire. Sa perturbation peut aussi être un facteur de néoplasie (Karin, 1985). Selon Day, *et al.* (1985), le cadmium du foie incorpore le cadmium dans la MTn de la même façon que le zinc perd de la Mtn, ce qui implique un remplacement et une cohabitation des ions métalliques. Il apparaît que ce qui est retenu dans le cytoplasme dans le cas d'un animal non-préinduit du métal exogène déjà saturé de Mtn existante, c'est le lien avec des protéines à PME. C'est précisément ce que nous observons.

Nous supposons ici dans l'expérience 3, qu'il y a bien eu un déplacement suffisant pour que le zinc soit en nette déficience comme complexe métalloprotéinique surtout si nous considérons le rôle critique que joue le zinc dans le fonctionnement de certains enzymes tel l'anhydrase carbonique. Il est probable qu'en réponse au stress, la Mrn n'a pu être formée en quantité suffisante.

Lorsqu'un changement de contenu d'éléments dans un tissu ou du patron subcellulaire de distribution du métal survient, cela nous prévient habituellement que des interactions antagonistes sont en opération. La multiplicité des interactions implique des effets antagonistes et peut être explicable parce que la protéine MTn-type peut lier simultanément les

cadmium, zinc, cuivre en proportions différentes; on croit que cela réduit la visibilité de la détection de la MTn. Il est possible que nous ayons une MTn mixte avec différents métaux. L'effet sur la rétention ou la perte d'élément serait fonction du taux de dégradation ou de biotransformation du produit résultant et de l'affinité de la protéine pour le métal (Hoesktra, *et al.*, 1974).

Kraker, *et al.* (1988), avancent que dans des cellules déficientes en zinc, la MTn-similaire apparaît exister comme une apoprotéine. La MTn serait le principal donneur de zinc à l'apoanhydrase carbonique ajouté au cytosol dans les cellules de Ehrlich dans le foie chez la souris. Donc la Zn-MTn est le dépôt labile de Zn dans les cellules de Ehrlich qui peut être mobilisé sous des conditions de déficience en zinc.

Il appert que l'identification de l'apo-Cd-P, protéine comme apo-MTn est incertaine sans caractérisation ultérieure ou purification subséquente.

6-2.3 Variation pondérale des organes et de la contamination au cadmium

Selon Haux et Larsson (1984), lors d'une contamination au cadmium, une réduction de la taille du foie est initialement observée.

Ceci n'a pu être observé dans les expériences précédentes : chronique et subaiguë car les tissus retournent à la normale après un certain temps et il se produit un équilibre entre les concentrations de cadmium des tissus après une période d'exposition. Par contre au tableau 20, nous pouvons voir que le poids des tissus des expérimentaux sont inférieurs à ceux des témoins mais dans les tests intragroupes de cette même expérience (Tableau 21, spécimens injectés et en exposition dans l'eau), le poids présente des différences non significatives dans les tissus.

Les coefficients de corrélation de Kendall (tableau 21) et de régression (tableau 3) confirment de façon générale cette relation, excepté pour les gonades et le rapport G/S. Les tests Fc et tac sont en dessous des valeurs des tables (où $F = 2,33$ et $t = 2,043$) pour un même α de 5%. Ceci est probablement dû à la grande variation individuelle des tissus qui est

démontrée par les coefficients de variation au tableau 22 et à une distribution inégale du cadmium dans les tissus .

Le facteur de bioconcentration (FBC) exprime la relation cadmium-tissu par une majoration du cadmium allant jusqu'à 18,6 pour le foie, 4,2 dans le rein et 0,1 pour le muscle comme valeurs maximales dans les tests à injections . Il n'y a pas de facteur de bioconcentration dans le test d'exposition au cadmium en solution dans l'eau car les valeurs de concentration du cadmium en solution sont trop faibles .

Ces valeurs confirment de façon générale l'ordre de concentration du cadmium total moyen dans les tissus suivants Foie > rein > muscle pour les expériences à injections (exp. 1 et 3) .

Le facteur de bioconcentration a été toutd'abord élaboré pour tenir compte de l'incorporation progressive et l'accumulation subséquente des toxiques dans les cellules . Aussi pour évaluer la bioconcentration exacte lors d'injection intrapéritonéale, par rapport aux cellules, il faudrait connaître le facteur de dilution sanguine. Dans ce cas-ci il n'est pas vraiment possible de prédire cette dilution; le (FBC_{Cd}) reste donc une bonne approximation .

Lors d'exposition au cadmium en solution dans l'eau, le facteur de bioaccumulation ou de bioconcentration, se réfère davantage à la chaîne alimentaire soit l'ingestion d'un grand nombre de particules contenant un peu de toxiques et aboutissant à une accumulation via la voie digestive .

Lech et Bend, (1980) traitent de la relation de biotransformation et de toxicité d'un toxique dans les poissons . Ainsi à un état de stabilité, le taux de changement d'un toxique auquel un poisson est exposé [F] est directement proportionnel à l'entrée du cadmium K1 et de la concentration de l'eau [W] du toxique et inversement relié au taux de biotransformation constant K2 et K3 (sortie ou enlèvement du toxique) . Ainsi l'équation suivante présente un modèle de dynamique d'un toxique lorsqu'il y a persistance et bioaccumulation ou bioconcentration dans le poisson : $[F] = [K1 / (K2 + K3) [W]]$ (équation 1). Ainsi, la cinétique du mouvement transépithelial de métaux tel le cadmium,dans la cellule (équation 1) est corrélé avec l'affinité de la Mtn . L'absorption du cadmium en premier lieu consiste en la liaison à une membrane de charge négative suivi de l'entrée intracellulaire

du métal en fonction de la concentration du métal diffusible dans la cellule (Foulkes et McMullen, 1987).

6-2.4 Effet de la contamination sur le comportement

Des observations de mouvements de nage erratique et d'agressivité sont notés dans cette expérience. Il est évident que la relation injections / stress-dominance ont eu un effet synergique pour finalement causer une mortalité de 50% de la population testée.

La plupart des organismes ont évolué de façon à s'adapter en développant des réponses de défense. Cependant lorsque les niveaux de stress et de concentration du toxique diminuent l'habileté de l'organisme à répondre, les espèces adoptent alors des comportements anormaux allant jusqu'à la survie de l'animal.

Nous savons qu'une préexposition à un métal lourd donne lieu à une meilleure acclimation face à des concentrations supérieures d'un même contaminant. Il serait donc possible d'obtenir des comportements marqués après acclimatation. Lorsqu'il y a excès d'un toxique, l'animal développe alors des comportements aberrants. Ceci nous indique qu'il y a eu dommage au niveau physiologique et biochimique des organes et du système nerveux. Les comportements les plus impliqués lors d'intoxication sont : la locomotion, l'alimentation, l'interaction sociale (territorialité, dominance, aggrégation etc.) (Rand, 1985).

Selon Benoit, *et al.* (1976), on remarque une hyperactivité au début du test, des mouvements de natation erratique et non-coordonnés et paralysie de quelques minutes. Finalement on ne peut citer ces observations qu'à titre indicatif et qualitatif pour cette expérimentation mais nous savons que les effets biotiques de la contamination ont eu un effet apparent et durable (tableau 23).

CHAPITRE VII

CHANGEMENTS MORPHOLOGIQUES

7.1 Généralités

Les résultats obtenus dans l'évaluation de la contamination au cadmium, de même que dans la détermination de la production de métalloprotéines nous indiquent que le tissu hépatique joue un rôle majeur dans le métabolisme des xénobiotiques inorganiques. Les changements du tissu hépatique induits par les substances chimiques ont été identifiés comme problème toxicologique depuis près de 100 ans (Zimmerman, 1978). Il fut reconnu très tôt que les blessures au tissu hépatique ne représentent pas une seule entité et que les lésions observées dépendent non seulement de l'agent chimique impliqué mais de la période d'exposition. Suivant une exposition aigüe on observe habituellement l'accumulation de lipides dans les hépatocytes, la nécrose cellulaire ou la disfonction hépatobiliaire alors que des expositions chroniques entraînent des changements cirrhotiques ou néoplasiques.

Des altérations biochimiques différentes peuvent mener au même résultat. Il ne semble pas y avoir un seul mécanisme de contrôle des changements dégénératifs chez les hépatocytes. Certaines formes de changement apparaissent réversibles alors que d'autres résultent en dommages permanents.

La mortalité associée avec différentes formes de lésions varie. La génèse des lésions diffère d'une espèce à l'autre et la relation dose - réponse n'est pas toujours claire.

Il n'est pas surprenant aujourd'hui que les toxicologues mettent souvent en doute l'effet de lésion hépatique à moins que celles-ci n'aient été décrites rigoureusement.

7.2 Considérations morphologiques et fonctionnelles

Comme nous l'avons indiqué dans un scénario (figure 1) en toxicologie naturelle comme en toxicologie expérimentale, le foie reçoit les toxiques tel le cadmium par voie sanguine. Aussi la façon traditionnelle de présenter les relations entre les cellules hépatiques et leur irrigation sanguine a été dans la configuration de lobules hexagonales. Il apparaît maintenant clairement que cette configuration ne correspond pas à l'unité fonctionnelle du foie. Par exemple l'injection de colorant dans la veine porte ou dans l'artère hépatique a montré que les vaisseaux terminaux afférents fournissent le sang seulement aux secteurs de lobules hépatiques adjacents. Ceci a conduit Rappaport (1979) à définir la masse parenchymateuse en terme d'unités fonctionnelles, les acini hépatiques. L'acinus hépatique simple consiste en une petite masse de cellules parenchymateuses irrégulières de forme et de taille, et arrangée autour d'un axe fait d'une veinule porte terminale, d'une artériole hépatique, d'un conduit bilaire, de vaisseaux lymphatiques et de neurones.

Le concept d'acinus montre qu'il existe des zones circulatoires dans chaque acinus. Rappaport (1979) en considère trois, dépendant de leur distance et des branches vasculaires terminales. Même s'il était commun de penser que les diverses cellules parenchymateuses dans le lobule hépatique possédaient la même spécificité fonctionnelle il est devenu évident qu'il n'y a pas uniformité (Gumucio et Miller, 1982).

Le concept d'hétérogénéité dans différentes cellules et dans différentes zones n'est pas encore complètement explicité. Cependant on peut déjà apprécier que le concept pourrait permettre de mettre un peu d'ordre dans les divers mécanismes qui semblent impliqués dans le développement de lésions hépatiques associées avec des agents hépatotoxiques. On peut citer en exemple de la non uniformité que nous trouvons beaucoup plus de cytochrome P - 450, d'hydrolase époxide et de transférase glutathione dans la zone 3 (Rappaport, 1979).

7.3. Résultats

Les analyses morphologiques ont été effectuées en considérant que les transformations peuvent se manifester au niveau des cellules comme au niveau subcellulaire.

En effet des mesures de diamètre cellulaire ont été réalisées sur le foie témoin et expérimental et les moyennes obtenues à partir de 30 échantillons témoins et de 30 expérimentaux (tableau 9) démontrent qu'il ne semble pas exister de différence significative entre les hépatocytes témoins et expérimentaux.

Par contre l'analyse subcellulaire est beaucoup plus révélatrice. Nous avons résumé dans un tableau (tableau 24) les principaux résultats de cette analyse, présentant ainsi les changements morphologiques causés par la contamination au cadmium chez les truites mouchetées expérimentales.

Dans l'analyse subcellulaire nous avons examiné 4 tissus : le foie, le rein, les gonades et le muscle. C'est dans le foie et le rein que les effets sont le plus marqués. Dans un premier temps lors d'une contamination sous-létale (subaigüe), l'examen du tissu hépatique, révèle une réorganisation du réticulum endoplasmique (figure 19) sous forme concentrique alors que chez le témoin, le réticulum se présente de façon rectiligne. Ceci pourrait être dû au jeune résultant de l'intoxication de la truite. On observerait donc ici un effet indirect du cadmium sur le foie. Ce phénomène semblerait une réaction commune à différente intensité d'intoxication au cadmium. Nous remarquons aussi un détachement des ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux. Ceci serait aussi fonction du niveau de contamination.

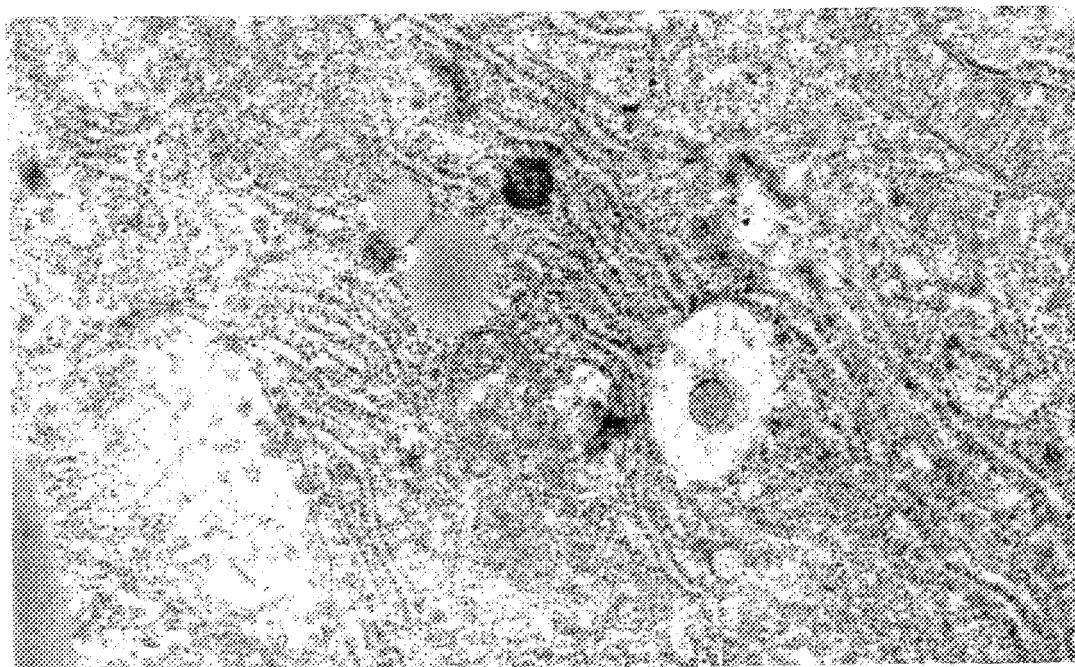
Un autre effet qui semble caractériser la contamination aux métaux lourds, c'est la déstructuration des mitochondries dans le foie (figure 20). Habituellement les mitochondries présentent 2 types de formes : oblongue et ronde, et leurs proportions sont équivalentes.

Lors d'un traitement au cadmium on retrouve pratiquement que des mitochondries de type rond d'après la littérature. C'est précisément ce que nous observons. De plus elles deviennent déstructurées, en ce sens qu'il y a réduction des crêtes, cela va même jusqu'à la rupture de la double membrane laissant ainsi s'écouler son contenu (matière condensée). On constate aussi un regroupement des mitochondries.

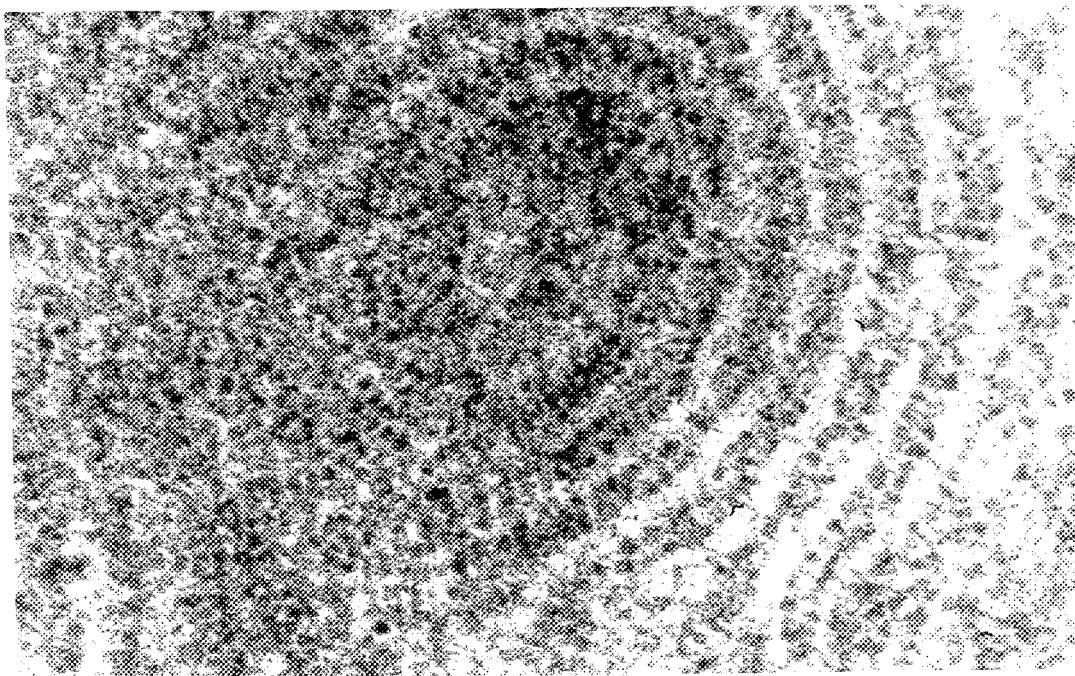
TABLEAU 24. Principaux changements morphologiques causés par la contamination au chlorure de cadmium ($CdCl_2$).

	Expériences de toxicité				
	Chronique	Subaiguë	Aiguë		
	F	R	M	G	
Accumulation membranaire	+		++	+	++
Augmentation du réticulum endoplasmique lisse	+		++		++ +++
Désorganisation des mitochondries	++		++ ++ +		+++
Dépôts cytoplasmiques	+		++		++
Vacuolisation de l'hétérochromatine			++		++
Réticulum concentrique			++		++
Réduction des organites cellulaires			++		++
Accumulation des lipides membranaires				+++	

*F = foie, R = rein, M = muscle, G = gonade

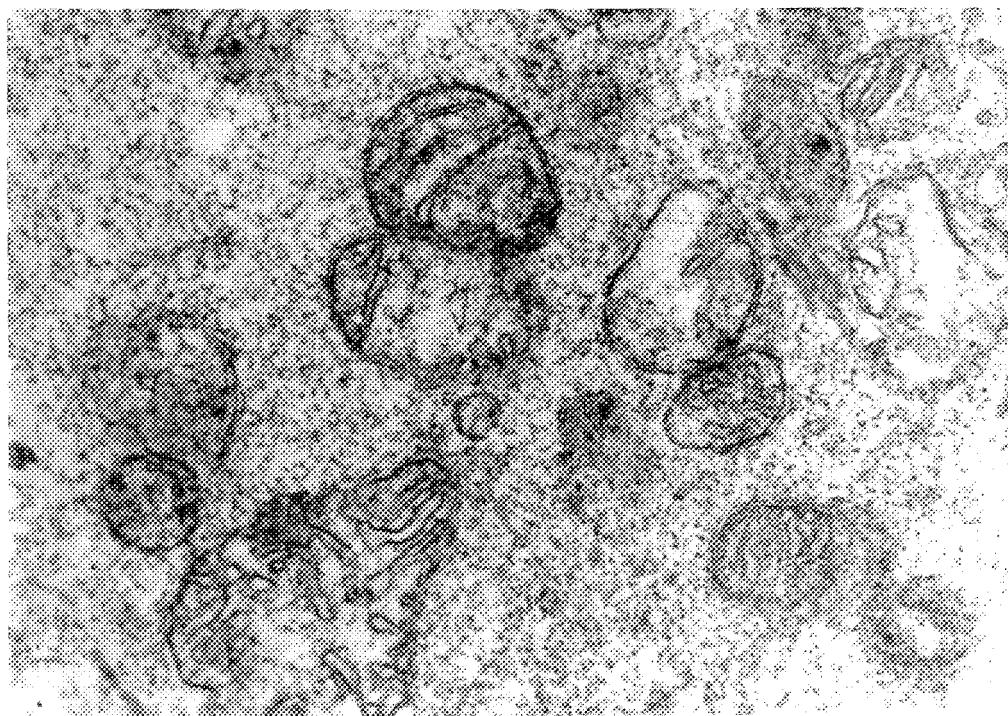


Foie Témoin

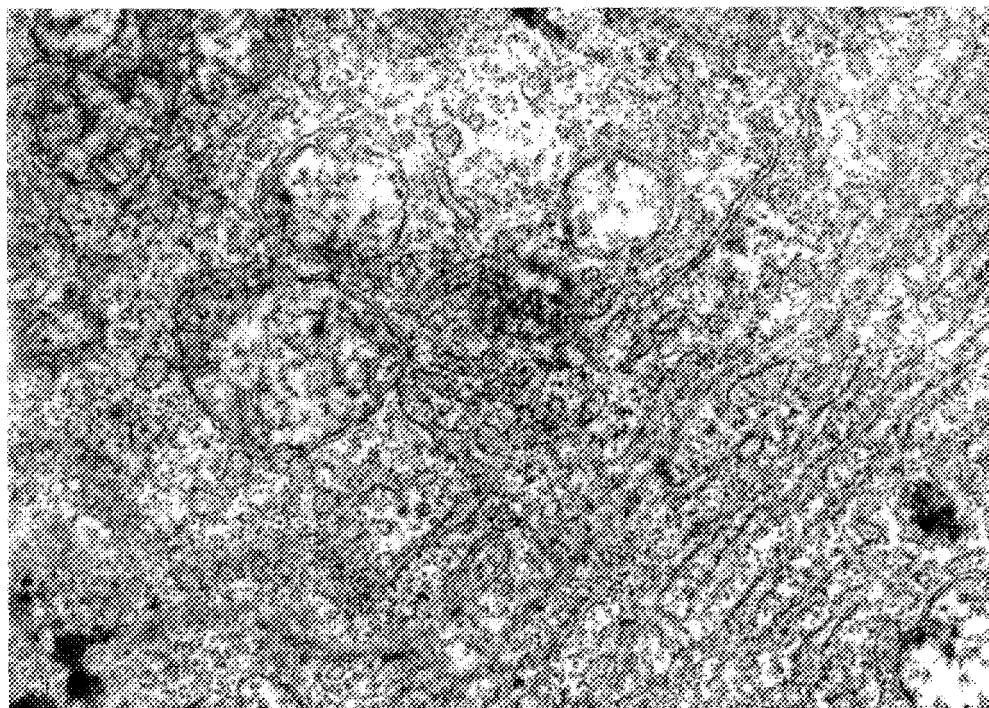


Foie Expérimental

Figure 19 . Réticulum endoplasmique concentrique,Foie Expérimental (63 000 X) et Foie Témoin (40 000 X) Expérience 1.



Foie Témoin



Foie Expérimental

Figure 20 . Déstructuration des mitochondries dans le foie expérimental (40 000 X), Expérience 3 et foie témoin (40 000 X), Expérience 1 .

Le tissu hépatique présente aussi certaines autres altérations telles : les accumulations membranaires (figure 21), vacuolisations et dépôts au niveau de l'hétérochromatine dans le noyau (figure 22). Au niveau du noyau il y a aussi perte de matière condensée. Les accumulations membranaires relèvent du système endosomal, système impliquant la dégradation de la nourriture et la transformation des protéines et organites de la cellule susceptibles d'avoir accumulé le cadmium. Pour se protéger et se détoxiquer, la cellule prend le chemin métabolique d'une suite de vacuoles de lysosomes primaires, secondaires et tertiaires et on observerait une augmentation de corps membranaire à ce moment là surtout dans les lysosomes tertiaires. C'est aussi une autre forme de storage de contaminants (métaux lourds).

Généralement lors de contamination, le rein présente une certaine nécrose au niveau subcellulaire, par granulation irrégulière. Les mitochondries sont aussi sévèrement touchées (figure 23). Cela implique la contraction et l'effacement des crêtes, la rupture de membrane augmentant ainsi le nombre de mitochondrie ronde et l'agglomération de celles-ci tout comme pour le foie. Dans le rein on peut voir aussi qu'il y a une importante augmentation du réticulum endoplasmique lisse impliquant la libération de nombreux ribosomes (figure 24).

Nous avons noté quelques autres altérations dans le muscle (figure 25) et dans les gonades (figure 26). Dans le muscle on rencontre aussi une désorganisation mitochondriale, storage de granules, accumulation membranaire et nécrose du tissu.

Chez les gonades femelles, une première observation consiste en la réduction des organites dans le cytoplasme. Ensuite vient la vacuolisation et le détachement partiel dans les lobules des ovaires qui sont moins nombreux et nous avons un bon nombre de globules de réserves. Si l'organisme est traité au cadmium, il y a augmentation des lipides surtout dans la région du noyau et la matière condensée est distribuée de façon variable.

En situation de contamination aux métaux lourds, nous reconnaissons qu'il existe des altérations tant au niveau de toxicité chronique, subaiguë qu'aiguë et nous constatons que ces effets sont amplifiés selon l'intensité de la contamination.

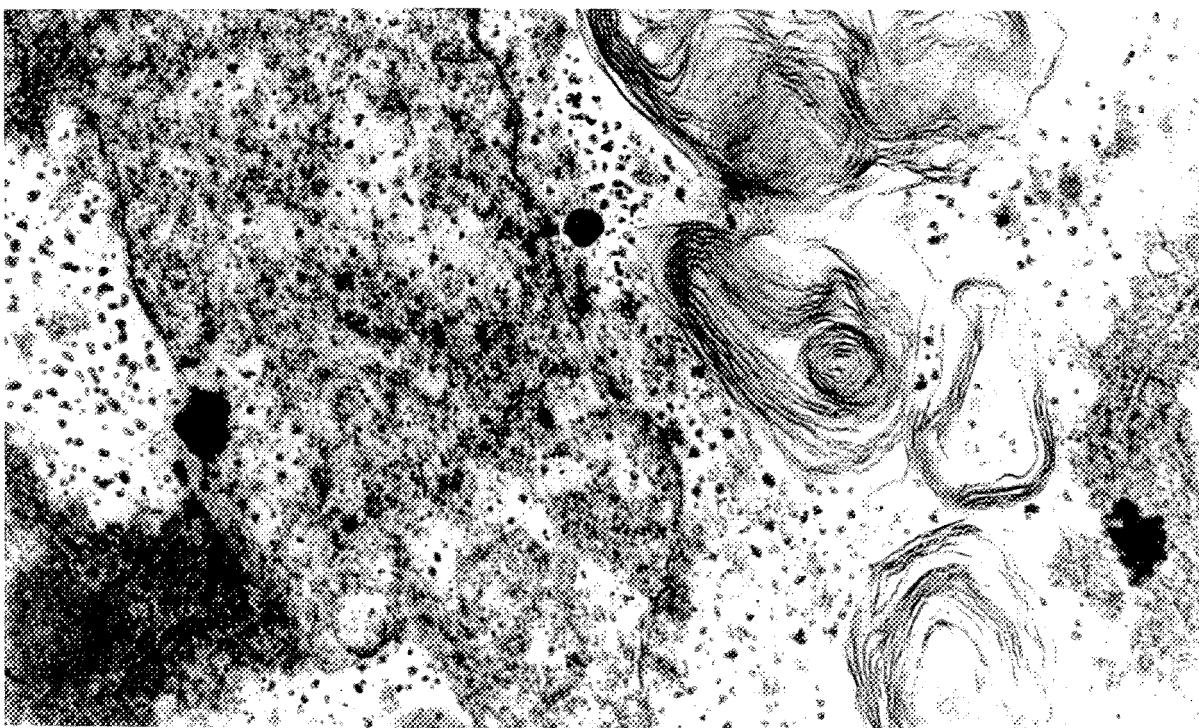


Figure 21. Accumulations membranaires dans le foie expérimental,
Expérience 2 ; (40 000 X)

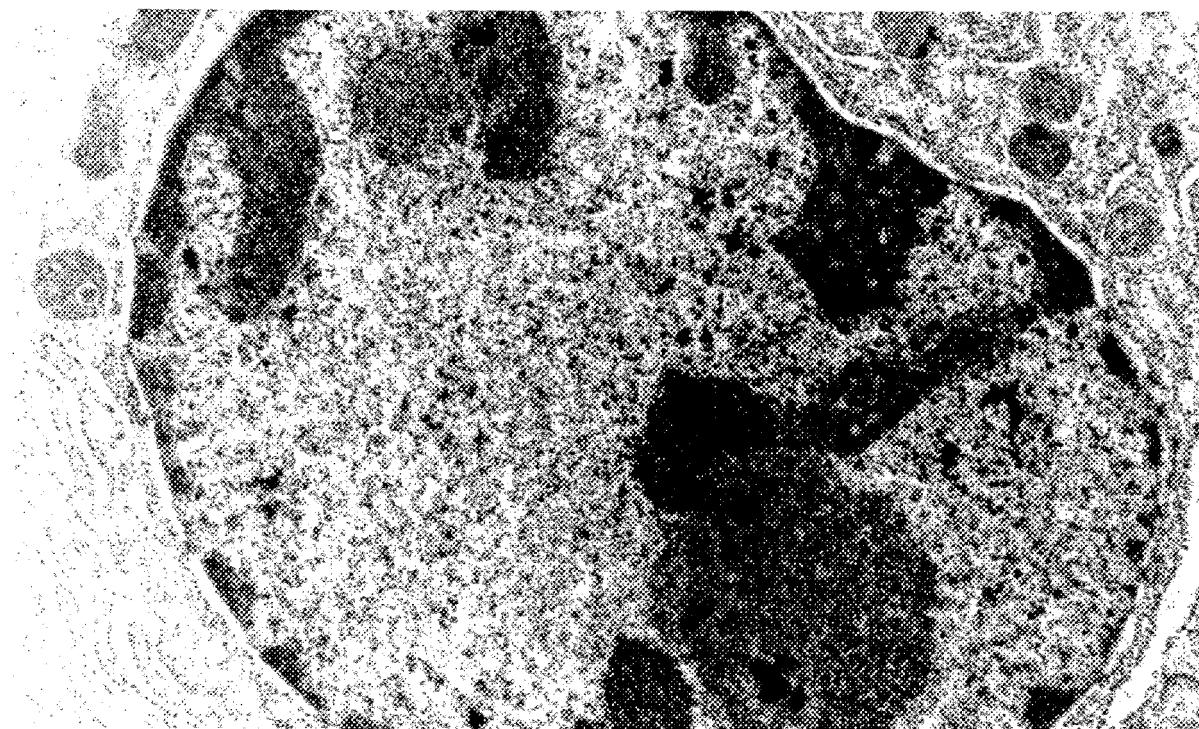


Figure 22. Vacuolisations de l'hétérochromatine du noyau du foie
expérimental, Expérience 1; (20 000 X)

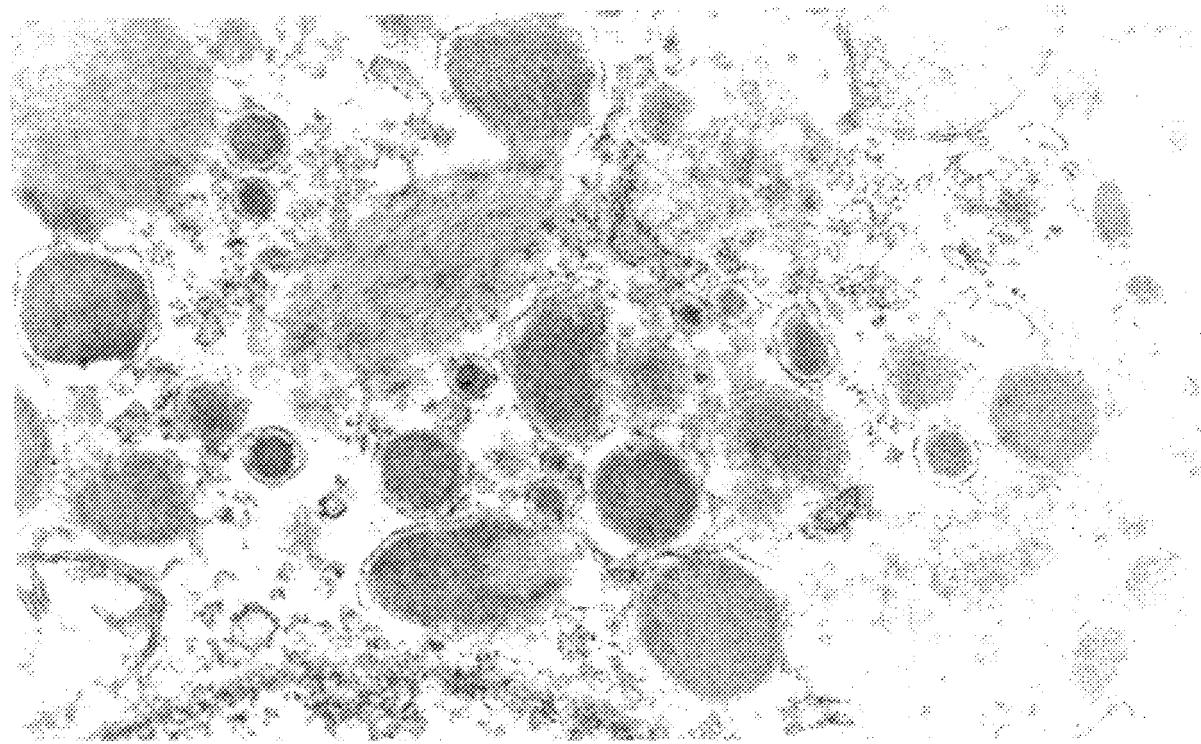


Figure 23. Déstructuration des mitochondries dans le rein expérimental ,
Expérience 1; (40 000 X)

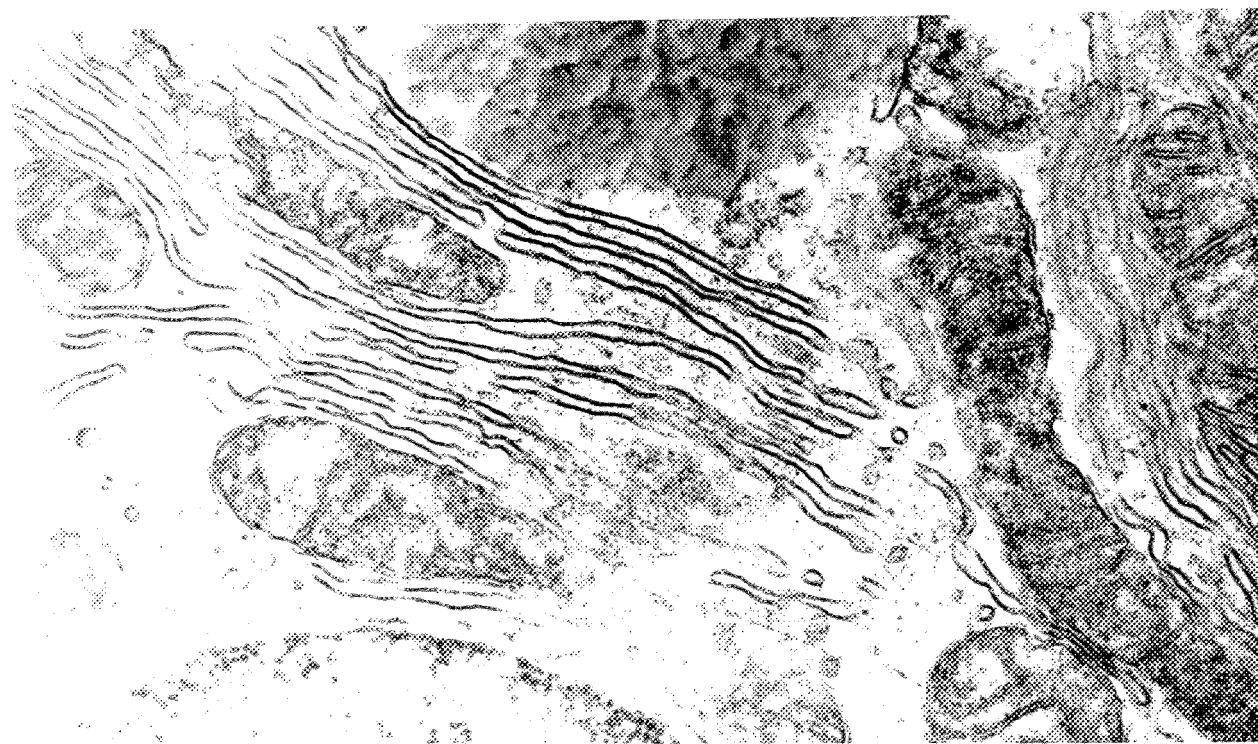


Figure 24. Augmentation du réticulum endoplasmique lisse dans le rein expérimental, Expérience 3 ; (40 000 X)

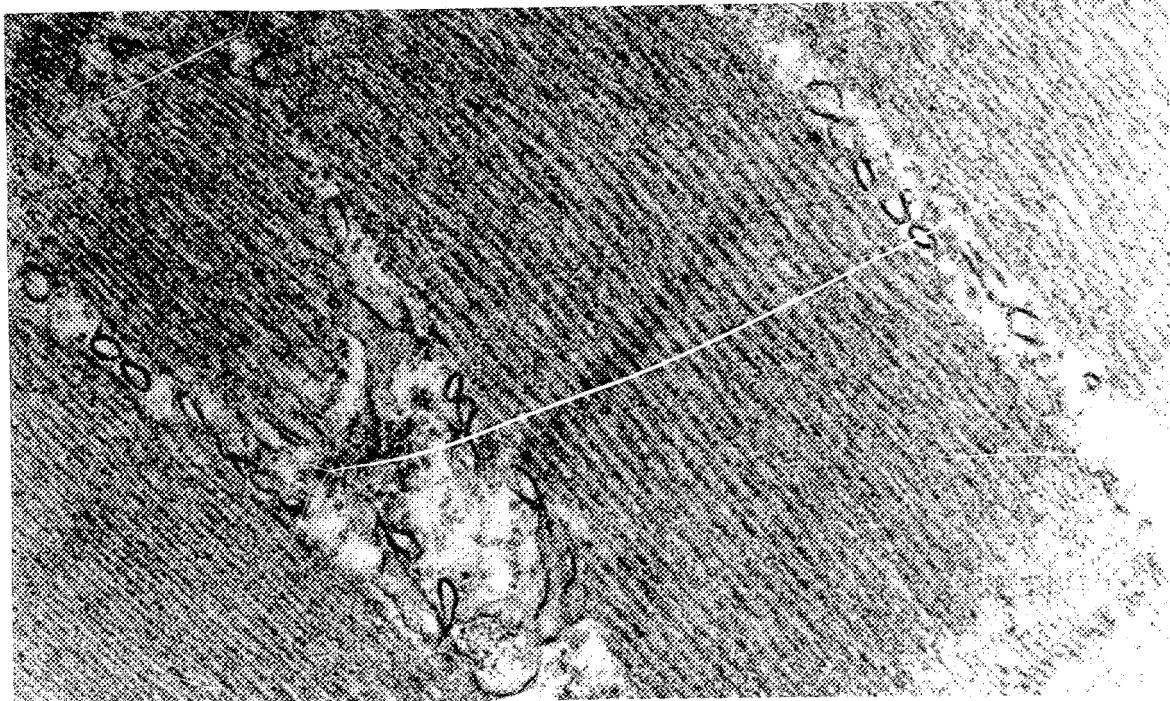


Figure 25 . Désorganisation mitochondriale dans le muscle expérimental,
Expérience 1; (60 000 X)

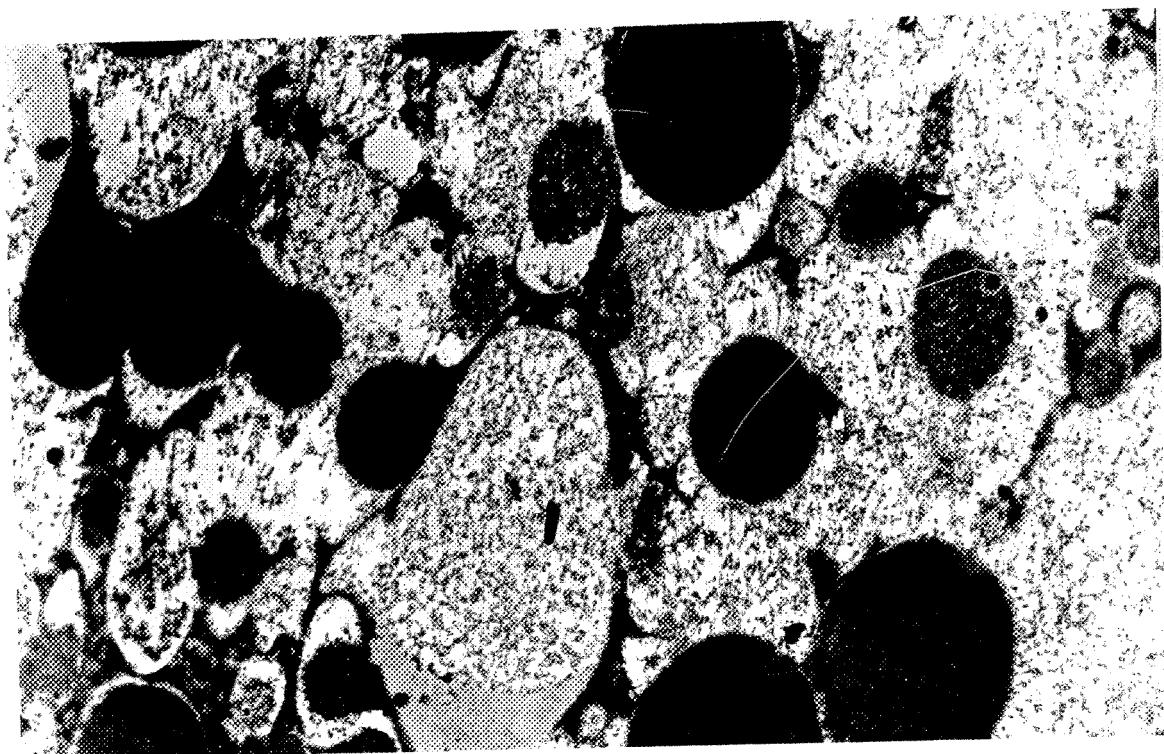


Figure 26 .Réduction des organites dans le cytoplasme des gonades femelles expérimentales, Expérience 1 ; (9 000 X)

7.4. Discussion

Dans le système de classification des changements histohépatiques dus à la toxicité , élaboré par Plaa (1986), on présente 5 types de réactions histopathologiques .

1- La première est appelée l'altération zonale hépatocellulaire et on y décrit des effets de nécrose ou d'accumulation lipidique . C'est probablement ce type de lésion qui a été le mieux décrit .

Nous pouvons observer certains de ces effets même à un niveau de toxicité relativement faible (expérience 1) .

2- Un deuxième type de réaction est nommée cholestase intrahépatique plutôt liée au blocage des canaux biliaires .

3- Une troisième catégorie est désignée comme la nécrose hépatique avec réponse inflammatoire . Nous n'avons pas observer de nécrose massive qui caractérise cette catégorie . Nous devons cependant noter que la désorganisation observée en toxicité aiguë pourrait mener éventuellement à une telle réaction .

4- Une quatrième classe correspond d'avantage aux effets que nous observons . Elle a été considérée comme un groupe de réactions non classables et touchant de façon générale à la réorganisation cytoplasmique (membranes, réticulum endoplasmique lisse, mitochondries) et nucléaire (vacuolisation) .

5- Puis un cinquième type qui est plutôt lié à la carcinogénèse . Nous observons pour notre part d'avantage un arrêt de la multiplication cellulaire (condensation chromosomique) que l'inverse .

On sait que les organismes marins évoluant dans des environnements contaminés , sont capables d'accumuler des taux élevés de métaux lourds

dans les tissus. Cette tolérance peut être due en partie à la présence de métalloprotéine intracellulaire. Lorsqu'on a un niveau élevé de métal en excès, l'habileté de la cellule à synthétiser des métalloprotéines peut être dépassée. C'est alors qu'il y aurait corrélation entre le développement de la pathologie et des métaux lourds (Jenkins, *et al.*, 1982).

Aussi l'altération de ces protéines refléterait une disfonction au niveau du tissu hépatique car le rôle du foie est de synthétiser les protéines du plasma dans lequel le cadmium est apporté par le sang et libéré par le plasma dans les tissus (Stowe, *et al.*, 1972). En ce qui concerne le tissu gonadique, les changements biochimiques peuvent impliquer une nécrose et une diminution significative de l'activité enzymatique (Samarawickrama, 1979).

Au niveau cellulaire et subcellulaire nous avons déjà cité pour la truite mouchetée quelques modifications morphologiques. Il appert qu'un traitement au cadmium provoquerait des lésions aux mitochondries qui deviennent hautement pleiomorphiques et ceci implique une diminution de leur efficacité fonctionnelle mais ne cause pas nécessairement la mort. L'inefficacité mitochondriale entraînerait à son tour un changement au niveau du métabolisme privilégiant certaines voies métaboliques plutôt que d'autres et l'accumulation de certains métabolites (exemple les lipides).

Dans le réticulum endoplasmique, le détachement des ribosomes suggère initialement que les protéines de synthèse sont diminuées avec un traitement au cadmium et présente comme effet indirect le bris des lipides. La présence de lysosomes autour de ces organites implique que les enzymes de digestion sont présents dans ces mêmes organites.

Il arrive qu'il y a réattachement des ribosomes; il y aurait reconstitution de synthèse mais de façon disproportionnée. On retrouverait une grande proportion de cadmium associé à la fraction particulée de la cellule et ceci est généralement associé aux lysosomes tertiaires. Le transfert du cadmium aux lysosomes (Samarawickrama, 1979 ; Vernberg, *et al.*, 1982) s'effectuerait par autophagie.

Il semblerait aussi que d'autres protéines telle l'albumine réagissant avec les ions métalliques pourraient rendre la cellule plus accessible à la pinocytose où les lysosomes agissent (Webb, 1979a).

Selon Vernberg, *et al.* (1982), les cellules pratiquent un certain contrôle des concentrations intracellulaires des métaux dans un animal ; ceci est effectué par la membrane externe des cellules afin de maintenir un gradient ionique critique pour le transport des métabolites et un gradient osmotique pour maintenir le volume des cellules. Donc la cinétique d'absorption du cadmium commence d'abord par la liaison à une membrane de charge négative suivie de l'entrée de l'ion métallique dans la cellule et sa diffusibilité reste fonction de sa concentration (Foulkes et McMullen, 1987).

Le calcium Ca^{+2} a précisément le rôle de maintenir dans le cytosol des concentrations faibles en métal et en particulier pour le cas du muscle.

Selon Ord et Al Atia (1979) le Cd^{+2} déplacerait les ions Ca^{+2} de façon considérable dans les organites telles les mitochondries.

Aussi comme stratégie alternative de la cellule, il y aurait storage intracellulaire dans des vésicules où les ions sont emmagasinés dans le réticulum sarcoplasmique du muscle (pour la contraction) et dans les organites pour contrôle d'énergie, telle la mitochondrie.

Finalement nous constatons que la cellule emploie différentes stratégies (métalloprotéines : transport et storage; compartimentation dans des vésicules intracellulaires où les pompes membranaires exercent un tampon sur la concentration des métaux) afin de pouvoir s'acclimater aux contaminants où elle pourrait faire face.

CONCLUSION

I - II en ressort que dans une intoxication au cadmium, le foie répond principalement par ce qui semble être la complexation avec 3 types de protéines selon leur poids moléculaire dans l'ordre de grandeur suivant : $\approx 45\ 000$, $\approx 28\ 000$ et $\approx 15\ 000$ daltons .

- La fraction de 45 000 pourrait représenter les molécules de complexation primaire avant la formation de la Mtn.

- Il apparaît que dans les situations de contamination subaiguë et aiguë, le foie atteint un niveau de saturation en ce qui concerne la complexation du cadmium avec les protéines, ce niveau de saturation étant indiqué par une concentration maximale de même ordre .

- Le comportement des protéines de poids moléculaire d'environ 28 000 semblent être caractérisées par les conditions suivantes selon la situation de contamination :

 a) Le cadmium semble saturer des sites sur d'autres molécules que la Mtn ou le ligand de zinc

 b) Lorsqu'il y a déplacement métallique le zinc s'est combiné à d'autres particules .

 c) Cette molécule pourrait représenter un précurseur de la métallothionéine (apo-Mtn) .

- Finalement les molécules de poids moléculaire autour de 15 000 pourraient représenter les Mtn elles-mêmes ou les iso-Mtn .

Ce qui est assez étonnant c'est que indépendamment de la durée d'exposition (8 jours, 1 mois et 5 mois) et de la concentration (chronique,subaiguë et aiguë), nous observons que le cadmium est majoritairement associé aux protéines à PME . Nous apportons plus loin une interprétation possible de cette observation .

Tout d'abord le cadmium semble être capté rapidement mais de par sa distribution dans les tissus, on ne verrait pas les pics représentant la synthèse maximale de la Mtn associée au cadmium.

La tolérance des tissus lors d'une contamination aux métaux lourds se reflète par une stratégie cellulaire consistant à utiliser des protéines intracellulaires ayant une forte affinité pour les métaux, procurant ainsi une certaine protection au tissu cible. Lorsque les métaux sont en excès et que l'habileté de la cellule à synthétiser de la Mtn est dépassée, ces métaux en excès ne seraient pas séquestrés. A ce moment il y aurait déplacement ou débordement du cadmium (expérience 3 aigüe) vers la Mtn et le zinc se combine à d'autres particules c'est alors que le cadmium se lierait d'avantage aux protéines à PME ou THPM. Ceci correspondrait aussi à l'atteinte d'un niveau de saturation. S'il y a cohabitation entre les ions zinc et cadmium c'est que nous sommes en situation de contamination sous-létale (expériences 1) et ce sont les ions Cd^{+2} libres qui sont toxiques. Les PME sont aussi favorisés.

Ainsi la distribution des ions métalliques s'effectue entre la Mtn et les autres sites potentiels de liaison et d'action toxique dans la cellule, ce qui implique que ces autres interactions avec le métal pourraient réduire fortement l'habileté de l'organisme à synthétiser de la Mtn.

Dans l'expérience 2 (Saguenay) la contamination semble assez faible et nous considérons plutôt cette association au PME comme un état d'équilibre suite à un séjours de cinq mois dans le Saguenay.

II - La distribution du cadmium dans l'organisme s'effectue de façon prévisible par la ségrégation des tissus. Ainsi lors de contamination, le cadmium produit le patron de distribution suivant : F > R > Surfaces d'absorption > M.

Le foie est le tissu le plus touché et le muscle le moins affecté lorsque la contamination est plutôt faible comme dans le cas de toxicité chronique en milieu naturel. On sait qu'en milieu marin 90% du cadmium est lié, ce qui implique que sa biodisponibilité est plutôt limitée et le rôle du foie se trouve alors remplacé par le rein et les surfaces d'absorption.

Les gonades peuvent aussi être affectées par le transfert intermédiaire du cadmium par le foie. Dans les situations expérimentales subaigüe et aigüe, nous avons atteint pour le tissu hépatique un niveau de saturation qui est

d'ailleurs confirmé par le facteur de bioconcentration et permet aussi de démontrer les organes priorisés en situation d'intoxication aux métaux lourds .

Un fait intéressant est la concentration élevée en zinc retrouvé dans le foie pour les expériences de toxicité subaiguë et chronique et la nette déficience lors de contamination aiguë . Ainsi nous obtenons une valeur équivalente à 100% du zinc par rapport au zinc contenu dans le témoin pour l'expérience 1, nous sommes à 60% en zinc du témoin pour l'expérience 2 et à 12% en zinc pour l'expérience 3 (aigüe) . On observe qu'il y a effectivement compétition pour les mêmes sites d'interaction vu la similarité chimique du zinc et du cadmium . Dans le cas de l'expérience de DL50, nous aurions donc dépassé la tolérance permettant l'acclimatation au métal .

En temps normal la Mtn n'est pas liée à tous les ions zinc pour la détoxification de l'animal . Elle se lie aux métaux lorsqu'ils sont en grandes quantités et que ceci représente un état d'alerte pour les systèmes internes de l'animal . Toutefois lorsque les métaux sont en excès et que le tissu est incapable d'en contrôler la concentration, il risque d'y avoir un débordement et par ce fait la distribution des métaux s'en trouve modifiée .

Par contre lorsqu'il y a peu de zinc, la Mtn se dégraderait rapidement .

III- Dans l'intoxication au cadmium, les cellules hépatiques manifestent un réarrangement au niveau des membranes internes (ex : réticulum endoplasmique) qui pourrait impliquer le système endosomique .

L'ultrastructure nous révèle de nombreuses altérations et ces altérations sont probablement le résultat direct ou indirect d'une contamination observée . Nous constatons une augmentation du réticulum endoplasmique lisse, la désorganisation des mitochondries, la réduction des organites cellulaires, l'accumulation membranaire, le réticulum formant des figures concentriques, la vacuolisation de l'hétérochromatine . Dans tous les tests effectués, nous avons observé ces phénomènes à divers degré . Ils sont plus marqués lors de l'expérience DL50 et se produisent même lors de test chronique . Ces différences morphologiques peuvent être dues en partie à des effets secondaires de la contamination tel l'arrêt de l'alimentation .

A titre indicatif nous avons également remarqué un changement de comportement alimentaire et de nage . Il semble que lorsque les animaux sont nourris, une bonne partie du cadmium s'éliminerait dans les féces. Ceci a pu contribuer à réduire la synthèse de la métallothionéine .

Ces résultats nous amène à conclure que :

- a) Plusieurs types moléculaires sont impliqués dans la complexation protéine-cadmium .
- b) La distribution du cadmium dans les tissus obéit à un patron bien prévisible .
- c) A quelque situation d'ion libre et de complexe, des effets cytopathologiques se manifestent après l'introduction du cadmium .
- d) Le mécanisme de transport intracellulaire reste indéterminé .

BIBLIOGRAPHIE

- Aylett, B. J. 1979. The chemistry and biochemistry of cadmium .In Webb, M. ed . Topics in environmental health . The chemistry , biochemistry and biology of cadmium . 2 : 1-44 .
- Azeez, P. A., S. Panigrahi, et R. M. Sharma. 1985. Metallothionein and metallothionein-like proteins in amphibia, fishes and lower invertebrates : a review. Biol Mem. 10 : 200-209 .
- Banerjee, D., S. Onosaka, et G. Cherian. 1982. Immunohistochemical localisation of metallothionein in cell nucleus and cytoplasm of rat liver and kidney. Toxicology . 24 : 95-105 .
- Beattie, J. H., et D. Pascoe. 1979. A cadmium - binding protein in rainbow trout Toxicology Letters. 4 : 241- 246 .
- Bengtsson, B-E., C. H. Carlin, A. Larsson, et O. Svandberg. 1976. Vertebral damage in minnows, Phoxinus phoxinus L. exposed to cadmium. Ambio. 4 : 166-168 .
- Benoit, D. A., E. N. Leonard, G. M. Christensen, et T. Fiandt. 1976. Toxic effects of cadmium on three generations of brook trout (Salvelinus fontinalis) Trans. Am. Fish. Soc. 105 : 550-560 .
- Bettina, G., et R. Loewen. 1975. Renal morphology of fresh water trout . American J. Anatomy . 143 : 93-114 .
- Bouquegneau, J. M., M. Martoja, et M. Truchet. 1983. Localisation biochimique du cadmium chez Murex trunculus ,(L.)(Prosobranche Néogastéropode) en milieu non pollué et après intoxication expérimentale . C. R. Acad. Sci. 296 série III : 1121-1124 .
- Bremner, I., et N. T. Davies. 1974. Zinc proteins in rat liver . In W.G. Hoekstra J. W. Suttee, H.E. Ganther, et W. Mertz[ed.] Trace element metabolism in animals . Vol 2 . University Park Press .

- Bremner, I. 1979. Mammalian absorption transport and excretion of cadmium. In Webb, M. ed. Topics in environmental health . The chemistry , biochemistry and biology of cadmium . 2 : 175-194 .
- Bryan, G. W. 1971. The effects of heavy metals (other than mercury) on marine and estuarine organisms. Proc. Roy. Soc. London B. 177 : 389-410 .
- Cairns, V. W., P. V. Hodson, et S. O. Nriagu. 1984. Contaminant effects on fisheries . In J. O. Nriagu. Advances in Environmental Science and technology . Vol. 16 Ed. John Wiley and Sons.
- Chambers, E. J., et J. D. Yarbrough. 1976. Xenobiotic biotransformation systems in fishes : Review Comp. Biochem. Physiol. 55C : 77-84 .
- Chapman, G. B. 1981. Ultrastructure of the liver of the fingerling rainbow trout Salmo gairdneri, Richardson . J. Fish Biol. 18 : 553-567.
- Cherian, M. G., et R. A. Goyer. 1978. Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals : Minireview. Life Sciences. 23 : 1-10 .
- Cherian, M. G., et M. Nordberg. 1983. Cellular adaptation in metal toxicology and metallothioneine. Toxicology. 28 : 1-15 .
- Coombs, Th. L. 1979. Cadmium in aquatic organisms. In Webb, M. Ed. Topics in environmental health . The chemistry ,biochemistry and biology of cadmium . 2 : 93-140 .
- Cotton, F. A., et G. Wilkinson. 1980. Advanced Inorganic Chemistry. Wiley Interscience . New York .

- Crespo, S., G. Nonnotte, D. A. Colin, C. Leray, L. Nonnotte, et A. Aubree. 1986. Morphological and functional alterations induced in trout intestine by dietary cadmium and lead .Fisheries Society of the British Isles . 28 -1 : 69-80 .
- Day, F. A., A. E. Funk, et F. O. Brady. 1984. In vivo and ex vivo displacement of zinc from metallothionein by cadmium and by mercury . Chem. Biol. Interactions. 50 : 159 - 174 .
- Engel, D. W., et G. Roesijadi. 1987. Metallothioneins : A monitoring tool . Physiol. and Pollut. of Marine Organisms. 421-438 .
- Förlin, L. et T. Anderson. 1985. Storage conditions of rainbow trout liver cytochrome P-450 and conjugating enzymes . Comp. Biochem. Physiol. 80B : 569-572 .
- Förlin, L., C. Haux, L. Karlsson-Norrgren, et P. Runn. 1985. Biotransformation enzyme activities and histopathology in rainbow trout , Salmo gairdneri , treated with cadmium . In Karlsson - Norrgren ,L. ed. Cadmium and aluminium in fish ; Body distribution and morphological effects. Can. Techn. Report fish. aquat. Sci. 1368 : 405-408 .
- Foulkes, E. C., et D. M. McMullen. 1987. Kinetics of transepithelial movement of heavy metals in rat jejunum . American Physiol. Society. 253. Gastrointest. Liver Physiol. 16 : 134 -138 .
- Frausto da Silva, J. R. et R. J. P. Williams. 1976. The uptake of elements by biological systems in Dunitz et al . Ed. Structure and bonding . 29 : 69-121 .

- Freeman, H. C., et G. B. Sangalang. 1976. Changes in steroid hormone metabolism as a sensitive method of monitoring pollutants and contaminants in CNRC 1979 : 16744 . Les effets du cadmium dans l'environnement canadien .
- Gabe, M. 1968. Techniques histologiques . Aminoacides et protides : Mise en évidence des groupements thiols et disulfures. Ed . Masson . 520-525 .
- Gelber, R. D., P. T. Lavin, C. R. Mehta et D. A. Schoenfeld. 1985. Statistical analysis . In Rand, G. M., et Petrocelli, S. R. Fundamentals of toxicology . 110 - 123 .
- George ,S. G. 1982. Subcellular accumulation and detoxication of metals in aquatic animals. In Vernberg, W. B., A. Calabrese, F. P. Thurberg, et F. J. Vernberg . Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity . Academic press ,Toronto . 2-52 .
- Gumucio, J. J., et D. L. Miller. 1982. Zonal hepatic function : solute - hepatocyte interactions within the liver acinus . In Popper, H., et Schaffuer, F. Eds. Progress in liver diseases Vol. 7 . Grune et Stratton , New-York . 17 - 30 .
- Hamilton, S. J. 1985. Metallothionein in brook trout (Salvelinus fontinalis) as a biological indicator of inorganic chemical contaminant stress. Dissertation abstracts international 46 : 11B . 3661 .
- Hamilton, S. J., et P. M. Mehrle. 1986. Metallothionein in fish : Review of its importance in assessing stress from metal contaminants . Transactions of American Fish. Society. 115 : 596-609 .
- Hamilton, S. J., P. M. Mehrle, et J. R. Jones. 1987. a) Cadmium- saturation technique for measuring metallothionein in brook trout . Transactions American Fish. Society . 116 : 541- 550.

- Hamilton, S. J., P. M. Mehrle, et J. R. Jones. 1987. b) Evaluation of metallothionein measurement as a biological indicator of stress from cadmium in brook trout. *Transactions American Fish. Society* . 116 : 551 - 560 .
- Haux, C., et A. Larsson. 1984. Long-term sublethal physiological effects on rainbow trout, Salmo gairdneri , during exposure to cadmium and after subsequent recovery . *Aquatic Toxicol.* 119 : 129-142 .
- Haux, C., P. E. Olsson, I. Thorsen, L. Förlin, et A. Larsson. 1984. Partial isolation and purification of cadmium - binding proteins from rainbow trout liver. *Marine Environ. Research.* 14 : 456-458 .
- Hoekstra, W. G., J. W. Suttee, H. E. Ganther, et W. Mertz . 1974. Trace element metabolism in animals. Vol 2. University Park Press, Baltimore.
- Hunziker, P. E., et J. H. R. Kägi. 1984. Metallothionein , in Metalloproteins Part 2 : metal proteins with non-redox roles. P.M. Harrison ed . 4 : 149-181 .
- Jenkins, K., D. A. Brown, P. S. Oshida, et E. M. Perkins. 1982. Cytosolic metal distribution as an indicator of toxicity in sea urchins from the southern California bight . *Marine Pollution Bulletin* . 13 : 413-421.
- Karin, M. 1985. Metallothioneins : Proteins in search of function . Minireview . *Cell* . 41 : 9-10 .
- Kawahara, H., et T. Nishida. ; Mizuhira, V., Y. Futaesaku, et M. Kimura. 1974. Electron-probe analysis on the uptake of metals in L-cell (in vitro) ; Subcellular demonstrations of some heavy metals by the aid of analytical electron microscope . *Journal of Electron Microscopy* .Vol 23 .

- Klaverkamp, J. F., W. A. MacDonald, D. A. Duncan, et R. Wagemann. 1984. Metallothionein and acclimation to heavy metals in fish : A review .In Cairns, V.W. Advances in environmental science and technology . Contaminant effects on fisheries . Wiley series . 16 : 99-113 .
- Köhler, K., et H. U. Riisgard . 1982. Formation of metallothioneins in relation to accumulation in common mussel Mytilus edulis . Marine Biology. 66 : 53 - 58 .
- Kraker, A. J., G. Krakower, C. F. Shaw III, D. H. Petering, et J. S. Garvey. 1988. Zinc metabolism in Ehrlich cells : properties of metallothionein-like zinc binding protein . Cancer Research. 48 : 3381-3388 .
- Larrivée, D. H. 1991. Toxicité métallique des organismes dans le Saguenay . Rapport 20. Laboratoire de Biologie du Développement .U.Q.A.C.
- Larsson, A., B-E. Bengtsson, et C. Haux. 1981. Disturbed ion balance in flounder, Platichthys flesus L. exposed to sublethal levels of cadmium . Aquatic toxicology . 1 : 19-53 .
- Larsson, A., et C. Haux. 1982. Altered carbohydrate metabolism in fish exposed to sublethal levels of cadmium . J. Environ. Biol. 3 : 71-81 .
- Leber, A. P., et T. S. Miya. 1976. A mechanism for cadmium and zinc induced tolerance to cadmium toxicity : Involvement of metallothionein Toxicol. Applied Pharmacol. 37 : 403 - 414 .
- Lech, J. L., et J. R. Bend. 1980. Relationship between biotransformation and toxicity and fate of xenobiotic chemicals in fish . Environ. Health Perspectives. 34 : 115-131 .

- Leland, H. V., et S. J. Kuwabara . 1985. Trace métals. In Rand, G. M., et Petrocelli, S. R. Fundamentals of Aquatic Toxicology . 374-415 .
- Ley, H. L., M. L. Failla, et D. S. Cherry. 1982. Rainbow trout Zn,Cu - Metallothionein : Isolation and characterisation. Résumé 2171. Federation Proceedings . Ed Federation American Societies Experimental Biology. Vol. 41.
- Ley, H. L., M. L. Failla, et D. S. Cherry. 1983. Isolation and characterisation of hepatic metallothionein from rainbow trout Salmo gairdneri . Comp. Biochem. Physiol. 74B : 507-513 .
- Loring, D. H., R. T. T. Rantala et J. M. Smith. 1983. Response time of Saguenay fjord sediments to metal contamination. Environmental Biogeochemistry Ecol. Bull. 35 : 59 .
- McCarter, J. A., A. T. Matheson, M. Roch, R. W. Olafson, et J. T. Buckley. 1982. Chronic exposure of coho salmon to sublethal concentration of copper- II . Distribution of copper between high and low molecular weight proteins in liver cytosol and the possible role of metallothionein in detoxification . Comp. Biochem. Physiol. 72C : 21-26 .
- Mahan, B. H. 1967. University chemistry . Bilingua series . Addison - Wesley Publishing , California, 662 p.
- Mehrle, P. M., et F. L. Mayer . 1985. Biochemistry / physiology . In Rand, G. M., et Petrocelli, S. R. Fundamentals of Aquatic Toxicology . 264-282 .

- Moore, J. W., et S. Ramamoorthy. 1984. Cadmium in Heavy metals in natural waters . Applied monitoring and impact assessment . 3 : 42-45 .
- Neff, M. J. 1985. Use of biochemical measurements to detect pollutant - mediated damage to fish . Aquatic toxicology and hazard assessment. 17ième Symposium. 155-181 . Ed. Cardwell Purdy Bahner .
- Noël-Lambot, F., C. H. Gerdau, et A. Disteche. 1978. Distribution of Cd,Zn and Cu in liver and gills of the eel *Anguilla anguilla* with a special reference to metallothionein . Comp. Biochem. Physiol. 61C :177-187 .
- Olsson, P. E., et C. Haux. 1985. Alterations in hepatic metallothionein content in perch, *Perca fluviatilis* , environmentally exposed to cadmium . Marine Environ. Research. 17 : 181-183 .
- Ord, M. J., et G. R. Al Atia . 1979. The intracellular effects of cadmium ; an experimental study using *Amoeba proteus* as a single cellular model .In Webb,M. ed. Topics in environmental health . The chemistry , biochemistry and biology of cadmium . 2 : 141-174 .
- Overnell, J., et T. L. Coombs. 1979. Purification and properties of plaice metallothionein, a cadmium-binding protein from the liver of the plaice *Pleuronectes platessa*. Biochem. J. 183 : 277 .
- Petering, D. H., et B. Fowler. 1986. Discussion summary roles of metallothionein and related proteins in metal metabolism and toxicity : problems and perspectives . Environm. Health perspectives . 65 : 217-214 .
- Petrocelli, S. R. 1985. Chronic toxicity tests . In Rand, G. M., et S. R. Petrocelli. Fundamentals of toxicology . 96 -109 .

- Plaa, G. L. 1986. Toxic responses off the liver toxicology. In Casarett and Doull's toxicology . Ed. Classen, C. D., M. O. Amdur et J. Doull . McMullan , 3⁰ ed.
- Probst, G. S., W. F. Bousquet, et T. S. Miya. 1977. Correlation of hepatic metallothionein concentrations with acute cadmium toxicity in mouse . Toxicol. Pharmacol. 39 : 61-69 .
- Rand, G. M. 1985. Behavior . In Rand ,G. M., et S. R. Petrocelli. Fundamentals of Toxicology . 221-263 .
- Rand, G. M., et S. R. Petrocelli. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology . Hemisphere publ. Corporation. McGraw-Hill . 666 p.
- Rappaport, A. M. 1979. Physioanatomical basis of toxic liver injury . In Farber,E. and Fisher , M.M. Eds. Toxic injures of the liver . Part A. Marcel Dekker,Inc. New-York . 1-57 .
- Robinson, W. E., et D. K. Ryan. 1988. Transport of cadmium and other metals in the blood of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria*. Marine biology . 97 : 101-109 .
- Roch, M., J. A. McCarter, A. T. Matheson, M. J. R. Clark, et R. W. Olafson .1982. Hepatic metallothionein in rainbow trout , Salmo gairdneri as an indicator of metal pollution in Campbell River System . Can. J. Fish. and Aquatic Sciences. 39 : 1596-1601 .
- Roch, M., et J. A. McCarter. 1984. a) Hepatic metallothionein production and resistance to heavy metals by rainbow trout Salmo gairdneri *I exposed to an artificial mixture of zinc copper and cadmium . Comp. Biochem. Physiol. 77C : 71-75 .

- Roch, M., et J. A. McCarter. 1984. b) Hepatic metallothionein production and resistance to heavy metals by rainbow trout Salmo gairdneri #2, held in a series of contaminated lakes . Comp. Biochem. Physiol. 77C : 77-82 .
- Roch, M., et J. A. McCarter. 1984. c) Metallothionein induction, growth and survival of chinook salmon exposed to zinc ,copper and cadmium Bull. Environ. Contam. Toxicol. 32 : 478-485 .
- Roch, M., et J. A. McCarter. 1986. Survival and hepatic metallothionein in developing rainbow trout exposed to a mixture of zinc ,copper and cadmium . Bull. Environ. Contam. Toxicol. 36 : 168-175 .
- Roch, M., et E. J. Maly. 1979. Relationship of cadmium - induced hypocalcemia with mortality in rainbow trout (Salmo gairdneri) and the influence of temperature on toxicity . Journal of the Fisheries Research Board of Canada . 36 : 1297-1303 .
- Saint-Gelais, S., et D. H. Larrivée. 1986. Culture du Saumon de l'Atlantique Salmo salar en eau salée dans l'estuaire du St-Laurent, Québec (Canada) avec hivernage en eau douce . Aquacultural Engineering. 5 : 17-32 .
- Samarawickrama, G. P. 1979. Biological effects of cadmium in mammals. In Webb,M. ed. Topics in environmental health. The chemistry, biochemistry and biology of cadmium. 2 : 341-422 .
- Sangalang, G. B., et M. J. O'Halloran. 1973. Adverse effects of cadmium on brook trout testis and on in vitro testicular androgen synthesis. Biology of Reproduction. 9 : 391-403 .
- Scherrer, B. 1984. Biostatistique . Ed. Gaetan Morin,Chicoutimi, Qc. Canada . 850 p.

- Seiler, H. G., H. Sigel, et A. E. Sigel . 1988. Handbook on toxicity of inorganic compounds : Cadmium . Marcel Dekker , Inc. N. Y. 155-174 .
- Shears, M. A., et G. L. Fletcher. 1985. Hepatic metallothionein in the winter flounder, Pseudopleuronectes americanus . Can. J. Zool. 63 : 1602-1609 .
- Spacie, A., et J. L. Hamelink. 1985. Bioaccumulation . In Rand, G. M., et Petrocelli, S. R . Fundamentals of Aquatic Toxicology . 495-525 .
- Sprague, J. B. 1985. Factors that modify toxicity .In Rand, G. M., et Petrocelli, S.R . Fundamentals of Aquatic Toxicology . 124-163 .
- Stillman, M. J., W. Cai, et A. J. Zelazowski. 1987. Cadmium binding to metallothioneins . Domain specificity in reactions of a and b fragments apometallothionein, and zinc metallothionein with Cd²⁺ . J. Biol. Chem. 262 : 4538-4548 . American Society Biol. Chem. inc .
- Stone, H., et J. Overnell. 1985. Non-metallothionein cadmium binding proteins : Minireview . Comp. Biochem. Physiol. 80C : 9-14 .
- Stowe, D. H., M. Wilson, et R. A. Goyer. 1972. Clinical and morphologic effects of oral cadmium toxicity in rabbits . Arch. Path. 94 : 389-405 .
- Takeda, H., et C. Shimizu . 1982. Existence of the metallothionein - like protein in various fish tissues . Japanese Society Scient. Fish. 48 : 711-715 .
- Thomas, D. G., A. Cryer, J. F. Del G. Solbe, et J. Kay. 1983. A comparison of the accumulation and the protein binding of environmental cadmium in gills, kidney and liver of rainbow trout , Salmo gairdneri Richardson . Comp. Biochem. Physiol. 76C : 241-246 .

- Thomas, D. G., M. W. Brown, D. Shurben, J. F. Del G. Solbe, et J. Kay. 1985. A comparison of the sequestration of cadmium and zinc in tissues of rainbow trout, Salmo gairdneri, following exposure to the metals singly or in combination. *Comp. Biochem. Physiol.* 82C : 55-62.
- Verbost, P. M., G. Flik, R. A. C. Lock, et S. E. W. Bonga. 1987. Cadmium inhibition of Ca²⁺ uptake in rainbow trout gills. *American Physiol. Society*. 0363-6119 : 216-221.
- Vernberg, W. B., A. Calabrese, F. P. Thurberg, et F. J. Vernberg. 1982. Physiological mechanisms of marine pollutant toxicity. *Acad. Press*, Toronto.
- Viarengo, A., M. Pertica, L. Canesi, A. Mazzucotelli, M. Orunesu, et J. M. Bouquegneau. 1989. Purification and biochemical characterization of a lysosomal copper-rich thionein-like protein involved in metal detoxification in digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol.* 93C : 389-395.
- Webb, M. 1975. Metallothionein and the toxicity of cadmium. In McEntyre, A. D., et C. E. Mills, ed. *Ecological Toxicological Research*. 177-186.
- Webb, M. 1979. a) The metallothioneins: interactions of cadmium with cellular components; *Toxicology of Cd-Thionein*. In Webb, M. ed. *Topics in environmental health. The chemistry, biochemistry and biology of cadmium*. 2 : 195-266 ; 285-340 ; 423-432.
- Webb, M. 1979. b) The chemistry, biochemistry and biology of cadmium. In *Topics in environmental Health Vol. 2*. Elsevier N-Holland, N.Y.
- Weser, U., et H. Rupp. 1979. Physicochemical properties of metallothioneins. In Webb, M. ed. *Topics in environmental health. The chemistry, biochemistry and biology of cadmium*. 2 : 267-284.

Winge, D., J. Krasno, et V. Colucci. 1974. Cadmium in rat liver: Correlation between bound metal and pathology. In Hoekstra, W.G., J. W. Suttee, H. E. Ganther, et W. Mertz [ed.] Trace element metabolism in animals. Vol. 2. University Park Press, Baltimore.

Zimmerman, H. L. 1978. Hepatotoxicity. Appleton - Century - Crofts, New-York.

GLOSSAIRE

Acclimatation : Ajustement compensatoire d'un organisme suite à un changement des conditions du milieu . L'ajustement peut-être de nature physiologique ,biochimique ou comportementale .

Antagoniste : Substance qui réduit la toxicité d'une autre substance chez un organisme .

Bioconcentration : Processus impliquant une nette accumulation d'une substance dans un organisme . Le taux d'entrée est supérieur au taux d'élimination .

Biotransformation : Processus par lequel la transformation d'un xénobiotique en un autre composé est catalysée par voies biologiques

Détoxication : Processus par lequel une substance toxique est éliminée ou neutralisée .

Dose : Concentration d'une substance dans un organisme donné (concentration / poids) .

Dose létale 50 (DL 50) : Dose d'une substance toxique causant la mort de 50% de la population testée à l'intérieur de 96 heures .

Dose maximale acceptable : C'est la concentration maximale acceptable par poids pour une substance toxique pour un organisme donné avant que se manifestent des effets observables .

Dose - réponse : Relation (le plus souvent exprimée sous forme de courbe) entre la concentration dans un organisme et la réponse observée .

Facteur de bioconcentration (FBC) : C'est le rapport de la concentration du toxique dans les tissus sur la concentration dans l'eau ou dans l'injection .

Introduction : Processus par lequel une substance toxique est transportée et accumulée par un organisme .

Métal lourd : Métal de masse atomique élevée .

Métallothionéine (Mtn) : C'est une protéine thermostable, de poids moléculaire variant de 6 000 à 15 000 daltons et caractérisée par un contenu élevé en résidus de cystéine / cystine (30%), une déficience en acide aminé aromatique et une capacité de complexer 7 atomes de métal par molécule de protéine .

Partie par million (ppm) : Concentration unitaire d'une substance dans un volume ou dans un poids .

Ex : 1 mg / l = 1 ppm
1 mg / kg = 1 ppm

Significatif (statistiquement) : Paramètre (survie, croissance etc) qui présente en comparant un groupe à un autre une probabilité statistique de 95% avec alpha de 0,05

ou 99% " " 0,01

Témoin : C'est un organisme ou un groupe d'organismes qui à l'intérieur des conditions d'une expérience de toxicité, ne se distingue des sujets expérimentaux que par le fait qu'ils ne sont pas soumis à l'action du toxique .

Toxicité : Potentiel d'un agent à engendrer des effets adverses temporaires ou non sur un organisme .

Toxicité aiguë : Intoxication suffisamment sévère pour induire une réponse létale rapide .

Toxicité chronique : Toxicité qui agit de façon persistante pendant une période pouvant se prolonger jusqu'à plusieurs années .

L'exposition au toxique dans ce cas induit une réponse biologique relativement lente et progressive .

Toxicité subaiguë (sous-létale) : Se dit de la toxicité au-dessous de la toxicité aiguë mais présentant une altération observable (physiologique, anatomique etc) .

Toxique : Agent capable de produire des réponses adverses dans un système biologique .

Unité de toxicité : Unité d'altération d'une substance exprimée comme une fraction du seuil de la concentration létale .

Xénobiotique : Substance étrangère à un organisme donné .