

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE DE CERTAINS MÉTAUX CRITIQUES ET
STRATÉGIQUES DANS LES CELLULES INTESTINALES DU GOÉLAND À BEC
CERCLÉ *LARUS DELAWARENSIS* DE LA RÉGION DE MONTRÉAL (QUÉBEC,
CANADA)

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
FRÉDÉRIQUE PELLETIER

OCTOBRE 2023

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier mon superviseur Maikel Rosabal pour tout le support, la disponibilité, l'empathie et la bienveillance que j'ai eu la chance d'avoir de sa part à travers mon parcours. Merci pour toutes les connaissances ainsi que pour les opportunités de voyager de Montréal à Québec en passant par Varennes jusqu'en Belgique. Je voudrais également remercier mon co-superviseur Jonathan Verreault pour les précieux conseils, le soutien financier et la chance d'avoir pu travailler avec les goélands.

Je tiens également à remercier mon système de support qui m'a permis de passer à travers l'expérience de la maîtrise; merci Maman de toujours me pousser à être la meilleure version de moi-même, tu es ma plus grande inspiration encore et pour toujours. Merci Papa d'avoir toujours cru en moi et d'être mon supporteur #1. Merci Simon d'avoir été là chaque jour et de me supporter dans tout, tout le temps. Merci Phil d'être ma personne ressource, de me motiver et de toujours avoir les bons mots. Finalement, merci Alice, Sara, Gen, Rox et Sarah pour être les meilleures amies du monde et d'être toujours là, vous avez vraiment fait la différence (significative).

Je voudrais remercier tous.tes mes collègues, devenu.e.s ami.e.s, qui ont rendu mon projet de maîtrise tellement plus le fun: Anaïs (pour avoir été ma partenaire dans tout), Julien (pour nos conversations flyées), Vincent (pour m'avoir divertie comme jamais), Maxime (pour tous tes skills de jedi statisticien), Sandrine (pour avoir été la meilleure des stagiaires), Marie (pour tous tes précieux conseils), Valérie (pour être toujours sur la même longueur d'onde), Madeleine (pour ton écoute et ton support), Laura (pour tous les good

times), Jérémy (pour la meilleure semaine en Belgique ever, et Vive le Québec Libre !), Manon (pour toute ton expertise, ta sagesse et ton empathie) et Kimberley (pour toute ta disponibilité et nos moments de complicité).

Un dernier merci tout spécial à Chaker, sans qui je n'aurais probablement jamais pondu ce mémoire. We made it !

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES ACRONYMES, SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	IX
RÉSUMÉ	10
INTRODUCTION	11
CHAPITRE I: ÉTAT DES CONNAISSANCES	14
1.1 LES ÉLÉMENTS TRACES MÉTALLIQUES.....	14
1.1.1 <i>La contamination urbaine</i>	15
1.2 LES MÉTAUX CRITIQUES ET STRATÉGIQUES	17
1.2.1 <i>Éléments de terres rares</i>	18
1.2.2 <i>Éléments du groupe platine</i>	21
1.2.3 <i>Cobalt</i>	23
1.3 BIOACCUMULATION DES ÉLÉMENTS TRACES MÉTALLIQUES	24
1.4 BIODISTRIBUTION DES MÉTAUX DANS LES ORGANES.....	26
1.5 MÉTAUX DANS LE MILIEU INTRACELLULAIRE	28
1.5.1 <i>Approche du fractionnement subcellulaire</i>	35
1.6 LE GOÉLAND À BEC CERCLÉ.....	40
1.6.1 <i>Écologie</i>	40
1.6.2 <i>Voies d'exposition aux métaux</i>	42
1.7 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES.....	46
CHAPITRE II: SUBCELLULAR PARTITIONING OF CRITICAL AND STRATEGIC METALS INCLUDING RARE EARTH ELEMENTS, PALLADIUM AND COBALT IN INTESTINAL CELLS OF URBAN-ADAPTED RING-BILLED GULLS	48
2.1 ABSTRACT	49
2.2 INTRODUCTION	50
2.3 MATERIALS AND METHODS.....	54
2.3.1 <i>Sample collection</i>	54
2.3.2 <i>Subcellular partitioning protocol</i>	54
2.3.3 <i>Metal analysis and data quality assessment</i>	58
2.3.4 <i>Data exploration and statistical analysis</i>	60
2.4 RESULTS.....	61

2.4.1	<i>Total metal concentrations in gulls intestinal cells</i>	61
2.4.2	<i>Subcellular metal partitioning in intestinal cells</i>	64
2.4.2.1	Lanthanum, cerium and yttrium.....	64
2.4.2.2	Gadolinium, Neodymium and Praseodymium.....	67
2.4.2.3	Palladium and Cobalt.....	69
2.4.3	<i>Integration of subcellular partitioning results</i>	70
2.5	DISCUSSION.....	72
2.5.1	<i>Metal accumulation</i>	72
2.5.2	<i>Metal subcellular partitioning</i>	74
2.5.2.1	Rare earth elements.....	74
2.5.2.2	Platinum group element	77
2.5.2.3	Cobalt.....	79
2.6	CONCLUSIONS	81
2.7	ACKNOWLEDGMENTS	82
CHAPITRE III: CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		8
RÉFÉRENCES		13

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1.** Tableau périodique des éléments indiquant les ETR et les EGP. Adapté du tableau libre de droits de Eni Generalic (www.periodni.com).21
- Figure 1.2.** Schéma de la structure interne d'une cellule de *L. delawarensis* représentant différents composants subcellulaires ainsi que les fractions obtenues à travers l'approche opérationnelle du fractionnement subcellulaire. En rouge : « les fractions sensibles » soit celles sensibles à l'accumulation de métal, en vert : les fractions de détoxification soit celles impliquées dans la détoxification des métaux.36
- Figure 2.1.** Subcellular metal partitioning protocol adapted for intestinal cells of ring-billed gulls (*Larus delawarensis*).57
- Figure 2.2.** Relationship between total metal concentrations (nmol g⁻¹ dw) in intestinal cells of *L. delawarensis* and metal concentrations (nmol g⁻¹ dw) in detoxified-metal compartment (left panels) and metal-sensitive compartment (right panels) for La (panels A, B), Ce (panels C, D) and Y (Panels E, F). Each point represents an individual ring-billed gull. Only significant linear regressions are shown. Abbreviations: GRAN: granules; HSP: heat-stable proteins; MITO: mitochondria; LYSO: lysosomes/microsomes; HDP: heat-denatured proteins.66
- Figure 2.3.** Relationship between total metal concentration (nmol g⁻¹ dw) in intestinal cells of *L. delawarensis* and metal concentrations (nmol g⁻¹ dw) in detoxified-metal compartment (left panels) and metal-sensitive compartment (right panels) for Gd (panels A, B), Pr (panels C, D) and Nd (Panels E, F). Each point represents an individual ring-billed gull. Only significant linear regressions are shown. Abbreviations: GRAN: granules; HSP: heat-stable proteins; MITO: mitochondria; LYSO: lysosomes/microsomes; HDP: heat-denatured proteins.68
- Figure 2.4.** Relationship between total metal concentration (nmol g⁻¹ dw) in intestinal cells of *L. delawarensis* and metal concentrations (nmol g⁻¹ dw) in detoxified-metal compartment (left panels) and metal-sensitive compartment (right panels) for Co (panels A, B) and Pd (panels C, D). Each point represents an individual ring-billed gull. Only significant linear regressions are shown. Abbreviations: GRAN: granules; HSP: heat-stable proteins; MITO: mitochondria; LYSO: lysosomes/microsomes; HDP: heat-denatured proteins.70
- Figure 2.5.** A) Distribution (%) of intracellular accumulation between detoxified-metal (granule and HSP fractions) and metal-sensitive (mitochondria, lysosomes/microsomes and HDP fractions) compartments in intestinal cells of *L. delawarensis* of each studied metal. B) Comparison of metal distribution (in %) within detoxified-metal compartment in intestinal cells of *L. delarawensis* for each studied metal. Abbreviations: GRAN: granules

*: significant differences between both compartments; ***: significant differences in metal accumulation between both detoxified-metal fractions.....71

Figure S 1. Proportion (mean \pm sd; n = 5) of each enzymatic biomarker used to assess the efficient of the subcellular partitioning protocol adapted for intestinal cells of *L. delawarensis*. Different letters indicate significant differences in enzymatic proportion among all subcellular fractions and similar letters represent non-significant differences. CCO: cytochrome C oxidase (mitochondrial membrane biomarker); CS: citrate synthase (mitochondrial matrix biomarker); LDH: lactate dehydrogenase, (cytosol biomarker). Statistical differences were obtained by multiple Wilcoxon pairwise tests. Enzymatic validation protocol was taken from Rosabal et al., 2014.84

Figure S 2. Relationship between total metal concentration (nmol g⁻¹ dw) in intestinal cells of *L. delawarensis* and metal contribution (%) in detoxified-metal compartment (left panels) and metal-sensitive compartment (right panels) for La (panels A, B), Ce (panels C, D) and Y (Panels E, F). Each point represents one individual bird. Only significant linear regressions are shown. Abbreviations: GRAN: granules; HSP: heat-stable proteins; MITO: mitochondria; LYSO: lysosomes/microsomes; HDP: heat-denatured proteins.0

Figure S 3. Relationship between total metal concentration (nmol g⁻¹ dw) in intestinal cells of *L. delawarensis* and metal contribution (%) in detoxified-metal compartment (left panels) and metal-sensitive compartment (right panels) for Gd (panels A, B), Pr (panels C, D) and Nd (Panels E, F). Each point represents one individual bird. Only significant linear regressions are shown. Abbreviations: GRAN: granules; HSP: heat-stable proteins; MITO: mitochondria; LYSO: lysosomes/microsomes; HDP: heat-denatured proteins.1

Figure S 4. Relationship between total metal concentration (nmol g⁻¹ dw) in intestinal cells of *L. delawarensis* and metal contribution (%) (nmol g⁻¹ dw) in both compartments. The detoxified-metal compartment holds the granule-like fraction and HSP fraction. The metal-sensitive compartment represents the combination fo the mitochondrial, microsomes and lysosomes, and HDP fractions. Each point represents one individual bird. Only significant linear regressions are shown.....2

Figure S 5. Relationship between total metal concentration (nmol g⁻¹ dw) in intestinal cells of *L. delawarensis* and metal contribution (%) in detoxified-metal compartment (left panels) and metal-sensitive compartment (right panels) for Co (panels A, B) and Pd (panels C, D). Each point represents one individual bird. Only significant linear regressions are shown. Abbreviations: GRAN: granules; HSP: heat-stable proteins; MITO: mitochondria; LYSO: lysosomes/microsomes; HDP: heat-denatured proteins.....3

Figure S 6. REEs relative proportion in *L. delawarensis* intestinal cells.6

Figure S 7. REE anomalies calculated from PAAS-normalized data in *L. delawarensis* intestinal cells7

LISTE DES TABLEAUX

- Table 1.1.** Classification des ions métalliques selon leurs affinités préférentielles ainsi que les ligands et groupements fonctionnels favorisés dans les systèmes biologiques d'après Neiboer et Richardson (1980). Le symbole R représente un radical alkyle.....30
- Table 2.1.** Range (minimum-maximum) of total trace metal concentrations (nmol. g-1 dw) and body weight (g). Total concentration gradient ($[M]_{\max} / [M]_{\min}$) for each metal in ring-billed gull intestinal samples. Sex distribution (F: female; M: male) is also given...63
- Table S 1.** Influence of sex and body weight on metal accumulation in ring-billed gulls (*Larus delawarensis*) of the Montreal area (Québec, Canada). Influence of each variable is given by the p-value of F-test applied on each model. Abbreviations: GLM: Generalized Linear Models; Df: Residual degrees of freedom; Resid. Dev: Residual Deviance; F: F statistics from F-test; Pr(>F): p-value for F statistics.....85
- Table S 2.** Values for mass balance calculations, certified reference materials values and PGE spiked-samples. Certified reference materials used were DOLT-5 (Dogfish liver; National Research Council Canada, Ottawa, ON, Canada; $n = 6$) and BCR-688 (Mussel tissue; European Commission, Geel, Belgium; $n = 3$).4
- Table S 3.** Pearson correlation coefficients describing the relationships between studied metals. Values in bold are significant ($p < 0.05$) r-values.....5

LISTE DES ACRONYMES, SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
EGP	Éléments du groupe platine
ETM	Éléments traces métalliques
ETR	Éléments de terre rare
HREE	<i>Heavy rare earth elements</i>
HDP	<i>Heat-denaturated protein</i>
HSP	<i>Heat-stable protein</i>
ICP-MS	Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif
IRM	Imagerie à résonance magnétique
LREE	<i>Light rare earth elements</i>
MCS	Métaux Critiques et Stratégiques
MT	Métallothionéine
POP	Polluant organique persistant

RÉSUMÉ

Dans les milieux urbains, les activités anthropiques telles que les industries, les systèmes de transport, ainsi que la production de déchets urbains et l'expansion des réseaux routiers sont responsables du relargage important d'éléments traces métalliques (ETM) dans l'environnement. Avec la transition énergétique mondiale et le développement de nouvelles technologies, la contamination par les ETM du groupe des métaux critiques et stratégiques (MCS), incluant notamment les éléments de terres rares (ETR) et les éléments du groupe platine (EGP), est de plus en plus importante. L'accumulation d'ETM dans les cellules des organismes habitant en milieu urbain peut engendrer des effets délétères. En effet, la liaison de ces derniers à des sites dits « sensibles » peut perturber plusieurs processus cellulaires importants. Actuellement, les informations concernant les risques toxicologiques et environnementaux des MCS notamment les ETR, les EGP et le Co sont limitées. Ce projet de mémoire cherche à investiguer la répartition subcellulaire d'une série de MCS (La, Ce, Co, Gd, Nd, Pd, Pr) dans les cellules intestinales d'une espèce aviaire bio-indicatrice des milieux urbains, soit le goéland à bec cerclé (*Larus delawarensis*) de la région de Montréal (Québec, Canada). Un protocole de fractionnement subcellulaire optimisé a été appliqué sur les cellules intestinales afin de déterminer l'accumulation de ces métaux dans les cellules intestinales des goélands à bec cerclé et également d'évaluer la répartition entre les compartiments de détoxification des métaux (granules et protéines thermostables du cytosol (i.e. métallothionéine (MT)) et ceux « sensibles » à l'accumulation soit les organelles (i.e. mitochondries) et les protéines thermosensibles du cytosol. Nos résultats ont démontré que pour l'ensemble des MCS étudiés, les proportions les plus importantes de métal accumulé dans les cellules intestinales se trouvaient dans les fractions de détoxification (entre 48 - 73,4 %). Pour l'ensemble des ETR à l'étude (La, Ce, Gd, Y, Pr, Nd), les granules se sont avérées être le mécanisme de détoxification le plus important. Inversement, les proportions les plus importantes de Pd ont été associées à la fraction des protéines thermostables du cytosol, incluant la MT. Les plus grandes proportions de Co ont été retrouvées dans les granules. Une accumulation dans les fractions sensibles a tout de même été observée pour tous les MCS étudiés, où le Pd a présenté la plus grande proportion (28 %). Ces résultats offrent des informations importantes quant à la gestion intracellulaire des MCS par les organismes. Les conclusions de ce projet de maîtrise pourront contribuer à mieux dresser le portrait de la contamination urbaine par les MCS et pourront être très utiles pour une éventuelle évaluation du risque environnemental.

INTRODUCTION

En raison de leur forte productivité et des altérations physiques importantes de l'environnement naturel, les milieux urbains sont particulièrement vulnérables à la contamination de leurs compartiments environnementaux (Wong *et al.*, 2006). Les activités industrielles, les raffineries, les réseaux routiers ainsi que les activités agricoles et municipales sont responsables de la mobilisation importante d'éléments traces métalliques (ETM) dans ces milieux. Les ETM sont persistants et bioaccumulables dans les organismes, de plus ils ont une grande capacité de dispersion dans l'environnement et peuvent être retrouvés dans tous les compartiments environnementaux (Nordberg *et al.*, 2014). L'accumulation importante d'ETM dans les sites physiologiques critiques dans les cellules et les tissus des organismes exposés peut induire une toxicité (Mason et Jenkins, 1995). Actuellement, la contamination dans les milieux urbains par les ETM ne se limite plus aux métaux traces courants comme le zinc (Zn), le cadmium (Cd) ou le plomb (Pb) (Ge *et al.*, 2000). En effet, la quête à la transition énergétique mondiale ainsi que le développement de nouvelles technologies impliquent l'utilisation importante de métaux critiques et stratégiques (MCS). Ce groupe est composé en partie du cobalt (Co), du nickel (Ni), du lithium (Li), du scandium (Sc) et du titane (Ti) mais également des éléments de terre rares (ETR) ainsi que des éléments du groupe platine (EGP). Les ETR et les EGP sont des contaminants métalliques dit « émergents » dans les environnements urbains et leur présence accrue soulève plusieurs inquiétudes au niveau de leur toxicité (Berbel *et al.*, 2021; Tepe *et al.*, 2014).

Les analyses de bioaccumulation et de répartition intracellulaire des métaux traces dans les tissus des organismes permet d'enrichir la compréhension de la toxicité des ETM. En effet, à travers une méthode comme le fractionnement subcellulaire, il est possible de distinguer l'accumulation des métaux dans les fractions métalliques détoxifiées (soit les protéines de détoxification comme la métallothionéine (MT) et les granules), de celle dans les fractions sensibles à la toxicité des métaux, comme les enzymes cytosoliques et les organites incluant le réticulum endoplasmique et les mitochondries (Rosabal *et al.*, 2015; Wallace et Luoma, 2003). Alors que l'accumulation d'ETM dans les fractions de détoxification ne représente pas un risque toxicologique, en revanche l'accumulation de métaux dans les fractions sensibles peut mener à la liaison de ces derniers à des sites physiologiques importants (Rosabal *et al.*, 2015; Wallace et Luoma, 2003). En comparant l'accumulation entre ces compartiments, les analyses de fractionnement subcellulaire permettent de fournir des informations importantes sur les comportements des métaux et peuvent nous renseigner sur la possible sensibilité des organismes exposés aux métaux. Actuellement, ces connaissances concernant plusieurs MCS (incluant les ETR et les EGP) sont encore limitées.

Dans les études écotoxicologiques, l'utilisation d'espèces bioindicatrices permet de nous renseigner sur la contamination actuelle de l'environnement à l'étude. Dans ce projet, le goéland à bec cerclé (*Larus delawarensis*) a été choisi puisqu'il est un bon organisme indicateur de l'exposition aux contaminants dans la région de Montréal. Dû à son mode d'alimentation omnivore et opportuniste, à ses sites d'alimentation diversifiés (ex. lieux d'enfouissement technique, terres agricoles, milieu aquatique, etc.) ainsi qu'à sa position élevée dans le réseau trophique, il s'expose à plusieurs types de contaminants dans le milieu

urbain notamment les MCS (Brown *et al.*, 2019; Caron-Beaudoin *et al.*, 2013). Les objectifs principaux de ce projet sont d'une part de déterminer la bioaccumulation de certains MCS (Co, ETR et EGP) dans les tissus des goélands à bec cerclé, et d'autre part d'évaluer la répartition subcellulaire de ces éléments dans les cellules intestinales.

Les MCS représentent un enjeu important en écotoxicologie en raison de leur mobilisation importante dans les milieux urbains ainsi que leur risque toxicologique pour les organismes (Markert & Friese, 2000a; Nordberg *et al.*, 2014). Ainsi, les données de fractionnement subcellulaire permettent d'améliorer les connaissances concernant le devenir intracellulaire des métaux et de contribuer à la compréhension de leur toxicité chez les oiseaux vivant en milieux urbains. Ces résultats offrent également des outils non négligeables dans l'établissement du portrait de la contamination urbaine par les MCS et pourront contribuer à une éventuelle évaluation du risque environnemental de ces contaminants dans ce milieu.

CHAPITRE I: ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 LES ÉLÉMENTS TRACES MÉTALLIQUES

Les éléments traces métalliques (ETM) (ou *métaux traces*) font référence aux métaux et aux métalloïdes présents dans l'environnement à des concentrations généralement très faibles, soit autour du 0,1% (Chojnacka, 2018). Naturellement présents dans l'environnement, ils font partie de l'équilibre géochimique de la Terre. Ils proviennent de l'altération des roches ou encore du brassage des sédiments des fonds marins, des rivières et des lacs, et peuvent également être libérés lors de catastrophes naturelles comme des éruptions volcaniques et des feux de forêt (Swaine, 2000). Étant donné leur importante capacité de mobilisation, les métaux traces sont présents dans tous les compartiments environnementaux (Gouzy et Ducos, 2008). Ils sont retrouvés principalement dans le sol et les sédiments, dans l'eau et également dans l'air sous forme gazeuse ou particulaire à travers la poussière et la fumée (Markert et Friese, 2000).

Outre les causes naturelles, les métaux traces parviennent également à l'environnement par des voies de nature anthropique. En effet, les activités industrielles, agricoles, minières ainsi que les fonderies et la combustion de composants organiques sont responsables du relargage important de métaux traces dans l'environnement (Swaine, 2000). S'ajoutant à ceux déjà présents de façon naturelle, les métaux traces d'origine anthropique enrichissent le réservoir de métaux et causent une perturbation de leur cycle naturel dans l'environnement (Markert et Friese, 2000). De plus, les changements dans les conditions environnementales liés aux activités anthropiques, par exemple l'acidification

des sols et des sources d'eau, ont également des effets indirects sur la stabilité et la capacité de mobilisation des métaux traces dans l'environnement (Nordberg *et al.*, 2014).

Ces éléments métalliques sont bioaccumulés aussi dans tous les organismes vivants. Certains d'entre eux participent à des processus biochimiques essentiels à la survie des organismes (Nordberg *et al.*, 2014). D'autres ETM « non essentiels » s'accumulent aussi dans les différents tissus animaux. Cependant, ils sont tous toxiques lorsqu'ils se trouvent en excès (Nordberg *et al.*, 2014). En raison de la croissance exponentielle des activités industrielles et au développement de nouvelles technologies, le relâchement de métaux dans l'environnement a triplé depuis le début de la révolution industrielle et les ETM, notamment ceux associés à de nouvelles technologies, ont atteint des concentrations importantes dans l'environnement (Mudd *et al.*, 2018; Rollin et Quiot, 2006; Wang, J. *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2017).

1.1.1 La contamination urbaine

Les ETM sont devenus un enjeu important en santé environnementale notamment en raison de leur rôle dans plusieurs processus biochimiques chez les organismes vivants (Markert et Friese, 2000). Les études écotoxicologiques mettent en évidence la présence d'ETM dans plusieurs compartiments environnementaux dans les milieux agricoles, miniers, industriels et le milieu urbain n'est pas exempté de ces contaminations. D'ailleurs, la présence de métaux traces tels que le cadmium (Cd), le zinc (Zn) ou encore l'arsenic (As) et le plomb (Pb) est devenue courante dans les milieux anthropisés (Ge *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2006). Alors que la contamination dans les milieux agricoles et miniers est actuellement déjà grandement abordée dans les études toxicologiques, un intérêt récent,

mais grandissant, est porté à la contamination urbaine par les ETM, notamment par des métaux traces pour lesquels il n'existe aucune législation ou norme environnementales.

Les environnements urbains sont uniques et leur dynamique particulière rend la contamination de leurs compartiments environnementaux beaucoup plus complexe (Wong *et al.*, 2006). Ils ont un taux de productivité particulièrement élevé malgré le fait qu'il ne soit pas lié aux activités agricoles, et le relargage de déchets autant industriels que municipaux est beaucoup plus élevé qu'ailleurs. De plus, la prépondérance des infrastructures et industries autant sur le sol urbain que sous terre implique de libérer des espaces importants pour permettre les liens physiques et les systèmes de transport motorisés (Wong *et al.*, 2006). Le réseau des infrastructures, des routes et des industries des milieux urbains est responsable de la consommation importante de ressources et de carburant et inévitablement des émissions de métaux traces (Kelly *et al.*, 1996). En raison de cette dynamique particulière, il est reconnu que la dispersion, la distribution et la mobilisation des métaux traces sont grandement influencées par les conditions environnementales des milieux urbains (Kelly *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 2006).

La contamination urbaine par les ETM ne se limite pas aux métaux traces conventionnels comme le Zn, le Cd ou le Pb (Wong *et al.*, 2006). En effet, elle inclut également la présence d'éléments de terres rares (ETR) et les éléments du groupe platine (EGP), deux groupes de polluants métalliques considérés comme « émergents » dans les environnements urbains (Berbel *et al.*, 2021; Tepe *et al.*, 2014). Les émissions d'ETR sont très variées alors que celles d'EPG sont principalement atmosphériques, et elles sont souvent liées aux systèmes de transports motorisés notamment par la combustion d'essence et la production de catalyseurs (Haque *et al.*, 2014; Pagano *et al.*, 2015; Wiseman, 2015;

Wong *et al.*, 2006). En raison du niveau élevé de trafic et de déplacements motorisés dans les environnements urbains, l'exposition à ces métaux est plus importante. Alors qu'il est prévu que 70% de la population mondiale habite les centres urbains d'ici 2070, la contamination urbaine représente un enjeu actuel de grande importance (Ajmone-Marsan et Biasioli, 2010).

1.2 LES MÉTAUX CRITIQUES ET STRATÉGIQUES

Les métaux critiques et stratégiques (MCS) sont une série d'ETM utilisés dans plusieurs technologies du quotidien et sont au cœur du développement de plusieurs technologies « vertes ». En effet, on les retrouve dans les batteries des téléphones portables et ordinateurs; dans celles des voitures électriques et des systèmes éoliens; dans les aimants industriels et automobiles ainsi que dans les disques durs des ordinateurs (Dalpé-Mainville *et al.*, 2021). Certains d'entre eux sont également utilisés dans la sphère médicale et dans les catalyseurs des voitures (Batley et Campbell, 2022). Les MCS forment un grand groupe incluant notamment l'antimoine (Sb), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cobalt (Co), le cuivre (Cu), le lithium (Li), le manganèse (Mn), le nickel (Ni), le titane (Ti), le scandium (Sc), le sélénium (Se), le vanadium (V), le zinc (Zn), les ETR ainsi que les EGP (Dalpé-Mainville *et al.*, 2021; Ministère de l'Énergie et des Ressources Naturelles, 2020). La quête à la transition énergétique mondiale ainsi que la croissance du développement de nouvelles technologies engendrent une demande importante pour l'exploitation et l'utilisation de ces métaux et cette demande prévoit d'augmenter exponentiellement dans les prochaines décennies (Batley et Campbell, 2022; Dalpé-Mainville *et al.*, 2021). Alors que les MCS

soulèvent d'importants enjeux économiques, une attention particulière est maintenant portée sur les possibles impacts environnementaux de leur utilisation.

1.2.1 *Éléments de terres rares*

Les ETR sont un groupe de métaux traces regroupant le scandium ($_{21}\text{Sc}$), l'yttrium ($_{39}\text{Y}$) et les 15 éléments de la série des lanthanides (Haque *et al.*, 2014). Ils sont catégorisés en 2 sous-groupes; soit celui des terres rares légères (LREE pour *light rare earth elements*) comprenant le scandium ($_{21}\text{Sc}$), le lanthane ($_{57}\text{La}$), le cérium ($_{58}\text{Ce}$), le praséodyme ($_{59}\text{Pr}$), le néodyme ($_{60}\text{Nd}$), le prométhium ($_{61}\text{Pm}$), le samarium ($_{62}\text{Sm}$) et l'euporium ($_{63}\text{Eu}$), ainsi que celui des terres rares lourdes (HREE pour *heavy rare earth elements*) comprenant l'yttrium ($_{39}\text{Y}$), le gadolinium ($_{64}\text{Gd}$), le terbium ($_{65}\text{Tb}$), le dysprosium ($_{66}\text{Dy}$), l'holmium ($_{67}\text{Ho}$), l'erbium ($_{68}\text{Er}$), le thulium ($_{69}\text{Tm}$), l'ytterbium ($_{70}\text{Yb}$) et le lutécium ($_{71}\text{Lu}$) (Haque *et al.*, 2014). Les ETR sont extraits dans les minerais où ils y sont naturellement présents. La composition en ETR des minerais est très souvent dominée par un type d'ETR, donc soit des LREE ou des HREE (Haque *et al.*, 2014). Les minerais de bastnaésite et de monazite contiennent principalement des LREE, alors que les minerais de xénotime ou gadolinite contiennent de l'Y et des HREE (Haque *et al.*, 2014).

Leur principale application industrielle implique leur utilisation dans la production de puissants aimants pour les appareils électroniques notamment dans les écrans et les lasers, la céramique et les tissus, et ils sont également utilisés dans la sphère médicale pour les scans, les radiographies et les systèmes d'imagerie à résonance magnétique (IRM) (Rim, 2016). Les ETR sont également utilisés en applications métallurgiques notamment dans les alliages, dans les pièces électroniques et également comme catalyseurs chimiques

(Weber et Reisman, 2012). En effet, ils sont largement retrouvés comme catalyseurs, autant industriels qu'automobiles où ils sont ajoutés comme additifs dans l'essence et dans les batteries (Dalpé-Mainville *et al.*, 2021; Weber et Reisman, 2012). Étant donné les propriétés optiques, catalytiques et magnétiques uniques des ETR, ils sont notamment incorporés dans les produits de haute-technologie et sont très convoités dans les « technologies vertes » notamment dans les batteries des voitures hybrides et électriques ainsi que dans les systèmes éoliens (Alonso *et al.*, 2012; Batley et Campbell, 2022; Haque *et al.*, 2014). S'ajoutant aux conséquences environnementales importantes liées à leur extraction, leur récupération et leur raffinage, les ETR soulèvent des inquiétudes toxicologiques importantes quant à leur utilisation dans les industries et manufactures. En effet, les ETR sont bioaccumulables et persistants dans l'environnement, et bien qu'ils n'aient pas beaucoup de potentiel intrinsèque de dispersion, les produits dans lesquels ils se trouvent eux se dispersent facilement (Haque *et al.*, 2014). En raison de la gestion des déchets urbains et manufacturés, les ETR contenus dans les aimants, les téléphones portables, les écrans, les batteries, et autres déchets se retrouvent dans les lieux d'enfouissement technique (Haque *et al.*, 2014; Rim, 2016). Conséquemment à la lixiviation des sols et à la proximité des dépotoirs, les ETR se retrouvent de telle façon dans les cours d'eau pour finalement atteindre les environnements aquatiques voisinant de milieux urbains. De plus, les déchets et les eaux contaminées des industries représentent également des sources importantes d'exposition environnementale et conséquemment, un potentiel de bioaccumulation non négligeable (Rim, 2016). D'autre part, les ETR sont également retrouvés dans la poussière sur les routes et les chaussées dues à l'accumulation des particules libérées à travers les gaz d'échappement des véhicules. Cette forme particulière

présente sur les routes augmente drastiquement leur dispersion dans l'environnement. Sur le plan toxicologique, les ETR peuvent tous présenter un effet d'hormèse à faibles concentrations. Ainsi, une exposition à de faibles doses à ces métaux induirait des effets bénéfiques pour les organismes (Calabrese, 2005). Cependant, une exposition à de fortes concentrations peut causer des effets délétères. Ces effets sont néanmoins peu étudiés, ce qui constitue un frein à une évaluation des risques toxicologiques.

La source la plus importante de pollution atmosphérique aux ETR est celle du Ce. Étant l'ETR le plus abondant dans la croûte terrestre, il est utilisé comme catalyseur chimique dans l'essence pour en améliorer le rendement (Ma *et al.*, 2014). Majoritairement ajouté dans le diesel, le Ce permet d'augmenter la combustion et diminuer simultanément la température d'ignition (Ma *et al.*, 2014). Alors que les moteurs au diesel émettent de 30 à 100 fois plus de particules que les moteurs au gaz, les émissions de nanoparticules de Ce sous forme d'oxyde de Ce ($n\text{CeO}_2$) à travers les gaz d'échappement sont importantes et elles représentent des sources d'exposition environnementales et occupationnelles (Ma *et al.*, 2014; Rim, 2016). Il a été démontré que le Ce produit une réponse inflammatoire des poumons et une fibrose pulmonaire chez les rats jusqu'à 4 semaines après une exposition aiguë au CeO_2 (Ma *et al.*, 2014). Ceci pose d'importantes inquiétudes pour l'environnement dans les régions urbaines et industrialisées puisque la présence de véhicules au diesel dans ces dernières est importante. Le trafic routier représente donc une source importante d'émissions d'ETR.

permettent la conversion des gaz d'échappement polluants comme les hydrocarbures et le monoxyde de carbone en des formes moins toxiques (Berbel *et al.*, 2021; Rauch et Peucker-Ehrenbrink, 2015). Ces gaz d'échappement représentent la source anthropique principale d'exposition aux EGP (Savignan *et al.*, 2021). Bien que les émissions directes d'EGP sont parfois considérées comme étant non toxiques puisque les métaux sont sous forme élémentaire et sont non solubles, les EGP gagnent leur potentiel de toxicité lorsqu'ils sont complexés à d'autres éléments formant des sels actifs solubles dans l'eau (Gagnon et Patel, 2007; Wiseman, 2015). Ainsi, la présence dans l'environnement d'agents complexant comme les substances humiques ou les chlorures peuvent servir à rendre les EGP en des formes plus solubles (Wiseman, 2015). Ainsi, leur complexation avec les composants environnementaux permet leur accumulation sous des formes toxiques dans la poussière et les particules sur les routes, ce qui augmente leur dispersion dans l'environnement. La présence accrue d'EGP dans les particules en suspension dans l'air dans les environnements urbains soulève des inquiétudes importantes quant à leur potentiel de toxicité (Wiseman, 2015). Outre ces sources, les applications médicales notamment la prescription de médicaments à base de Pt dans certains traitements pour le cancer; et le raffinement de métaux sont responsables du relargage d'EGP dans les déchets de production et les eaux usées (Rauch et Peucker-Ehrenbrink, 2015; Savignan *et al.*, 2021).

Puisque le fond naturel d'EGP est très faible, l'addition d'EGP provenant de sources anthropiques au flux naturel est facilement détectable (Rauch et Peucker-Ehrenbrink, 2015). Depuis les 30 dernières années, l'utilisation de Pt, Pd et Rh dans des applications anthropiques a drastiquement augmenté (Rauch et Peucker-Ehrenbrink, 2015). Actuellement, les EGP sont de plus en plus retrouvés dans les environnements urbains

notamment dans la poussière sur les routes. Les travaux de Leopold et al (2008) ont mesuré les concentrations en EGP dans la poussière des routes de trois tunnels près de Munich en Allemagne; leurs analyses ont démontré que les concentrations en Pd variaient entre 311 et 516 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en 2007 alors qu'elles se trouvaient entre 14 et 22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en 1994 (Leopold *et al.*, 2008). Conséquemment, l'augmentation de leur présence dans les environnements urbains soulève de plus en plus d'inquiétudes au niveau de leur toxicité et des impacts environnementaux (Berbel *et al.*, 2021; Gagnon et Patel, 2007; Savignan *et al.*, 2021). Puisque les EGP sont un groupe de contaminants métalliques auquel on porte une attention relativement récente, les études concernant leur comportement et leur toxicité sont encore limitées.

1.2.3 Cobalt

Le Cobalt est un ETM relativement stable qui présente plusieurs propriétés similaires au Ni et au Fe (Barceloux et Barceloux, 1999; Okamoto et Eltis, 2011). Par sa faible sensibilité à l'oxydation et sa résistance aux hautes températures, il est utilisé dans les superalliages et dans les aciers à haute-résistance (Barceloux et Barceloux, 1999). Le Co est fortement prisé dans le développement des technologies de transport dites « vertes » puisqu'il est utilisé dans la production de batteries, notamment dans la composition des cathodes dans les batteries lithium-ion, ainsi que comme catalyseur à haut-rendement dans la production de biocarburants (Barrio-Parra *et al.*, 2018; Dalpé-Mainville *et al.*, 2021; Moss *et al.*, 2011).

Le Co est un métal dit essentiel aux organismes puisqu'il compose l'ion central dans la structure même de la vitamine B12 (Barceloux et Barceloux, 1999; Osman *et al.*, 2021).

Cependant, comme tout métal essentiel, sa présence en excès dans les cellules et les tissus des organismes peut induire des effets délétères. La toxicité cellulaire du Co implique une forte compétition avec d'autres ions métalliques pour des sites de liaison cellulaires, notamment avec le Fe étant donné leurs charges ioniques similaires (Osman *et al.*, 2021). Plus largement, la toxicité du Co a été associée à des cardiomyopathies ainsi que des troubles respiratoires importants notamment de l'asthme, des pneumonies, des dermatites de contact ainsi qu'à l'augmentation des risques de cancer du poumon (Barceloux et Barceloux, 1999; Okamoto et Eltis, 2011).

La contamination atmosphérique par le Co, ainsi que la présence de ce dernier dans les sols, représente des voies d'exposition importantes pour les organismes (Osman *et al.*, 2021). En effet, les activités anthropiques comme la combustion de carburants, les activités industrielles comme la production de batteries ainsi que l'application de fertilisants agricoles impliquent la dispersion d'ions Co dans les environnements urbains (Barceloux et Barceloux, 1999). Certaines émissions de Co sont également liées à son utilisation dans les systèmes de chauffage domestiques (Barrio-Parra *et al.*, 2018). Alors que la demande mondiale pour l'extraction et l'utilisation du Co prévoit augmenter de 460 % jusqu'en 2050, les connaissances concernant son comportement dans les cellules ainsi que sa toxicité nécessitent d'être renforcées (Dalpé-Mainville *et al.*, 2021).

1.3 BIOACCUMULATION DES ÉLÉMENTS TRACES MÉTALLIQUES

La toxicité des ETM dépend grandement de leur biodisponibilité dans un environnement donné et de leur tendance à s'accumuler dans les tissus des organismes.

Selon Luoma et Rainbow (2008), la bioaccumulation fait référence à « l'accumulation nette d'un contaminant dans un tissu donné comme conséquence de l'absorption par les différentes sources environnementales, comme l'eau et la nourriture, en considérant la perte par l'excrétion et la dilution par la croissance de l'organisme ». L'étude de la bioaccumulation de métaux traces dans les organismes est un outil important lors de l'évaluation de la contamination environnementale (Ali *et al.*, 2019). Dans le cas des ETM, ils peuvent s'accumuler dans les organismes par absorption directe ou encore par adsorption à travers les surfaces (Szynkowska *et al.*, 2018). Comparativement aux autres contaminants environnementaux comme les pesticides ou les polluants organiques persistants (POP), les ETM ne sont pas métabolisés par les organismes. Ainsi, puisqu'ils ne sont pas dégradés et ne forment pas de complexes organiques ou inorganiques ils vont donc s'accumuler dans l'organisme avant de pouvoir être excrétés (Markert et Friese, 2000). Lors d'une exposition importante, l'accumulation d'ETM dans les tissus et les organes surpasse les capacités de stockage des cellules. Il peut donc y avoir des effets délétères sur le métabolisme, la physiologie et la survie des organismes. En effet, des concentrations de métaux dépassant le seuil de toxicité peuvent induire des perturbations dans les fonctions cellulaires ce qui peut mener à des altérations dans la croissance, la reproduction, le système immunitaire et également dans les processus métaboliques (Jakimska *et al.*, 2011).

De façon générale, la bioaccumulation est grandement influencée par la biodisponibilité des contaminants, et la distinction entre les deux est importante pour comprendre la toxicité des ETM (Adriano, 2001). La biodisponibilité se définit comme étant la fraction biologiquement disponible pour la bioaccumulation dans les organismes

(Adriano, 2001). Dans le cas des ETM, la biodisponibilité est grandement influencée par la spéciation et les facteurs physico-chimiques du compartiment environnemental dans lequel ils se trouvent (Ali *et al.*, 2019; Szyrkowska *et al.*, 2018). En plus de la spéciation du métal, la bioaccumulation dépend également des caractéristiques propres aux organismes. En effet, la bioaccumulation des contaminants est un processus qui est spécifique à l'espèce. Les mécanismes de bioaccumulation dépendent de plusieurs facteurs notamment le métabolisme, la structure des cellules, tissus et organes, les habitudes d'alimentation et les mécanismes de détoxification de l'organisme (Ali *et al.*, 2019; Jakimska *et al.*, 2011; Stawarz, 2009). De plus, les caractéristiques comme l'âge, le sexe, la taille, la physiologie et même les facteurs génétiques des organismes peuvent faire varier l'endroit et la vitesse à laquelle les métaux s'accumulent (Ali *et al.*, 2019; Stawarz, 2009).

1.4 BIODISTRIBUTION DES MÉTAUX DANS LES ORGANES

Bien que la bioaccumulation soit un indice important pour connaître la contamination environnementale par les ETM, elle n'est pas suffisante pour comprendre l'ensemble de la toxicité des métaux traces. Puisque certains métaux traces « essentiels » ont un rôle actif dans le métabolisme des organismes, ils doivent être pris en charge par des mécanismes de distribution (Vijver *et al.*, 2004). Une fois qu'ils sont entrés dans les organismes, les ETR vont être transportés pour atteindre les différents tissus et organes de l'organisme (Stawarz, 2009). Cette distribution permet de maintenir les « pool » d'ions métalliques essentiels au métabolisme et aux processus physiologiques des organismes (Vijver *et al.*, 2004). Les métaux peuvent traverser les membranes plasmiques des cellules par transport facilité, soit par des protéines de transport, des protéines membranaires spécifiques ou encore par

endocytose (Marigómez *et al.*, 2002). Étant donné que les métaux traces toxiques compétitionnent avec les métaux « essentiels » pour les mêmes sites, leur liaison aux protéines qui transportent normalement les métaux « essentiels » va permettre leur distribution dans les tissus (Elder *et al.*, 2014; Stawarz, 2009). Le site d'action des métaux traces est grandement influencé par les propriétés physico-chimiques de ces derniers ainsi que les mécanismes cellulaires de bioaccumulation (Vijver *et al.*, 2004). En effet, puisque les organes ont des besoins physiologiques en métaux spécifiques, les profils de bioaccumulation des métaux vont varier dans les tissus d'un organe à l'autre.

Chez les poissons, le mercure (Hg), un métal non -essentiel, a tendance à s'accumuler de façon plus importante dans les muscles que dans le foie, tandis que le cadmium (Cd) s'accumule dans les reins et le foie (Moiseenko et Gashkina, 2020). Le mécanisme de toxicité du Hg implique sa liaison de coordination covalente avec les groupements sulfhydryles des protéines causant des dommages structuraux importants (Moiseenko et Gashkina, 2020). Ainsi, il est fortement accumulé dans les tissus riches en protéines comme les muscles. Dans le cas du Cd, il interagit fortement avec la cystéine de la métallothionéine dû à ses ressemblances importantes avec les métaux essentiels comme le Zn, impliqué dans le fonctionnement de la métallothionéine, ce qui explique son accumulation dans le foie et les reins (Moiseenko et Gashkina, 2020).

Les ETR vont entrer dans les organismes à travers les membranes et les muqueuses du système digestif et par les voies respiratoires (Stawarz, 2009). L'absorption par les voies respiratoires dépend principalement de la solubilité des particules métalliques ainsi que de leur taille (Elder *et al.*, 2014). Les nanoparticules et les gaz peuvent atteindre la circulation systémique par les échanges gazeux alvéolaires alors que les plus grosses particules vont

se déposer dans les voies respiratoires. Ces dernières peuvent cependant tout de même atteindre la circulation, et ce par un processus de transfert vers la voie gastro-intestinale (Elder *et al.*, 2014). En effet, suite à leur déposition dans les voies respiratoires, elles sont captées par le système de clairance mucociliaire des poumons et vont être transportées à l'intérieur du mucus vers le pharynx (Elder *et al.*, 2014). L'absorption gastro-intestinale est grandement influencée par la spéciation et la complexation des métaux. Les ETR sont absorbés par la voie gastro-intestinale à travers la nourriture ingérée par l'organisme. La complexation des métaux traces avec des composants organiques facilite leur absorption. Par exemple, le mercure complexé à des sels inorganiques a un taux d'absorption par la voie gastro-intestinale d'environ 10% alors que le méthyl-mercure est presque totalement absorbé (90-100%) (Elder *et al.*, 2014). Par le fait même, la barrière gastro-intestinale représente une voie d'absorption importante pour les métaux traces.

Des études investiguant la distribution des ETM à travers les différents organes et tissus sont importantes pour nous renseigner sur les sites principaux d'accumulation des métaux et déterminer les sites qui seront plutôt « sensibles ». Ces informations s'avèrent utiles comme point de départ pour des études plus spécifiques de toxicité.

1.5 MÉTAUX DANS LE MILIEU INTRACELLULAIRE

Puisque le maintien d'un « pool » de métaux est essentiel au fonctionnement du métabolisme, les organismes ont développé plusieurs stratégies d'accumulation des métaux dans le milieu intracellulaire. Par exemple, ils peuvent être sous forme d'ion libre ou complexés avec d'autres ions, liés aux centres actifs des enzymes, dans les vésicules ou les lysosomes ou encore liés à des composants cellulaires (Vijver *et al.*, 2004). Contrairement

à l'extérieur de la cellule, le milieu intracellulaire présente des caractéristiques qui rendent les liaisons métal-ligand beaucoup plus importantes. En effet, en plus d'être riche en ligands, le milieu intracellulaire se trouve à un pH de 7 stable ce qui limite les changements dans l'environnement et conséquemment ceux dans la nature de la spéciation des métaux (Campbell et Hare, 2009). Bien que les conditions intracellulaires comme le pH ou le potentiel d'oxydoréduction peuvent influencer le comportement des métaux dans les cellules, les propriétés physico-chimiques guident l'affinité des ions métalliques pour des ligands particuliers. Dans le but d'établir le lien entre les caractéristiques chimiques des ions métalliques et leur toxicité dans les cellules, les travaux pionniers de Nieoboer et Richardson (1980) ainsi que ceux de Kinraide (2009) ont présenté un système de classification des ions métalliques selon leurs propriétés de coordination. Cette classification regroupe les métaux en trois groupes (classes) selon leur état d'oxydation, permettant d'expliquer l'ampleur de leur affinité pour certains ligands intracellulaires.

soufre, azote et oxygène ($S > N > O$) (Duffus, 2002; Kinraide, 2009; Nieboer et Richardson, 1980). Cette classe comprend entre autres le Rh, Pd, Ir et Pt des EGP ainsi que le Pb et Hg. En raison de leur affinité, les ions métalliques de classe B vont former des complexes avec des ligands tels que H-, I-, CN-, CO et S²⁻ (Nieboer et Richardson, 1980). Dans les systèmes biologiques, ils vont chercher à se lier à des ligands contenant du soufre et de l'azote (Nieboer et Richardson, 1980). Ainsi, ils ont des affinités pour les groupements fonctionnels des protéines tels que les amines, thioéthers, sulfhydryles et disulfures, ainsi que pour l'azote hétérocyclique tel que les nucléotides (Nieboer et Richardson, 1980). Contrairement à ceux de la classe A, les ions métalliques de classe B ont la capacité de former des liaisons covalentes. Par exemple, leur liaison de coordination covalente avec des groupements essentiels comme -SH (sulfhydryle) et -S-S- (disulfure) peut altérer l'intégrité des protéines et le fonctionnement des enzymes (Nieboer et Richardson, 1980). Par conséquent, les ions métalliques de classe B sont généralement plus toxiques pour les organismes. Le troisième groupe est celui des métaux intermédiaires. Cette classe regroupe les métaux qui possèdent des affinités pour des ligands de classe A ou B, donc qui peuvent agir comme des métaux d'une ou de l'autre classe (Duffus, 2002; Nieboer et Richardson, 1980).

Le stockage de métaux intracellulaire a cependant une limite où des concentrations trop fortes peuvent engendrer de la toxicité. En effet, la toxicité des métaux survient lorsque la capacité de stockage intracellulaire est saturée, laissant donc place à des liaisons inappropriées avec des biomolécules importantes, ce qui cause des perturbations dans les fonctions biologiques (Mason et Jenkins, 1995). Contrairement aux métaux essentiels, les ETR et les EPG sont toxiques même à de faibles concentrations. En réponse à des

expositions importantes à des métaux traces dans l'environnement, les organismes ont développé des mécanismes permettant de limiter la toxicité des métaux (Campbell et Hare, 2009; Mason et Jenkins, 1995; Vijver *et al.*, 2004). Les mécanismes de détoxification intracellulaires mis en place impliquent principalement la séquestration des métaux toxiques pour faire varier leur toxicocinétique, limitant donc leur disponibilité (Davidson *et al.*, 2014; Vijver *et al.*, 2004). Le milieu intracellulaire contient des ligands spéciaux, soit des molécules de liaison aux métaux, qui ont comme rôle de capter les métaux en excès et de les séquestrer (Jakimska *et al.*, 2011). Il existe deux principaux mécanismes de séquestration des métaux. Le premier implique la métallothionéine (MT), une protéine cytosolique de liaison aux métaux. La MT est une protéine thermorésistante à faible poids moléculaire qui est très riche en cystéines (Davidson *et al.*, 2014; Marigómez *et al.*, 2002). Les groupements thiol de la cystéine offrent à la MT une forte affinité pour les métaux, autant essentiels que toxiques (Davidson *et al.*, 2014). La MT se lie aux métaux pour limiter leur disponibilité pour les autres ligands « sensibles » intracellulaires, protégeant donc la cellule des effets toxiques des métaux (Jakimska *et al.*, 2011; Rainbow, 2007). De cette façon, la MT participe activement à la gestion intracellulaire des métaux chez les organismes.

La MT est une protéine très stable capable de faire des complexes durables avec les métaux, ce qui permet leur séquestration efficace. En effet, il a été démontré que lorsque le facteur de transcription MTF-1, responsable de l'induction de l'expression de la MT est surexprimée chez les souris, la néphrotoxicité ainsi que la létalité du Cd est réduite (Jakimska *et al.*, 2011). C'est également le cas du Pt et du Pd qui peuvent se lier aux groupements sulfhydryles de la MT en remplaçant le Cd ou le Zn dans certains organes

impliqués dans la détoxification comme le foie ou les reins (Ek *et al.*, 2004). Puisque des expositions à des métaux traces induisent la synthèse de la MT, elle est souvent utilisée comme biomarqueur d'exposition aux métaux. En effet, sa quantification donne des informations concernant les concentrations de métaux séquestrés dans les différents tissus des organismes (Koivula et Eeva, 2010). La MT est une protéine ubiquitaire, donc elle est présente chez presque tous les organismes vivants. Bien que les mécanismes de détoxification soient spécifiques aux espèces, les MT ont une structure considérablement similaire chez les oiseaux et les mammifères (Koivula et Eeva, 2010). De plus, les travaux de Andrews et al (1996) ont démontré que la MT semble être structurellement identique chez plusieurs espèces d'oiseaux, notamment entre le poulet domestique (*Gallus domesticus*), le dindon sauvage (*Meleagris gallopavo*) et la caille européenne (*Coturnix coturnix*). Chez les oiseaux, les métaux traces associés aux MT comme le Cd, le Zn et le Pb ont tendance à fortement s'accumuler dans le foie et les reins (Elliott et Scheuhammer, 1997; Koivula et Eeva, 2010). Les travaux de Elliott et al (1992) ont identifié de fortes corrélations entre les concentrations hépatiques en MT et celles de Cd chez certains oiseaux marins notamment l'océanite cul-blanc (*Oceanodroma leucorhoa*), le goéland argenté (*Larus argentatus*), et le macareux moine (*Fratercula artica*); alors que ceux de Elliott et al (1997) ont identifié de fortes corrélations entre les concentrations rénales en MT et celles de Cd chez le macareux rhinocéros (*Cerorhinca monocerata*), le starique de Cassin (*Ptychoramphus aleuticus*) et le guillemot à cou blanc (*Synthliboramphus antiquus*) (Elliott et Scheuhammer, 1997; Elliott *et al.*, 1992). Certains isoformes de MT aviaire ont également été retrouvés dans le foie, les reins, le pancréas et la muqueuse intestinale du poulet domestique (*Gallus domesticus*) (Andrews *et al.*, 1996).

Un autre mécanisme de détoxification grandement utilisé par les organismes est la séquestration des métaux dans des compartiments appelés « granules ». Il existe 3 types de granules; le type A, soit des granules amorphes composées de dépôts de phosphates de calcium qui ont tendance à accumuler le Zn; le type B, qui est principalement des granules provenant des lysosomes et qui accumule l'Ag, le Cd, le Hg et le Cu; et finalement le type C, qui est sensiblement une agrégation d'excès de Fe (Rainbow, 2007). Ce mécanisme de détoxification a grandement été étudié chez les invertébrés, notamment dans les cellules intestinales des crustacés ainsi que chez les bivalves et les oligochètes (Bjerregaard *et al.*, 2014; Koivula et Eeva, 2010). Toutefois, la formation de granules métalliques a également été observée chez certains vertébrés notamment chez les poissons. Des études sur la distribution subcellulaire de certains métaux traces dans les tissus du choquemort (*Fundulus heteroclitus*) ont démontré le rôle important des granules métalliques dans la détoxification du Cd et du Pb chez les organismes aquatiques (Goto et Wallace, 2010). Des granules séquestrant le Cd, le Se et le Hg ont également été observé chez certains mammifères marins notamment le dauphin et le lion de mer (*Otaria byronia*) (Gallien *et al.*, 2001; Nigro et Leonzio, 1996). Les études portant sur la formation de granules chez les oiseaux sont encore limitées, mais les travaux de Nam et al (2005) ainsi que ceux de Nigro et Leonzio (1996) ont montré la présence de ces granules chez certains oiseaux aquatiques sauvages notamment le grand cormoran (*Phalacrocorax carbo*), suggérant que ce mécanisme de détoxification existe afin de compenser lorsque l'ingestion de métaux traces est importante et que le mécanisme d'excrétion par les plumes ne suffit plus (Nam *et al.*, 2005; Nigro et Leonzio, 1996). De plus, les récents travaux de Parker et Kraak (2018) ont démontré la présence de granules comme mécanisme de détoxification dans les tissus du

foie, de la rate ainsi que dans la muqueuse intestinale du pigeon domestique (*Columbia livia domesticus*) exposé aux métaux traces en laboratoire (G.H. Parker et Kraak, 2018).

Cependant, les mécanismes de séquestration et de stockage des métaux dans les différents compartiments cellulaires ne sont pas parfaitement efficaces. En effet, certains métaux échappent à ces mécanismes et peuvent donc tout de même interagir avec des sites sensibles dans les cellules et induire de la toxicité. Par exemple, la liaison de coordination du Hg de façon covalente avec les groupements sulfhydryles des protéines cause des dommages structuraux importants, traduisant donc une toxicité subcellulaire (Moiseenko et Gashkina, 2020). La toxicité subcellulaire est définie par Mason et Jenkins (1995) comme étant l'ensemble des dérèglements des fonctions biologiques induits par des liaisons inappropriées et non spécifiques d'ETM sur des sites physiologiques importants dans les cellules tels que les biomolécules (ex. acide désoxyribonucléique (ADN), acide ribonucléique (ARN), enzymes et peptides) ou encore des organites (ex. réticulum endoplasmique et mitochondries).

1.5.1 Approche du fractionnement subcellulaire

L'approche du fractionnement subcellulaire est une technique de plus en plus utilisée dans les études toxicologiques puisqu'elle permet de fournir des informations clés concernant la bioaccumulation et la compartimentation des métaux à l'intérieur de la cellule. À travers cette méthode, une distinction importante est appliquée quant à l'accumulation des métaux dans les fractions métalliques détoxifiées (soit les protéines thermostables comme les MT, et les granules), de celle dans les fractions sensibles à la toxicité par une exposition aux métaux, comme les enzymes cytosoliques et les organites

incluant les microsomes et les mitochondries (Rosabal *et al.*, 2015; Wallace et Luoma, 2003). Alors que les métaux dans la fraction détoxifiée ne représentent pas un risque toxicologique, en revanche l'accumulation de métaux dans les fractions sensibles peut mener à la liaison de ces derniers à des sites physiologiques importants (Rosabal *et al.*, 2015; Wallace et Luoma, 2003).

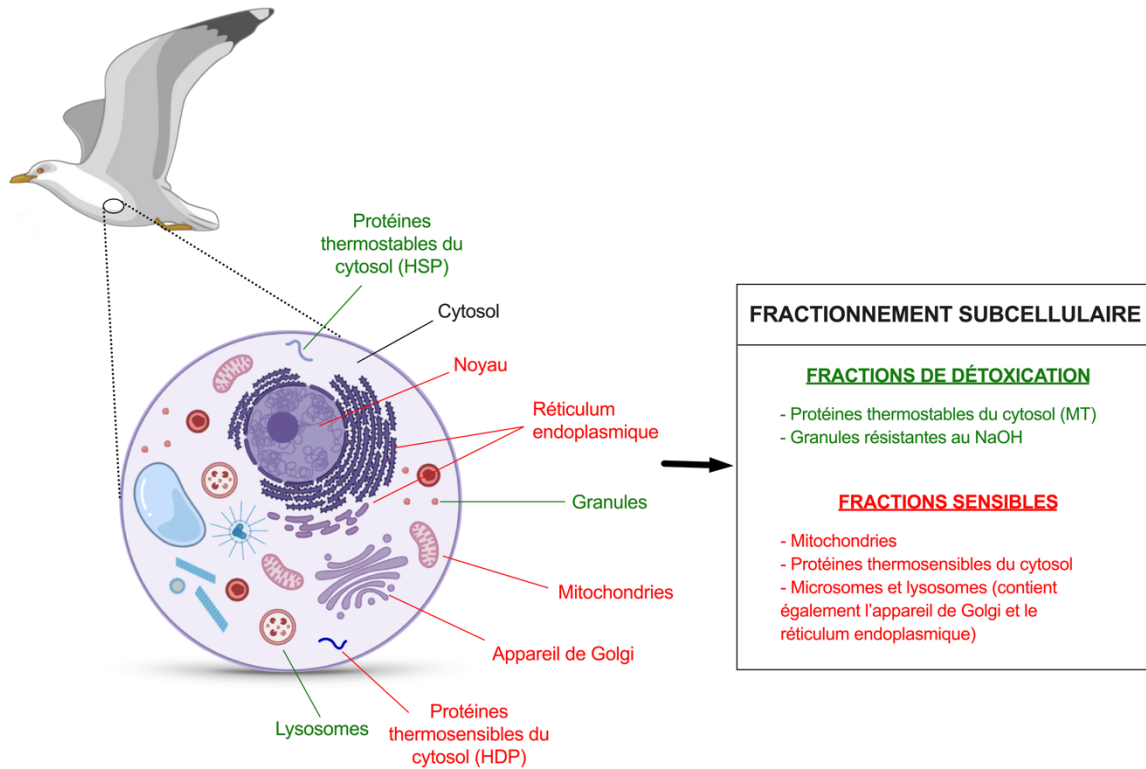


Figure 1.2. Schéma de la structure interne d'une cellule de *L. delawarensis* représentant différents composants subcellulaires ainsi que les fractions obtenues à travers l'approche opérationnelle du fractionnement subcellulaire. En rouge : « les fractions sensibles » soit celles sensibles à l'accumulation de métal, en vert : les fractions de détoxification soient celles impliquées dans la détoxification des métaux.

Le fractionnement subcellulaire permet, à travers un processus d'homogénéisation cellulaire et une série de centrifugations différentielles des cellules, de rompre la membrane plasmique et d'obtenir six fractions subcellulaires différentes. L'homogénéisation des tissus permet tout d'abord d'accéder au milieu intracellulaire sans briser les organelles

comme les mitochondries, les lysosomes ou le noyau (Campbell et Hare, 2009). La centrifugation différentielle quant à elle est une technique délicate pour les cellules qui permet la séparation efficace de l'homogénat en fractions subcellulaires (Campbell et Hare, 2009). Avec l'ajout du protocole de dénaturation par la chaleur, il est même possible d'obtenir des fractions du cytoplasme contenant des HSP dont la MT, puisqu'il permet la séparation des protéines cytoplasmiques sensibles à la chaleur (Campbell et Hare, 2009). Également, une digestion avec du NaOH est nécessaire pour isoler les granules des débris. En général, le fractionnement subcellulaire permet d'obtenir les fractions suivantes : (1) noyau et débris, (2) granules (fraction résistante à la digestion par le NaOH), (3) protéines thermorésistantes (*HSP* pour *heat-stable protein*) comme les MT, (4) microsomes et lysosomes, (5) mitochondries et (6) les protéines thermosensibles du cytosol (*HDP* pour *heat-denaturated protein*) (Cardon, P. Y. *et al.*, 2018; Rosabal *et al.*, 2014). Les fractions subcellulaires obtenues sont par la suite analysées par spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS) pour obtenir les concentrations en métaux. L'ICP-MS est une analyse en spectrométrie très avantageuse puisqu'elle est hautement sensible quant à la détection de métaux (Campbell et Hare, 2009). Le fractionnement subcellulaire est une approche qui présente plusieurs avantages. Ceci permet de mesurer les concentrations de métaux dans plusieurs compartiments au lieu de se limiter aux concentrations tissulaires totales pour comprendre le risque toxique d'ETM. En effet, grâce aux techniques d'homogénéisation et de centrifugation différentielle, il est possible d'isoler des fractions subcellulaires de façon efficace sans compromettre les autres composants cellulaires (Campbell et Hare, 2009). L'homogénéisation des tissus permet tout d'abord d'accéder au milieu intracellulaire (Campbell et Hare, 2009). La centrifugation différentielle quant à elle

est une technique délicate pour les cellules qui permet la séparation efficace de l'homogénat en fractions subcellulaires (Campbell et Hare, 2009). Avec l'ajout du protocole de dénaturation par la chaleur, il est même possible d'obtenir des fractions du cytoplasme contenant des HSP dont la MT, puisqu'il permet la séparation des protéines cytoplasmiques sensibles à la chaleur (Campbell et Hare, 2009).

Il est reconnu que la distribution des métaux à travers les compartiments subcellulaires est un facteur pouvant expliquer la tolérance des organismes aux métaux traces (Cardon, P. Y. *et al.*, 2018). Ainsi, les données du fractionnement subcellulaire permettent de connaître les stratégies de détoxification utilisées par des organismes pour faire face à ces contaminants (Rosabal *et al.*, 2012; Rosabal *et al.*, 2015; Wang, W.-X. et Rainbow, 2007). Parallèlement, ces analyses permettent d'identifier les sites subcellulaires où l'accumulation d'ETM est importante; fournissant donc des informations clés dans la caractérisation des biomolécules ciblées par ces contaminants métalliques à l'aide des approches en métallomique environnementale. Ainsi, cette approche permet de comprendre pourquoi certains métaux sont plus toxiques et la comparaison des données du fractionnement enrichit la compréhension des différences interspécifiques dans la sensibilité aux métaux traces (Barst *et al.*, 2016; Barst *et al.*, 2018; Eyckmans *et al.*, 2012; Urien *et al.*, 2018). Cette approche est également utilisée dans les études de biodisponibilité des métaux dans les réseaux trophiques. En effet, par l'étude des concentrations intracellulaires des métaux à travers les échanges entre les proies et les prédateurs, il est possible d'estimer le pourcentage du métal bioaccumulé dans la proie qui sera transféré aux prédateurs (Cardon, P. Y. *et al.*, 2018; Dubois et Hare, 2009; Dumas et Hare, 2008).

Bien que plutôt récente, l'approche du fractionnement subcellulaire est déjà utilisée dans plusieurs études notamment concernant l'accumulation intracellulaire d'ETR et d'EPG et ce chez différents organismes. Les travaux de Racine (2016) sur l'accumulation de La et Eu chez l'algue verte (*Chlamydomonas reinhardtii*) ainsi que ceux de Cardon et al (2019) portant sur l'accumulation d'Y chez la daphnie (*Daphnia magna*) et les chironomes (*Chironomus riparius*) ont pu démontrer des profils d'accumulations intracellulaires indiquant une accumulation plus importante de ces ETR dans les fractions résistantes au NaOH (granules), exposant donc l'importance de mécanisme de détoxification dans la gestion intracellulaire des ETR (Cardon, P.-Y. *et al.*, 2019; Racine, 2016). Plus récemment, les travaux de Desjardins et al (2022) sur la perchaude (*Perca flavescens*) du Lac St-Pierre (Québec, Canada) ont permis révélé des profils d'accumulation intracellulaire des métaux variables en fonction de leur classification ionique où notamment les métaux de classe B seraient détoxiqués majoritairement par la fraction des HSP (Desjardins *et al.*, 2022). De plus, les travaux de Labrie (2021) et Rolland (2020) sur le fractionnement subcellulaire de La et Ce ont démontré une relation linéaire positive dans l'accumulation de ces métaux dans les sites sensibles et les sites de détoxification en fonction de la concentration totale en métal.

Néanmoins, le fractionnement subcellulaire est une technique qui possède certaines limites. Campbell et Hare (2009) ont recensé certaines de ces limitations. En raison de ces limites, il est important d'effectuer une optimisation du protocole de fractionnement subcellulaire à appliquer à l'aide de marqueurs enzymatiques afin d'assurer le meilleur rendement (Cardon, P. Y. *et al.*, 2018; Lavoie *et al.*, 2009; Rosabal *et al.*, 2014; Urien *et al.*, 2020).

1.6 LE GOÉLAND À BEC CERCLÉ

Les espèces aviaires sont des organismes de choix dans les études en toxicologie environnementale (Burger et Gochfeld, 2004; Durkalec *et al.*, 2022). En raison des particularités de leur métabolisme ainsi que leur capacité à réguler leurs activités de détoxification en réponse à leur environnement, les oiseaux réussissent à moduler leur tolérance aux xénobiotiques ce qui favorise leur survie dans des environnements particulièrement contaminés (Koivula et Eeva, 2010). De plus, les oiseaux sont de bonnes espèces bioindicatrices puisqu'ils ont la capacité d'accumuler de fortes quantités de contaminants, notamment étant donné leur position trophique élevée (Durkalec *et al.*, 2022; Hofer *et al.*, 2010; Vizuite *et al.*, 2018). Dans ce sens, le goéland à bec cerclé (*Larus delawarensis*) est un modèle d'organisme de plus en plus utilisé dans l'étude de la contamination des environnements urbains. En effet, ses comportements alimentaires, sa capacité d'adaptation aux environnements anthropisés et son habitat à proximité des milieux urbains l'expose à plusieurs types de contaminants. L'enrichissement anthropique de métaux traces dans l'environnement est important dans les milieux urbains, et les oiseaux vivants dans ces environnements accumulent des concentrations tissulaires de métaux plus importantes que chez des espèces aviaires arctiques (Brown *et al.*, 2019). Conséquemment, le goéland à bec cerclé est une bonne espèce bio-indicatrice des niveaux de contamination aux métaux traces.

1.6.1 Écologie

Le goéland à bec cerclé est l'espèce de la famille des laridés (*Laridea*) la plus répandue en Amérique du Nord (Giroux *et al.*, 2016). C'est un oiseau migrateur nichant en colonies, dont la plus populeuse se retrouve sur l'île Deslauriers au nord-est de la ville de Montréal. À 3 km en aval de Montréal, cette île se situe au milieu du fleuve Saint-Laurent et compte près de 44 000 nids (2012), représentant donc la plus grosse colonie de goélands à bec cerclé en Amérique du Nord (Giroux *et al.*, 2016). En raison de sa grande capacité d'adaptation aux milieux anthropisés, il occupe des niches se trouvant près des activités urbaines. Le goéland à bec cerclé de la région de Montréal est opportuniste et omnivore, et en raison de l'hétérogénéité du paysage urbain de cette région, il dispose de plusieurs sources d'alimentation (Caron-Beaudoin *et al.*, 2013). Les travaux de Caron-Beaudoin *et al.* (2013) sur la colonie de goélands à bec cerclé de l'Île Deslauriers ont démontré que les goélands ont trois grandes zones d'alimentation; la zone urbanisée, la zone agricole et la zone plus naturelle soit à travers le fleuve Saint-Laurent. Le comportement alimentaire opportuniste du goéland à bec cerclé peut se traduire autant dans des habitats plus naturels tant aquatiques que terrestres comme le fleuve Saint-Laurent, ou encore à travers des habitats très anthropisés comme les terres agricoles ou les lieux d'enfouissement technique (Brown *et al.*, 2019; Caron-Beaudoin *et al.*, 2013). L'île Deslauriers se trouve à proximité de plusieurs terres agricoles autour du fleuve Saint-Laurent, et les goélands à bec cerclé de la colonie préconisent ces sites d'alimentation notamment pour la consommation de vers, de certains arthropodes et de graines (Brown *et al.*, 2019). La zone urbanisée quant à elle possède une diversité importante de sources d'alimentation principalement de nature anthropique. Les goélands se nourrissent dans les ordures ménagères et celles de la ville, dans les lieux d'enfouissement technique ainsi que dans les bassins de traitement des eaux

usées (Brousseau *et al.*, 1996; Caron-Beaudoin *et al.*, 2013; Giroux *et al.*, 2016). À travers une même colonie, les individus peuvent favoriser certaines zones d'alimentation. Les habitudes alimentaires des oiseaux peuvent grandement faire varier les concentrations de contaminants dans les tissus. En analysant les isotopes stables dans les tissus et en utilisant les données de localisation GPS, Caron-Beaudoin *et al.* (2013) ont pu conclure que le contenu stomacal des individus de la même colonie varie significativement en fonction de la zone d'alimentation choisie. Également, les travaux de Brown *et al.* (2019) ont révélé une accumulation plus importante d'Y (un élément du groupe des ETR) dans les tissus hépatiques des oiseaux choisissant de se nourrir dans les zones agricoles. Cependant, plusieurs autres facteurs peuvent contribuer à la variabilité notamment l'âge, l'habitat et même le sexe des oiseaux (Brown *et al.*, 2019). Brown *et al.* (2019) suggèrent que ces différences dans l'accumulation dans les tissus pourraient être expliquées par le choix des oiseaux femelles à s'alimenter dans des terres agricoles, dans le but de limiter leurs coûts en énergie lors de la saison de la ponte et de la couvée. Ainsi, ces dernières seraient exposées à des métaux traces différents des individus qui favorisent les sites d'alimentation en zone urbaine particulièrement les dépotoirs. D'un autre côté, les auteurs ont aussi souligné que des différences physiologiques entre les sexes pourraient également expliquer les constats observés dans l'accumulation d'Y. Ces informations nous suggèrent l'importance de considérer le sexe comme facteur lors des études portant sur le fractionnement subcellulaire de ces contaminants chez *L. delawarensis*.

1.6.2 Voies d'exposition aux métaux

Sur le plan toxicocinétique, l'ingestion par l'alimentation et l'inhalation de particules sont des voies d'exposition importantes aux métaux traces. La voie gastro-intestinale est fortement impliquée dans le processus d'absorption des métaux traces dans les organismes et donc, les sources alimentaires des organismes peuvent donc représenter des voies d'expositions importantes. Dans les milieux urbains, la gestion des déchets domestiques et des industries implique le relargage important d'ETM, notamment d'ETR, dans les lieux d'enfouissement technique (Haque *et al.*, 2014; Rim, 2016). Ces derniers sont contaminés par le contenu direct des déchets, mais également par les dépositions atmosphériques ainsi que par la lixiviation des sols environnants. Les ordures ménagères et les lieux d'enfouissement technique sont des sources d'alimentation importantes pour les goélands à bec cerclé (Brousseau *et al.*, 1996; Giroux *et al.*, 2016). Les lieux d'enfouissement technique sont attrayants pour les oiseaux puisqu'il est possible d'y trouver des aliments anthropiques riches en énergie (Brown *et al.*, 2019). Les émissions atmosphériques d'EGP pourraient également être un vecteur de contamination des sources alimentaires des goélands à bec cerclé. En effet, la complexation des particules d'EPG avec des ligands environnementaux permet leur accumulation sous des formes toxiques dans la poussière et les particules sur les routes (Wiseman, 2015). Cette complexation augmente la dispersion des EPG dans l'environnement pour finalement atteindre les sources alimentaires des oiseaux. Alors qu'il est reconnu que les oiseaux sont principalement exposés aux métaux traces par l'alimentation, il a été suggéré que les voies d'exposition par l'inhalation de particules pourraient également contribuer à la bioaccumulation dans les tissus (Naccari *et al.*, 2009; Sorais *et al.*, 2017; Sorais *et al.*, 2021). Bien qu'il ait été démontré que 20% à 30% du Pt est biodisponible suite à une inhalation chez les rats, les

connaissances concernant l'inhalation d'EGP chez les oiseaux sont encore limitées (Ek *et al.*, 2004). Il est toutefois possible de croire que les particules atmosphériques d'EGP pourraient tout de même s'accumuler dans les tissus des oiseaux. En effet, Sorais *et al.* (2017) ont suggéré que les dépôts atmosphériques de contaminants sur le plumage des oiseaux pourraient représenter une voie d'exposition additionnelle lors du comportement de nettoyage des plumes. D'ailleurs, les travaux de Ek *et al.* (2004) ont démontré que le plumage des faucons pèlerins (*Falco peregrinus*) vivant en milieux urbains contient des concentrations plus importantes d'EGP que celui des individus en milieux sauvages. Ces auteurs ont également présenté un rapport sur les concentrations totales de Pt dans le guano du faucon pèlerin. Ces concentrations se sont avérées plutôt faibles comparativement aux autres tissus, ce qui suggère qu'il y aurait peu d'excrétion du Pt chez les oiseaux. Ces données soulèvent des inquiétudes importantes concernant les oiseaux vivants dans les milieux urbains (Ek *et al.*, 2004).

Dans un même ordre d'idée, par la proximité des zones urbaines avec le fleuve Saint-Laurent, la lixiviation des sols des quartiers urbains et des lieux d'enfouissement technique, ainsi que le rejet des eaux usées et des déchets industriels représentent également une source importante de contamination des environnements aquatique et terrestre fluviaux (Rim, 2016). Les goélands qui favorisent une zone d'alimentation naturelle aquatique ou terrestre à travers le fleuve Saint-Laurent vont se nourrir de diverses espèces de poissons, d'arthropodes aquatiques et d'arthropodes comme des coléoptères et des diptères (Caron-Beaudoin *et al.*, 2013). Dans les zones agricoles, l'application de fertilisants inorganiques est responsable de l'addition importante de métaux traces dont les ETR dans les sols agricoles (Ali *et al.*, 2019; Gonzalez *et al.*, 2014). Dans les zones agricoles, les goélands

sont exposés aux ETR par la consommation d'organismes comme les vers et certains arthropodes ainsi que par la co-ingestion de particules du sol agricole (Brown *et al.*, 2019).

Actuellement, des travaux sur la distribution subcellulaire des ETM, incluant les ETR et les EGP dans le foie des goélands à bec cerclé sont en cours à l'Université du Québec à Montréal (UQAM). Alors que les concentrations de métaux dans le foie peuvent être un indicateur d'exposition chronique, celles retrouvées dans les tissus comme les plumes, les poumons et l'intestin sont de bons indicateurs d'une exposition récente et permettent donc de fournir des informations sur la pollution environnementale de l'habitat (Naccari *et al.*, 2009). Cependant, nous ne connaissons pas le devenir intracellulaire des ETM, incluant les ETR et les EGP, dans d'autres tissus d'intérêt toxicologique notamment l'intestin. Ce dernier est particulièrement intéressant puisqu'il est le reflet de l'importance de la nourriture comme voie d'exposition aux métaux (Naccari *et al.*, 2009).

1.7 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

À la lumière de ces connaissances, l'objectif principal de ce projet est de nous renseigner sur l'accumulation et sur la répartition subcellulaire des ETM notamment les ETR et les EGP dans les tissus des goélands à bec cerclé (*Larus delawarensis*) de la région de Montréal. Ceci permettra d'améliorer les connaissances concernant le devenir intracellulaire des métaux et de mieux comprendre leur toxicité chez les oiseaux. Ces résultats permettront également de dresser un meilleur portrait sur la contamination urbaine par ces ETM dans la région de Montréal.

Objectifs spécifiques :

- A) Déterminer l'accumulation d'une série de MCS incluant les ETR et les EGP et le Co dans les cellules intestinales du goéland à bec cerclé récolté dans la région urbaine de la Ville de Montréal

Hypothèses :

- i. Une accumulation importante de ces MCS est retrouvée dans les cellules intestinales de *L. delawarensis*
- B) Déterminer le devenir intracellulaire des MCS (en particulier, les ETR, le EGP et le Co) dans les cellules intestinales du goéland à bec cerclé à l'aide de l'approche du fractionnement subcellulaire
 - a. Optimiser un protocole de fractionnement subcellulaire adapté aux cellules intestinales de *L. delawarensis*

- b. Comparer la distribution subcellulaire des ETR, EPG et Co entre les compartiments de détoxification et sensibles en considérant les trois classes de métaux

Hypothèses :

- i. Les biomarqueurs enzymatiques démontrent l'efficacité attendue du protocole de fractionnement subcellulaire optimisé pour les cellules intestinales de *L. delawarensis*
- ii. Dans les cellules intestinales, l'accumulation d'ETR, d'EGP et de Co dans les fractions détoxiquées et les fractions sensibles augmente en fonction de l'augmentation de la concentration totale
- iii. Dû aux différentes propriétés des classes de métaux, la fraction de détoxification contenant les MT accumule les plus fortes concentrations de métaux de classe B, donc les EGP; alors que la fraction des granules contient les plus fortes concentrations de métaux de classe A, donc les ETR
- iv. Le Co s'accumule autant dans les HSP que dans les granules en raison de son comportement de métal intermédiaire
- v. Malgré la réponse de détoxification, les ETM s'accumulent de façon importante dans les fractions « sensibles », et ce pour l'ensemble des ETM étudiés

CHAPITRE II: SUBCELLULAR PARTITIONING OF CRITICAL AND
STRATEGIC METALS INCLUDING RARE EARTH ELEMENTS,
PALLADIUM AND COBALT IN INTESTINAL CELLS OF URBAN-
ADAPTED RING-BILLED GULLS

Frédérique Pelletier, Jonathan Verreault, Maikel Rosabal*

Groupe de recherche en toxicologie de l'environnement (TOXEN), Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, QC, H3C 3P8, Canada

* Corresponding author:

Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Succursale Centre-ville, Montreal, QC, H3C 3P8, Canada.

Tel.: +1-514-987-3000, ext. 3924 Fax: +1-514-987-4647;

E-mail address: rosabal.maikel@uqam.ca

2.1 ABSTRACT

Urban areas are increasingly exposed to concentrations of critical and strategic metals (CSM) such as rare earth elements (REEs) and platinum group elements (PGEs), for which information regarding their toxicological risks is scarce. In this study, we determined the subcellular partitioning of various CSM (La, Ce, Co, Gd, Nd, Pd, Pr) in intestinal cells of a bioindicator avian species breeding in highly urbanized areas, the ring-billed gull (*Larus delawarensis*). Ring-billed gulls (n = 45) were captured in the Montreal area (QC, Canada) and samples from the intestinal cells were collected for metal distribution analyses between detoxified-metal fractions (granules, heat-stable proteins and peptides) and “sensitive” sites (microsomes, mitochondria, and heat-denatured proteins) putatively involved in metal toxicity. Using an optimized subcellular partitioning protocol, metal quantification in the different subcellular fractions was performed by ICP-MS. The proportions of total metal accumulated in the gut cells that were found as detoxified forms varied from 48% (Pd) to 73.4% (Nd). In contrast to Pd, which was mainly associated with the HSP fraction, REEs in ring-billed gulls were consistently found in greater concentrations in the granule fraction. Co was mostly accumulated in granules. Accumulation in the metal-sensitive fractions was also observed, where Pd yielded the highest proportion (28%) compared to the other CSM (ranged from 2.6% to 17%). Our results contributed to the understanding of subcellular partitioning of CSM in birds to cope with these emerging contaminants. These findings provide a baseline concentration of various emerging inorganic contaminants with a potential use for environmental risk assessments.

Keywords: emerging contaminants; birds; urban areas; metal detoxification, rare earth elements, platinum group elements

2.2 INTRODUCTION

Critical and strategic metals (CSM) have emerged as a growing concern in environmental toxicology studies due to the environmental risks associated with their increasing use and demand in the development of new technologies (Batley et Campbell, 2022). This group of metals includes various elements such as cobalt (Co), lithium (Li) and titanium (Ti), but also rare earth elements (REEs) as well as platinum group elements (PGEs). Highly urbanized regions are particularly vulnerable to CSM contamination of their environmental compartments due to the elevated emissions of CSM from multiple sources (Wong *et al.*, 2006). The highly developed network of infrastructures, roads, and industries as well as the significant release from both municipal and industrial wastes are important sources of metal emissions in urban areas (Aguilera *et al.*, 2021; Aguilera *et al.*, 2022; Alharbi *et al.*, 2019; Wong *et al.*, 2006). This is the case for several CSM, including Co that is widely used in batteries and catalysts, which are products poorly managed by the recycling industry, making it likely to end up in landfills and other urbanized areas (Barrio-Parra *et al.*, 2018). Unlike some trace metals such as cadmium (Cd), zinc (Zn), arsenic (As) and lead (Pb) that have been widely studied in urban environments, REEs and PGEs are considered as "emerging" metal contaminants (Batley et Campbell, 2022; Berbel *et al.*, 2021; Ge *et al.*, 2000; Tepe *et al.*, 2014). REEs are used primarily in the production of magnets for electronic devices including displays and lasers, and also in the medical field for scans, X-rays and magnetic resonance imagery (MRI) (MacMillan *et al.*, 2017; Rim, 2016). They are also spread in agricultural fields as they are often added in fertilizers (mainly Y) (Batley et Campbell, 2022; Brown *et al.*, 2019). In urban areas, municipal and manufactured waste management entails the dispersion of REEs contained in magnets, cell

phones, monitors, batteries, and other wastes that eventually end up in landfills (Haque *et al.*, 2014; Rim, 2016). While REE emissions are highly diverse, PGE emissions are primarily atmospheric and are often linked to motorized transportation systems including gasoline combustion and catalyst production commonly found in heavy traffic areas (Batley et Campbell, 2022; Pagano *et al.*, 2015; Rauch et Peucker-Ehrenbrink, 2015; Savignan *et al.*, 2021; Wiseman, 2015). Exhaust gases represent the primary anthropogenic source of exposure to PGEs (Savignan et al., 2021). Added as an active substance to catalysts in the car exhaust system since the 1960s, they convert polluting emissions such as hydrocarbons and carbon monoxide into less toxic forms (Berbel *et al.*, 2021; Rauch et Peucker-Ehrenbrink, 2015). PGEs gain their toxicity potential when complexed with other elements forming water-soluble active salts in dust and particulate matter on roads, increasing their dispersion in the environment (Gagnon et Patel, 2007; Wiseman, 2015).

The understanding of the potential risks of CSM in urban areas is critical as the demand for these metals increases rapidly (Watari *et al.*, 2020). To address this knowledge gap, studies focused on generating toxicological data (e.g., tissue metal levels, metal interaction with cellular sites, and subcellular targets) on CSM in organisms in urban areas are needed. In this regard, the subcellular partitioning approach, which has been increasingly used in the last two decades, provides important information about the compartmentalization of metals within the cell (Cardon, P.-Y. *et al.*, 2019; Rosabal *et al.*, 2015). Through this method, an important distinction is applied regarding the accumulation of metals in detoxified-metal fractions (i.e., cytosolic thermostable proteins such as metallothioneins (MTs), and granules), from that in fractions potentially susceptible to metal toxicity such as cytosolic enzymes and organelles including microsomes and mitochondria (Rosabal *et*

al., 2015; Wallace et Luoma, 2003). While metals in the detoxified-metal fraction do not represent a toxicological risk, accumulation of these contaminants in metal-sensitive fractions can lead to important cellular impairments (Cardon, P.-Y. *et al.*, 2020; Rosabal *et al.*, 2015; Wallace et Luoma, 2003). Insight into the detoxification strategies used by organisms to cope with these contaminants as well as the associated potential risk of metals can also be revealed (Rainbow, 2007; Rosabal *et al.*, 2012; Rosabal *et al.*, 2015). More recently, metal measurements from subcellular partitioning were used to predict the intracellular behaviors of metals including REEs based on their classification from Nieboer et al (1980) metal classification according to chemical affinities (Desjardins *et al.*, 2022; Labrie, 2022; Rolland, 2020).

With regards to CSM, some pioneer works has already reported information about the subcellular distribution of several metals from REE and PGE groups mostly in aquatic organisms including algae, invertebrates, and fishes (Cardon, P.-Y. *et al.*, 2020; Desjardins *et al.*, 2022; Labrie, 2022; Racine, 2016; Rolland, 2020). To our knowledge, no studies of subcellular partitioning of CMS including REEs and PGEs have been done on wild animals in urban areas, where the concentrations of these metallic contaminants of high environmental concern are expected to increase in the upcoming years. Avian species are often used as organisms of choice for environmental biomonitoring studies (Burger et Gochfeld, 2004; Durkalec *et al.*, 2022; Hofer *et al.*, 2010). In this regard, the ring-billed gull (*Larus delawarensis*) is a pertinent model species, and it is increasingly used to study the exposure to organic and inorganic contaminants in urban areas (Brown *et al.*, 2019; Kerric *et al.*, 2021; Sorais *et al.*, 2021). Indeed, its high trophic position, its opportunistic and omnivorous feeding behaviors, its ability to adapt to highly urbanized regions and its

habitat in proximity to urban areas exposes it to several metallic contaminants. Numerous work on *L. delawarensis* feeding habits exposed the predominant choice of landfills, urban and municipal waste and agricultural field as important foraging habitats (Brown *et al.*, 2019; Sorais *et al.*, 2020). Human food in household garbage and landfills represent important diet resources for ring-billed gulls in the Montreal area as they are energy-rich (Brousseau *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2019; Giroux *et al.*, 2016).

The aims of this study were to: 1) determine the intracellular distribution of selected CSM (e.g., Co, REEs, and PGEs) between both subcellular compartments (detoxified-metal and metal-sensitive) in the intestinal cells of the ring-billed gull, and 2) investigate the major cellular detoxification mechanism for each CSM metal. We selected intestinal cells for this study because the gastrointestinal tract represents an important route of absorption for trace metals via the food ingested by the organism (Stawarz, 2009). Also, concentrations in this tissue are good indicators of recent exposure and thus provide information on environmental contamination of the habitat (Naccari *et al.*, 2009). Consistent with the actual knowledge on cellular metal-detoxifying processes, we hypothesized that CSMs accumulate to a greater extent in the detoxified-metal compartment than in the metal-sensitive sites in ring-billed gull intestinal cells. Furthermore, we believe that the intracellular distribution patterns of metals across subcellular fractions are influenced by their preferential binding affinities to chemical groups as established by Nieboer et al (1980) metal classification. Our work seeks to improve our knowledge of the intracellular fate of metals and to contribute to the understanding of the toxicity risk of these metals in bird cells. It will also provide baseline

concentrations of CSM in bird cells for eventual environmental risk assessment of these contaminants in urban environments.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 *Sample collection*

Ring-billed gulls were collected between late May and early June 2019 ($n = 45$, F: 21, M: 24) on Deslauriers Island in the St. Lawrence River, located around 3 km downstream from the city of Montreal (Quebec, Canada). This 0,96 km² island hosts one of the largest colonies of ring-billed gulls in North America (Giroux *et al.*, 2016). Members of the colony can feed in various habitats surrounding the urban Montreal area; natural habitats such as the St. Lawrence River, but also heavily urbanized locations such as landfills, wastewater plants and agricultural fields (Brown *et al.*, 2019; Caron-Beaudoin *et al.*, 2013).

Gulls were randomly selected and captured using a leg trap set around the nest. Morphological data (e.g., body weight) were taken directly after capture. Subsequently, the birds were euthanized by cervical dislocation and intestinal tissues (duodenum) were collected, flash-frozen in liquid nitrogen, and kept in the lab at -80 °C until metal analyses. The capture and handling procedures with ring-billed gulls have been approved by the Comité institutionnel de protection des animaux (CIPA) of the Université du Québec à Montréal (permit no. 885).

2.3.2 *Subcellular partitioning protocol*

For subcellular partitioning measurements, samples of intestinal cells of birds collected in 2019 ($n = 36$, F: 19, M: 17) were prepared. A subcellular metal partitioning protocol including a two-step homogenization strategy, a series of differential centrifugations and additional steps (e.g., heat denaturation, NaOH digestion) was adapted to bird intestinal cells. As protocols for intestinal cells, even less on those of birds, were not yet validated, a series of optimization steps were performed. Various parameters (e.g., homogenization, homogenization buffer, centrifugation) were tested and the most efficient protocol was selected to be applied to intestinal cells (Fig. S1). The efficiency of several subcellular partitioning protocols was assessed by enzymatic validation where the distribution (in %) of specific enzyme biomarkers to mitochondrial (Cytochrome C oxidase, Citrate synthase) and cytosolic fractions (Lactate dehydrogenase) were determined among selected isolated subcellular fractions (Fig. S1) (Rosabal *et al.*, 2014). According to our results, our final protocol is able to yield six operationally defined subcellular fractions: 1) mitochondria; 2) lysosomes/microsomes; 3) heat-denatured proteins (HDP); 4) heat-stable proteins and peptides (HSP); 5) debris/nuclei; and 6) granule-like fractions, despite some artifacts (high % of CS in cytosol fraction).

From each bird, around 180-200 mg of intestinal tissues (intestinal wall) were homogenized using a two-step homogenization protocol (Fig. 1). Each sample was initially minced on ice using a sterilized cutting blade and an acid-washed petri dish and then placed into a 15 mL tube. Homogenisation buffer (25mM Tris, 250mM Sucrose) was added to each tube at a ratio of 1:4 (tissue wet weight [mg]: buffer volume [μ L]). Suspended tissues were homogenized using a Polytron IKA T18 digital ULTRA-TURRAX [®] for three periods of 15 s with 30 s intervals at 7000 rpm using verticals up and down motions. The

resulting homogenate (H1) was centrifuged at 800 x g for 15 min at 4 °C. The supernatant was collected (S1) and the resulting pellet (P1) was re-suspended in 25mM-250mM Tris-Sucrose buffer with a ratio of 1:2 (tissue wet weight [mg]: buffer volume [μ l]). The pellet P1 was homogenized for a second time using a Polytron IKA T18 digital ULTRA-TURRAX ® for 15 s at 6000 rpm using up and down motions. The supernatant fraction (S1) previously collected was added to this homogenate (H2). An aliquot of 400 μ l was collected for mass-balance calculation (See section 2.3 for more details). The rest of the homogenate was then centrifuged at 800 x g for 15 min at 4 °C. The resulting supernatant (S2) was collected and placed into another microcentrifuge Eppendorf 1.5 mL tube for a centrifugation step at 25,000 x g for 30 min at 4 °C to isolate mitochondrial fraction as pellet (P3). The supernatant (S3) was transferred to a new tube to be centrifuged at 100,000 x g for 1 h at 4 °C to collect lysosomes/microsomes (P4) fraction from the cytosol (S4).

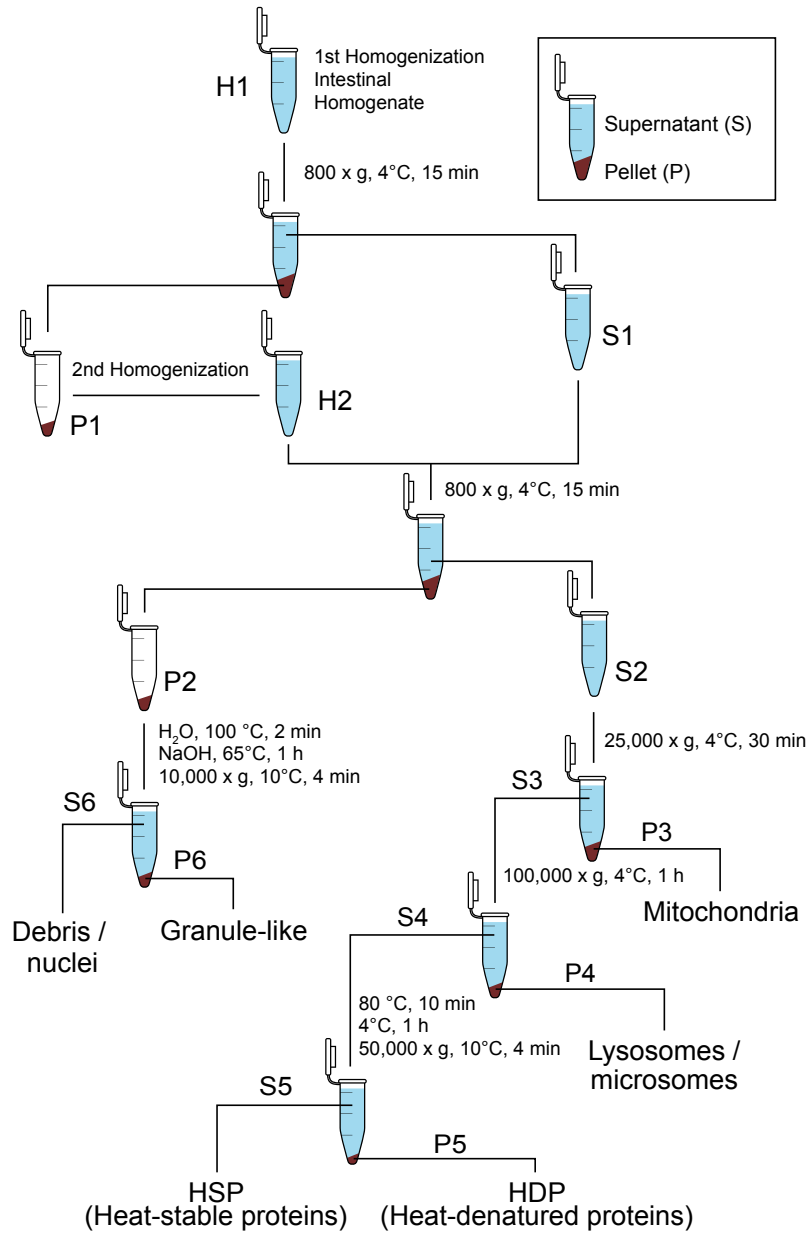


Figure 2.1. Subcellular metal partitioning protocol adapted for intestinal cells of ring-billed gulls (*Larus delawarensis*).

The cytosol fraction (S4) underwent a thermal shock where it was heated at 80 °C for 10 min and kept on ice for 1 h before centrifugation at 50,000 x g for 10 min at 4 °C. The heat-denatured proteins (HDP) were collected as a pellet (P5) and the heat-stable

proteins (HSP), which contains metallothionein and metallothionein-like proteins and other peptides as supernatant (S5). The final pellet (P2) resulting from the two-step homogenisation was suspended in 500 μ L ultrapure water and heated during 2 min at 100 $^{\circ}$ C, followed by adding 500 μ L of NaOH (1M; 99,998%, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and a final heating process at 65 $^{\circ}$ C for 1 h. The resulting sample was centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4 $^{\circ}$ C to collect NaOH-resistant fraction (granule-like fraction, P6) from the debris and nuclei fraction (S6). All sample fractions were stored in -80 $^{\circ}$ C until further analysis. Centrifugations steps at > 50 000 x g were done in a SorvallTM LegendTM Micro 21R Microcentrifuge (Thermo Scientific), and for those > 50 000 x g, they were done using a ThermoFisher FiberliteTM F50L-24 x 1.5 Fixed-Angle Rotor in a Beckman CoulterTM OptimaTM LE-80K Preparative Ultracentrifuge.

2.3.3 *Metal analysis and data quality assessment*

Samples prepared for subcellular partitioning measurements were freeze-dried for 24 h using a freeze dryer (LabconcoTM FreezoneTM 4.5L -50 $^{\circ}$ C Benchtop Freeze Dryers, 115V US Models, Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada) to obtain wet weight (ww) /dry weight (dw) ratios. All samples were digested using nitric acid (HNO₃) (Optima grade, Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada) and hydrochloric acid (HCl) (Optima grade, Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada), and heated at 65 $^{\circ}$ C for 5 h. Once samples cooled, 250 μ L of hydrogen peroxide (H₂O₂) (Optima grade, Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada) was added to the samples that were then left at room temperature for 24 h. The digestion was completed by adding ultrapure water to ensure a 5% (v/v) acid nitric percentage and a 3% (v/v) hydrochloric acid percentage in the samples (Jensen *et al.*, 2002). To ensure data

quality, digestion blanks were prepared as well as samples from certified reference materials (CRM) which underwent the same digestion protocol as the intestinal cell samples.

Concentrations of La, Ce, Co, Gd, Nd, Pd, Pr and Y were obtained by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS; Thermo Elemental X Series, Winsford, England, United Kingdom). For samples where metal concentrations were under the detection limit ($< DL$), a correction of half the DL was applied (Antweiler, 2015). Two certified reference materials (CRM) were used: DOLT-5 (Dogfish liver; National Research Council Canada, Ottawa, ON, Canada; $n = 6$); BCR-688 (Mussel tissue; European Commission, Geel, Belgium; $n = 3$) to assess digestion efficiency. Range of CRM recovery percentage was from 85 % to 125 % (Table SII). Given the lack of certified reference material for PGEs in biological samples, we proceeded with analysis of spiked samples in PGEs in some subcellular fractions to verify the recovery (%) of added amount of these metals in our samples. Average recovery ($\pm SD$, $n = 3$) of spiked samples with Pd was $116\% \pm 3\%$. To assess potential material lost or metal contamination during our subcellular partitioning manipulations, a mass balance calculation was performed on each individual by using the ratio of the sum of metal burdens in all fractions divided by the total metal burden measured in the homogenate, multiplied by 100 (Rosabal *et al.*, 2012). Only individuals for which a good metal recovery (60% to 140%) were selected for final analysis. Range of the mass metal balance estimations for studied metals was from 79 % to 110 % (Table SII).

2.3.4 Data exploration and statistical analysis

Data obtained from subcellular partitioning analyses is presented in two variables; 1) metal concentration, expressed in nmol divided by the dry weight of the intestinal cells (nmol g⁻¹ dw) and 2) metal contribution (%) which is the relative contribution of the metal burden in a fraction divided by the total metal in all subcellular fractions.

Statistical analyses were performed using R 3.6.1 (R Core Team, 2019). A significance level of $\alpha = 0,05$ was used for all tests. All data are presented as mean \pm standard deviation (SD). To assess the effects of independent variables such as ring-billed gull sex or body weight on metal concentration, generalized linear models (GLM) using a gamma distribution and a log-link function were used. Model adjustment was verified by visual analysis of residuals plots. ANOVA's F-tests on GLM models were then used to test the effects of sex and body weight on metal levels. Correlations between total concentration of each metals (La, Ce, Gd, Y, Pr, Nd, Pd and Co) were established using Pearson's correlation coefficient (r). To detect possible anthropogenic enrichments of REEs, normalization using the Post-Archean Australian Shale (PAAS) was applied followed by assessment of REEs anomalies (Ce, Pr, Nd, Gd) in their relative proportion using *Eq.1* (Pourmand *et al.*, 2012; Rétif *et al.*, 2023).

(Equation 1, example for Pr)

$$Pr_{anomaly} = \frac{2 \times Pr_{PAAS}}{Ce_{PAAS} + Nd_{PAAS}}$$

Relationships between metal concentration as well as relative metal contribution (%) in each subcellular fraction and the total metal burden in intestinal tissues were explored using linear regression when the assumptions of normality and homoscedasticity

were met. Model validation was verified by visual analysis of residuals plots. Only significant linear relationships were presented in the results. Finally, model study as well as Student's t-test and pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with a false discovery rate adjustment method were used to compare metal levels between each subcellular fraction to establish an increasing order of importance. This was used to compare intracellular metal concentrations in compartments, and metal-detoxifying responses within detoxified-metal compartments for each metal. All figures, including curve fitting of significant linear regressions, were performed using GraphPad Prism version 9.4.0 for Mac OS X, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com.

2.4 RESULTS

2.4.1 *Total metal concentrations in gulls intestinal cells*

Concentrations of La, Ce, Co, Gd, Nd, Pd, Pr and Y measured in intestinal tissue were not consistently influenced by the sex or body weight of ring-billed gulls, except for La, for which metal levels were higher in males (Table S1). Pd was the only PGEs reported in this study since others (Pt and Rh) were not detected in samples (< LD). Total intestinal metal quantifications indicated different metal concentration gradients ($[M]_{\max} / [M]_{\min}$) among the targeted metals (Table 2.1). Globally, REEs concentration gradients (e.g., Pr: 47; Nd: 43) were higher than those observed for Pd (4). This gradient decreased in the following order: Pr > Nd > La > Ce = Gd = Co > Pd.

For the 17 REEs measured (total REEs content in intestinal cells), La (45 %), Y (21 %), Ce (20 %), Nd (8.7 %), Sm (2.9 %), Pr (1.9 %) and Gd (1.48 %) were the most abundant in all ring-billed gull intestinal cell samples (Fig. S6). Positive correlations ($0.02 > p > 0.0001$) were observed between the whole-tissue concentrations of La, Ce, Gd ($r: 0.58 - 1$) (Table. SIII). Concentrations of Pr and Nd were not correlated with each other nor with the previous REEs mentioned (Table SIII). Yttrium concentrations were correlated with those of Ce ($r: 0.70$) and Co ($r: 0.78$), while Pd was with those of Nd ($r: 0.64$). Anomalies in REEs (mean \pm SD) were: Ce (0.5 ± 0.3), Pr (0.5 ± 0.2), Nd (1.1 ± 0.4), and Gd (2.1 ± 1.0) (Fig. S7).

Table 2.1. Range (minimum-maximum) of total trace metal concentrations (nmol. g⁻¹ dw) and body weight (g). Total concentration gradient ([M]_{max} / [M]_{min}) for each metal in ring-billed gull intestinal samples. Sex distribution (F: female; M: male) is also given.

	Trace metals							
	La	Ce	Gd	Y	Nd	Pr	Pd	Co
Number of samples ^a	24	25	25	10	12	15	15	31
[M] range (nmol g ⁻¹ dw)	0.43-7.38	0.25-3.05	0.02-0.23	0.22-2.19	0.03-1.30	0.007-0.33	0.07-0.28	0.69-7.93
Gradient [M] _{max} / [M] _{min}	17	12	11	10	43	47	4	11
Body weight range (g)	387-562	395-562	387-562	404-549	395-562	395-562	387-544	395-562
Sex distribution	F :13 M :11*	F :14 M :11	F :14 M :11	F :5 M :5	F :7 M :5	F :8 M :7	F :7 M :8	F :17 M :14

*: significant effect of sex on the total metal concentration was observed (Table SI)

^a: samples for which mass balance was between 60 % and 140%

2.4.2 Subcellular metal partitioning in intestinal cells

2.4.2.1 Lanthanum, cerium and yttrium

Significant linear relationships were consistently observed between total metal concentrations in intestinal cells and those in the granule fraction for La (R^2 : 0.93; $p < 0.001$), Ce (R^2 : 0.91; $p < 0.001$), and Y (R^2 : 0.49; $p = 0.01$) (Fig. 2.2 panel A, C, E). Metal levels in the HSP fraction were linearly related to the total intracellular concentrations, but only for Ce (R^2 : 0.19; $p = 0.01$) and Y (R^2 : 0.89; $p < 0.001$) (Fig. 2.2 panel C and E). Concentrations of La (R^2 : 0.83; $p < 0.001$), Ce (R^2 : 0.89; $p < 0.001$), and Y (R^2 : 0.96; $p < 0.001$) in the mitochondrial fraction also increased significantly with increasing metal concentrations in ring-billed gull intestinal cells (Fig. 2.2 panel B, D, F). Metals determined in the HDP fraction showed a linear relationship with the whole-tissue metal concentrations for Ce (R^2 : 0.14; $p = 0.03$) and Y (R^2 : 0.35; $p = 0.03$), but for lysosomes/microsomes, this relationship was only significant for Y (R^2 : 0.84; $p < 0.001$) (Fig. 2.2 panel B, D, F).

The relative contributions (%) of La (R^2 : 0.55; $p < 0.001$) and Ce (R^2 : 0.22; $p = 0.009$) in the granule fraction significantly increased with the total metal concentrations. Also, Y proportions calculated in the mitochondrial fraction were also correlated with the total concentration gradient (R^2 : 0.69; $p = 0.001$). However, proportions of La in the cytosolic fractions (HSP: R^2 : 0.27; $p = 0.005$; Lysosomes/microsomes: R^2 : 0.15; $p = 0.03$) as well as those of Ce in the HDP fraction (R^2 : 0.35; $p < 0.001$) showed a negative relationship with the whole intestinal metal concentrations (Fig. S2). Globally, the metal contributions found in the isolated fractions were in decreasing order: La: granules > HSP > mitochondria > lysosomes/microsomes, HDP; Ce: granules > mitochondria > HDP, HSP,

lysosomes/microsomes and Y: granules > mitochondria > HDP, HSP, lysosomes/microsomes. Metal levels in the granule fraction were consistently higher than those measured in other subcellular fractions for La ($39 \pm 15\%$), Ce ($53 \pm 13\%$) and Y ($64 \pm 9\%$) (Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test, $0.0003 < p < 0.0001$). Within the metal-sensitive fractions, mitochondria were the principal target of accumulation of La ($11 \pm 4\%$), Ce ($12 \pm 4\%$) and Y ($9 \pm 5\%$) (Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test, $0.01 < p < 0.0001$).

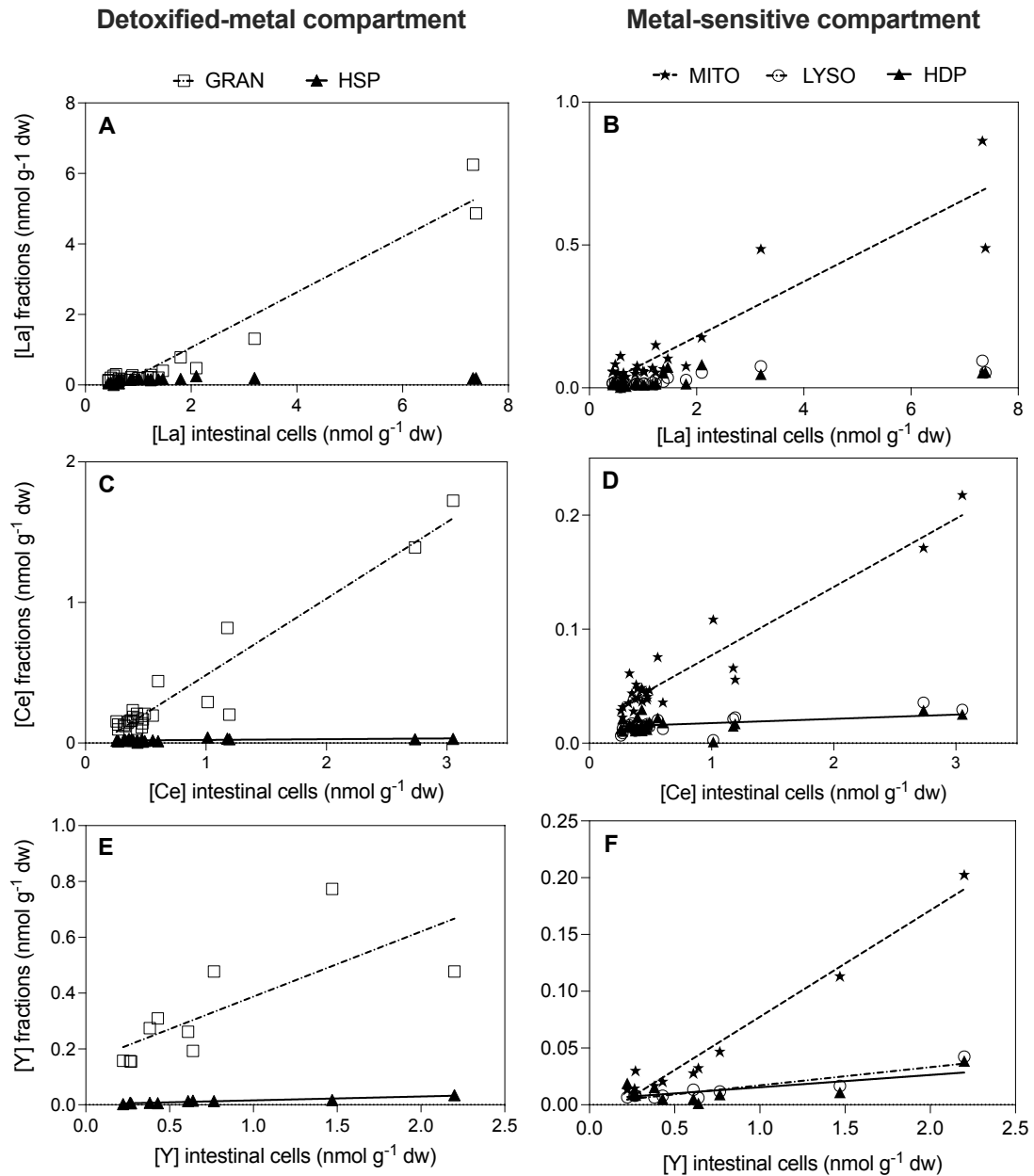


Figure 2.2. Relationship between total metal concentrations (nmol g⁻¹ dw) in intestinal cells of *L. delawarensis* and metal concentrations (nmol g⁻¹ dw) in detoxified-metal compartment (left panels) and metal-sensitive compartment (right panels) for La (panels A, B), Ce (panels C, D) and Y (Panels E, F). Each point represents an individual ring-billed gull. Only significant linear regressions are shown. Abbreviations: GRAN: granules; HSP: heat-stable proteins; MITO: mitochondria; LYSO: lysosomes/microsomes; HDP: heat-denatured proteins.

2.4.2.2 Gadolinium, Neodymium and Praseodymium

Similar to previous REEs, metal concentrations in the granule fraction were positively correlated with the total concentrations in ring-billed gull intestinal cells for Gd ($R^2: 0.97; p < 0.001$), Pr ($R^2: 0.94; p < 0.001$) and Nd ($R^2: 0.94; p < 0.001$) (Fig. 2.3 panel A, C, E). For the cytosolic fraction involved in metal detoxication, only Pr levels ($R^2: 0.71; p < 0.001$) increased with the total metal concentration gradient (Fig. 2.3 panel C). Moreover, the contributions of these three REEs in the granule fraction to the total intracellular metal burdens were predominant (mean \pm SD: Gd: $48 \pm 14\%$; Pr: $68 \pm 14\%$; Nd: $71 \pm 16\%$) (Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test, $0.002 < p < 0.0001$). No relationship was observed for total metal concentration and Gd, Nd and Pr in any of the metal-sensitive fractions (Fig. 2.3 panels B, D, F). With respect to metal contributions (%), only the granule (Gd: $R^2: 0.34; p = 0.001$) and the mitochondrial (Pr: $R^2: 0.22; p = 0.04$) fractions showed a positive correlation with the whole-tissue concentrations (Fig. S3, panel A and D). Accumulation in the HDP (Pr: $R^2: 0.50; p = 0.001$; Nd: $R^2: 0.44; p = 0.01$) and in the lysosomes/microsomes (Nd: $R^2: 0.29; p = 0.04$) fractions were negatively related to total intracellular metal concentrations (Fig. S3, panel D and F). As for the metal-sensitive sites, mitochondria accounted for the highest accumulation of Gd ($10 \pm 9\%$), Pr ($5 \pm 3\%$) and Nd ($8 \pm 3\%$) (Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test, $0.02 < p < 0.0001$).

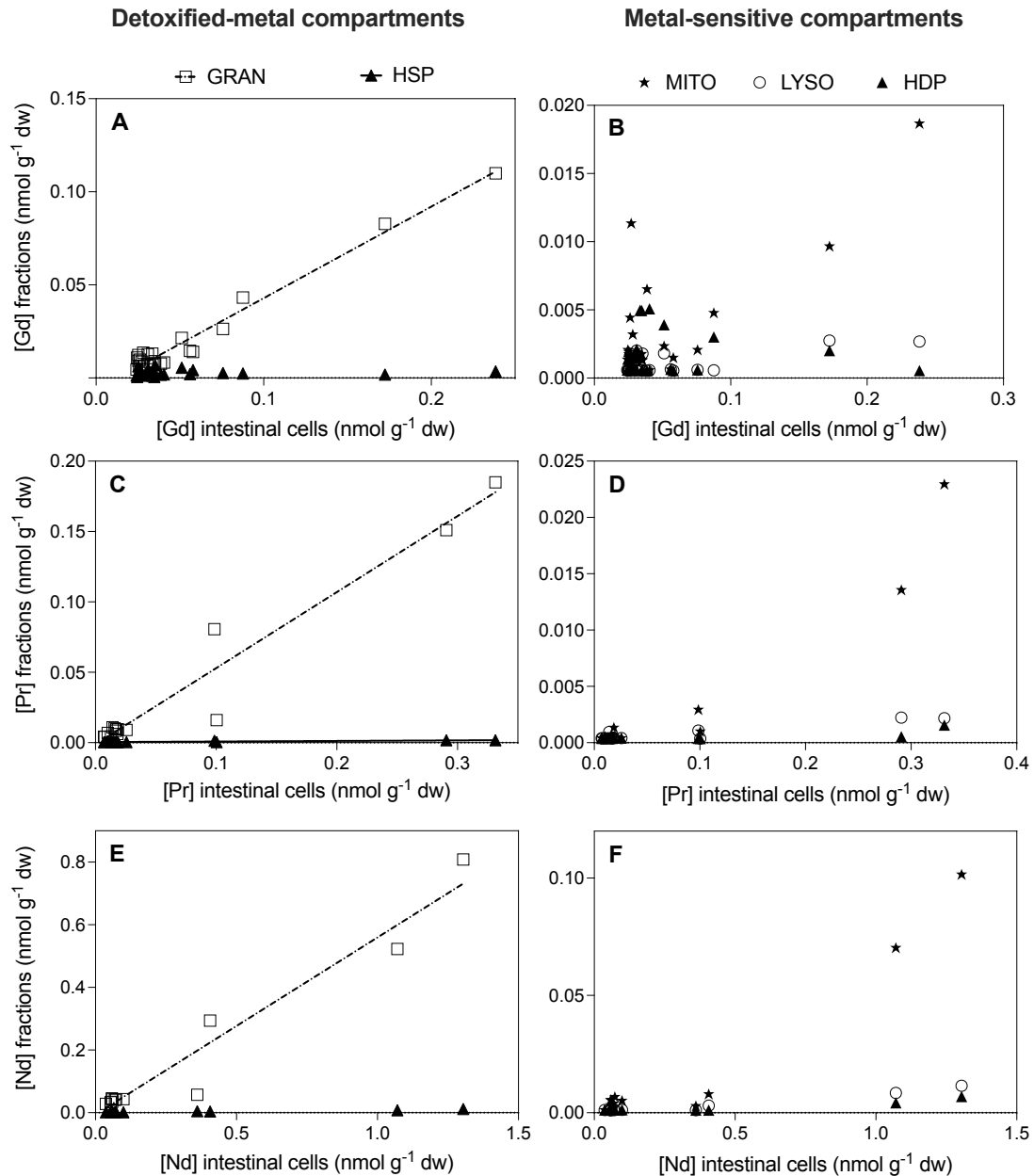


Figure 2.3. Relationship between total metal concentration (nmol g⁻¹ dw) in intestinal cells of *L. delawarensis* and metal concentrations (nmol g⁻¹ dw) in detoxified-metal compartment (left panels) and metal-sensitive compartment (right panels) for Gd (panels A, B), Pr (panels C, D) and Nd (Panels E, F). Each point represents an individual ring-billed gull. Only significant linear regressions are shown. Abbreviations: GRAN: granules; HSP: heat-stable proteins; MITO: mitochondria; LYSO: lysosomes/microsomes; HDP: heat-denatured proteins.

2.4.2.3 Palladium and Cobalt

Concentrations of Co (R^2 : 0.66; $p < 0.001$) and Pd (R^2 : 0.48; $p = 0.002$) in the HSP fraction linearly increased as a function of total intestinal metal concentrations (Fig. 2.4 panels A, C). For the granule fraction, this increasing trend was only observed for Co (R^2 : 0.68; $p < 0.001$) (Fig. 2.4 panel A) but not for Pd. In the metal-sensitive compartment, only Co concentrations in the mitochondrial fraction (R^2 : 0.70; $p < 0.001$) were correlated with the total intracellular concentrations, whereas for Pd, only the HDP fraction significantly increased with the total metal concentration gradient (Fig. 2.4, panels B, D). In terms of metal proportions (%), the HDP fraction was the only fraction to show a negative correlation (Co: R^2 : 0.18; $p = 0.009$) as the total Co concentration increased in the bird cells (Fig. S4, panel B). Overall, the decreasing order of metal accumulation in isolated fractions for Co: granules > HSP > HDP > mitochondria > lysosomes/microsomes differed from that observed for Pd: HSP > mitochondria > granules, HDP, lysosomes/microsomes. In contrast with Co, for which the metal concentration in granule fraction was dominant ($32 \pm 12\%$) compared to the proportions measured in other subcellular fractions, Pd showed the highest mean concentration in the HSP fraction ($39 \pm 10\%$) (Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test, $0.003 < p < 0.0001$). The cytosolic detoxifying fraction followed the granules fraction as the second highest in Co concentration ($21 \pm 10\%$). As for the metal-sensitive compartments, the HDP fraction accumulated the highest Co concentration ($8 \pm 3\%$), while for Pd it was the mitochondrial fraction ($18 \pm 13\%$) (Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test, $0.009 < p < 0.0001$).

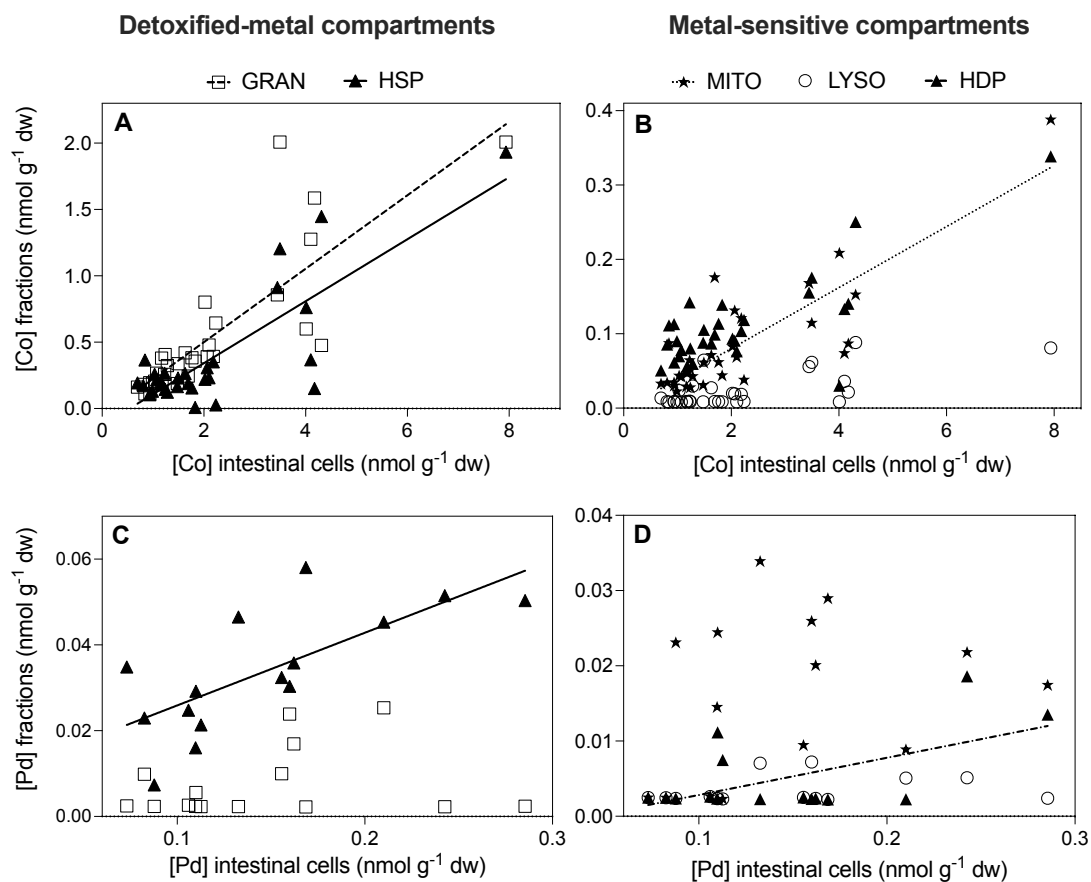


Figure 2.4. Relationship between total metal concentration ($\text{nmol g}^{-1} \text{ dw}$) in intestinal cells of *L. delawarensis* and metal concentrations ($\text{nmol g}^{-1} \text{ dw}$) in detoxified-metal compartment (left panels) and metal-sensitive compartment (right panels) for Co (panels A, B) and Pd (panels C, D). Each point represents an individual ring-billed gull. Only significant linear regressions are shown. Abbreviations: GRAN: granules; HSP: heat-stable proteins; MITO: mitochondria; LYSO: lysosomes/microsomes; HDP: heat-denatured proteins.

2.4.3 Integration of subcellular partitioning results

Globally, all measured metals in intestinal cells of ring-billed gulls were more accumulated in the detoxified-metal compartment than the metal-sensitive compartment (Fig. 2.5, panel A) when comparing average contributions. The contribution range of the REEs to the total metal burden varied from 55.6 % to 73.4 % compared to Co and Pd with 53,9% and 47,4%, respectively.

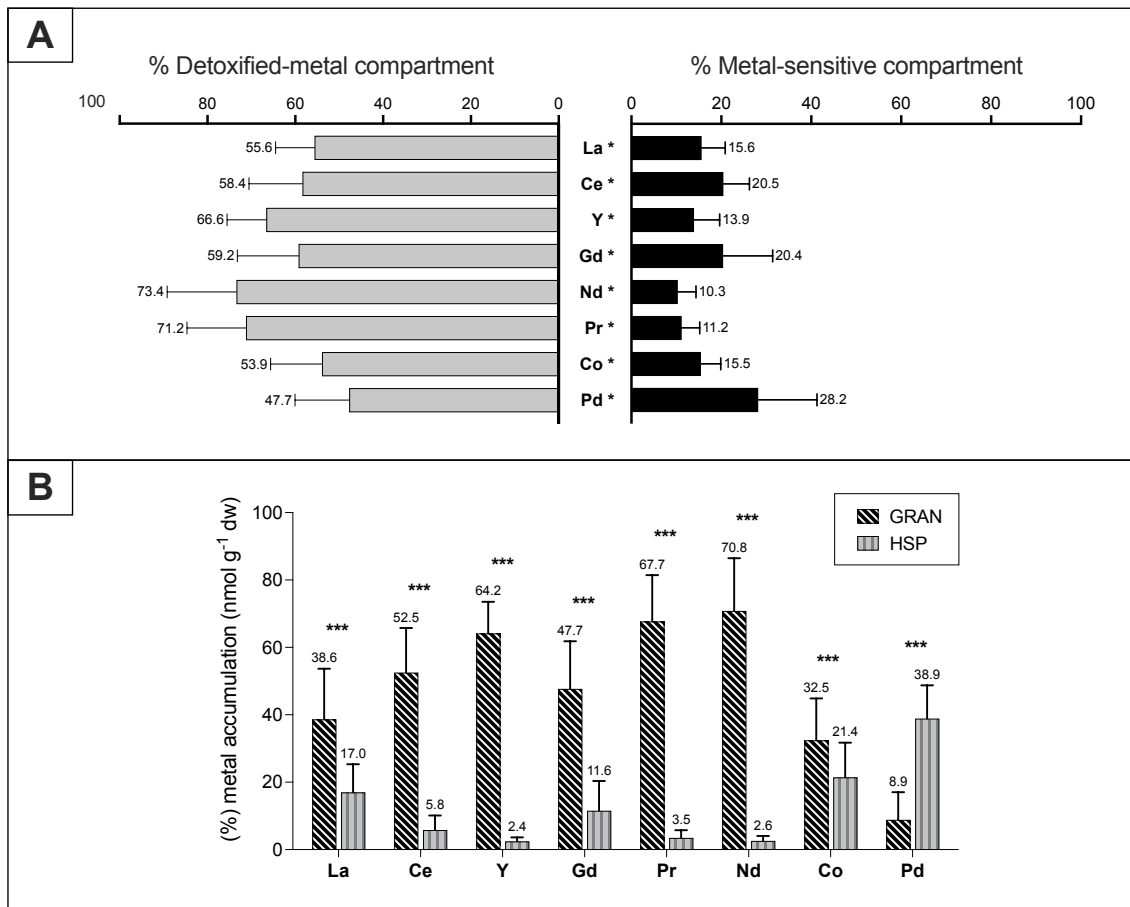


Figure 2.5. A) Distribution (%) of intracellular accumulation between detoxified-metal (granule and HSP fractions) and metal-sensitive (mitochondria, lysosomes/microsomes and HDP fractions) compartments in intestinal cells of *L. delawarensis* of each studied metal. B) Comparison of metal distribution (in %) within detoxified-metal compartment in intestinal cells of *L. delarawensis* for each studied metal. Abbreviations: GRAN: granules *: significant differences between both compartments; ***: significant differences in metal accumulation between both detoxified-metal fractions.

Accordingly, metal levels in metal-sensitive site did not exceed 28.2% (Pd) of the total intracellular metal concentrations, where the lowest values observed were generally reported for REEs (from 10.3% to 20.5%) (Fig. 2.5, panel A). Concentration of La (R^2 : 0.56; $p < 0.001$), Ce (R^2 : 0.14; $p = 0.003$) and Co (R^2 : 0.48; $p < 0.001$) in the detoxified-metal compartment significantly increased along the metal concentration gradient observed

in intestinal cells (Fig. S5-SI). When comparing both fractions involved in metal detoxification, REEs were mostly found in granule fractions (La: 38.6 %; Ce: 52.5 %; Y: 64.2 %; Gd: 47.7 %; Pr: 67.7 % and Nd: 70.8 %) (Fig. 2.5, panel B). Co was also much more associated with granule fractions (32.5 %), but to a lesser extent than REEs (Fig. 2.5, panel B). In contrast to REEs and Co, Pd was much more distributed in the HSP (38.9 %) fraction than in the granule-like structures (Fig. 5, panel B).

2.5 DISCUSSION

2.5.1 *Metal accumulation*

Concentration of various CSM such as REEs, Pd and Co measured in ring-billed gulls intestinal cells showed considerable variations from the lowest to highest values reported. The high gradients in total metal concentrations in gulls could be associated with their exposure to metals in various foraging habitats near the city of Montreal (e.g., industrial and urban areas, landfills, and agricultural fields). Exposure to REEs in ring-billed gull intestinal tissues could be the result of foraging activities in agricultural fields as well as in landfills as proposed by Brown et al. (2019). The higher concentrations of light rare earth elements (LREE) (La, Ce, Gd, Pr, Nd) found in our sample is consistent with work by Dang et al. (2022) and MacMillan et al. (2017) on REEs bioaccumulation in freshwater, marine and terrestrial ecosystems in the Canadian Arctic, where LREE concentration were consistently higher in biota tissues than heavy rare earth elements (HREE). Significant correlations were observed among some REEs (e.g., La, Ce, Gd, Y), which agrees with MacMillan et al. (2017), who are considering REE as a unique group,

which can be an useful stand-in when studying individual REEs concentration in tissues. However, the lack of relationship for Nd and Pr with the other REEs measured in intestinal cells is not consistent with previous observations by MacMillan et al. (2017). This could possibly be an indication of a difference source of exposure to Nd and Pr where other REEs could be less abundant. Normalization of REEs concentrations to PAAS revealed negative anomalies in the relative abundance for Ce, Pr and Sm (0.5). These anomalies could be explained by changes in REEs redox state, notably of Ce that can be both tri- or tetravalent (Ce^{3+} or Ce^{4+}) which can affect bioavailability for organisms (Wang, Z. *et al.*, 2019). On the other hand, Gd exhibited a positive anomaly (2.1). Positive anomalies (> 1) typically denotes an increase in the exposure or uptake of this element over the other REEs (MacMillan *et al.*, 2017). As Gd is often used as a contrasting reagent in magnetic resonance imaging, anthropogenic enrichment of Gd from medical waste could be a plausible explanation for this observation (Itoh *et al.*, 2017). Recent studies have also suggested that Gd concentrations in the St-Lawrence River could be associated with waste water from the city of Montreal, which could lead to accumulation in organisms by trophic transfer (Dang *et al.*, 2022).

Accumulation of Pd in ring-billed gull intestinal cells could be associated with exposure via PGEs atmospheric deposition on ring-billed gull's food sources from road dusts. This idea is supported by Jensen et al., (2002) who demonstrated that the plumage's surface of peregrine falcons (*Falco peregrinus*) living in urban environments contains higher concentrations of PGEs (Pd, Pt and Rh) than on that of individuals from rural areas. Thus, bird's feather cleaning activities (i.e., preening) could represent an additional exposure pathway to metals (Jensen *et al.*, 2002). Like REEs, accumulation of Co in ring-

billed gulls nesting in the city of Montreal area could reflect the exposure through Co-contaminated food sources in landfills or other municipal waste. And in addition to runoff from industrial activities, another possible source of cobalt in urban environments could be surface washing by rain or snow who carries dissolved and particulate metals into the sewer system and directly into the river (Joshi et Balasubramanian, 2010). Although knowledge on Co concentration in avian gut cells is scarce, Dauwe et al. (2003) reported Co concentrations (6-20 nmol g⁻¹ dw) in intestinal cells of female great tits (*Parus major*) slightly higher than those found in ring-billed gulls (0.69-7.93 nmol g⁻¹ dw) .

2.5.2 *Metal subcellular partitioning*

2.5.2.1 *Rare earth elements*

More than half of the REEs measured levels in ring-billed gull intestinal cells were found in the detoxified-metal compartment, which includes the granule and the HSP fractions. The concentration of detoxified REEs forms in this compartment progressively increased as the total metal concentration in the gut cell increases for La and Ce, which suggests a dominant REE detoxification response in intestinal cells. To our knowledge, no work on subcellular partitioning of REEs has been done on birds, but our results are consistent with work done by Labrie (2022) who found a higher accumulation of La and Ce in the detoxified-metal fractions (71% and 78% respectively) in amphipods (*Hyalella azteca*) collected from the Yellowknife area (Northwest Territories, Canada).

Across the detoxified-metal compartment, a significant accumulation of REEs in the granule fraction was observed for all REEs measured. This suggests a progressive

metal-detoxifying process in response to intracellular metal accumulation. Our results are consistent with the work of Rolland (2020) on field-collected northern pike (*Esox lucius*) and lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) from the Yellowknife area (Northwest Territories, Canada) in metal-contaminated sites from mining activities. The authors reported similar relationships in the liver of these fish, where the majority of La and Ce detoxified was found in the granule fraction. The predominance of REEs accumulation in granule fraction has also been observed in zooplankton organisms including in *Daphnia magna* and *Chironomus riparus* exposed to Y (another REE) in laboratory, where the majority (81 %) of intracellular Y accumulates in this fraction (Cardon, P.-Y. *et al.*, 2019). The pattern of REE accumulation in the granule fraction is consistent with the behaviors of class A metals (Marigómez *et al.*, 2002), which includes essential metals for living organisms as well as REEs (Kinraide, 2009; Nieboer et Richardson, 1980). Metal ions of this class have an affinity for oxygen, nitrogen, and sulfur ions ($O > N > S$) as electron donors (Nieboer et Richardson, 1980). Trivalent lanthanoids cations exhibit the same ionic behavior as several essential metals and can therefore bind to the same electron donors (Dang *et al.*, 2022; Hirano et Suzuki, 1996). Since cytosolic granules tend to accumulate excess concentrations of essential metals such as Zn, Fe, and Ca, they may accumulate REEs that exhibit the same ionic behavior (Cardon, P.-Y. *et al.*, 2019; Hopkin, 1989; Rainbow, 2007). For instance, work on some REEs hypothesized that Y might be incorporated to Ca-containing granules due to ionic mimicry involving strong Ca inhibition in Ca metabolism (Cardon, P.-Y. *et al.*, 2019; Mason et Jenkins, 1995). Labrie (2020) reported correlations between La and Ce and some key metals contained in the granules

(Ca, Fe and S) in *H. azteca*, suggesting that these two REEs may be incorporated to Fe-containing granules in *H. azteca* (Labrie, 2022).

The key role of these mineral inclusions as metal-detoxification mechanism has been extensively studied in invertebrates, including in the intestinal cells of crustaceans, molluscs, as well as in bivalves and oligochaetes (Bjerregaard *et al.*, 2014; Koivula et Eeva, 2010; Marigómez *et al.*, 2002). More recently, sequestration by metal granules has also been observed in some vertebrates, notably by Rolland (2020) who investigated the role of metal granules in the sequestration of REEs such as La and Ce in the liver cells of northern pike (*Esox lucius*) and lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). Studies on granule formation in birds are still limited, but the work of Nam *et al.* (2005) and Nigro and Leonzio (1996) exposed the presence of granules in some aquatic birds, specifically in the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*) (Nam *et al.*, 2005; Nigro et Leonzio, 1996). In birds, it is suggested that this detoxification mechanism exists to compensate when trace metal ingestion is high, and the feather excretion mechanism is no longer sufficient (Nam *et al.*, 2005; Nigro et Leonzio, 1996). Furthermore, Parker and Kraak (2018) demonstrated the presence of dense cytosolic granules sequestering excess Fe as a detoxification mechanism in liver, spleen, as well as intestinal mucosa of the domestic pigeon (*Columbia livia domestica*) exposed to Fe in the laboratory (G.H. Parker et Kraak, 2018). Accumulation in the HSP fraction sites, including MT, was nevertheless observed for the REEs studied where metal recovery in this fraction was on average 4.6 times lower than in the granule fraction. This is consistent with the behaviors of class A metals, which show low affinity for proteins containing thiol groups, such as MT and GSH (Hanana *et al.*, 2021).

Despite the significant accumulation in detoxified-metal compartments, all REEs were also found in the metal-sensitive fractions where most of the intracellular metal recovery was in the mitochondria fraction. Since REEs have similar ionic behavior to other class A metals, especially Ca, one might expect an interaction with similar biomolecules containing O-ligands (Nieboer et Richardson, 1980). It has been shown that La^{3+} and Ca^{2+} display a similar ionic radius, thus both having high affinity for the same binding sites, notably on the mitochondria since it has the ability to accumulate Ca^{2+} to meet the needs of its fundamental bioenergetic process (Beedle *et al.*, 2002; Lehninger et Carafoli, 1971; Nicholls, 2005). As a result of an important REEs accumulation in this organelle, there could be possible impairment in the essential roles of Ca.

2.5.2.2 *Platinum group element*

To our knowledge, subcellular partitioning studies of PGEs on birds are scarce. In fact, Racine (2016) carried out the only other study on subcellular measurements of PGEs. Their work on the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* exposed in laboratory to Pd and Pt found that both PGEs were accumulated to a greater extent in the organelle fractions (i.e. in metal-sensitive fraction) as well as in the HSP fraction (Racine, 2016). Accordingly, our results indicated that 28.2 % of the total intracellular Pd was accumulated in these putative metal-sensitive fractions, which represents the highest accumulation in this compartment for all the metals measured in this study. Similar to REEs, the mitochondrial fraction was the predominant sites among the fractions considered as sensitive sites. Mitochondria are known to be an important subcellular binding site for Pd since, like other class B metals, this metal has high affinity binding properties with thiol functional groups

(Hosseini *et al.*, 2016). Although the toxicity of Pd to mitochondrial sites is fairly known, the work of Hosseini *et al.* (2016) on rat liver and kidney suggested that Pd interacts with the sulfhydryl groups of succinate dehydrogenase (SDH) in the mitochondrial electron transport chain that may alter its activity in cellular respiration. Metallomics studies are needed to further identify the intracellular targets of Pd in those subcellular fractions.

Nevertheless, Pd recovery was more important in the detoxification compartment than in the metal-sensitive one. As opposed to REEs, Pd levels were higher in the HSP fraction than in the granules fraction. Since HSP fraction includes cytosolic proteins such as MT and other cysteine-rich proteins, it is expected that, as a class B metal, Pd would be strongly accumulated in this fraction. PGEs can have the same binding affinities as several other well-known metals in class B such as Cd, Pb, Ag and Hg (Nieboer *et Richardson*, 1980). Metal ions in this class have a higher affinity for sulfur ions ($S > N > O$) as electron donors (Nieboer *et Richardson*, 1980). Thus, they have a strong affinity for sulfhydryl and thioether binding sites in proteins (Marigómez *et al.*, 2002; Mason *et Jenkins*, 1995; Nieboer *et Richardson*, 1980). PGEs can bind strongly to MT depending on its availability of sulfhydryl groups (Ek *et al.*, 2004). While the formation of MT complexes with Cd, Pb or Hg has been extensively studied (Marigómez *et al.*, 2002), few research has focused on its binding with PGEs.

The occurrence of the MT detoxification response has been widely observed in both captive and wild birds (Elliott *et Scheuhammer*, 1997). Elliott *et al.* (1992) identified strong correlations in the hepatic and renal concentrations of MT and Cd (another class B metal) in seabirds, notably the leach storm-petrel (*Oceanodroma leucorhoa*), the herring gull (*Larus argentatus*), the Atlantic puffin (*Fratercula artica*), the rhinoceros puffins

(*Cerorhinca monocerata*), Cassin's auklets (*Ptychoramphus aleuticus*), and the white-necked murrelets (*Synthliboramphus antiquus*) (Elliott et Scheuhammer, 1997). Nonetheless, it has been shown that PGEs, notably Pd and Pt, have a higher affinity for binding to MT than Cd or Zn, so their binding is often associated with a replacement of these ions on MT (Ek *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 1998). Additionally, Gagnon and Patel (2007) demonstrated that MT synthesis increases by more than 2-fold in the liver of chicken embryos exposed to Pt, Pd and Rh. Our results regarding PGEs accumulation are thus consistent with expected class B metal behavior and it suggests the predominant role of MT and other cysteine-rich proteins in the intracellular accumulation responses (Elliott et Scheuhammer, 1997; Elliott *et al.*, 1992).

2.5.2.3 Cobalt

Co is an essential metal for organisms as it is involved in several important biochemical processes within cells. According to Nieboer and Richardson (1980) metallic ion classification, Co is a so-called borderline metal due to the fact that it shares ionic affinities belonging to the two classes (Li *et al.*, 2020; Marigómez *et al.*, 2002; Nieboer et Richardson, 1980). However, the specific behavior of borderline metals is still ambiguous (Nieboer et Richardson, 1980). Most of Co concentration in ring-billed gull intestinal cell was found in the detoxified-metal compartment, where a positive relationship was established between Co concentrations in this compartment and the total metal concentration in the cell. This might suggest the capacity of cells to handle a substantial accumulation of essential metals like Co. Nam et al (2005) performed subcellular partitioning studies on several birds including the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*),

the mallard (*Anas platyrhynchos*) and the spot-billed duck (*Anas poecilorhyncha*), and yielded similar percentages of Co accumulation (71 %, 55 % and 56 % respectively) in the fractions containing MTs (HSP fraction) and granules as those obtained by our work.

Regarding subcellular distribution across the detoxification compartment, Co accumulates to a greater extent in granules than in HSP fractions. Our findings agree with Sezer et al. (2018) who also applied the subcellular fractionation approach on the european oyster (*Ostrea edulis*) exposed to Co-contaminated food in laboratory conditions. The authors found that the majority of Co (~ 60-80 %) was accumulated in the granules of oyster cells (Sezer *et al.*, 2018). The similarity of our results as well as the consideration of the ionic affinities of the metal classes lead us to believe that Co could display some class A metal behaviors. Nevertheless, an accumulation of Co in the HSP fraction (on average 21.4%) was also observed. Although it is significantly lower, its contribution is still larger than the one observed for REEs (class A), which reinforces the borderline character of Co. According to Marigomez et al (2002), it is very likely for a borderline metal to bind to both sulphide and oxygen-based electron donors, sometimes in the same cell. Considering the high content of sulphhydryl groups in MT, one might expect Co accumulation in the HSP fraction. Our results indicated positive relationships of Co concentrations in both the granule and HSP fractions following an increase in total Co concentration in the cell.

The presence of Co in the metal-sensitive fractions, especially in the HDP fraction, could reflect the essential needs of this metal for biochemical processes as well as the activation of certain metalloenzymes. Within the metal-sensitive compartment, accumulation of Co was more important in the cytosolic fraction (HDP) followed by the

mitochondria. This metal can bind to several kinds of metalloproteins including methionine aminopeptidase, a protein involved in the intracellular targeting and functional regulation of proteins, the latter being known to be sensitive to Co^{2+} (Kobayashi et Shimizu, 1999). Also, prolidase, nitrile hydratase and glucose isomerase specifically located in the cytosol all require the presence of Co ions for their activation (Kobayashi et Shimizu, 1999). The accumulation of Co in sensitive sites such as mitochondria could be explained by its binding to the mitochondrial Co ion transporter COT1, which captures and transports Co across the mitochondrial membrane (Kobayashi et Shimizu, 1999).

2.6 CONCLUSIONS

This study provided key information on the subcellular distribution of several CSM in the intestinal tissues of ring-billed gulls found in the urban area of Montreal. All of the studied metals were found to significantly accumulate more in the detoxification compartments, suggesting that ring-billed gulls may be tolerant to CSM accumulation. This study also demonstrated that the detoxification mechanisms of metals vary according to the metal's different chemical and ionic properties. REEs (La, Ce, Gd, Y, Pr, and Nd) were consistently accumulated to a greater extent in the granule fraction, reflecting the expected behaviors of class A metals which show stronger affinities for O-containing ligands. In contrast, Pd was accumulated more significantly in the HSP fraction, which is consistent with the high affinity of class B metals for cysteine-rich ligands such as MT. Surprisingly, Co accumulated more heavily in the granule fraction. However, there was still a significant accumulation of Co in the HSP fraction, suggesting that Co has the ability to be bound to

several types of intracellular ligands. Considerable accumulation of Pd was observed in the metal-sensitive fractions, which may suggest that Pd may pose more toxicological risks to birds than the other CSM studied. However more studies using toxicity biomarkers would be necessary to establish this link. Our work contributes not only to deepen our knowledge on the presence of granules and MT as metal-detoxification mechanisms in vertebrates, but also to understand their important role in the handling of critical and strategic metals including REEs and PGEs in birds. To our knowledge, this study presents the first results of subcellular distribution of CSM in wild bird's intestinal tissues. Overall, the intestinal metal concentrations measured in this study represent a current baseline concentration for CSM that are also considered "emerging" contaminants in urban environments. Given that the concentrations of such elements are expected to increase in the incoming years, further monitoring effort should be necessary to follow this metal contamination in the Montreal area.

2.7 ACKNOWLEDGMENTS

This research study was funded by the Canada Research Chair in Comparative Avian Toxicology (J. Verreault), a NSERC Discovery grant (MR) and EcotoQ (FRQNT Research cluster) stipend (F. Pelletier) and support (M. Rosabal). We would like to thank A. Kerric and M. Sorais on the assistance provided on the field for sample collection, as well as the people who assist us in the analytical measurements, J. Labrie, J. Perreault, M. Moingt and S. Prémont, and finally P-O. Montiglio and M. Fraser-Franco for statistical analysis

guidance. The authors also want to acknowledge the assistance provided by undergraduate internship students in this project, H. Ouellet, A. Isayeva, S. Provencal and V. Blouin.

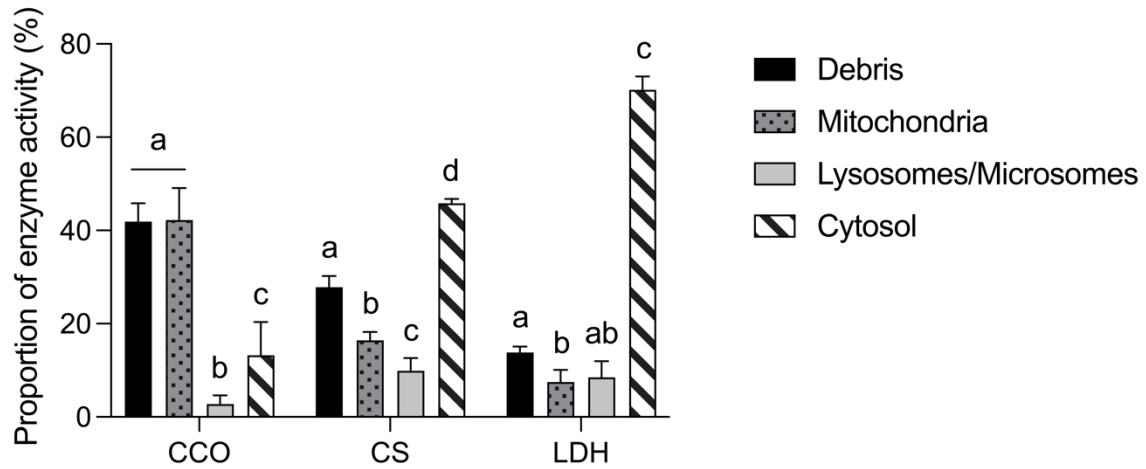


Figure S 1. Proportion (mean \pm sd; n = 5) of each enzymatic biomarker used to assess the efficient of the subcellular partitioning protocol adapted for intestinal cells of *L. delawarensis*. Different letters indicate significant differences in enzymatic proportion among all subcellular fractions and similar letters represent non-significant differences. CCO: cytochrome C oxidase (mitochondrial membrane biomarker); CS: citrate synthase (mitochondrial matrix biomarker); LDH: lactate dehydrogenase, (cytosol biomarker). Statistical differences were obtained by multiple Wilcoxon pairwise tests. Enzymatic validation protocol was taken from Rosabal et al., 2014.

Table S 1. Influence of sex and body weight on metal accumulation in ring-billed gulls (*Larus delawarensis*) of the Montreal area (Québec, Canada). Influence of each variable is given by the p-value of F-test applied on each model. Abbreviations: GLM: Generalized Linear Models; Df: Residual degrees of freedom; Resid. Dev: Residual Deviance; F: F statistics from F-test; Pr(>F): p-value for F statistics.

Variables in the models	Df	Resid. Dev	F	Pr(>F)
GLM gamma distribution (link = log)				
La- GLM(Sex*Mass) <i>n</i>=24 (F :13, M :11)				
Sex	22	14.15	5.4087	0.0306 *
Mass	21	12.78	1.9563	0.1772
Sex :Mass	20	12.45	0.4698	0.5009
Ce- GLM(Sex*Mass) <i>n</i>=25 (F :14, M :11)				
Sex	23	13.79	0.0211	0.8858
Mass	22	13.77	0.0265	0.8722
Sex :Mass	21	11.44	3.0126	0.0972
Gd- GLM(Sex*Mass) <i>n</i>=25 (F :14, M :11)				
Sex	23	10.13	2.9493	0.1006
Mass	22	7.93	3.8946	0.0617
Sex :Mass	21	7.53	0.7183	0.4062
Y- GLM(Sex*Mass) <i>n</i>=10 (F :5, M :5)				
Sex	8	4.89	1.3301	0.2927
Mass	7	3.75	2.3143	0.1790
Sex :Mass	6	3.24	1.0441	0.3463
Nd- GLM(Sex*Mass) <i>n</i>=12 (F :7, M :5)				
Sex	10	18.87	0.3417	0.5749
Mass	9	18.80	0.0579	0.8159
Sex :Mass	8	12.71	5.4109	0.0484 *
Pr- GLM(Sex*Mass) <i>n</i>=15 (F:8, M:7)				
Sex	13	26.07	0.0818	0.7801
Mass	12	25.67	0.3167	0.5848
Sex: Mass	11	17.58	6.3641	0.0283 *
Co- GLM(Sex*Mass) <i>n</i>=31 (F:17, M:14)				
Sex	29	11.81	0.2186	0.6438
Mass	28	11.06	2.0380	0.1648
Sex :Mass	27	8.41	7.2035	0.0122 *
Pd-GLM(Sex*Mass) <i>n</i>=15 (F:7, M:8)				
Sex	13	1.86	2.1802	0.1672
Mass	12	1.84	0.1021	0.7553
Sex :Mass	11	1.82	0.0733	0.7916

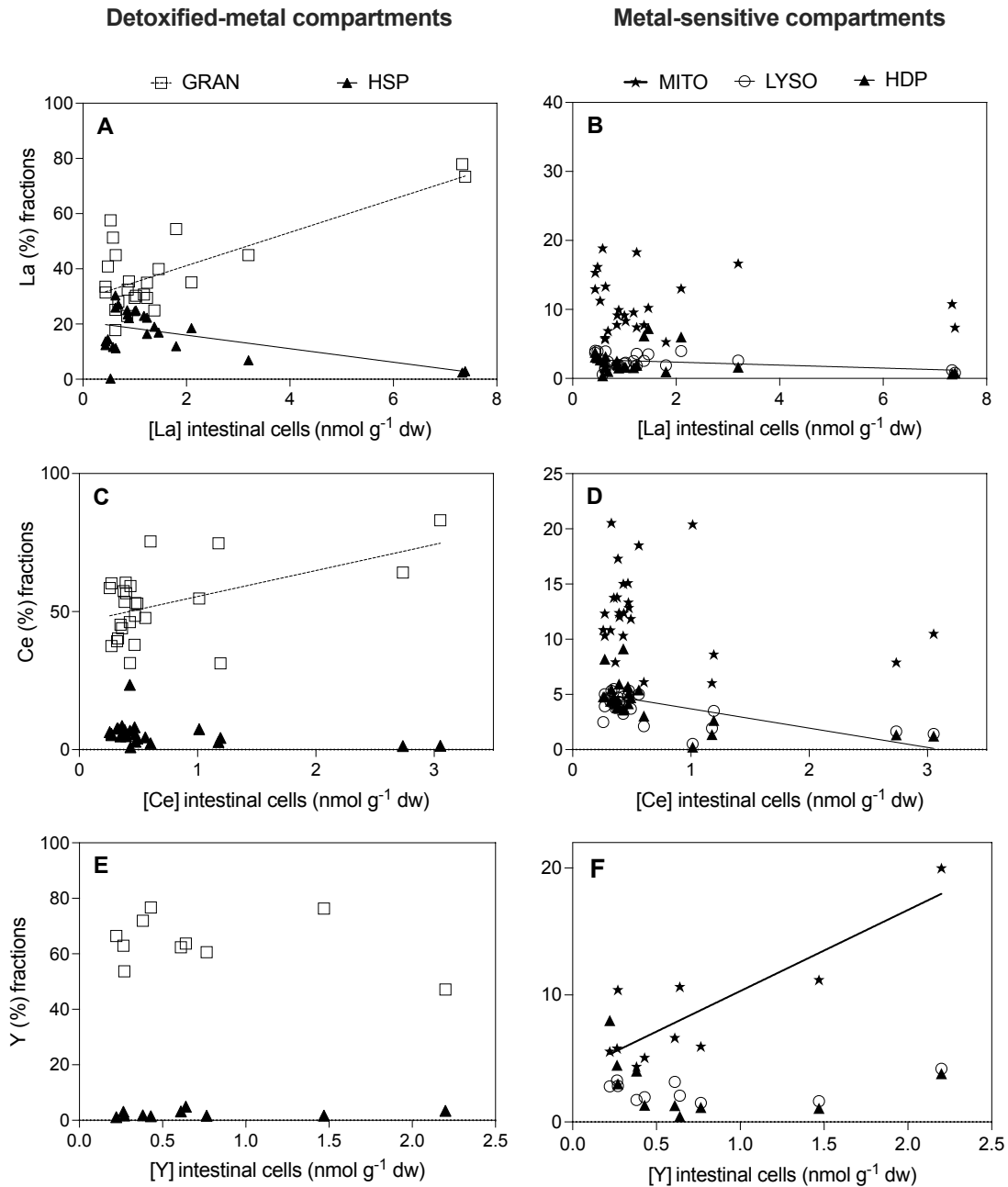


Figure S 2. Relationship between total metal concentration (nmol g⁻¹ dw) in intestinal cells of *L. delawarensis* and metal contribution (%) in detoxified-metal compartment (left panels) and metal-sensitive compartment (right panels) for La (panels A, B), Ce (panels C, D) and Y (Panels E, F). Each point represents one individual bird. Only significant linear regressions are shown. Abbreviations: GRAN: granules; HSP: heat-stable proteins; MITO: mitochondria; LYSO: lysosomes/microsomes; HDP: heat-denatured proteins.

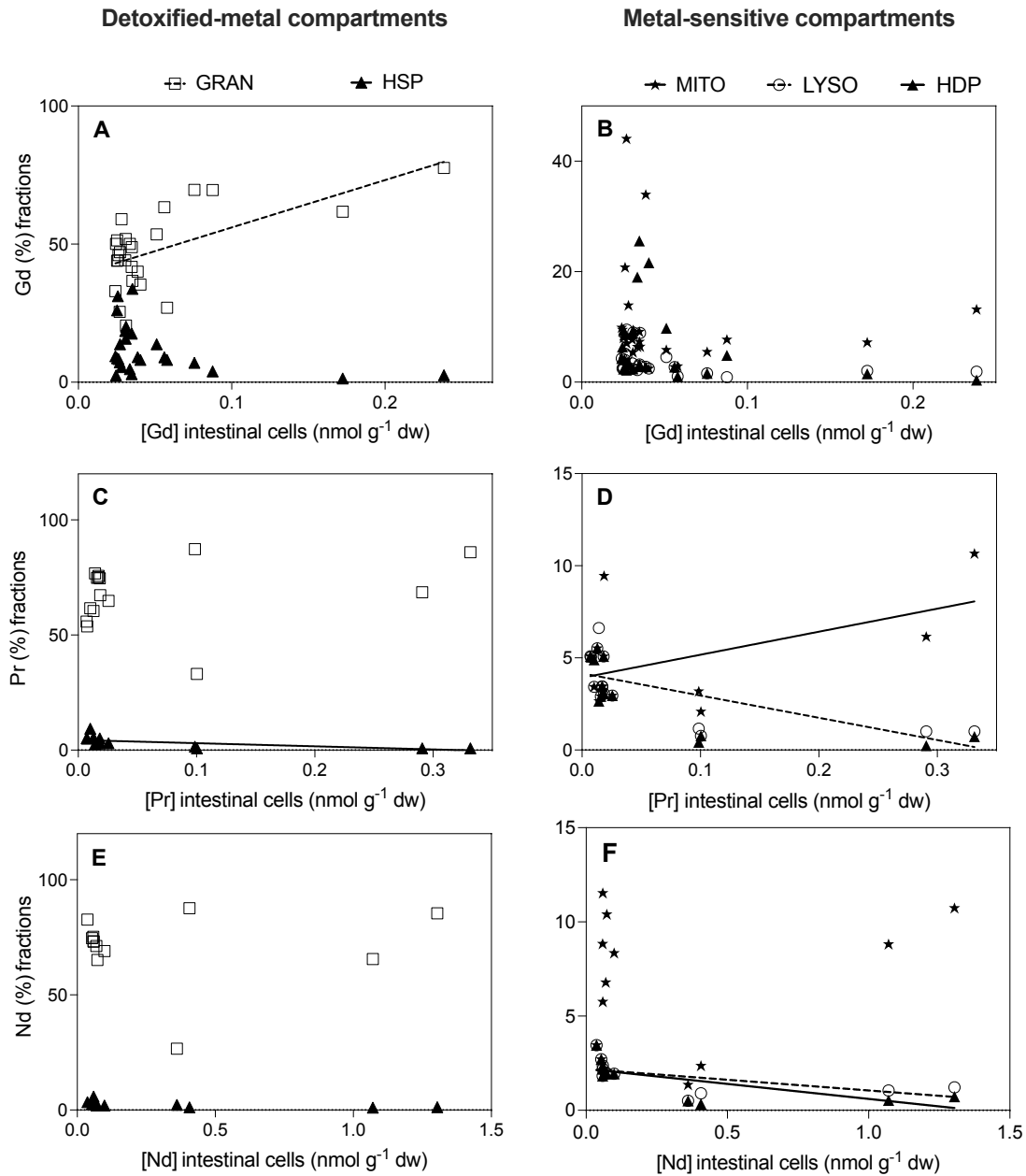


Figure S 3. Relationship between total metal concentration (nmol g⁻¹ dw) in intestinal cells of *L. delawarensis* and metal contribution (%) in detoxified-metal compartment (left panels) and metal-sensitive compartment (right panels) for Gd (panels A, B), Pr (panels C, D) and Nd (Panels E, F). Each point represents one individual bird. Only significant linear regressions are shown. Abbreviations: GRAN: granules; HSP: heat-stable proteins; MITO: mitochondria; LYSO: lysosomes/microsomes; HDP: heat-denatured proteins.

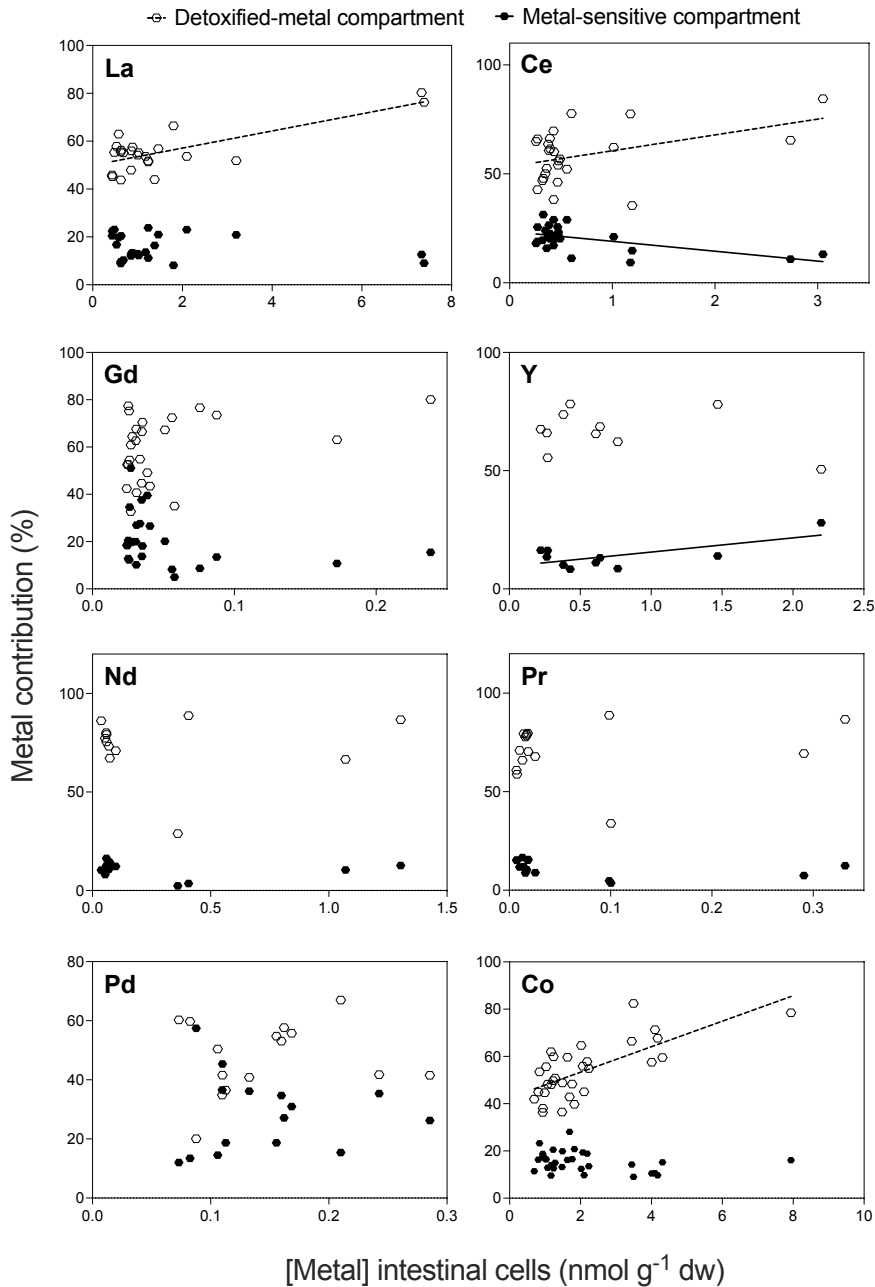


Figure S 4. Relationship between total metal concentration (nmol g⁻¹ dw) in intestinal cells of *L. delawarensis* and metal contribution (%) (nmol g⁻¹ dw) in both compartments. The detoxified-metal compartment holds the granule-like fraction and HSP fraction. The metal-sensitive compartment represents the combination for the mitochondrial, microsomes and lysosomes, and HDP fractions. Each point represents one individual bird. Only significant linear regressions are shown.

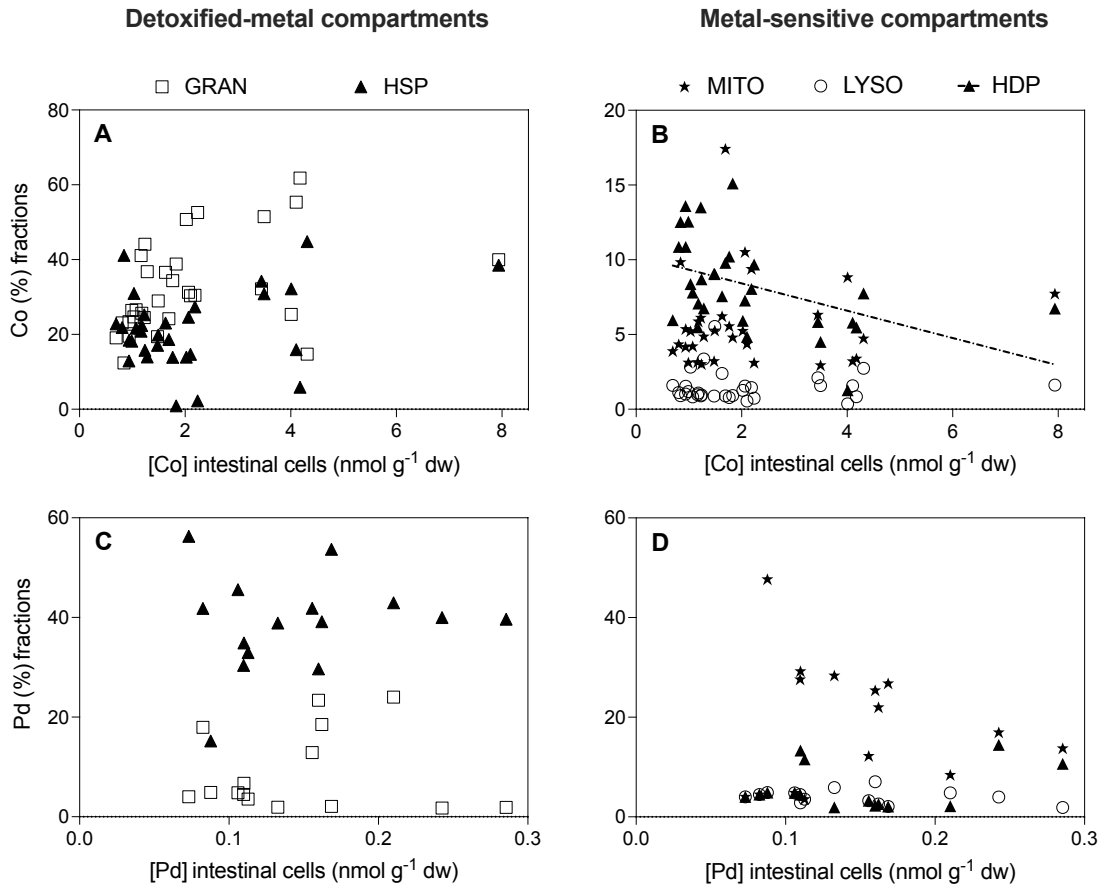


Figure S 5. Relationship between total metal concentration (nmol g⁻¹ dw) in intestinal cells of *L. delawarensis* and metal contribution (%) in detoxified-metal compartment (left panels) and metal-sensitive compartment (right panels) for Co (panels A, B) and Pd (panels C, D). Each point represents one individual bird. Only significant linear regressions are shown. Abbreviations: GRAN: granules; HSP: heat-stable proteins; MITO: mitochondria; LYSO: lysosomes/microsomes; HDP: heat-denatured proteins.

Table S 2. Values for mass balance calculations, certified reference materials values and PGE spiked-samples. Certified reference materials used were DOLT-5 (Dogfish liver; National Research Council Canada, Ottawa, ON, Canada; $n = 6$) and BCR-688 (Mussel tissue; European Commission, Geel, Belgium; $n = 3$).

Metal	Mass balance (mean \pm SD %)	DOLT-5 (mean \pm SD %)	BCR-668 (mean \pm SD %)	Spiked-samples (mean \pm SD %)
La	104 \pm 19	-	93 \pm 1	-
Ce	107 \pm 21	-	94 \pm 3	-
Gd	90 \pm 18	-	89 \pm 3	-
Y	110 \pm 31	-	85 \pm 2	-
Nd	108 \pm 19	-	89 \pm 5	-
Pr	101 \pm 26	-	91 \pm 0.1	-
Co	97 \pm 20	125 \pm 3	-	-
Pd	79 \pm 16	-	-	116 \pm 3

Table S 3. Pearson correlation coefficients describing the relationships between studied metals. Values in bold are significant ($p < 0.05$) r-values.

	Y	La	Ce	Gd	Pr	Nd	Co	Pd
Y	1.00	0.07	0.70	-0.50	-0.14	-0.09	0.78	-0.20
La		1.00	0.59	0.58	-0.25	-0.08	0.12	0.17
Ce			1.00	0.92	-0.05	-0.07	-0.009	-0.07
Gd				1.00	-0.17	-0.32	-0.24	0.01
Pr					1.00	0.06	0.30	0.06
Nd						1.00	-0.17	0.64
Co							1.00	0.08
Pd								1.00

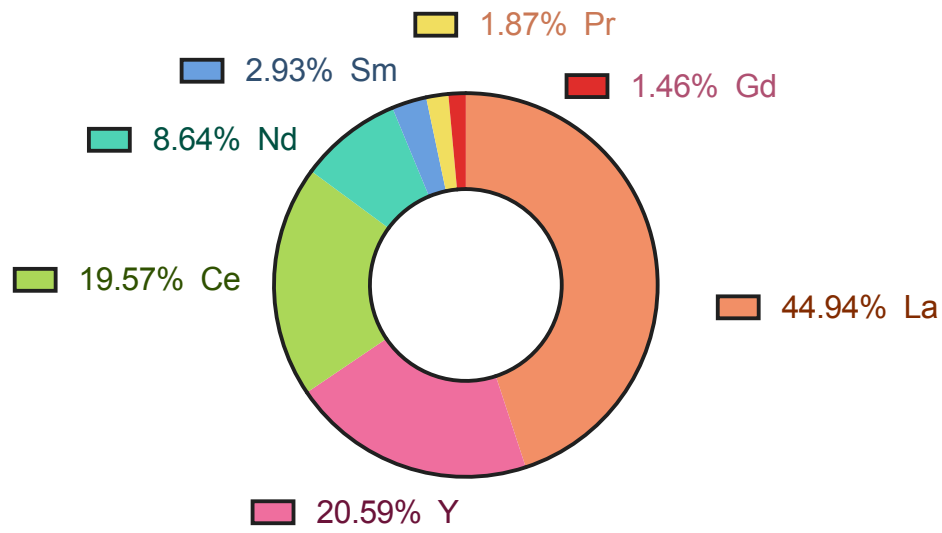


Figure S 6. REEs relative proportion in *L. delawarensis* intestinal cells.

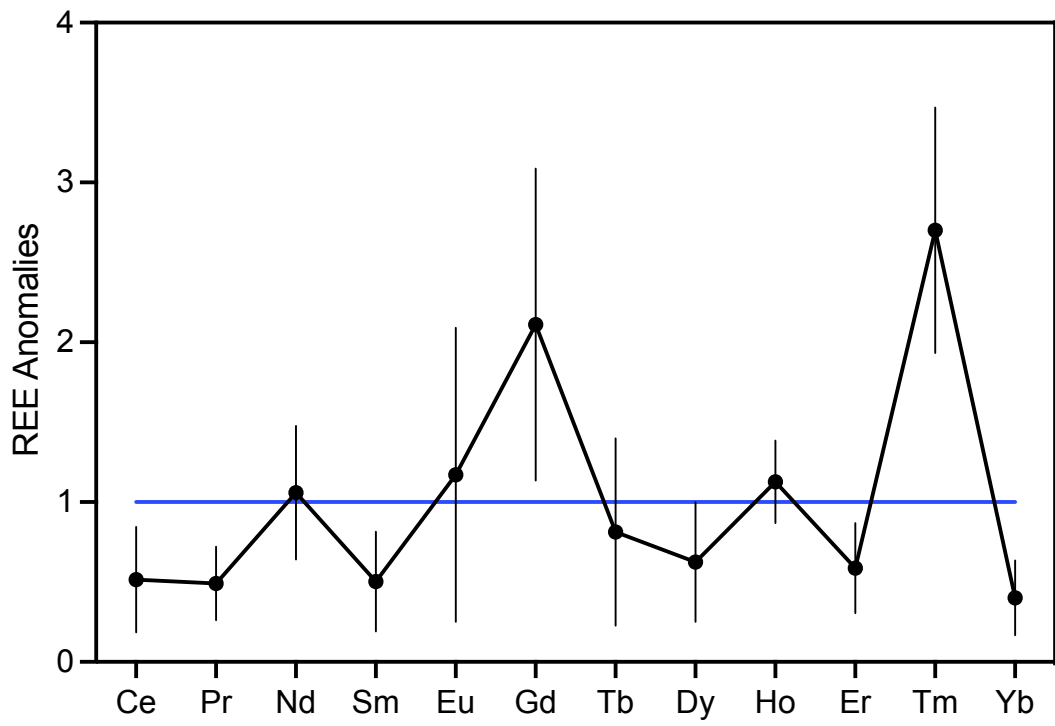


Figure S 7. REE anomalies calculated from PAAS-normalized data in *L. delawarensis* intestinal cells

CHAPITRE III: CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

À travers ce projet de maîtrise, nous nous sommes intéressés au devenir intracellulaire de certains MCS (La, Ce, Gd, Y, Nd, Pr, Pd et Co) dans les cellules intestinales du goéland à bec cerclé de la région de Montréal (Québec, Canada). Tout d'abord, nous avons été en mesure de rapporter des résultats pour six membres du groupe d'ETR (La, Ce, Gd, Y, Nd, Pr), pour le Co, ainsi que pour un seul membre d'EGP (Pd). De plus, d'importants gradients de concentration tissulaire totale ont été observés pour l'ensemble des MSC étudiés, ce qui peut refléter les différents niveaux d'exposition *auquel L. delawarensis* est exposé dans la région urbaine de Montréal. Il serait intéressant de combiner nos résultats avec des analyses isotopiques ainsi que des données géospatiales sur les déplacements de ces oiseaux afin d'identifier les sources spécifiques de ces contaminants. À notre connaissance, aucune étude n'a répertorié de concentrations de ces MCS dans des cellules intestinales d'oiseaux, à l'exception du Co, pour lequel les données mesurées dans cette étude sont inférieures à celles rapportées dans la littérature. Dans l'exercice de comparer les concentrations de MCS obtenues dans ce projet avec d'autres études menées sur différentes espèces aviaires, nous avons constaté un manque critique de données ce qui limite l'interprétation des niveaux de concentrations obtenues dans les goélands à bec cerclé récoltés. Nous pensons que les concentrations actuelles ne représentent pas un risque toxicologique important pour l'animal à l'étude, mais elles nous permettent de générer une base de données sur ces contaminants pour d'éventuels suivis environnementaux.

Dans un deuxième temps, nous avons investigué la distribution subcellulaire de ces métaux. Grâce à la méthode du fractionnement subcellulaire, nous avons pu obtenir des résultats précurseurs dans la compréhension de la gestion intracellulaire de ces métaux chez les oiseaux vivant en milieux urbains. L'utilisation de cette méthode exige une optimisation du protocole au préalable afin d'obtenir une séparation optimale des fractions subcellulaires. Basée sur le protocole de validation enzymatique de Cardon et al. (2018), l'optimisation de la méthode d'homogénéisation et de la série de centrifugations différentielles permet de vérifier l'efficacité de l'approche opérationnelle. Dans ce projet, nous avons validé un protocole adapté à des cellules intestinales à l'aide de biomarqueurs enzymatiques spécifiques à certaines fractions soit la CCO, la CS et la LDH. Bien que notre validation enzymatique ait démontré une séparation subcellulaire relativement efficace, il est à noter que le processus d'optimisation est toutefois limité par la validation de ces seules enzymes et qu'il existe un biais de confirmation pour les autres fractions obtenues pour lesquelles nous n'avons pas de tests enzymatiques réalisables. Il est également important de mentionner que l'approche du fractionnement subcellulaire est une approche opérationnelle impliquant certaines limites inhérentes à tout processus de séparation cellulaire. En effet, les manipulations sont grandement influencées par l'opérateur. Ce qui peut induire de grandes variations lors de l'application du protocole. De plus, les étapes d'homogénéisation et de centrifugations différentielles posent des défis importants, notamment à cause du bris de certains composants cellulaires fragiles comme les mitochondries, ce qui peut mener à un déversement de métaux d'une fraction à une autre. Somme toute, notre protocole optimisé a le potentiel de devenir un guide de référence pour d'autres études portant sur cette approche dans ce type de tissus.

À notre connaissance, nos résultats de fractionnement subcellulaire se situent dans les tout premiers travaux concernant la gestion intracellulaire des EGP chez les vertébrés récoltés dans des environnements aquatiques ou terrestres. De plus, bien que les études concernant le fractionnement subcellulaire des ETR se font de plus en plus communes, nos résultats sont pionniers dans ces connaissances sur les oiseaux sauvages. Alors que le Co est un métal grandement utilisé dans la sphère industrielle depuis plusieurs décennies, l'intérêt écotoxicologique qu'il lui est porté est relativement faible. Nos résultats s'ajoutent aux quelques études concernant le fractionnement subcellulaire, et permettent de renforcer nos connaissances concernant son devenir intracellulaire.

L'approche du fractionnement subcellulaire s'est avérée être efficace sur les cellules intestinales du goéland à bec cerclé puisque la cohérence des résultats obtenus dans ce projet avec ceux de la littérature sur le sujet indique une tendance similaire dans le comportement intracellulaire des métaux. En effet, il était attendu de voir une détoxification importante par les granules pour les ETR (métaux de classe A). La littérature sur le fractionnement subcellulaire des ETR présente les mêmes profils d'accumulation que ceux révélés par nos résultats pour les différents ETR étudiés (La, Ce, Gd, Y, Pr et Nd). Les granules cytosoliques ont tendance à accumuler fortement les métaux essentiels comme le Zn, le Fe et le Ca, étant tous des métaux de classe A. Ayant un comportement ionique similaire aux métaux essentiels, les ETR sont alors également séquestrés par les granules. De plus, il serait important d'étudier les implications des enrichissements en LREE et HREE dans l'évaluation des risques des ETR tel qu'abordé par Dang et al. (2023). Contrairement aux métaux de classe A qui ont une faible affinité pour les groupements sulfhydryles, les métaux de classe B se lient fortement aux groupements présents sur la

MT. En effet, le Pd (classe B) est majoritairement retrouvé dans la fraction HSP contenant la MT. D'autre part, en accord avec la classification intermédiaire du Co, il était attendu de voir une accumulation dans les granules, mais également la fraction HSP. En effet, puisque les métaux intermédiaires peuvent présenter des affinités autant de classe A que de classe B, leur comportement peut être moins prévisible. Nos résultats ont cependant indiqué que la proportion de Co dans les granules est significativement supérieure à celle dans la fraction HSP, ce qui suggère un profil de classe A prédominant. Le rôle important de ces stratégies de détoxification (soit par granules ou par la MT) a été aussi démontré par les relations linéaires positives entre l'accumulation de métaux dans ces fractions et la concentration totale en métal dans les cellules intestinales. Cependant, il est important de souligner que ces régressions doivent être interprétées avec prudence étant donné la présence de certaines données plus extrêmes pouvant influencer grandement la régression ainsi que le coefficient de détermination (R^2) dans certains cas.

Finalement, une accumulation dans les fractions « sensibles » aux métaux a tout de même été observée, où les mitochondries et les protéines thermosensibles du cytosol sont généralement les principales cibles d'accumulation des MCS. Une accumulation importante de métaux dans les sites cellulaires critiques peut avoir des effets délétères importants sur le métabolisme des organismes. Les données obtenues dans ce projet ne permettent cependant pas de d'étudier la toxicité cellulaire de ces métaux. Ceci nous démontre l'importance d'utiliser des biomarqueurs de toxicité (i.e. peroxydation lipidique, biomarqueurs enzymatiques du métabolisme anaérobique et aérobie, ainsi que ceux du métabolisme lipidique, catabolique, etc.) comme complément aux analyses de fractionnement subcellulaire. Il est à noter que pour certains organismes, notamment le

goéland à bec cerclé de la région de Montréal, les métaux ne sont pas les seuls contaminants urbains pouvant induire de la toxicité subcellulaire. En effet, ces oiseaux sont également exposés à des contaminants organiques à travers leur alimentation, ce qui peut limiter les corrélations lors des analyses de biomarqueurs de toxicité.

RÉFÉRENCES

- Adriano, D. C. (2001). Bioavailability of trace metals. Dans *Trace elements in terrestrial environments* (p. 61-89). Springer.
- Aguilera, A., Bautista-Hernández, D., Bautista, F., Goguitchaichvili, A. et Cejudo, R. (2021). Is the urban form a driver of heavy metal pollution in road dust? Evidence from Mexico City. *Atmosphere*, 12(2), 266.
- Aguilera, A., Cortés, J. L., Delgado, C., Aguilar, Y., Aguilar, D., Cejudo, R., . . . Bautista, F. (2022). Heavy Metal Contamination (Cu, Pb, Zn, Fe, and Mn) in Urban Dust and its Possible Ecological and Human Health Risk in Mexican Cities. *Frontiers in Environmental Science*, 195.
- Ajmone-Marsan, F. et Biasioli, M. (2010). Trace elements in soils of urban areas. *Water, Air, & Soil Pollution*, 213(1-4), 121-143.
- Alharbi, B. H., Pasha, M. J. et Al-Shamsi, M. A. S. (2019). Influence of different urban structures on metal contamination in two metropolitan cities. *Scientific reports*, 9(1), 1-15.
- Ali, H., Khan, E. et Ilahi, I. (2019). Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Journal of Chemistry*, 2019.
- Alonso, E., Sherman, A. M., Wallington, T. J., Everson, M. P., Field, F. R., Roth, R. et Kirchain, R. E. (2012). Evaluating rare earth element availability: A case with revolutionary demand from clean technologies. *Environmental Science & Technology*, 46(6), 3406-3414.
- Andrews, G. K., Fernando, L. P., Moore, K. L., Dalton, T. P. et Sobieski, R. J. (1996). Avian metallothioneins: structure, regulation and evolution. *The Journal of nutrition*, 126(suppl_4), 1317S-1323S.
- Antweiler, R. C. (2015). Evaluation of statistical treatments of left-censored environmental data using coincident uncensored data sets. II. Group comparisons. *Environmental Science & Technology*, 49(22), 13439-13446.
- Barceloux, D. G. et Barceloux, D. (1999). Cobalt. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 37(2), 201-216.
- Barrio-Parra, F., Elío, J., De Miguel, E., García-González, J., Izquierdo, M. et Álvarez, R. (2018). Environmental risk assessment of cobalt and manganese from industrial

- sources in an estuarine system. *Environmental Geochemistry and Health*, 40(2), 737-748.
- Barst, B. D., Rosabal, M., Campbell, P. G., Muir, D. G., Wang, X., Köck, G. et Drevnick, P. E. (2016). Subcellular distribution of trace elements and liver histology of landlocked Arctic char (*Salvelinus alpinus*) sampled along a mercury contamination gradient. *Environmental Pollution*, 212, 574-583.
- Barst, B. D., Rosabal, M., Drevnick, P. E., Campbell, P. G. et Basu, N. (2018). Subcellular distributions of trace elements (Cd, Pb, As, Hg, Se) in the livers of Alaskan yelloweye rockfish (*Sebastes ruberrimus*). *Environmental Pollution*, 242, 63-72.
- Batley, G. E. et Campbell, P. G. (2022). Metal contaminants of emerging concern in aquatic systems. *Environmental Chemistry*, 19(1), 23-40.
- Beedle, A., Hamid, J. et Zamponi, G. (2002). Inhibition of transiently expressed low-and high-voltage-activated calcium channels by trivalent metal cations. *The Journal of membrane biology*, 187(3), 225-238.
- Berbel, G. B. B., Hortellani, M. A., de Souza Sarkis, J. E., Chiozzini, V. G., Fávaro, D. I. T., Sutti, B. O., . . . de Santis Braga, E. (2021). Emerging contaminants (Rh, Pd, and Pt) in surface sediments from a Brazilian subtropical estuary influenced by anthropogenic activities. *Marine Pollution Bulletin*, 163, 111929.
- Bjerregaard, P., Andersen, C. B. I. et Anderson, O. (2014). Ecotoxicology of Metals— Sources, Transport, and Effects on the Ecosystem. Dans G. F. Nordberg, B. A. Fowler et M. Nordberg (dir.), *Handbook on the Toxicology of Metals* (chap. 21, p. 425-459). Academic press.
- Brousseau, P., Lefebvre, J. et Giroux, J.-F. (1996). Diet of ring-billed gull chicks in urban and non-urban colonies in Quebec. *Colonial Waterbirds*, 22-30.
- Brown, L., Rosabal, M., Sorais, M., Poirier, A., Widory, D. et Verreault, J. (2019). Habitat use strategy influences the tissue signature of trace elements including rare earth elements in an urban-adapted omnivorous bird. *Environmental Research*, 168, 261-269.
- Burger, J. et Gochfeld, M. (2004). Marine birds as sentinels of environmental pollution. *EcoHealth*, 1(3), 263-274.
- Calabrese, E. J. (2005). Toxicological awakenings: the rebirth of hormesis as a central pillar of toxicology. *Toxicology and applied pharmacology*, 204(1), 1-8.

- Campbell, P. G. et Hare, L. (2009). Metal detoxification in freshwater animals. Roles of metallothioneins. Dans *Metallothioneins and related chelators* (p. 239-277). Royal Society of Chemistry Cambridge, UK.
- Cardon, P.-Y., Roques, O., Caron, A., Rosabal, M., Fortin, C. et Amyot, M. (2020). Role of prey subcellular distribution on the bioaccumulation of yttrium (Y) in the rainbow trout. *Environmental Pollution*, 258, 113804.
- Cardon, P.-Y., Triffault-Bouchet, G., Caron, A., Rosabal, M., Fortin, C. et Amyot, M. (2019). Toxicity and subcellular fractionation of yttrium in three freshwater organisms: *Daphnia magna*, *Chironomus riparius*, and *Oncorhynchus mykiss*. *ACS omega*, 4(9), 13747-13755.
- Cardon, P. Y., Caron, A., Rosabal, M., Fortin, C. et Amyot, M. (2018). Enzymatic validation of species-specific protocols for metal subcellular fractionation in freshwater animals. *Limnology and Oceanography: Methods*, 16(9), 537-555.
- Caron-Beaudoin, É., Gentes, M.-L., Patenaude-Monette, M., Hélie, J.-F., Giroux, J.-F. et Verreault, J. (2013). Combined usage of stable isotopes and GPS-based telemetry to understand the feeding ecology of an omnivorous bird, the Ring-billed Gull (*Larus delawarensis*). *Canadian journal of zoology*, 91(10), 689-697.
- Chojnacka, K. (2018). Introduction. Dans K. Chojnacka, A. Saeid et J. Wiley (dir.), *Recent Advances in Trace Elements*. Wiley Online Library.
- Dalpé-Mainville, M., Boulanger, J.-F. et Coudert, L. (2021). Métaux critiques et stratégiques rejetés au Québec et au Canada: une analyse des données de l'inventaire national des rejets de polluants (INRP).
- Dang, D. H., Ma, L., Ha, Q. K. et Wang, W. (2022). A multi-tracer approach to disentangle anthropogenic emissions from natural processes in the St. Lawrence River and Estuary. *Water Research*, 219, 118588.
- Dang, D. H., Wang, W., Winkler, G. et Chatzis, A. (2023). Rare earth element uptake mechanisms in plankton in the Estuary and Gulf of St. Lawrence. *Science of The Total Environment*, 860, 160394.
- Dauwe, T., Janssens, E., Bervoets, L., Blust, R. et Eens, M. (2005). Heavy-metal concentrations in female laying great tits (*Parus major*) and their clutches. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 49(2), 249-256.
- Davidson, T., Ke, Q. et Costa, M. (2014). Selected Molecular Mechanisms of Metal Toxicity and Carcinogenicity. Dans G. F. Nordberg, B. A. Fowler et M. Nordberg (dir.), *Handbook on the Toxicology of Metals* (chap. 9, p. 173-196). Academic press.

- Desjardins, K., Khadra, M., Caron, A., Ponton, D. E., Rosabal, M. et Amyot, M. (2022). Significance of chemical affinity on metal subcellular distribution in yellow perch (*Perca flavescens*) livers from Lake Saint-Pierre (QUEBEC, Canada). *Environmental Pollution*, 312, 120077.
- Dubois, M. et Hare, L. (2009). Selenium assimilation and loss by an insect predator and its relationship to Se subcellular partitioning in two prey types. *Environmental Pollution*, 157(3), 772-777.
- Duffus, J. H. (2002). " Heavy metals" a meaningless term?(IUPAC Technical Report). *Pure and applied chemistry*, 74(5), 793-807.
- Dumas, J. et Hare, L. (2008). The internal distribution of nickel and thallium in two freshwater invertebrates and its relevance to trophic transfer. *Environmental Science & Technology*, 42(14), 5144-5149.
- Durkalec, M., Martínez-Haro, M., Nawrocka, A., Pareja-Carrera, J., Smits, J. E. et Mateo, R. (2022). Factors influencing lead, mercury and other trace element exposure in birds from metal mining areas. *Environmental Research*, 212, 113575.
- Ek, K. H., Morrison, G. M. et Rauch, S. (2004). Environmental routes for platinum group elements to biological materials—a review. *Science of the Total Environment*, 334, 21-38.
- Elder, A., Nordberg, G. F. et Kleinman, M. (2014). Routes of Exposure, Dose, and Toxicokinetics of Metals. Dans G. F. Nordberg, B. A. Fowler et M. Nordberg (dir.), *Handbook on the Toxicology of Metals* (chap. 3, p. 45-74). Academic press.
- Elliott, J. et Scheuhammer, A. (1997). Heavy metal and metallothionein concentrations in seabirds from the Pacific coast of Canada. *Marine Pollution Bulletin*, 34(10), 794-801.
- Elliott, J., Scheuhammer, A., Leighton, F. et Pearce, P. (1992). Heavy metal and metallothionein concentrations in Atlantic Canadian seabirds. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 22(1), 63-73.
- Eyckmans, M., Blust, R. et De Boeck, G. (2012). Subcellular differences in handling Cu excess in three freshwater fish species contributes greatly to their differences in sensitivity to Cu. *Aquatic Toxicology*, 118, 97-107.
- G.H. Parker et Kraak, G. V. D. (2018). Use of metal-rich slag as a source of grit and its effects on pigeon health and fitness. *Journal of Environment Science and Pollution Research*, 4(2), 256-267.

- Gagnon, Z. E. et Patel, A. (2007). Induction of metallothionein in chick embryos as a mechanism of tolerance to platinum group metal exposure. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 42(3), 381-387.
- Gallien, I., Caurant, F., Bordes, M., Bustamante, P., Miramand, P., Fernandez, B., . . . Babin, P. (2001). Cadmium-containing granules in kidney tissue of the Atlantic white-sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*) off the Faroe Islands. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(3), 389-395.
- Ge, Y., Murray, P. et Hendershot, W. (2000). Trace metal speciation and bioavailability in urban soils. *Environmental Pollution*, 107(1), 137-144.
- Giroux, J.-F., Patenaude-Monette, M., Lagarde, F., Thiériot, E., Brousseau, P. et Molina, P. (2016). The rise and fall of Ring-billed Gulls (*Larus delawarensis*) in eastern North America. *Waterbirds*, 39(sp1), 87-98.
- Gonzalez, V., Vignati, D. A., Leyval, C. et Giamberini, L. (2014). Environmental fate and ecotoxicity of lanthanides: are they a uniform group beyond chemistry? *Environment International*, 71, 148-157.
- Goto, D. et Wallace, W. G. (2010). Metal intracellular partitioning as a detoxification mechanism for mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) living in metal-polluted salt marshes. *Marine environmental research*, 69(3), 163-171.
- Gouzy, A. et Ducos, G. (2008). La connaissance des éléments traces métalliques : un défi pour la gestion de l'environnement. *Air pur*, (75), 6-10.
- Hanana, H., Kowalczyk, J., André, C. et Gagné, F. (2021). Insights on the toxicity of selected rare earth elements in rainbow trout hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 248, 109097.
- Haque, N., Hughes, A., Lim, S. et Vernon, C. (2014). Rare earth elements: Overview of mining, mineralogy, uses, sustainability and environmental impact. *Resources*, 3(4), 614-635.
- Hirano, S. et Suzuki, K. T. (1996). Exposure, metabolism, and toxicity of rare earths and related compounds. *Environmental Health Perspectives*, 104(suppl 1), 85-95.
- Hofer, C., Gallagher, F. J. et Holzapfel, C. (2010). Metal accumulation and performance of nestlings of passerine bird species at an urban brownfield site. *Environmental Pollution*, 158(5), 1207-1213.
- Hopkin, S. P. (1989). *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates* Elsevier Applied Science Publishers.

- Hosseini, M., Jafarian, I., Farahani, S., Khodadadi, R., Tagavi, S., Naserzadeh, P., . . . Arghavanifard, N. (2016). New mechanistic approach of inorganic palladium toxicity: impairment in mitochondrial electron transfer. *Metallomics*, 8(2), 252-259.
- Itoh, A., Kodani, T., Ono, M., Nakano, K., Kunieda, T., Tsuchida, Y., . . . Fujimori, E. (2017). Potential anthropogenic pollution by Eu as well as Gd observed in river water around urban area. *Chemistry Letters*, 46(9), 1327-1329.
- Jakimska, A., Konieczka, P., Skóra, K. et Namieśnik, J. (2011). Bioaccumulation of Metals in Tissues of Marine Animals, Part I: the Role and Impact of Heavy Metals on Organisms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 20(5).
- Jensen, K. H., Rauch, S., Morrison, G. et Lindberg, P. (2002). Platinum group elements in the feathers of raptors and their prey. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(3), 338-347.
- Joshi, U. et Balasubramanian, R. (2010). Characteristics and environmental mobility of trace elements in urban runoff. *Chemosphere*, 80(3), 310-318.
- Kelly, J., Thornton, I. et Simpson, P. (1996). Urban geochemistry: a study of the influence of anthropogenic activity on the heavy metal content of soils in traditionally industrial and non-industrial areas of Britain. *Applied geochemistry*, 11(1-2), 363-370.
- Kerric, A., Okeme, J., Jantunen, L., Giroux, J.-F., Diamond, M. L. et Verreault, J. (2021). Spatial and temporal variations of halogenated flame retardants and organophosphate esters in landfill air: Potential linkages with gull exposure. *Environmental Pollution*, 271, 116396.
- Kinraide, T. B. (2009). Improved scales for metal ion softness and toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 28(3), 525-533.
- Kobayashi, M. et Shimizu, S. (1999). Cobalt proteins. *European Journal of Biochemistry*, 261(1), 1-9.
- Koivula, M. J. et Eeva, T. (2010). Metal-related oxidative stress in birds. *Environmental Pollution*, 158(7), 2359-2370.
- Labrie, J. (2022). Bioaccumulation et répartition subcellulaire d'éléments traces métalliques chez l'amphipode *Hyaella azteca* provenant de la région de Yellowknife (Territoires du Nord-Ouest, Canada). *Université du Québec à Montréal (UQAM)*.

- Lavoie, M., Bernier, J., Fortin, C. et Campbell, P. G. (2009). Cell homogenization and subcellular fractionation in two phytoplanktonic algae: implications for the assessment of metal subcellular distributions. *Limnology and Oceanography: Methods*, 7(4), 277-286.
- Lehninger, A. L. et Carafoli, E. (1971). The interaction of La^{3+} with mitochondria in relation to respiration-coupled Ca^{2+} transport. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 143(2), 506-515.
- Leopold, K., Maier, M., Weber, S. et Schuster, M. (2008). Long-term study of palladium in road tunnel dust and sewage sludge ash. *Environmental Pollution*, 156(2), 341-347.
- Li, Z., Meng, X., Wang, Y. et Wang, X. (2020, 2020/09/01). Developing the relationship between metal ionic characters and ecological risk assessment screening values using QICAR. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(26), 32954-32961. doi: 10.1007/s11356-020-09571-w
- Ma, J. Y., Young, S.-H., Mercer, R. R., Barger, M., Schwegler-Berry, D., Ma, J. K. et Castranova, V. (2014). Interactive effects of cerium oxide and diesel exhaust nanoparticles on inducing pulmonary fibrosis. *Toxicology and applied pharmacology*, 278(2), 135-147.
- MacMillan, G. A., Chételat, J., Heath, J. P., Mickpegak, R. et Amyot, M. (2017). Rare earth elements in freshwater, marine, and terrestrial ecosystems in the eastern Canadian Arctic. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 19(10), 1336-1345.
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M. P., Angulo, E. et Giamberini, L. (2002). Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy research and technique*, 56(5), 358-392.
- Markert, B. et Friese, K. (2000). Instrumental techniques for trace analysis. Dans *Trace elements: their distribution and effects in the environment* (chap. 5, p. 137-187). Elsevier.
- Mason, A. Z. et Jenkins, K. D. (1995). Metal detoxification in aquatic organisms. Dans A. Tessier et D. Turner (dir.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems* (p. pp. 479-608). Chichester, UK : J. Wiley & Sons.
- Ministère de l'Énergie et des Ressources Naturelles. (2020). *Les minéraux critiques et stratégiques: Une industrie en croissance, des occasions à saisir* Montréal : Bibliothèque et Archives nationales du Québec. Récupéré de https://mern.gouv.qc.ca/wp-content/uploads/Brochure-Investisseurs_VQuebec.pdf

- Moiseenko, T. et Gashkina, N. (2020). Distribution and bioaccumulation of heavy metals (Hg, Cd and Pb) in fish: influence of the aquatic environment and climate. *Environmental Research Letters*, 15(11), 115013.
- Moss, R., Tzimas, E., Kara, H., Willis, P. et Kooroshy, J. (2011). Critical metals in strategic energy technologies. *Publications Office of the European Union, Luxembourg*.
- Mudd, G. M., Jowitt, S. M. et Werner, T. T. (2018). Global platinum group element resources, reserves and mining—a critical assessment. *Science of the Total Environment*, 622, 614-625.
- Naccari, C., Cristani, M., Cimino, F., Arcoraci, T. et Trombetta, D. (2009). Common buzzards (*Buteo buteo*) bio-indicators of heavy metals pollution in Sicily (Italy). *Environment International*, 35(3), 594-598.
- Nam, D.-H., Anan, Y., Ikemoto, T. et Tanabe, S. (2005). Multielemental accumulation and its intracellular distribution in tissues of some aquatic birds. *Marine Pollution Bulletin*, 50(11), 1347-1362.
- Nicholls, D. G. (2005). Mitochondria and calcium signaling. *Cell calcium*, 38(3-4), 311-317.
- Nieboer, E. et Richardson, D. H. (1980). The replacement of the nondescript term ‘heavy metals’ by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, 1(1), 3-26.
- Nigro, M. et Leonzio, C. (1996). Intracellular storage of mercury and selenium in different marine vertebrates. *Marine Ecology Progress Series*, 135, 137-143.
- Nordberg, G. F., Fowler, B. A. et Nordberg, M. (2014). Toxicology of Metals: Overview, Definitions, Concepts, and Trends. Dans G. F. Nordberg, B. A. Fowler et M. Nordberg (dir.), *Handbook on the Toxicology of Metals* (chap. 1, p. 3-14). Academic press.
- Okamoto, S. et Eltis, L. D. (2011). The biological occurrence and trafficking of cobalt. *Metallomics*, 3(10), 963-970.
- Osman, D., Cooke, A., Young, T. R., Deery, E., Robinson, N. J. et Warren, M. J. (2021). The requirement for cobalt in vitamin B12: A paradigm for protein metalation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1868(1), 118896.
- Pagano, G., Aliberti, F., Guida, M., Oral, R., Siciliano, A., Trifuoggi, M. et Tommasi, F. (2015). Rare earth elements in human and animal health: state of art and research priorities. *Environmental Research*, 142, 215-220.

- Pourmand, A., Dauphas, N. et Ireland, T. J. (2012). A novel extraction chromatography and MC-ICP-MS technique for rapid analysis of REE, Sc and Y: Revising CI-chondrite and Post-Archean Australian Shale (PAAS) abundances. *Chemical Geology*, 291, 38-54.
- R Core Team. (2019). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria : R Foundation for Statistical Computing. Récupéré de <https://www.R-project.org/>
- Racine, K. (2016). *Étude de la répartition subcellulaire des éléments du groupe platine et des terres rares chez l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii*. Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique.
- Rainbow, P. S. (2007). Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability and toxicity. *Environment International*, 33(4), 576-582.
- Rauch, S. et Peucker-Ehrenbrink, B. (2015). Sources of Platinum Group Elements in the Environment. Dans F. Zereini et C. L. Wiseman (dir.), *Platinum metals in the environment* (p. 3-19). Springer.
- Rétif, J., Zalouk-Vergnoux, A., Briant, N. et Poirier, L. (2023). From geochemistry to ecotoxicology of rare earth elements in aquatic environments: Diversity and uses of normalization reference materials and anomaly calculation methods. *Science of The Total Environment*, 856, 158890.
- Rim, K.-T. (2016). Effects of rare earth elements on the environment and human health: a literature review. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 8(3), 189-200.
- Rolland, A. (2020). *Analyse subcellulaire de la contamination en éléments traces métalliques (As, Sb, Cd, Ag, La, Ce) dans des foies de grand corégone (Coregonus clupeaformis) et de grand brochet (Esox lucius) de la région de Yellowknife (T.N.-O., Canada)*.
- Rollin, C. et Quiot, F. (2006). *Éléments traces métalliques-guide méthodologique: recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines*. Rapp. d'étude INERIS.
- Rosabal, M., Hare, L. et Campbell, P. G. (2012). Subcellular metal partitioning in larvae of the insect *Chaoborus* collected along an environmental metal exposure gradient (Cd, Cu, Ni and Zn). *Aquatic Toxicology*, 120, 67-78.
- Rosabal, M., Hare, L. et Campbell, P. G. (2014). Assessment of a subcellular metal partitioning protocol for aquatic invertebrates: preservation, homogenization, and subcellular fractionation. *Limnology and Oceanography: Methods*, 12(7), 507-518.

- Rosabal, M., Pierron, F., Couture, P., Baudrimont, M., Hare, L. et Campbell, P. G. (2015). Subcellular partitioning of non-essential trace metals (Ag, As, Cd, Ni, Pb, and Tl) in livers of American (*Anguilla rostrata*) and European (*Anguilla anguilla*) yellow eels. *Aquatic Toxicology*, *160*, 128-141.
- Savignan, L., Faucher, S., Chéry, P. et Lespes, G. (2021). Platinum group elements contamination in soils: Review of the current state. *Chemosphere*, *271*, 129517.
- Sezer, N., Kılıç, Ö., Metian, M. et Belivermiş, M. (2018). Effects of ocean acidification on ¹⁰⁹Cd, ⁵⁷Co, and ¹³⁴Cs bioconcentration by the european oyster (*Ostrea edulis*): biokinetics and tissue-to-subcellular partitioning. *Journal of Environmental Radioactivity*, *192*, 376-384.
- Sorais, M., Mazerolle, M. J., Giroux, J.-F. et Verreault, J. (2020). Landfills represent significant atmospheric sources of exposure to halogenated flame retardants for urban-adapted gulls. *Environment International*, *135*, 105387.
- Sorais, M., Rezaei, A., Okeme, J. O., Diamond, M. L., Izquierdo, R., Giroux, J.-F. et Verreault, J. (2017). A miniature bird-borne passive air sampler for monitoring halogenated flame retardants. *Science of the Total Environment*, *599*, 1903-1911.
- Sorais, M., Spiegel, O., Mazerolle, M. J., Giroux, J.-F. et Verreault, J. (2021). Gulls foraging in landfills: Does atmospheric exposure to halogenated flame retardants result in bioaccumulation? *Environment International*, *147*, 106369.
- Stawarz, R. (2009). *Trace elements and heavy metals in animals and humans: selected aspects of their content and distribution* Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Pedagogicznego, Kraków.
- Swaine, D. J. (2000). Why trace elements are important. *Fuel Processing Technology*, *65*, 21-33.
- Szynkowska, M. I., Pawlaczyk, A. et Mackiewicz, E. (2018). Bioaccumulation and Biomagnification of Trace Elements in the Environment. Dans K. Chojnacka, A. Saeid et J. Wiley (dir.), *Recent Advances in Trace Elements*. Wiley Online Library.
- Tepe, N., Romero, M. et Bau, M. (2014). High-technology metals as emerging contaminants: Strong increase of anthropogenic gadolinium levels in tap water of Berlin, Germany, from 2009 to 2012. *Applied geochemistry*, *45*, 191-197.
- Urien, N., Caron, A., Lerquet, M., Couture, P. et Campbell, P. G. (2020). Optimization of a subcellular metal fractionation method for fish liver: Homogenization, subcellular separation, and trial isolation of nuclear materials. *Limnology and Oceanography: Methods*, *18*(8), 398-410.

- Urien, N., Cooper, S., Caron, A., Sonnenberg, H., Rozon-Ramilo, L., Campbell, P. G. et Couture, P. (2018). Subcellular partitioning of metals and metalloids (As, Cd, Cu, Se and Zn) in liver and gonads of wild white suckers (*Catostomus commersonii*) collected downstream from a mining operation. *Aquatic Toxicology*, 202, 105-116.
- Vijver, M. G., Van Gestel, C. A., Lanno, R. P., Van Straalen, N. M. et Peijnenburg, W. J. (2004). Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review. *Environmental Science & Technology*, 38(18), 4705-4712.
- Vizuete, J., Pérez-López, M., Míguez-Santiyán, M. P. et Hernández-Moreno, D. (2018). Mercury (Hg), lead (Pb), cadmium (Cd), selenium (Se), and arsenic (As) in liver, kidney, and feathers of gulls: A review. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 247*, 85-146.
- Wallace, W. G. et Luoma, S. N. (2003). Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Marine Ecology Progress Series*, 257, 125-137.
- Wang, J., Guo, M., Liu, M. et Wei, X. (2020). Long-term outlook for global rare earth production. *Resources Policy*, 65, 101569.
- Wang, W.-X. et Rainbow, P. S. (2007). Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms. *Environmental Chemistry*, 3(6), 395-399.
- Wang, Z., Yin, L., Xiang, H., Qin, X. et Wang, S. (2019). Accumulation patterns and species-specific characteristics of yttrium and rare earth elements (YREEs) in biological matrices from Maluan Bay, China: implications for biomonitoring. *Environmental Research*, 179, 108804.
- Watari, T., Nansai, K. et Nakajima, K. (2020). Review of critical metal dynamics to 2050 for 48 elements. *Resources, Conservation and Recycling*, 155, 104669.
- Weber, R. J. et Reisman, D. J. (2012). Rare earth elements: A review of production, processing, recycling, and associated environmental issues. *US EPA Region*.
- Wiseman, C. L. S. (2015). Platinum Metals in Airborne Particulate Matter and Their Bioaccessibility. Dans F. Zereini et C. L. Wiseman (dir.), *Platinum metals in the environment* (p. 447-462). Springer.
- Wong, C. S., Li, X. et Thornton, I. (2006). Urban environmental geochemistry of trace metals. *Environmental Pollution*, 142(1), 1-16.
- Zhang, Q., Zhong, W., Xing, B., Tang, W. et Chen, Y. (1998). Binding properties and stoichiometries of a palladium (II) complex to metallothioneins in vivo and in vitro. *Journal of inorganic biochemistry*, 72(3-4), 195-200.

Zhou, B., Li, Z. et Chen, C. (2017). Global potential of rare earth resources and rare earth demand from clean technologies. *Minerals*, 7(11), 203.