

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

INHIBITION RÉCIPROQUE DU TRANSPORT DE CADMIUM ET DE
CALCIUM DANS LES CELLULES ADRÉNO-CORTICALES DE TRUITE
ARC-EN-CIEL (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
ELYSE GAGNON

MARS 2006

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.01-2006). 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

J'aimerais remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au succès de ce travail de recherche. Plus particulièrement, ma directrice, Catherine Jumarie qui par son support moral constant, ses commentaires judicieux et son approche scientifique rigoureuse a su bien me guider pour mener à terme un travail de longue haleine. Je n'aurais sans doute pas pu entreprendre le voyage de la maîtrise sans l'appui et la confiance inconditionnelle de ma famille, qui a su me supporter tant dans le cours de la vie normale que dans les moments difficiles. Finalement, j'ai eu un compagnon de route inébranlable qui a su me motiver, me relever et me pousser à finir ce qui m'apparaissait comme parfois impossible. À travers tous ces joueurs, il y en a d'autres qui se sont immiscés dans mon travail quotidien et qui ont su également me donner ce coup de pouce inestimable qui est souvent la clé de la réussite.

Dans plusieurs philosophies orientales, il est important de donner un nom à tout ce qui est tributaire de notre réussite personnelle afin d'en réaliser pleinement l'impact, alors je nomme : Catherine, Jean-Marc, Papa, Maman, Marc, Pierre-Michel, Anne-Marie, Geneviève, Joëlle, Louise, Andréanne, Jocelyne, Jacques, Charlotte, Raoul, Pénélope et tous ceux qui sont partis mais qui veillent toujours dans l'ombre.

Merci!

Il faudra tailler, tailler, toujours tailler et que
d'autres taillent encore lorsque nous ne serons
plus, abattant sans pitié, éclaircissant les rangs
pour que la forêt reste saine.

Jean Anouilh, *L'Alouette*

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------------|
| LISTE DES FIGURES | vii |
| LISTE DES TABLEAUX..... | ix |
| LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES..... | x |
| RÉSUMÉ..... | xi |
| INTRODUCTION..... | 1 |
| CHAPITRE I:..... | 4 |
| CONTAMINATION ENVIRONNEMENTALE PAR LE CD..... | 4 |
| 1.1 Géochimie du Cd | 4 |
| 1.2 Cycle du Cd dans l'environnement..... | 6 |
| 1.3 Sources naturelles et anthropiques et usages industriels du Cd..... | 7 |
| 1.4 Contamination environnementale et exposition au Cd | 9 |
| 1.4.1 Chez les humains et les mammifères..... | 9 |
| 1.5 Le Cd dans l'eau | 10 |
| 1.5.1 Spéciation du Cd en milieu aquatique | 13 |
| 1.5.2 Cd et organismes aquatiques..... | 15 |
| 1.5.3 Méthallothionéines..... | 17 |
| CHAPITRE II: | 20 |
| TOXICOLOGIE ENDOCRINIENNE CHEZ LE POISSON..... | 20 |
| 2.1 Introduction..... | 20 |
| 2.2 Le cortisol | 21 |
| 2.2.1 Fonctions physiologiques..... | 22 |
| 2.2.2 Axe hypothalamo-hypophyso-surrénal chez le mammifère | 23 |
| 2.2.3 Axe hypothalamo-hypophyso-interrénal chez le poisson | 27 |
| 2.2.4 Exposition au Cd: observations faites in vivo et vitro | 30 |
| 2.3 Transport membranaire..... | 33 |
| 2.4 Interactions avec les métaux essentiels..... | 34 |
| 2.4.1 Cd et Ca..... | 35 |
| 2.4.2 Cd et Zn..... | 38 |
| 2.5 Conclusion | 41 |

| | |
|--|-----------|
| CHAPITRE III: | 43 |
| OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE | 43 |
| 3.1 Prémises et hypothèse générale..... | 43 |
| 3.2 Hypothèses de recherche spécifiques..... | 44 |
| 3.3 Objectifs de la recherche..... | 44 |
| CHAPITRE IV: | 45 |
| RECIPROCAL INHIBITION OF CD AND CA UPTAKE IN ISOLATED ADRENOCORTICAL CELLS OF THE RAINBOW TROUT (ONCORHYNCHUS MYKISS) | 45 |
| 4.1 Abstract..... | 47 |
| 4.2 Introduction..... | 48 |
| 4.3 Materials and methods: | 50 |
| 4.3.1 Chemicals..... | 50 |
| 4.3.2 Experimental animals..... | 50 |
| 4.3.3 Preparation of head kidney cell suspension | 50 |
| 4.3.4 Measurement of ¹⁰⁹ Cd and ⁴⁵ Ca uptake | 51 |
| 4.3.5 Metal speciation and experimental conditions..... | 52 |
| 4.3.6 Data analysis | 52 |
| 4.4 Results..... | 54 |
| 4.4.1 Time course of Cd and Ca uptake as a function of the inorganic metal speciation | 54 |
| 4.4.2 Kinetic parameter of Cd and Ca accumulation..... | 54 |
| 4.4.3 Effects of channel blockers on Ca uptake..... | 55 |
| 4.4.4 Cd and Ca reciprocal inhibition | 55 |
| 4.4.5 Effects of Zn on Cd and Ca uptake..... | 56 |
| 4.4.6 Effects of Zn on Cd and Ca reciprocal inhibition as a function of metal speciation | 56 |
| 4.5 Discussion..... | 57 |
| 4.6 References:..... | 60 |

| | |
|---|-----------|
| CHAPITRE V: | 71 |
| DISCUSSION | 71 |
| 5.1 Retour sur les objectifs de recherche | 71 |
| 5.1.1 1 ^{er} objectif : Caractériser le transport de Ca dans la cellule adrénocorticale de truite arc-en-ciel..... | 71 |
| 5.1.2 2 ^e objectif : Étudier les inhibitions réciproques possibles Cd/Ca pour le transport dans la cellule adrénocorticale et ses effets sur l'homéostasie calcique. | 72 |
| 5.1.3 3 ^e objectif : Identifier les synergies ou antagonismes possibles entre le Ca, le Zn et le Cd sur l'accumulation cellulaire et sur la perturbation cortisolique..... | 73 |
| 5.2 Retour sur l'approche scientifique | 74 |
| 5.2.1 Originalité de la technique | 74 |
| 5.2.2 Modèle cellulaire | 76 |
| 5.2.3 Analyses en cytométrie de flux (FACS) | 76 |
| 5.2.4 Projet de recherche par rapport à la problématique initiale | 77 |
| 5.2.5 Perspectives futures | 78 |
| CONCLUSION | 80 |
| RÉFÉRENCES | 82 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| <p>Figure 1.1 Conversion et transport du cadmium dans les différents compartiments de l'écosystème (Fishbein 1974).....</p> | 7 |
| <p>Figure 1.2 Utilisation industrielle du Cd</p> | 9 |
| <p>Figure 2.1 Seconds messagers des voies de signalisation associées aux protéines G (inspirée de Marieb et Laurendeau 1993).....</p> | 25 |
| <p>Figure 2.2 Axe hypothalamo-hypophysaire-interrénal chez le poisson (Hontela 1998).....</p> | 28 |
| <p>Figure 2.3 Sites d'actions de perturbateurs endocriniens (Hontela 1997).....</p> | 41 |
| <p>Figure 4.1: Time-course of the accumulation of 0.5 μM Cd (A) and 0.5 mM Ca (B) in adrenocortical cells of rainbow trout in a nitrate (filled circles) or a chloride medium (open circles). Points shown are means \pm SD evaluated on 3 determinations of the same cell preparation (A: 6 to 7 fishes, B: 4 fishes). The lines shown are the best-fit curves over data points obtained according to Eq. (1). Inset in (A): Time-course of the accumulation of 0.5 μM Cd in the serum-free MEM medium. Points shown are means \pm SD evaluated on 3 determinations of the same cell preparation (3 fishes).</p> | 65 |
| <p>Figure 4.2: Determination of kinetic parameters for Cd (A) and Ca (B) uptake in adrenocortical cells of rainbow trout in a nitrate medium. Initial uptake values were estimated at 3 min using a fixed ^{109}Cd concentration of 0.5 μM and unlabeled Cd concentrations ranging from 0 to 100 μM (A) or 2.5 μCi $^{45}\text{Ca}/\text{ml}$ and unlabeled Ca concentrations ranging from 0 to 10 mM (B). The lines shown are the best-fit curves over data points obtained according to Eq. (2). Values shown are means \pm SD evaluated on 3 determinations of the same cell preparation (4 fishes) (A) or on 4 determinations of the same cell preparation (6 fishes) (B).</p> | 66 |

Figure 4.3: Short term (5 min) accumulation of 0.5 mM Ca in adrenocortical cells of rainbow trout measured in the presence of 10 μ M nifedipine, 10 μ M verapamil or 10 μ M lanthanum in the nitrate medium. Experiments were conducted in a standard sodium (113 mM Na⁺) (filled columns) or in a Na⁺-free potassium (147 mM K⁺) exposure medium (dashed columns). In the last case, cell suspensions were also preincubated in the nitrate K⁺ medium for 15 min prior to uptake measurements. Values shown are means \pm SD evaluated on 3 determinations of the same cell preparation (5 fishes).....67

Figure 4.4: Short term (3 min) accumulation of 0.5 μ M Cd (**A**) and 0.5 mM Ca (**B**) in adrenocortical cells of rainbow trout in the nitrate (filled circles) or the chloride medium (open circles) as a function of increasing concentrations of Ca (**A**) or Cd (**B**). The lines shown are the best-fit curves over data points obtained according to Eq. (3) with the following apparent constant of inhibition: $K_i = 0.9 \pm 0.4$ mM (**A**), and $K_i = 23 \pm 17$ μ M (**B**). Points shown are means \pm SD evaluated on 4 determinations of the same cell preparation (6 to 7 fishes in **A**; 6 fishes in **B**).68

Figure 4.5: Short term (5 min) accumulation of 0.5 μ M Cd (**A**) or 0.5 mM Ca (**B**) in adrenocortical cells of rainbow trout in the nitrate (filled circles) or the chloride medium (open circles) as a function of increasing concentrations of Zn. The lines shown are the best-fit curves over data points obtained according to Eq. (3) with the following apparent constant of inhibition: $K_i = 2.0 \pm 1.0$ and 0.7 ± 1.1 μ M in the chloride and the nitrate medium, respectively (**A**). Points shown are means \pm SD evaluated on 4 determinations of the same cell preparation (6 fishes in **A**; 3 fishes in **B**)......69

Figure 4.6: Short term (5 min) accumulation of 0.5 μ M ¹⁰⁹Cd (**A**) or 0.5 mM ⁴⁵Ca (2.5 μ Ci ⁴⁵Ca/ml) (**B**) in adrenocortical cells of rainbow trout measured in the chloride (dashed columns) or the nitrate medium (filled columns), in the absence (Ctrl) or in the presence of 5 mM Ca, 100 μ M Cd or 100 μ M Zn, added alone or in various combinations. Values shown are means \pm SD evaluated on 3 determinations of the same cell preparation (3 to 7 fishes in **A**; 4 fishes in **B**). *Significant differences ($p \leq 0.05$) compared with the appropriate control value. δ Significant differences ($p \leq 0.05$) compared with chloride medium under the same experimental conditions. Columns labelled with different letters (for the same exposure medium) are significantly different ($p = 0.05$).70

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1.1 | |
| Propriétés atomiques et chimiques du Cd..... | 4 |
| Tableau 1.2 | |
| Répartition en pourcentage des huit isotopes stables de Cd en milieu naturel (Tiré de Les effets du cadmium dans l'environnement canadien, 1979)..... | 5 |
| Tableau 1.3 | |
| Répartition des émissions de Cd dans les trois compartiments environnementaux (Frieberg <i>et al.</i> 1986, Pinot <i>et al.</i> 2000)..... | 8 |
| Tableau 1.4 | |
| Apports anthropiques de Cd et de Hg dans les écosystèmes aquatiques (10^6 kg/an) (eau douce et eau de mer) (adapté de Nriagu et Pacyna, 1988)..... | 11 |
| Tableau 1.5 | |
| Spéciation du Cd en milieu nitrate et en milieu chlorure (pH 7.5) (adapté de Elisma et Jumarie, 2001)..... | 15 |

LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AC : adénylate cyclase
ACTH : hormone adrénocorticotrope
ADN : acide désoxyribonucléique
AMPc : adénosyl monophosphate cyclique
ATP : adénosyl triphosphate
Ca : calcium
Cd : cadmium
CRF : corticolibérine hypothalamique
Cu : cuivre
FAO : Food and Agriculture Organization
Hg : mercure
IP₃ : inositol triphosphate
MC2 : mélanocortine 2
MT : méthallothionéine
NAQUADAT : base de données nationales sur la qualité des eaux
OMS : Organisme mondial de la santé
Pb : plomb
PKA : protéine kinase A
PLC : phospholipase C
RE : réticulum endoplasmique
ROS : espèces d'oxygène réactives
tMTa : méthallothionéine transcriptase a
tMTb : méthallothionéine transcriptase b
ZF : zone fasciculée
ZG : zone glomérulée
Zn : zinc

RÉSUMÉ

Certains métaux peuvent agir comme perturbateurs endocriniens : les truites arc-en-ciel vivant dans les lacs contaminés au cadmium (Cd) ou au zinc (Zn) présentent une sécrétion cortisolique affaiblie en réponse au stress comparativement à celles non exposées. Des études *in vitro* ont révélé que le Cd et le Zn agissent directement sur la cellule adrénocorticale et nous avons démontré que le ^{109}Cd est transporté dans ces cellules par un système de transport spécifique. Comme la sécrétion cortisolique en réponse à l'adrénocorticotrophine (ACTH) impliquerait un influx de calcium (Ca), nous avons émis l'hypothèse que le Cd et le Zn inhiberaient cet influx. Les effets réciproques du Cd et du Ca, ainsi que du Zn, sur le transport de ^{109}Cd et de ^{45}Ca ont été caractérisés dans des cellules adrénocorticales isolées de truites d'élevage. Nous avons utilisé des milieux d'incubation inorganiques et avons analysé les résultats en terme de spéciation des métaux. Nos résultats démontrent l'existence d'un transport spécifique pour le ^{45}Ca . Des inhibitions réciproques entre le Cd et le Ca ont été observées en conditions optimisant les niveaux de Cd^{2+} comparativement aux chloro-complexes (CdCl_n^{2-n}). Le Zn inhibe préférentiellement le transport de $^{109}\text{CdCl}_n^{2-n}$ sans affecter l'accumulation de ^{45}Ca . Le Cd pourrait donc perturber la sécrétion de cortisol en diminuant la biodisponibilité du Ca dans les cellules stéroïdogéniques du tissu interrénal, mais il est peu probable que le Zn agisse ainsi. Le transport de ^{109}Cd étant inhibé par le Zn, ces deux métaux n'agiraient pas en synergie sur la fonction hormonale. Cette étude valide l'utilisation de cellules adrénocorticales isolées pour mieux comprendre la défaillance cortisolique observée chez les poissons vivant en écosystèmes contaminés.

Mots clés : cadmium, zinc, calcium, cortisol, spéciation, inhibition réciproque

INTRODUCTION

Les divers compartiments environnementaux sont de plus en plus contaminés par des agents chimiques susceptibles de porter préjudice aux êtres vivants. Les processus industriels, l'utilisation des pesticides en agriculture et la combustion de combustibles fossiles sont quelques exemples d'activités anthropiques nuisibles (Léonard 1990, Pinot *et al.* 2000, Goyer et Clarkson 2001). De plus, les produits chimiques fabriqués par l'Homme sont actuellement au nombre dépassant les 60 000 et environ 1000 nouveaux produits sont fabriqués chaque année.

Les milieux aquatiques et les divers écosystèmes qu'ils abritent sont particulièrement sensibles aux effets dommageables de la contamination environnementale. Les métaux lourds se retrouvent de façon ubiquiste dans l'environnement et certains d'entre eux sont bioaccumulables dans tous les systèmes biologiques. Les métaux lourds se divisent en deux catégories, certains sont dits essentiels comme par exemple le zinc (Zn), le fer (Fe) ou le cuivre (Cu) car ils participent à la régulation de certaines fonctions physiologiques (Gunshin *et al.* 1997) tandis que les métaux lourds non-essentiels, tels que le plomb (Pb), le mercure (Hg) ou le cadmium (Cd) n'accomplissent aucune fonction connue dans l'organisme (Eberlee *et al.* 1997, Goyer et Clarkson 2001). Parmi les métaux lourds non-essentiels, le Cd est un polluant non-biodégradable et cumulatif pouvant altérer divers niveaux trophiques en milieu aquatique sur plusieurs centaines d'années (Sorensen 1991). De plus, les risques associés au Cd, comme à tout autre xénobiotique, dépendent non seulement de sa toxicité propre mais aussi de son transfert dans l'environnement, de son absorption et de son métabolisme par les êtres vivants.

Le Cd est l'un des métaux lourds les plus toxiques que l'on retrouve dans l'environnement à l'heure actuelle. Ses effets toxiques sont bien connus chez les mammifères et chez les poissons. Néanmoins, très peu de recherches ont été effectuées sur ses mécanismes d'action au niveau cellulaire à titre de perturbateur endocrinien.

Ce projet de maîtrise vise donc à éclaircir et à analyser d'une manière critique les mécanismes de toxicité du Cd. En plus de mieux comprendre sa géochimie, son cycle dans l'environnement, ses sources et ses utilisations industrielles, nous devons aborder la question de mécanismes de toxicité et ce, plus particulièrement chez les organismes aquatiques. De plus, cette étude permettra d'élucider comment les métaux lourds comme

le Cd agissent sur la fonction hormonale et plus particulièrement sur la cellule stéroïdogénique chez une espèce sensible, telle que la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) dans un contexte d'écotoxicologie.

CHAPITRE I:

CONTAMINATION ENVIRONNEMENTALE PAR LE CD

1.1 Géochimie du Cd

Le Cd est un élément relativement rare, il se répartit de façon uniforme dans la croûte terrestre où sa concentration moyenne varie entre 0,15 et 0,2 mg/kg (Taylor, 1964, Hiatt et Huff, 1975). Dans les roches et les sédiments, sa concentration peut varier énormément allant de 0.1 à 1 mg/g et jusqu'à 100 mg/g dans les roches phosphatiques (Pinot *et al.*, 2000). Le Cd appartient au groupe IIB dans la classification périodique ce qui lui confère sa forme divalente qui le rend chimiquement très semblable au Zn qu'il remplace de façon isomorphe dans presque tous ses minerais (Cotton et Wilkinson, 1973, Barry, 1974, Brown et Chow, 1975, Sorensen, 1991, Stohs et Bagchi, 1995, Andres *et al.*, 2000). Les caractéristiques du Cd sont énumérées dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1
Propriétés atomiques et chimiques du Cd

| | |
|--------------------------------|--|
| Numéro atomique et symbole | 48, Cd |
| Masse atomique | 112,411 g.mol ⁻¹ |
| Masse volumique | 8,7 g.cm ⁻³ à 20°C |
| Configuration électronique | [Kr]4d ¹⁰ 5s ² |
| Rayon ionique | 0,097 (+2) nm |
| Énergie de première ionisation | 866 kJ.mol ⁻¹ |
| Énergie de deuxième ionisation | 1622 kJ.mol ⁻¹ |
| Rayon atomique (Van der Waals) | 0,158nm |
| Température de fusion | 321°C |
| Température d'ébullition | 767°C |
| Électronégativité de Pauling | 1,69 |
| Potentiel standard | -0,402V |
| Isotopes les plus stables | ¹¹⁶ Cd, ¹¹⁴ Cd, ¹¹³ Cd, ¹¹² Cd, ¹¹¹ Cd, ¹¹⁰ Cd, ¹⁰⁹ Cd, ¹⁰⁸ Cd |
| Découverte | 1817 par Friedrich Strohmeyer en Allemagne |

Comme le Zn, le Cd forme des halides ioniques mais n'est pas sous forme méthylée dans l'environnement à cause de l'instabilité de ses dérivés monoalkyles (Sorensen, 1991). Dans le milieu naturel, on le retrouve sous forme de divers complexes minéraux

ainsi que lié à des chélateurs naturels. On retrouve huit isotopes stables de Cd dans l'environnement dont la répartition en pourcentages est décrite au tableau 1.2.

Tableau 1.2
Répartition en pourcentages des huit isotopes stables de Cd en milieu naturel
 (Tiré de *Les effets du cadmium dans l'environnement canadien, 1979*)

| Isotope | % |
|-------------------|-------|
| ¹⁰⁶ Cd | 1,21 |
| ¹⁰⁸ Cd | 0,88 |
| ¹¹⁰ Cd | 12,39 |
| ¹¹¹ Cd | 12,75 |
| ¹¹² Cd | 24,07 |
| ¹¹³ Cd | 12,26 |
| ¹¹⁴ Cd | 28,86 |
| ¹¹⁶ Cd | 7,58 |

Le Cd est essentiellement insoluble dans l'eau, toutefois, certains de ses composés sont facilement solubles tels que le chlorure de Cd (CdCl_2), le bromure de Cd (CdBr_2), le nitrate de Cd ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) et le sulfate de Cd (CdSO_4) (Budavari *et al.*, 1989). Les composés considérés comme étant insolubles, soit l'oxyde de Cd (CdO), le carbonate de Cd (CdCO_3) ou le sulfure de Cd (CdS), peuvent être solubilisés dans des conditions d'acidité ou d'oxydation élevée (OMS 1992b). C'est ce qui explique qu'en milieu aquatique, en conditions neutres, le Cd se retrouve principalement dans les sédiments.

Aucun gisement rentable de Cd n'est actuellement exploité au Québec, sa production est donc directement reliée à la production du Zn et c'est comme impureté qu'on le retrouve dans les déchets miniers (McNelly *et al.*, 1980). Les gisements de Zn sont présents dans presque tous les types de roche, mais la majorité des minerais exploitables se retrouvent surtout dans les roches calcaires et sédimentaires.

Bien que l'utilisation du Cd soit assez récente, par exemple en électroplastie où il sert surtout à titre d'agent anti-corrosif pour la protection d'autres métaux ou alliages, les métaux qu'il accompagne généralement, comme le Cu, le Pb ou le Zn, sont utilisés depuis plusieurs milliers d'années (Friberg *et al.*, 1974). Ainsi, la contamination environnementale a cours depuis très longtemps et les nouveaux usages du Cd ne font qu'augmenter sa diffusion dans l'environnement. C'est pourquoi il est important de se

souvenir que sa présence dans l'environnement est considérée par plusieurs comme représentant un risque élevé pour les différents écosystèmes.

1.2 Cycle du Cd dans l'environnement

Les principales causes naturelles de pénétration du Cd dans l'environnement sont provoquées par l'altération des roches et des gisements cadmifères ce qui permet à l'élément d'amorcer son cycle d'oxydation superficiel, en majorité sous forme de composés solubles. Certaines sources rocheuses comme la sphalérite s'oxydent bien et la majorité du Cd et du Zn qui s'y retrouvent sont dissous pour former des sulfates (CNRC, 1979, Environnement Canada, 1983, CEPA, 1994) Le Cd peut aussi migrer sous forme de nitrates, de chlorures ou de complexes de carbonate, d'hydroxyde ou d'ammoniaque. On le retrouve également sous formes de divers complexes de chélation ou de complexes organométalliques issus de la décomposition de matières organiques de provenance animale, végétale ou humique (Page et Bingham, 1973). Les organismes vivants, notamment les plantes, peuvent jouer un rôle essentiel dans le cycle biogéochimique du Cd dans certains milieux. Dans l'eau, le Cd peut précipiter par adsorption sur des particules sédimentaires ou par chélation ainsi que par complexation avec des composés humiques. Les émissions atmosphériques, pour leur part, jouent également un rôle important puisqu'elles sont la principale voie d'introduction anthropique de Cd dans le milieu. Les industries sidérurgiques ainsi que la production primaire de Zn et de Cu sont parmi les principaux responsables de la pollution atmosphérique par le Cd. Les concentrations de Cd particulaire dans l'air ambiant varient selon la proximité des régions industrielles et urbaines. Dans les milieux non pollués et inhabités les concentrations sont de moins de 1 ng/m^3 par rapport aux milieux industriels, comme par exemple les usines de fabrication de piles alcalines, où les concentrations s'élèvent jusqu'à $1000 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ (Oberdöster, 1992). Dans les sols de surface, le contenu moyen en Cd oscille entre 0.7 et $1.1 \text{ } \mu\text{g/g}$ tandis que dans les poussières, selon une étude conduite par le département de l'Environnement Britannique, les niveaux sont souvent six fois supérieures à ceux des sols (Culbard *et al.*, 1988).

La transformation et la migration du Cd à travers les différents milieux de l'écosystème sont schématisées dans la figure 1.1.

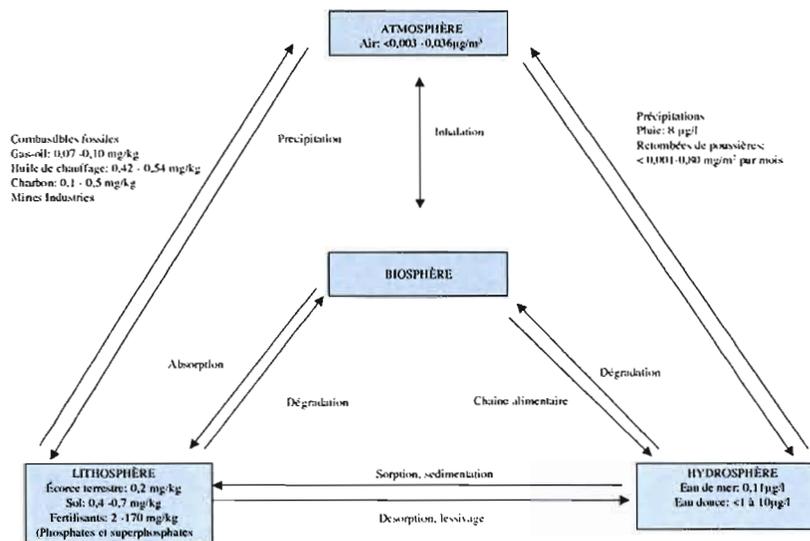


Figure 1.1 Conversion et transport du cadmium dans les différents compartiments de l'écosystème (Fishbein, 1974).

1.3 Sources naturelles et anthropiques et usages industriels du Cd

Les secteurs d'activités humaines responsables de l'introduction du Cd dans le milieu peuvent être classés dans l'ordre d'importance suivant : (i) émissions atmosphériques et pollutions des eaux par l'exploitation des mines, traitement de minerais métalliques (Zn, Pb et Cu) et autres activités telles que la fabrication d'alliages, de peintures, d'accumulateurs et de plastiques, (ii) utilisation et emploi en agriculture de boues, de fertilisants et de pesticides contenant du Cd et (iii) combustion fossile (Friberg *et al.*, 1974).

À l'échelle planétaire, les émissions naturelles de Cd dans l'atmosphère sont estimées à environ 1300 tonnes par année et proviennent essentiellement du transport éolien des particules provenant du sol, des feux de forêt et des émissions volcaniques (Nriagu, 1989).

On a démontré que les activités humaines rejettent dans l'atmosphère de trois à dix fois plus de Cd que les sources naturelles, soit 3000 à 12 000 tonnes par année (Bertine et Goldberg, 1971, Nriagu, 1979, Yeats et Bowers, 1987). Aux États-Unis, on estime à 75% le taux de Cd provenant des activités industrielles et perdu dans le milieu (Sittig, 1975). Ces émissions ont été réparties et décrites par plusieurs auteurs et sont représentées au tableau 1.3.

Tableau 1.3
Répartition des émissions de Cd dans les trois compartiments environnementaux
(Frieberg *et al.*, 1986, Pinot *et al.*, 2000)

| Sources de Cd | Cd (tonnes/an) | | |
|--|----------------|---|------|
| | Terre | atmosphère | Eaux |
| Production du métal (fer et acier) | 341 | 24 | 21,3 |
| Raffinement des métaux non-ferreux | 338 | 31 | 27,3 |
| Production de ciments | 261 | | |
| Charbon pour la combustion | 161 | | |
| Huile de combustion | | 28 | |
| Déchets pour la combustion | | 28 | |
| Combustion du charbon | | 21 | |
| Production de pigments | | | 21 |
| Placage au Cd | | | 19,7 |
| Production de batteries | | | 13 |
| Fumée de tabac | | | |
| En considérant 1-2 µg/cigarette (1 paquet/jour) | | 0,5 à 1 mg inhalé/an (0,1 à 0,2 µg inhalé/cigarette) | |

La demande en Cd n'a fait qu'augmenter de façon constante depuis le début du 20^{ième} siècle et plus particulièrement depuis 1930. Actuellement, sa consommation n'est limitée que par sa faible concentration dans les minerais de Zn cadmifères et par la production de Zn affiné (Lymburner, 1974). En 1982, on a estimé la production et la consommation de Cd au Canada à respectivement 890 et 34 tonnes (Gauvin, 1986). On utilise surtout le Cd en électroplastie car il protège très efficacement les métaux ou les alliages contre la corrosion. Il est également utilisé dans la fabrication d'alliages à bas point de fusion, les alliages de Cu à faible teneur en Cd et comme composant des baguettes de soudage ou de brasage. Au Canada, le Cd est aussi utilisé dans la fabrication

du savon de Cd, reconnu pour sa capacité à stabiliser les plastiques, le chlorure de polyvinyle et les pigments (Lymburner, 1974). La répartition des utilisations industrielles du Cd est illustrée à la figure 1.2.

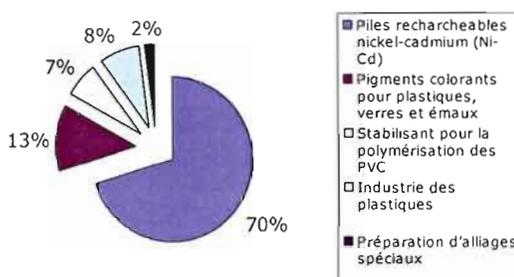


Figure 1.2 Utilisation industrielle du Cd

1.4 Contamination environnementale et exposition au Cd

La présence de Cd a été décelée dans la plupart des compartiments environnementaux au Canada incluant l'air, l'eau douce, l'eau salée, les sols, les sédiments et les organismes vivants. D'ailleurs, on a qualifié le Cd d'élément à utilisation dispersive en raison de son introduction sans retenue dans l'environnement (Fulkerson et Goeller, 1973). Peu de données sont disponibles sur l'évaluation et la caractérisation quantitatives des espèces de Cd présentes dans l'environnement. Cependant, on sait qu'une grande partie de celui-ci retrouvé chez les poissons et les mammifères ainsi que dans les aliments dérivés de ces animaux est associé à des molécules protéiques comme la métallothionéine (MT). À moins d'avis contraire, on peut considérer que les concentrations mesurées dans les différents milieux sont des concentrations exprimées en Cd total.

1.4.1 Chez les humains et les mammifères

Chez les humains, les aliments et la cigarette constituent la voie principale d'exposition au Cd (Lauwerys, 1978, Pinot *et al.*, 2000). Pour les mammifères, la nourriture, mais aussi l'eau, sont également les principales sources d'exposition au Cd.

On retrouve le Cd dans la viande, le poisson et les fruits à des concentrations variant entre 1 et 50 ppm (50 µg/g). Dans les aliments de base comme le riz, le blé et la pomme de terre, les concentrations varient de 10 à 150 ppm (Kjellström *et al.*, 1975, Lauwerys, 1978). On a observé les niveaux de Cd les plus élevés dans les organes internes de mammifères adultes (reins et foie) et dans certaines espèces de moules et d'huîtres. Les niveaux de Cd étant généralement inférieurs à 1 µg/L dans l'eau potable, celle-ci contribue peu à l'absorption de Cd par les êtres vivants. En général, la concentration moyenne de Cd retrouvée chez les humains varie entre 17 et 40 mg/kg (Elinder, 1985) et chez les mammifères, elle varie de 5 à 10 mg/kg (Eisler, 1985).

Mentionnons que l'inhalation est la voie d'absorption majeure pour les travailleurs en industries. Les concentrations aériennes totales de Cd varient selon le type d'industrie et les efforts effectués pour contrôler les émissions. Dans le passé, des concentrations variant de 100 à 10 000 µg/m³ ont déjà été mesurées. Les conditions de travail s'étant beaucoup améliorées, les concentrations ne dépassent généralement pas 20 µg/m³ (Adamsson, 1979).

Finalement, toutes ces données recueillies au fil du temps nous indiquent que le Cd est effectivement présent à plusieurs niveaux dans l'environnement. Ces données nous démontrent également que le Cd a rejoint plusieurs cycles géochimiques, affectant ainsi les systèmes biologiques de diverses façons. C'est pourquoi il est important de continuer à être rigoureux dans l'adoption de normes environnementales régulièrement en révision visant à protéger du mieux possible les être vivants susceptibles d'être contaminés par les métaux lourds dont le Cd.

1.5 Le Cd dans l'eau

La présence de Cd dans les milieux aquatiques est en partie attribuable à l'érosion des roches cadmifères mais surtout à l'activité humaine (Fleisher *et al.* 1974). La grande mobilité du Cd dans l'environnement lui permet d'accéder aux étendues d'eau douce où, selon l'acidité, il sera dissous ou adsorbé par les sédiments (Fleischer *et al.*, 1974, Pinot *et al.*, 2000). En eau douce non polluée, la concentration de Cd est généralement inférieure à 1 µg/L alors qu'en eau de mer les concentrations varient de 0,02 à 0,1 µg/L (Fleischer *et al.*, 1974, Friberg *et al.*, 1974, Pinot *et al.*, 2000). Les eaux polluées par les rejets d'usines métallurgiques, les ateliers d'électroplastie, de textile ou par les boues d'épuration

contiennent généralement des quantités supérieures aux $\mu\text{g/L}$. Puisque les écosystèmes aquatiques sont le réceptacle ultime de la contamination environnementale, ceux-ci subissent d'importants dommages lorsque les métaux lourds non-essentiels comme le Cd, le Hg ou le Pb entrent dans leur cycle naturel (Roesijadi et Robinson, 1994, Kennedy, 1995, Swiergosz-Kowalewska, 2001, Levesque *et al.*, 2002). Le tableau 1.4 résume les émissions anthropiques, industrielles et domestiques, de Cd et de Hg dans les écosystèmes aquatiques.

Tableau 1.4
Apports anthropiques de Cd et de Hg
dans les écosystèmes aquatiques (10^6 kg/an) (eau douce et eau de mer)
(adapté de Nriagu et Pacyna, 1988)

| <i>Catégorie</i> | <i>Cd</i> | <i>Hg</i> |
|----------------------------------|-----------|-----------|
| Eaux usée domestiques | 0,48-3 | 0-0,6 |
| Turbine électrique | 0,01-0,24 | 0-3,6 |
| Exploitation minière | 0-0,3 | 0-0,15 |
| Fonderie et raffinage | | |
| • Fer et acier | 0,01-3,6 | 0-0,04 |
| • Métaux non ferreux | | |
| Procédés manufacturiers | | |
| • Métaux | 0,5-1,8 | 0-0,75 |
| • Produits chimiques | 0,1-2,5 | 0,02-1,5 |
| • Pâtes et papiers | * | * |
| • Produits pétroliers | * | 0-0,02 |
| Retombées atmosphériques | 0,9-3,6 | 0,22-1,8 |
| Déversement de boues d'épuration | 0,08-1,3 | 0,01-0,31 |
| Apport total dans l'eau | 2,1-1,7 | 0,3-8,8 |
| Valeur moyenne | 9,4 | 4,6 |

La base de données nationale sur la qualité des eaux recèle les concentrations moyennes de Cd mesurées entre 1987 et 1991 dans les eaux de surface des provinces et des territoires canadiens. Au Québec, la concentration moyenne était de $0,3 \mu\text{g/L}$ ($< 0,1-10,8 \mu\text{g/L}$, $n=750$) alors que dans un territoire comme le Yukon elle était de $0,1 \mu\text{g/L}$ ($<$

0,1–1,3 µg/L, n=359) (NAQUADAT/ENVIRODAT, 1992). Par contre, cette analyse n'indique pas si les sites d'échantillonnage se trouvent à proximité de sources connues ou potentielles de Cd. Certaines données sont également disponibles pour plus de 70 lacs répartis à travers l'Ontario et échantillonnés entre 1980 et 1987. Les valeurs varient considérablement selon la proximité des sources potentielles de Cd. Près de Sudbury, une région minière reconnue pour ses activités de fonderies de métaux communs, la concentration moyenne de Cd était de 4,78 µg/L au Lac Wavy comparativement à 0,011 µg/L pour l'ensemble des lacs de la partie centrale du Bouclier canadien (n >100), ce qui nous indique que les concentrations élevées de Cd sont habituellement associées aux activités industrielles et/ou urbaines locales (Jackson, 1978, Smith, 1987).

Une étude effectuée en 1977 au Canada et concernant 71 réseaux d'alimentation en eau potable nous indique que les concentrations de Cd sont habituellement très faibles : ≤ 0,01 à 0,09 µg/L, la concentration moyenne globale étant de 0,03 µg/L (Méranger *et al.*, 1981a). Si l'on compare ces résultats à ceux obtenus dans une étude limitée aux réseaux d'alimentation en eau potable effectuée à proximité de fonderies, on observe des concentrations de Cd de 1 µg/L dans la moitié des échantillons traités et prélevés à Flin Flon au Manitoba de 1983 à 1987 (Bezák, 1991a). Puisque le Cd, sans fonction essentielle connue à ce jour, est toxique et qu'il est difficile de diminuer sa teneur dans les aliments, on juge qu'il faut diminuer autant que possible sa teneur dans l'eau potable. Plusieurs experts de la FAO et de l'OMS (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) estiment qu'un apport hebdomadaire total de 0,4 à 0,5 mg de Cd (pour une personne de 70 Kg) pourrait être admissible. Si l'on considère qu'une consommation journalière de 1,5 L d'eau contribue à environ 12% de l'apport total admissible, la concentration maximale acceptable de Cd dans l'eau potable est de 0,005 mg/L (Kjellstrom et Nordberg, 1978, Piscator, 1985).

Toutes ces données nous indiquent donc que le Cd atteint facilement les différentes étendues d'eau et que les concentrations retrouvées sont sujettes à de grandes variations selon les caractéristiques physico-chimiques du milieu, celles-ci pouvant modifier l'ampleur et la façon dont les divers écosystèmes sont touchés.

1.5.1 Spéciation du Cd en milieu aquatique

La spéciation des métaux lourds, et plus particulièrement du Cd en milieu aquatique, repose sur plusieurs facteurs physiques ou chimiques propres à l'environnement où il est retrouvé. La salinité, le pH, la dureté de l'eau, les éléments organiques dissous et le degré de sédimentation influencent la forme chimique qu'un métal va adopter (Roesijadi et Robinson, 1994). En effet, la capacité du Cd à former des complexes avec des molécules organiques ou inorganiques lui confère ses propriétés toxicologiques et influence sa disponibilité dans un milieu donné (Cherian, 1977, Cherian et Vostal, 1977, Roesijadi et Robinson, 1994, Elisma et Jumarie, 2001, Jumarie *et al.*, 2001). De plus, l'exposition effective d'un individu n'est pas seulement déterminée par la concentration totale du métal dans l'environnement car la spéciation, c'est-à-dire les différentes formes chimiques du métal et leur proportion relative, influence grandement la disponibilité du Cd dans le milieu de même que sa biodisponibilité (c.a.d fraction absorbée ou efficacité d'absorption *in vivo*) (Roesijadi et Robinson, 1994, Campbell, 1995). En toxicologie aquatique on se réfère souvent au modèle d'activité de l'ion libre émis par Morel (1983) qui prédit que la réponse physiologique suscitée par un métal dissous dans le milieu est directement proportionnelle à la concentration d'ion libre. D'ailleurs, plusieurs études ont démontré que lorsque l'on parle de métal dissous en milieu aquatique, c'est la forme ionique en solution (aussi appelée aqua-ion) qui a la plus grande biodisponibilité (Borgman, 1983, Brezonik *et al.*, 1991). Néanmoins, de nombreux autres résultats remettent en question ce dogme et le modèle de l'activité de l'ion libre est parfois contesté (Campbell, 1995).

En théorie, on devrait retrouver l'ion libre Cd^{2+} sous forme prédominante dans les phases dissoutes (Astruc, 1989) et on considère qu'il s'agit de la forme la plus biodisponible du métal. Cependant, en milieu naturel, certains facteurs physiques et/ou chimiques peuvent avoir une influence sur la forme et le sort du Cd et ainsi sur sa biodisponibilité. Par exemple, des études ont démontré que les concentrations de Cd dissous sont généralement plus élevées dans des lacs acides ayant un pH de 5,0 à 6,5 que dans les lacs à pH neutre (Steinnes, 1990). Ainsi l'acidité des lacs et rivières favorise la solubilisation du Cd; la forme solubilisée majeure étant toutefois l'aqua-ion.

Le comportement et la biodisponibilité du Cd sont donc directement liés à sa solubilité dans l'eau. Les effets marqués de la dureté de l'eau (CaCO_3) sur la spéciation

du Cd et sur sa toxicité sont bien connus (Sorensen, 1991). Des études ont démontré que les concentrations de Cd aqueux diminuent de 10% sur une période de 96 h en eau dure mais demeurent stables en eau douce (Sorensen, 1991). Une diminution de la dureté de l'eau et d'oxygène dissous ainsi qu'une diminution du pH provoque une baisse de la LC_{50} (concentration d'exposition létale pour 50% de la population) chez certaines espèces sensibles de poisson. Ainsi, la toxicité du Cd est plus marquée en eau douce qu'en eau dure.

En eau douce, à pH donné, la spéciation du Cd est largement influencée par la concentration d'ions chlorure dans le milieu environnant (Alabaster et Lloyd, 1981, Roesijadi et Robinson, 1994). La diffusion de chlorocomplexes $CdCl_2$ neutre à travers la membrane plasmique dépasse celle des ions Cd^{2+} . Ainsi, même en absence de ligand organique, la forme ionique ne peut être perçue comme étant l'unique forme biologique d'importance du Cd. Toutefois, en se basant sur des observations empiriques faites *in vivo*, on considère généralement les effets du Cd^{2+} comme étant plus significatifs biologiquement que ceux du $CdCl_2$ (Roesijadi et Robinson, 1994). Afin de mieux saisir l'importance de la spéciation du Cd pour ses effets toxiques, les conséquences de cette même spéciation sur la biodisponibilité du Cd doivent être mieux comprises.

Ainsi, on peut comprendre l'importance de travailler en conditions d'exposition définie où chaque composant du milieu, ainsi que leur concentration, est connu. La connaissance des constantes de complexation avec chacun des ligands présents, inorganique ou organique, nous permet alors le contrôle rigoureux de la spéciation, critère indispensable pour l'analyse des résultats en fonction de la spéciation.

Au cours de leurs recherches visant à estimer l'impact de la spéciation sur l'accumulation cellulaire de Cd inorganique, Elisma et Jumarie (2001) ont mis à profit le fait que le nitrate (NO_3^-) complexe très peu le Cd comparativement au chlorure (Cl^-) (Tableau 1.5).

Tableau 1.5
Spéciation du Cd
en milieu nitrate et en milieu chlorure (pH 7.5)
(adapté de Elisma et Jumarie, 2001)

| CHLORIDE | | NITRATE | |
|--------------------------------|----------------|---------------------------------|----------------|
| <i>Species</i> | <i>% Total</i> | <i>Species</i> | <i>% Total</i> |
| Cd ²⁺ | 14 | Cd ²⁺ | 80,4 |
| CdCl ⁺ | 61,3 | CdNO ₃ ⁺ | 11,7 |
| CdCl ₂ | 20,7 | CdHCO ₃ ⁺ | 5,3 |
| CdCl ₃ ⁻ | 1.9 | CdSO ₄ | 1,7 |

C'est donc le milieu nitrate qui favorise la plus grande proportion de Cd total dissous présent sous forme cationique libre. L'utilisation parallèle de milieux chlorure et nitrate permet ainsi d'observer si la forme cationique est mieux accumulée dans les cellules.

Dans une autre étude on discute de l'importance des chlorocomplexes dans l'accumulation du Cd dans les cellules intestinales de la lignée Caco-2 (Jumarie *et al.*, 2001). Cette étude révèle que l'accumulation de Cd dans ces cellules augmente avec des concentrations croissantes de chlorocomplexes CdCl_n²⁻ⁿ, alors que celle de Cd²⁺ est maintenue fixe. Ainsi, le modèle d'activité de l'ion libre de Morel (1983) peut être remis en question. Cependant, Jumarie et son équipe (2001) ont démontré qu'en conditions de transport non saturantes, le transport à court terme du Cd²⁺ augmente de façon linéaire avec une constante de proportionnalité de 30,9 ± 0,3 pmol/3min/mg protéine. Malgré le fait que les chlorocomplexes CdCl_n²⁻ⁿ soient transportés à peu près 2.5 fois plus lentement que l'ion libre (Jumarie *et al.*, 2001), ils contribuent à l'accumulation cellulaire de Cd. Ainsi, le transport de Cd ne peut être seulement attribué à la présence de l'ion libre Cd²⁺. Nous pouvons donc conclure qu'il est d'importance capitale de tenir compte de la spéciation des métaux dans l'évaluation de leur biodisponibilité tout autant que de leur toxicité.

1.5.2 Cd et organismes aquatiques

Comme la plupart des polluants terrestres, le Cd rejoint généralement les lacs, les rivières et les océans de la planète. Dans le passé, les études portant sur les effets du Cd

sur la faune aquatique se sont surtout limitées à la mortalité causée par des concentrations élevées de Cd (Freeman et Idler, 1975) alors qu'il est important d'observer les effets de concentrations sublétales susceptibles de produire des effets chroniques chez les animaux. Les effets sublétaux accompagnent souvent des changements de comportements, altèrent divers organes internes ou causent des troubles biochimiques et physiologiques (Sangalang et O'Halloran, 1972, Ricard *et al.*, 1998). Ainsi, il est important de mieux pouvoir caractériser ces effets puisqu'ils sont plus difficiles à observer.

Les concentrations de Cd dans l'eau qui sont létales pour les poissons sont généralement de 10 à 10 000 $\mu\text{g/L}$ selon l'animal étudié, le temps d'exposition, la présence et la concentration d'autres métaux dans le milieu, la température, la salinité, la spéciation du Cd dans le milieu, le pH, la dureté de l'eau ou la présence de composés et organismes jouant un rôle essentiel dans l'équilibre de l'écosystème aquatique (McKee et Wolf, 1963). De plus, l'absorption du Cd par les organismes aquatiques est un phénomène d'une très grande complexité puisqu'ils sont également tributaires de tous les facteurs susmentionnés. Ainsi, les diverses études portant sur l'accumulation de Cd chez les organismes aquatiques diffèrent énormément entre elles et peuvent parfois nous apparaître contradictoires. Effectivement, certaines nous rapportent une accumulation au niveau du foie, des reins et des organes internes (Hardisty *et al.*, 1974, Brooks et Rumsby, 1976, Norey *et al.*, 1990, Hollis *et al.*, 2001) tandis que d'autres ne peuvent confirmer une accumulation de Cd supérieure à celle habituellement retrouvée chez les organismes aquatiques ne vivant pas en eaux contaminées (Portman, 1972, Eustace, 1974, Brown *et al.*, 1986, Harrison et Klaverkamp, 1989). D'autres études révèlent des concentrations de Cd moyennes chez les poissons marins variant entre 0.05 et 0.15 $\mu\text{g/g}$ et de 0.02 à 0.1 $\mu\text{g/g}$ chez les espèces vivant en eau douce (Lovett *et al.*, 1972). Il se pourrait donc que les données varient selon la nature du milieu aquatique. Cependant ces concentrations peuvent augmenter de façon drastique et jusqu'à 0.75 $\mu\text{g/g}$ pour les poissons vivant dans des lacs pollués au Cd (Murphy *et al.*, 1978). Finalement, toutes les données recueillies jusqu'à maintenant ne semblent pas conférer un statut d'oligo-élément essentiel au Cd chez les organismes aquatiques. Ceci nous permet d'affirmer que le Cd est un contaminant environnemental puisque les espèces exposées présentent toutes une charge tissulaire plus ou moins élevée, selon le degré d'exposition et que cette charge contribue largement, selon sa concentration, à altérer diverses fonctions physiologiques chez le poisson.

1.5.3 Méthallothionéines

Les MT appartiennent à une famille de protéines de faible masse moléculaire (comprise entre 6 et 7 kDa) avec un contenu élevé en cystéine et une capacité à lier sélectivement divers métaux lourds. Ces protéines de liaison sont impliquées dans les processus de détoxification des métaux et leur induction peut être déclenchée par la présence d'ions métalliques, les endotoxines, les radiations UV, les cytokines, le stress oxydatif (Gedamu et Zarafullah, 1993, Olsson 1993, Roesijadi et Robinson, 1994, Haïdara *et al.*, 1999,). De plus, elles jouent un rôle dans l'homéostasie des métaux essentiels tels que le Zn et le Cu. Une induction de l'expression des gènes de la MT est directement corrélée à une augmentation des concentrations intracellulaires de métaux (Olsson, 1993). La MT a été caractérisée *in vitro* et *in vivo* et il y a beaucoup de spéculation quant à ses fonctions biologiques. Lors de sa découverte par Margoshes et Vallee dans le cortex rénal du cheval en 1957, la MT a d'abord été associée au Zn et au Cd (Margoshes et Vallee, 1957). Des études ultérieures ont démontré le rôle protecteur de la MT contre les effets toxiques du Cd (Jin *et al.*, 1996, Laflamme *et al.*, 2000, Bobillier-Chaumont *et al.*, 2005, Jiang *et al.*, 2005).

En milieu aquatique, les animaux font face à plusieurs stress environnementaux dont l'exposition aux métaux lourds. Chez les poissons, on a identifié la présence de MT dans l'intestin, le foie et les branchies, des tissus d'importance pour l'accumulation, l'entreposage et l'excrétion des métaux. Dans ces mêmes tissus, la capacité d'induction de MT est aussi plus élevée (Norey, 1990, Dang *et al.*, 2000, Laflamme *et al.*, 2000). À partir de lignées épithéliale (RTH-149) et fibroblastique (RTG-2) établies chez la truite arc-en-ciel (Gedamu et Zarafullah, 1993, Olsson, 1993), on a pu déterminer que le génome de cette espèce possède deux gènes codant la tMTa et la tMTb et que ces gènes sont induits en présence d'ions métalliques (Olsson, 1993). En utilisant une approche génétique biomoléculaire, il est possible de déterminer que ces gènes sont principalement régulés au niveau transcriptionnel et que leur promoteur respectif contient des éléments actifs en position *cis* permettant la transmission du signal (Gedamu et Zarafullah, 1993, Langston et Bebianno, 1998). De plus, ces recherches suggèrent que la fonction primaire des MT est étroitement associée à la régulation du pool intracellulaire d'ions métalliques. Ce système de régulation protège la cellule contre des taux élevés et possiblement toxiques de métaux essentiels tels que le Zn ou le Cu mais la MT séquestre aussi les

métaux toxiques tel le Cd et prévient ses interactions avec les thiols fonctionnels de la cellule (Olsson, 1993).

On a observé une accumulation importante de Cd lié à la MT dans le foie de poissons exposés dans l'environnement (Olsson, 1993, Kendall *et al.*, 2001). En 1999, une étude menée sur la perchaude dans six lacs de la région minière de l'Abitibi a démontré des concentrations croissantes de MT interrénale et hépatique parallèles au gradient de contamination des lacs (Laflamme *et al.*, 2000). De plus, une corrélation a été établie entre la concentration de MT et la concentration de métaux totaux dans les tissus interrénal et hépatique (Laflamme *et al.*, 2000). Ainsi, ces recherches démontrent qu'une exposition chronique *in vivo* aux métaux comme le Cd, le Cu et le Zn provoque l'augmentation des niveaux de MT chez la perchaude (Laflamme *et al.*, 2000).

Dang et son équipe (2001) ont étudié les effets d'une diète contaminée au Cd sur l'expression génique de la MT dans les branchies chez le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*). Ces recherches ont permis d'observer une augmentation marquée de l'expression génique de la MT dans les cellules à chlorure des branchies chez les poissons exposés oralement à une forte dose de Cd (125 mg Cd/kg). Elles permettent de conclure que le Cd distribué aux branchies s'y accumule dans les cellules à chlorure et stimule l'expression de la MT. Ainsi, l'induction de la MT chez les poissons pourrait servir d'indicateur cellulaire ou de biomarqueur d'exposition aux métaux.

Des études portant sur les rats diabétiques ont démontré une synthèse accrue de MT en réponse à une élévation des taux de glucagon ou de glucocorticoïdes (Jin *et al.*, 1996). Chez les poissons, on a également observé une corrélation entre l'élévation des niveaux de cortisol et celle des concentrations intracellulaires de MT dans les cellules stéroïdogéniques (Olsson, 1993). Cependant, nous savons que des poissons exposés de façon chronique aux polluants environnementaux ont souvent une incapacité à générer une réponse hormonale normale face au stress. Ainsi, nous supposons que lorsque la production de cortisol est compromise, l'induction de la MT peut également l'être.

En conclusion, la régulation de la MT chez la truite arc-en-ciel est un processus relativement complexe. De plus, certains tissus répondent plus spécifiquement que d'autres aux inducteurs de synthèse de MT: cette capacité d'induction apparaît comme étant inversement corrélée à la sensibilité des organes cibles (Gedam et Zarafullah, 1993,

Olsson, 1993). Finalement, puisque l'organisme est en quelque sorte protégé de façon temporaire contre la toxicité des métaux par leur liaison à la MT, une plus grande charge métallique peut être tolérée par l'individu suite à l'induction de la MT (Roesijadi et Robinson, 1994).

CHAPITRE II:

TOXICOLOGIE ENDOCRINIENNE CHEZ LE POISSON

2.1 Introduction

Le système endocrinien joue le rôle d'un système de communication complexe maintenant l'équilibre entre un grand nombre de systèmes physiologiques. Il est responsable de la modulation ou de la régulation de l'activité de presque tous les systèmes de l'organisme en fonction de divers facteurs tels que les fluctuations de température corporelle, les niveaux d'activité ou de stress, les taux d'éléments nutritifs et d'hormones en circulation nécessaires à la croissance, la reproduction et le métabolisme. Ainsi, tout composé chimique exogène, aussi inoffensif soit-il, peut perturber l'équilibre physiologique en agissant, soit directement sur les récepteurs hormonaux, soit indirectement par le biais de changements provoqués dans d'autres systèmes (Kavlock *et al.*, 1996, WHO, 2002).

Dans les dix dernières années, des expressions comme "perturbateur endocrinien" ou "modulateur endocrinien" sont entrées dans le vocabulaire populaire et scientifique pour décrire des substances chimiques exogènes qui altèrent une ou plusieurs fonctions du système endocrinien et qui, par définition, ont des effets nocifs sur la santé d'un organisme, de ses descendants ou de sous populations (EDSTAC, 1998, Kavlock, 1999). Les perturbateurs endocriniens peuvent donc agir de diverses manières sur les différentes parties du corps. Ils peuvent entre autre : réduire la production d'hormones dans les glandes endocrines, influencer sur l'émission d'hormones par les glandes endocrines, simuler ou bloquer l'action des hormones dans les tissus-cibles, ou accélérer le métabolisme des hormones et réduire ainsi leur champ d'action.

Cependant, pour que la définition de perturbateur endocrinien soit pertinente, elle doit nous permettre de faire une distinction entre les composés chimiques qui modifient

les fonctions hormonales et ceux qui n'ont pas d'effet. Cette définition est donc basée sur deux notions essentielles, à savoir : la modification de l'homéostasie endocrinienne et l'induction d'un effet nocif sur la santé. Plusieurs études ont démontré que le Cd, même à des doses infinitésimales perturbe significativement la communication cellulaire tant hormonale qu'immunitaire, ce qui caractérise un perturbateur endocrinien (Le Guével *et al.*, 2000, Lacroix et Hontela, 2004, Vétillard et Bailhache, 2005).

Les animaux aquatiques sont particulièrement touchés par les perturbateurs endocriniens, surtout les carnivores qui sont au haut de la chaîne alimentaire où s'accumulent à la longue des concentrations élevées de substances persistantes. Chez les poissons, on observe des effets néfastes sur la reproduction et le développement. Ces effets semblent être dus en partie à la présence d'oestrogènes déversés dans les rivières par les installations d'épuration des eaux usées ou de métaux lourds comme le Cd, le Hg ou le Pb dont l'apport par l'atmosphère peut être important, surtout dans les régions minières.

2.2 *Le cortisol*

En toxicologie, on cherche à mieux identifier les effets indésirables des xénobiotiques au niveau d'un organe ou d'un tissu donné et les principaux objectifs de recherche se résument souvent à mieux comprendre pourquoi l'organe-cible est atteint (Colby et Longhurst, 1992, Harvey, 1996, Capen, 2001). Des changements au niveau du statut hormonal peuvent causer des perturbations physiologiques importantes et bien que plusieurs études portent sur les effets délétères du Cd sur la fonction endocrinienne chez le poisson, on ne saisit pas encore clairement les mécanismes d'action responsables des effets observés (Hontela, 1997, Hontela, 1998, Brodeur *et al.*, 1998, Ricard *et al.*, 1998). De plus, il y a très peu d'information sur l'axe hypothalamo-hypophyso-interrénal chez le poisson (Ricard *et al.*, 1998) et encore moins sur les effets du Cd sur ce système endocrinien. Chez le mammifère, l'axe cortico-adréno-hypophysaire est bien connu et on s'en sert souvent comme modèle de référence pour l'analyse de résultats obtenus chez le poisson (Roesijadi et Robinson, 1994).

Le cortisol est synthétisé dans les cellules du tissu interrénal (pronéphros) situé en apex du rein chez les téléostéens et joue un rôle physiologique majeur dans la réponse au stress (Sorensen, 1991, Hontela, 1997, Weedelaar Bonga, 1997, Levesque *et al.*, 2003).

La régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes est soumise à un mécanisme d'inhibition rétroactive typique. Ainsi, la libération du cortisol est déclenchée par la corticotrophine (ACTH), laquelle est sécrétée sous l'effet de la corticolibérine hypothalamique (CRF). Tout stress aigu perturbe le rythme normal de sécrétion de cortisol car le système nerveux prend le pas sur les effets inhibiteurs du taux élevé de cortisol et provoque la libération accrue de CRF. Ainsi, l'élévation du taux d'ACTH subséquente cause un déversement de cortisol par la corticosurrénale (Colby et Longhurst, 1992, Harvey, 1996, Silverthorn, 1998, Capen, 2001). Des études récentes menées chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) ont démontré qu'une exposition aiguë à des niveaux sublétaux de Cd altère les niveaux de cortisol plasmatique, les hormones thyroïdiennes et le taux de glycogène hépatique (Hontela *et al.*, 1995, Hontela *et al.*, 1996, O'Norris *et al.*, 1997, Leblond et Hontela, 1999, O'Norris *et al.*, 1999). Par contre, les conséquences d'une fonction endocrinienne perturbée suite à une exposition chronique au Cd sur le métabolisme glucidique et sur la croissance n'ont pas encore été établies (Ricard *et al.*, 1998).

2.2.1 Fonctions physiologiques

Les glucocorticostéroïdes ont des effets métaboliques importants permettant aux animaux, au cours d'une exposition au stress, d'augmenter leur taux de glucose plasmatique nécessaire à l'activation des mécanismes homéostatiques de défense. De plus, ils stimulent la néoglucogénèse, c'est-à-dire la formation de glucose à partir de molécules non-glucidiques comme les acides aminés des protéines et le glycérol des triglycérides, et agissent sur la lipolyse en mobilisant les acides gras du tissu adipeux et en favorisant leur utilisation à des fins énergétiques. Ainsi, le glucose est réservé au système nerveux. Le cortisol provoque également la dégradation des protéines emmagasinées qui sont par la suite affectées à la réparation ou à la fabrication d'enzymes destinées aux processus métaboliques. Finalement, le cortisol intensifie les effets vasoconstricteurs de l'adrénaline ce qui a pour effet une augmentation de la pression artérielle et de l'efficacité circulatoire assurant ainsi aux cellules un apport rapide de nutriments et d'oxygène (Silverthorn, 1998).

Chez le mammifère, des taux excessivement élevés de glucocorticoïdes ralentissent la formation des os et du cartilage, inhibent la réaction inflammatoire en stabilisant les membranes lysosomiales et, en empêchant la vasodilatation, freinent l'activité du système

immunitaire et modifient le fonctionnement des systèmes cardiovasculaire, nerveux et digestif (Silverthorn, 1998).

Des études *in vitro* ont démontré que les cellules corticosurrénales de téléostéens convertissent de façon préférentielle la prégnénolone en cortisol et lorsque la progestérone est présente à titre de précurseur, celle-ci est convertie majoritairement en corticostérone (O’Norris, 1996, Hontela, 1998). *In vivo*, c’est le cortisol qui est produit de façon majoritaire. Les fluctuations journalières et saisonnières de la photopériode et de la température jouent également un rôle important dans les patrons de sécrétion des corticostéroïdes chez les téléostéens (Hontela, 1998). L’activité corticosurrénale atteint un pic saisonnier correspondant grossièrement aux périodes intenses de reproduction. De façon générale chez les téléostéens, les corticostéroïdes, et plus particulièrement le cortisol, stimulent le transport de sodium à travers les branchies, la muqueuse intestinale et le rein. De plus, le cortisol contribue au maintien de la balance lipides/glucides, de la gluconéogenèse et au métabolisme de protéines (O’Norris, 1996). Certaines études suggèrent que le stress, dont le stress de reproduction, est le déterminant critique dans la stimulation de la fonction corticosurrénale. Il est important de noter que la réponse au stress chez les non-mammifères est fort semblable à celle observée chez les mammifères.

2.2.2 *Axe hypothalamo-hypophyso-surrénal chez le mammifère*

Chez les organismes multicellulaires, les fonctions de différents groupes cellulaires spécialisés ou organes doivent être intégrées et coordonnées de façon ingénieuse afin de répondre à une stimulation venant de l’environnement extérieur. Chez les mammifères, une étroite collaboration existe entre les systèmes nerveux et endocrinien. Le système nerveux règle l’homéostasie (et l’adaptation de l’organisme à son environnement) par l’intermédiaire d’influx nerveux ou potentiels d’action transmis le long des axones neuronales et ces influx déclenchent à leur tour la libération de molécules de neurotransmetteurs. Par contraste, le système endocrinien libère ses molécules messagères (hormones) directement dans la circulation sanguine (Capen 2001). En étroite collaboration avec les centres végétatifs du cerveau et le système nerveux autonome, le système endocrinien contrôle la nutrition, le métabolisme, la croissance, la reproduction, l’adaptation à l’effort et l’équilibre du milieu intérieur ou homéostasie (Harvey 1996, Silverthorn 1998, Capen 2001). La plupart de ces fonctions sont soumises au contrôle central de l’hypothalamus. Dans l’hypothalamus, les stimulations nerveuses sont

transformées en stimulations hormonales. Les cellules spécialisées de l'hypothalamus (neuro-endocriniennes) produisent des hormones qui sont libérées dans le sang à la suite d'une stimulation. Ces hormones sont généralement relayées à l'hypophyse qui sert d'intermédiaire entre la glande-cible (rein, thyroïde, ovaire, testicule, corticosurrénale, médullosurrénale, pancréas) et l'hypothalamus. Les surrénales se divisent en médullosurrénales et corticosurrénales. La médullosurrénale occupe une position intermédiaire par rapport à l'hypothalamus. Effectivement, elle est responsable de la sécrétion de l'adrénaline et de la noradrénaline qui circulent dans le sang même si celles-ci sont aussi des neurotransmetteurs sécrétés par les neurones. La corticosurrénale est responsable de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes. Les minéralocorticoïdes, soit la corticostérone et l'aldostérone sont synthétisés dans la zone glomérulée et les glucocorticoïdes, soit le cortisol ou la cortisone, dans la zone fasciculée (Colby et Longhurst 1992, Silverthorn 1998). Contrairement aux poissons, les mammifères possèdent deux glandes surrénales, chacune étant située en apex des reins.

Chez les mammifères comme chez les poissons, la CRF et l'ACTH sont responsables de la régulation de la libération des glucocorticoïdes dans l'organisme. La sécrétion de l'ACTH se trouve d'une part régulée par le cortisol (boucle de rétroaction négative faisant intervenir la CRF) et d'autre part, augmentée par les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) de la médullosurrénale. Des récepteurs protéiques aux glucocorticoïdes se retrouvent dans plusieurs tissus de l'organisme tels que les muscles squelettiques et lisses, le muscle cardiaque, le cerveau, l'estomac, les reins, le foie, les poumons et les tissus lymphatiques et adipeux. Lorsque le premier messager, soit l'ACTH se lie à son récepteur membranaire, le mélanocortine 2 (MC2), cela provoque une cascade d'événements à l'intérieur de la cellule. La liaison de l'ACTH au MC2 active la protéine G qui à son tour active l'adénylate cyclase (AC) ou le complexe phospholipase-PIP qui provoquera des réactions différentes dans les cellules-cibles. Lorsque la protéine G se lie au complexe phospholipase-PIP celui-ci est scindé en diacylglycérol et en inositol triphosphate (IP_3) tel qu'illustré à la figure 2.1. Les molécules de diacylglycérol et d' IP_3 servent de seconds messagers : le diacylglycérol, en collaboration avec le Ca^{2+} intracellulaire, active des protéines kinases (comme la protéine kinase C (PKC)) tandis que l' IP_3 agit sur les canaux calciques du réticulum endoplasmique (RE) et d'autres sites de stockage intracellulaires qui libèrent des ions

calciques. Le Ca^{2+} agit ensuite à titre de troisième messager en modifiant l'activité de certaines enzymes dépendantes du complexe Ca-calmoduline actif.

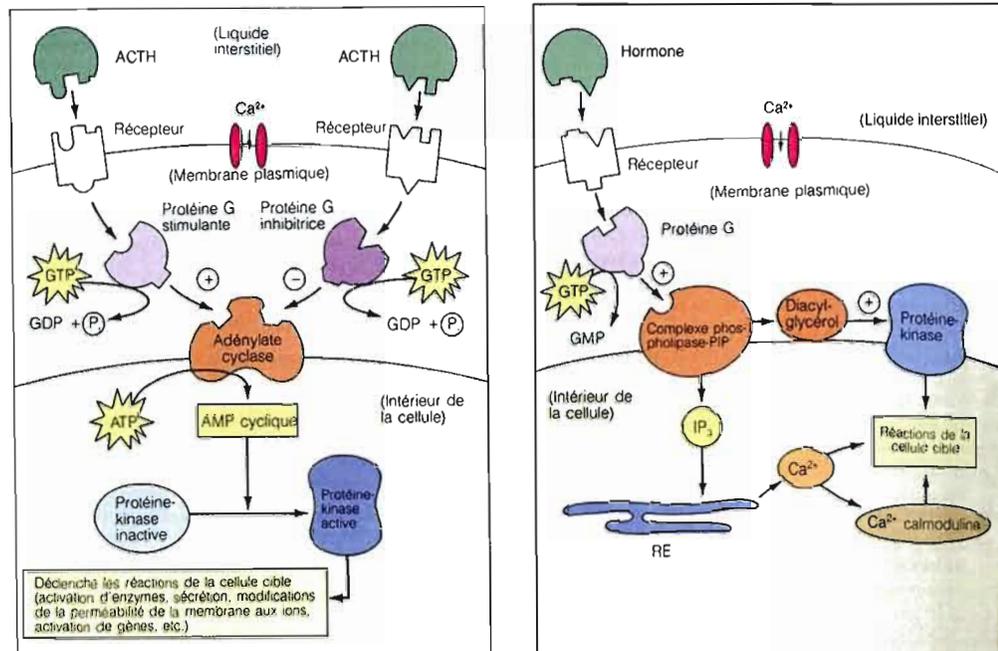


Figure 2.1 Seconds messagers des voies de signalisation associées aux protéines G (inspirée de Marieb et Laurendeau 1993).

Lorsque l'ACTH, par le biais de la protéine G, active l'AC, on observe une augmentation de la concentration intracellulaire du second messager, l'adénosine monophosphate (AMPc) et l'activation de la protéine kinase A (PKA) (Gallo-Payet et Payet, 2003). Dans les cellules de mammifères, la production et l'accumulation d'AMPc dans le milieu intracellulaire sont gérées par un équilibre entre l'activation et l'inactivation de l'AC respectivement par la protéine G et la protéine G_i . On considère l'AMPc comme étant le second messager principal des voies de signalisation enclenchées par la liaison de l'ACTH à son récepteur.

Par contre, plusieurs études démontrent que les mécanismes d'action de l'ACTH nécessitent à la fois l'implication de l'AMPc et du Ca^{2+} , tous deux étant en étroite interaction dans une boucle de rétroaction positive visant à stimuler la sécrétion stéroïdienne (incluant le cortisol) (Davies *et al.*, 1985, Laird *et al.*, 1991, Kondo, 2000, Gallo-Payet et Payet, 2003). De plus, il a été démontré que de faibles concentrations d'ACTH peuvent stimuler la sécrétion stéroïdienne et l'influx calcique sans qu'il n'y ait

toutefois de changements majeurs dans la production d'AMPc (Fukuda *et al.*, 1988). C'est pour cette raison que l'on peut considérer le Ca^{2+} comme étant également un second messenger de l'ACTH. Il est important de noter que les effets du Ca^{2+} dans la zone glomérulée sont différents de ceux observés dans la zone fasciculée du rein. Dans les cellules de mammifères, l'influx calcique est essentiel à la sécrétion d'aldostérone et de corticostérone dans la zone glomérulée (ZG) mais ne l'est pas nécessairement pour la sécrétion de cortisol dans la zone fasciculée (ZF) (Gallo-Payet et Payet, 2003). Kojima et son équipe (1985) ont démontré qu'à lui seul, le Ca^{2+} peut stimuler la sécrétion stéroïdienne et lorsqu'on le couple à la forskoline activant l'AC, l'action de l'ACTH est reproduite. Ceci renforce l'hypothèse stipulant que le Ca^{2+} est peut-être le second messenger principal. Cependant, on réfute cette hypothèse en argumentant que si le Ca^{2+} était le second messenger principal menant à la sécrétion stéroïdienne, sa concentration devrait augmenter rapidement à l'intérieur de la cellule, ce qui n'est pas le cas. De plus, des études récentes ont révélé la présence de deux isoformes d'adénylates cyclases (types 5 et 6) étant toutes deux insensibles au Ca^{2+} (Gallo-Payet et Payet, 2003).

Malgré ces observations en apparence contradictoires, les chercheurs s'entendent sur le rôle essentiel du Ca^{2+} dans la fonction endocrinienne de la cellule stéroïdogénique. Afin d'éclaircir ce rôle, il est important de comprendre la régulation de l'influx calcique. Plusieurs équipes ont démontré, en utilisant des cellules bovines provenant de la ZG et la ZF, que l'augmentation des niveaux de Ca intracellulaire induite par l'ACTH est un processus très lent et dépendant d'un influx calcique extracellulaire. Ce processus suit de près la production et l'accumulation d'AMPc à l'intérieur de la cellule. De plus, il semblerait qu'une étape de phosphorylation et d'activation de la PKA soit nécessaire à l'influx calcique (Gallo-Payet et Payet, 2003). La source calcique impliquée dans le mécanisme d'action de l'ACTH provient du milieu extracellulaire. Plusieurs études ont démontré qu'une modulation de l'activité des canaux ioniques joue un rôle essentiel dans la stimulation de l'activité sécrétrice des cellules adrénocorticales. L'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes de canaux calciques tels que le verapamil ou la nicardipine a permis d'identifier deux types distincts de canaux, L et T, dans les cellules adrénocorticales. Ces deux types de canaux se distinguent principalement par leur sensibilité au voltage, leur cinétique d'activation et d'inactivation, ainsi que leur sensibilité aux agents pharmacologiques (Enyeart *et al.*, 1993, Gallo-Payet et Payet, 2003). Le type T est caractérisé par un courant voltage-dépendant transitoire à faible

seuil. Le type L est caractérisé par un courant voltage-dépendant continu à haut seuil. Les deux types de canaux ont été identifiés dans les cellules stéroïdogéniques de rat, de bovin et d'humain. La mibefradil, un bloqueur spécifique de canaux calciques de type T inhibe la sécrétion de cortisol induite par l'ACTH dans les cellules de la ZF. Ceci vient renforcer l'idée d'une contribution de ces canaux à la sécrétion stéroïdienne (Enyeart *et al.*, 1993).

Ainsi, on peut conclure que dans les cellules stéroïdogéniques de mammifères, l'action de l'ACTH médiée par l'AMPc et le Ca^{2+} est essentielle à la sécrétion stéroïdienne et plus particulièrement à celle du cortisol. Même si l'AMPc demeure le second messenger essentiel de l'ACTH et que la PKA est la protéine kinase principalement stimulée, le Ca^{2+} occupe quand même un rôle important dans la régulation de la sécrétion de cortisol.

2.2.3 *Axe hypothalamo-hypophyso-interrénal chez le poisson*

Lorsque l'on compare cytologiquement les cellules corticosurrénales des vertébrés non-mammifères à celles des vertébrés mammifères, on constate que celles-ci sont relativement semblables aux cellules stéroïdogéniques de la *zona fasciculata* observées chez ces derniers. Suite à un stress environnemental *in vivo* ou à une stimulation *in vitro* à l'ACTH, on peut observer dans ces cellules une augmentation de la basophilie, de l'activité de la 3β -hydroxy- Δ^5 -stéroïde déhydrogénase (3β -HSD) et une diminution du contenu lipidique (O'Norris, 1996). De façon générale, les cellules corticosurrénales ichtyennes diffèrent principalement de celles des mammifères par leur patron de corticostéroïdogénèse et plus particulièrement en ce qui a trait aux hormones qui sont générées. Par contre, il est important de noter que les seconds messagers et enzymes impliqués menant à la corticostéroïdogénèse sont les mêmes chez tous les vertébrés sauf peut-être chez les poissons chez qui ce mécanisme est relativement peu connu.

Chez les poissons téléostéens, les cellules corticosurrénales sont fixées dans la partie la plus antérieure du rein, le pronéphros. Le pronéphros a perdu sa fonction rénale et est constitué principalement de tissu lymphoïde, de tubules pronéphriques non-fonctionnels et de petits îlots des cellules corticosurrénales (O'Norris, 1996). Ainsi, à cause de la nature diffuse du pronéphros chez les téléostéens, il est impossible de faire le prélèvement seul de cellules corticosurrénales par chirurgie. Le pronéphros est responsable de la sécrétion de cortisol, le corticostéroïde majeur chez les téléostéens, de la corticostérone,

de l'aldostérone et autres corticostéroïdes présents en quantités infimes (Hendersen *et al.*, 1985, Hontela, 1998, Hutchinson et Pickford, 2002, Lacroix et Hontela, 2003). *In vivo*, suite à un stress environnemental, la production de cortisol chez les téléostéens est régie principalement par une stimulation à l'ACTH tel que représenté à la figure 2.2.

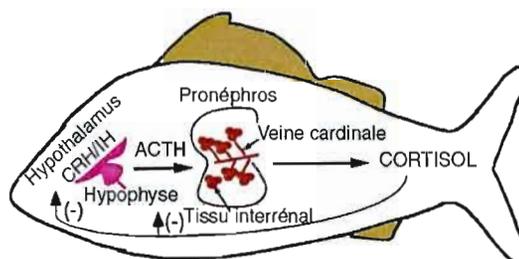


Figure 2.2 Axe hypothalamo-hypophysaire-interrénal chez le poisson (Hontela, 1998).

L'activité des cellules corticotrophes dans l'hypothalamus est gérée par la CRF et d'autres peptides hypophysaires (Wendelaar Bonga, 1993, Wendelaar Bonga, 1997, Hontela, 1997, Hontela, 1998). Cependant, la voie de signalisation et les messagers intracellulaires régulant la sécrétion cortisolique chez le poisson demeurent encore méconnus. Des études portant sur le contrôle de la synthèse du cortisol par l'ACTH chez le saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*) ont démontré l'importance de l'AMPc à titre de second messager intracellulaire (Patino *et al.*, 1986). De plus, on a démontré que le dibutyryl-AMPc (dbcAMPc), un analogue synthétique de l'AMPc, stimule la sécrétion de cortisol de façon dose-dépendante et ce, indépendamment de l'ACTH dans le tissu interrénal de la truite arc-en-ciel (Leblond *et al.*, 2001). Tel que discuté plus tôt, chez les mammifères, on s'entend pour dire que la voie principale menant à la synthèse de corticostéroïdes dans les cellules adrénocorticales implique la liaison de l'ACTH à son récepteur membranaire et la cascade subséquente de réactions intracellulaires intégrant la protéine G, l'AC, l'AMPc et la protéine kinase A (PKA). D'autres voies, telles que celle impliquant la PKC, stimulées par l'angiotensine II (AII) ou l'acétylcholine peuvent également générer la sécrétion de cortisol chez le poisson et ont un rôle dans la régulation de la synthèse des corticostéroïdes (Lacroix et Hontela, 2001).

Dans leur étude, Lacroix et Hontela (2001) ont caractérisé le rôle de la PKA et de la PKC dans la production aiguë de cortisol chez la truite arc-en-ciel en utilisant un

inhibiteur spécifique de la PKA et un activateur de la PKC. Ils ont également identifié les étapes de la signalisation cellulaire gérées par ces deux kinases. Leurs résultats démontrent que la PKA est un stimulateur important, pour ne pas dire crucial de la voie de signalisation de l'ACTH. Effectivement, l'inhibiteur de PKA (le H-89) diminuait de façon dose-dépendante la production de cortisol, confirmant ainsi l'implication de la PKA dans la voie de signalisation de l'ACTH. D'autre part, la voie de signalisation liée à la PKC, largement étudiée chez le mammifère et discutée plus haut, a également été investiguée. Cette voie implique surtout l'activation de la phospholipase C (PLC) par l'AII, la vasopressine ou l'acétylcholine et est très spécifique à l'espèce et au type cellulaire. La présence de AII et d'acétylcholine chez le poisson suggère des mécanismes de régulation de la biosynthèse des stéroïdes similaires à ceux observés chez les mammifères. En utilisant un stimulateur de la PKC (PMA), Lacroix et Hontela (2001) ont démontré que la PKC inhibe la réponse aiguë à l'ACTH chez la truite arc-en-ciel. Ainsi, ces résultats démontrent que la production accrue de stéroïdes dans le tissu interrénal de la truite arc-en-ciel est sous le contrôle d'au moins une voie de signalisation impliquant la PKA et la PKC.

L'équipe de Lacroix et Hontela (2006) a également étudié le rôle du Ca dans la voie cortisolique médiée par l'action de l'ACTH. Ces travaux ont démontré qu'une incubation de 60 min en absence de Ca diminue de 40% la sécrétion de cortisol (stimulée par l'ACTH) dans les cellules adrénocorticales de truite arc-en-ciel et de perchaude. Une incubation de 120 min faisait chuter la sécrétion à 30% de sa valeur contrôle. Ceci nous permet de conclure sur l'importance des réservoirs internes de Ca pour la réponse à l'ACTH. Effectivement, une préincubation en absence de Ca vide ces réservoirs et ceci d'autant plus que le temps d'incubation est long. Si l'on ajoute de l'EGTA (un chélateur de cations puissant), la sécrétion de cortisol devient nulle. Ceci peut s'expliquer du fait que la concentration extracellulaire de Ca^{2+} libre devient réellement nulle dans le milieu d'incubation car l'EGTA chélate le Ca^{2+} . De plus, une incubation en présence d'EGTA extracellulaire, même de très courte durée, peut générer un efflux calcique en favorisant un gradient de concentration sortant. Par ailleurs, la nifédipine, un bloqueur de canaux calciques voltage-dépendants, à des concentrations de 12,5, 25,0 et 100 μ M réduit respectivement la sécrétion cortisolique à 70, 45 et 3% de la valeur contrôle. Ainsi, en bloquant l'entrée de Ca dans la cellule, la sécrétion de cortisol diminue progressivement ce qui permet de conclure sur l'importance d'un influx calcique dans la voie cortisolique

médiée par l'ACTH. En présence de thapsigargine, un inhibiteur des pompes Ca^{2+} -ATPases du RE, la sécrétion de cortisol chute de 10% de sa valeur contrôle, ce qui souligne aussi l'importance du Ca provenant des réservoirs internes dans la réponse à l'ACTH. En présence de 100 μM de Cd, on observe 70% de sécrétion de cortisol. Dans les mêmes conditions, si l'on ajoute 25 μM de nifédipine, il y a 30% de sécrétion de cortisol. La nifédipine pourrait tout aussi bien affecter l'entrée de Cd que de Ca dans la cellule. Si la cellule a maintenu son réservoir intracellulaire de Ca, cela permet quand même une certaine sécrétion de cortisol.

2.2.4 Exposition au Cd: observations faites in vivo et vitro

Plusieurs études ont démontré qu'une exposition au Cd est susceptible de provoquer un large éventail d'effets toxiques chez les espèces aquatiques et plus particulièrement les poissons (McCarthy et Houston, 1976, Majewski et Giles, 1981). Il est important de noter que chez les poissons, les glucocorticostéroïdes ont des effets sur l'osmorégulation et sur la régulation du flux ionique permettant de contrer les perturbations osmotiques environnantes (Hontela, 1997). Plusieurs travaux de recherche démontrent que des expositions aiguës au Cd provoquent une élévation du taux de cortisol chez la truite arc-en-ciel et chez plusieurs autres espèces ichtyennes (Hontela *et al.*, 1996, O'Norris *et al.*, 1997, Brodeur *et al.*, 1998, Leblond et Hontela, 1999, O'Norris *et al.*, 1999). Par contre, une exposition chronique à de bas niveaux de Cd provoque, après un pic initial de sécrétion de cortisol, une diminution du taux de cortisol plasmatique. Une étude récente nous indique qu'une exposition à vie à des concentrations sublétales de Cd ou à d'autres métaux lourds perturbe la fonction endocrine des poissons et retarde la maturité (Lévesque *et al.*, 2003). Un affaiblissement de la sécrétion de cortisol suite à une exposition chronique aux xénobiotiques peut nuire à la survie des espèces en portant atteinte aux mécanismes de défense. Il est clair que des études plus poussées sur les effets du Cd sur la fonction endocrine sont nécessaires afin d'élucider à quel endroit celui-ci vient perturber l'axe hypothalamo-hypophysaire-interrénal.

Des études *in vivo* menées sur des poissons vivant dans les lacs contaminés au Cd rapportent une sécrétion de cortisol affaiblie en réponse au stress. Afin de caractériser les effets chroniques d'une exposition environnementale au Cd et à d'autres xénobiotiques sur la physiologie et sur la fonction endocrine des poissons *in vivo*, plusieurs études ont

été conduites dans des sites contaminés (Hontela, 1997, O'Norris, 1998, Levesque *et al.*, 2002). Ces études ont pour but principal de tester la réponse de l'axe hypothalamo-hypophyso-interrénal afin de déterminer si des poissons exposés de façon chronique au Cd et à d'autres polluants peuvent générer une réponse hormonale adéquate. Ces études rapportent sensiblement les mêmes résultats que ceux observés en laboratoire. Les niveaux de cortisol plasmatique, suite à un stress de capture, sont plus bas chez les poissons retrouvés dans les sites contaminés par rapport à ceux des poissons capturés au site de référence (O'Norris, 1996, Hontela, 1997, Sherwood *et al.*, 2000). De plus, chez la perchaude, on peut établir une corrélation positive entre la bioaccumulation des métaux lourds et le degré d'affaiblissement de la production de cortisol suite à un stress de capture aux sites contaminés (Hontela, 1997).

Comparativement aux espèces marines, les poissons d'eau douce sont particulièrement sensibles à une exposition au Cd (Sorensen, 1991). Effectivement, en eau douce, la toxicité des métaux est plus sévère à cause de la faible disponibilité des cations et plus particulièrement du Ca^{2+} . Ceci résulte en une incapacité des cations à compétitionner avec les différentes formes de métaux toxiques pour des sites de liaison, en particulier au niveau des branchies (Matsuo *et al.*, 2005).

En laboratoire, plusieurs travaux ont été effectués afin de déterminer la réponse de l'axe hypothalamo-hypophyso-interrénal à une exposition aiguë au Cd (Hontela *et al.*, 1996, Hontela, 1997). Ces travaux ont démontré qu'une exposition aiguë au Cd provoque une élévation des niveaux de cortisol plasmatiques chez la truite arc-en-ciel et chez d'autres espèces de poissons comme la perchaude et le saumon. Cependant, lorsque l'exposition au Cd perdure pendant plusieurs semaines, les niveaux de cortisol plasmatiques diminuent suite à un pic d'augmentation initiale. En effet, on a démontré chez la truite arc-en-ciel qu'une exposition au Cd à long terme (30 jours) altère la fonction endocrine. Chez les adultes exposés à de faibles concentrations de Cd (10 $\mu\text{g Cd/L}$), les taux de cortisol plasmatique augmentent alors qu'ils diminuent lorsque les concentrations sont élevées (25 $\mu\text{g Cd/L}$) (Ricard *et al.* 1997). D'autre part, l'exposition à long terme provoque un retard de croissance et une diminution des réserves énergétiques traduite par un taux de glycogène hépatique plus bas. Chez les juvéniles, on observe les mêmes réponses: en présence de 1 $\mu\text{g Cd/L}$, le cortisol plasmatique est élevé et à 5 $\mu\text{g Cd/L}$, il diminue (Ricard *et al.*, 1997). On peut supposer que des concentrations plus

élevées de Cd pourraient augmenter les niveaux de MT et une meilleure séquestration du Cd par celle-ci. Cependant, il est difficile de déterminer si les bas niveaux de cortisol plasmatique traduisent une acclimatation au Cd environnant ou s'il s'agit plutôt d'un épuisement de l'axe hypothalamo-hypophysio-interrénal (Brodeur *et al.*, 1997, Hontela, 1998, Ricard *et al.*, 1997).

Leblond et Hontela (1999) ont étudié les effets délétères de différents métaux sur la synthèse de cortisol sur les cellules adrénocorticales isolées de truite arc-en-ciel. La LC_{50} (dose qui tue 50% des cellules), la EC_{50} (dose qui inhibe la sécrétion de cortisol de 50%) et le ratio LC_{50}/EC_{50} (donnant un indice de la spécificité de l'effet toxique sur une fonction physiologique, dans le cas présent, la fonction endocrinienne) ont été déterminés pour divers métaux. Un gradient de cytotoxicité basé sur la mesure de LC_{50} a été établi comme suit : $Hg > CH_3Hg > Cd > Zn$, alors que la toxicité endocrinienne basée sur la valeur de EC_{50} se répartissait ainsi: $Hg > CH_3Hg > Cd > Zn$. Le ratio LC_{50}/EC_{50} décroissant suivant a donc pu être établi: $Cd > Zn > CH_3Hg > Hg$. Ces résultats nous indiquent que le métal le plus cytotoxique est le Hg alors que le Cd a la plus grande spécificité de toxicité endocrinienne. Plus précisément, les EC_{50} du Cd et du Zn (métaux que nous étudierons) ont respectivement été évaluées à 168 μM et 355 μM , alors que les LC_{50} étaient de 10,8 μM et de 22,8 μM . Ceci a donc permis d'estimer des ratios LC_{50}/EC_{50} respectifs similaires de 64,29 et de 64,22. Ces recherches n'ont pu révéler aucun effet antagoniste ni additif entre le Cd et le Zn sur la sécrétion de cortisol. D'ailleurs, cette même étude a permis de démontrer que le Cd peut agir directement sur la cellule stéroïdogénique responsable de la sécrétion de cortisol. En effet, Leblond et Hontela (1999) ont montré par leurs études *in vitro* menées sur les cellules adrénocorticales isolées que le Cd, le Zn et le Hg diminuent la sécrétion de cortisol stimulée par l'ACTH. Ces métaux semblent agir en aval de l'étape de formation d'AMPc. Sans avoir identifié exactement l'étape cible de la voie de signalisation, ces travaux indiquent toutefois où le Cd peut agir et modifier la sécrétion du cortisol dans la cellule stéroïdogénique.

Finalement, on peut constater que la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) fait l'objet de plusieurs travaux de recherche portant sur la toxicité du Cd *in vitro* et *in vivo* puisqu'elle est une espèce sentinelle. En contrepartie, la perchaude (*Perca flavescens*), une espèce plus résistante, est également souvent utilisée lors de recherches sur les contaminants (Lacroix et Hontela, 2004). *In vitro*, il a aussi été montré que les cellules

adrénocorticales de truite arc-en-ciel sont plus sensibles à la perturbation endocrinienne résultante d'un traitement au Cd puisque des rapports LC50/EC50 de 176 et de 38 ont respectivement été estimés pour les cellules adrénocorticales isolées de truites et de perchaudes (Lacroix et Hontela, 2004). Nous pouvons donc conclure que le Cd perturbe la sécrétion de cortisol en affectant l'axe hypothalamo-hypophysaire-interrénal de même qu'en affectant directement la cellule stéroïdogénique. Le cortisol ayant un rôle important au niveau du métabolisme énergétique, l'exposition au Cd peut donc affecter la physiologie des poissons. Ces poissons ont des niveaux de cortisol plasmatique plus élevés mais sont incapables de répondre à un stress supplémentaire.

2.3 *Transport membranaire*

L'absorption des métaux par les organismes aquatiques implique le transfert de ceux-ci au système circulatoire par la barrière épithéliale des branchies, du système digestif ou du tégument. Ce transfert à travers les cellules épithéliales implique trois étapes : premièrement, un transport via la membrane apicale qui joue le rôle d'interface entre le milieu interne et le milieu externe, deuxièmement un transport dans la cellule et des interactions avec les ligands intracellulaires et troisièmement un efflux à travers la membrane basolatérale, interface entre la cellule et le système circulatoire (Roesijadi et Robinson, 1994, Kennedy, 1995). Les organes d'absorption tendent à concentrer les métaux et peuvent avoir de grands potentiels de bioaccumulation.

Le transport cellulaire des métaux se fait par la membrane plasmique de deux façons : par transport membranaire ou par processus d'endocytose. Les métaux dissous sont captés par les surfaces exposées de l'organisme comme les branchies et les particules ingérées sont absorbées après leur solubilisation dans l'intestin. Les particules peuvent également être phagocytées et solubilisées dans des vésicules d'endocytose. Une fois internalisées, les particules ou complexes métalliques peuvent être fragmentés et redistribués à d'autres ligands cellulaires. Chez les vertébrés, les complexes métalliques doivent être fragmentés en structures plus simples dans la lumière de l'intestin avant de pouvoir être transportés par différents mécanismes de transport à travers les membranes (Alabaster, 1981, Kennedy, 1995).

Chez le poisson, l'absorption s'effectue principalement au niveau des branchies et de l'intestin (Bhattacharya, 2000). Des études récentes indiquent que le transport

membranaire des métaux dans les cellules branchiales et intestinales ne serait pas un transport actif dépendant de l'énergie pouvant transporter contre un gradient de concentration. Le transport membranaire serait plutôt passif donc transportant dans le sens d'un gradient de concentration favorisé par une liaison rapide des métaux aux ligands intracellulaires et l'efflux à travers la membrane basolatérale. Ainsi, les métaux semblent plutôt être transportés par diffusion simple ou médiée par des transporteurs passifs dans la cellule (Gerson et Shaikh, 1984, Glennas et Rugstad, 1984, Schoenmakers *et al.*, 1992).

Le transport de métaux essentiels tels que le Ca, le Fe ou le Zn est spécifique. Par exemple, des canaux calciques et co-transporteurs spécifiques sont respectivement impliqués dans le transport du Ca et du Fe. Le transport de ces métaux dépend donc de la température et répond à une cinétique saturable de type Michaelienne caractéristique des voies de transport médiées (Roesijadi et Robinson, 1994).

Chez la truite arc-en-ciel la compétition entre le Ca et le Zn pour le transport à travers les branchies démontre que ces deux éléments peuvent emprunter la même voie de transport (Norey *et al.*, 1990). Il est peu probable que les métaux non-essentiels comme le Cd et le Hg soient transportés dans la cellule par un mécanisme qui leur soit propre: il est généralement considéré que ces métaux empruntent les voies de transport existantes des métaux essentiels.

2.4 Interactions avec les métaux essentiels

En comprenant la relation qu'il existe entre le transport cellulaire des métaux essentiels et celui des métaux toxiques, il est beaucoup plus facile d'expliquer comment les métaux toxiques peuvent être assimilés par les êtres vivants de même que les conséquences de cette assimilation. Les métaux appartenant au groupe IIA partagent certaines affinités avec ceux du groupe IIB. Ceci résulte non seulement d'une similarité chimique, mais également d'un manque de spécificité des éléments avec lesquelles ils peuvent interagir. Il se peut qu'une pression sélective pour des ligands spécifiques n'ait pas été nécessaire aux populations n'ayant jamais été exposés aux polluants. Cependant, la présence de MT que l'on retrouve chez plusieurs espèces tout au long de l'évolution nous suggère un processus impliquant possiblement des protéines de liaison adaptées au transport du Zn pour contrôler son homéostasie tissulaire (Maroni *et al.*, 1987, Mokdad *et al.*, 1987). De plus, la prévalence de protéines pouvant faire des liaisons avec le Cd nous

indique que plusieurs espèces ont fait preuve de prudence au cours de l'évolution afin de se protéger contre l'accumulation de celui-ci (Simkiss *et al.*, 1982, Morgan *et al.*, 1989).

2.4.1 Cd et Ca

Plusieurs études menées sur différents types cellulaires tels que les cardiomyocytes, les hépatocytes et les entérocytes ont démontré que le Cd peut être transporté dans la cellule par les mêmes voies empruntées par d'autres éléments comme le Ca, le Zn ou le Fe (Endo *et al.*, 1996, Limaye et Shaikh, 1999, Elisma et Jumarie, 2001). Le Cd peut traverser des membranes reconstituées (bicouches lipidiques) sous forme ionique et on a même démontré qu'il peut être transporté par les canaux calciques dans les cellules hypophysaires et dans les hépatocytes de mammifères ainsi que dans les branchies de poisson (Hinkle *et al.*, 1987, Blazka et Shaikh, 1991, Dorian *et al.*, 1995, Lafuente et Esquifino, 1999, Baker *et al.*, 2003). Cette capacité à pénétrer dans la cellule en se substituant à un élément essentiel augmente la biodisponibilité, et conséquemment la toxicité, du Cd. Mis à part sa capacité à agir directement sur les mécanismes d'oxydo-réduction cellulaires, le Cd peut également moduler la toxicité des ROS en interférant avec la signalisation calcique. Le Cd emprunte les mêmes voies de transport que celles du Ca en passant par les canaux calciques ou empruntant des systèmes de transport spécifiques comportant des groupes sulfhydryl critiques (Limaye et Shaikh, 1999). De plus, le Cd bloque les canaux calciques en s'y fixant; sa perméabilité à travers ces mêmes canaux variant considérablement avec le type de canal. Le Cd semble également capable de provoquer des stimuli à l'intérieur de la cellule, causant ainsi une mobilisation du Ca. Le Cd peut donc interférer directement avec l'homéostasie et le métabolisme calcique et ces deux processus sont d'autant plus affectés que l'accumulation de Cd est importante (Staessen *et al.*, 1996).

De nombreuses études portent sur la relation entre le métabolisme du Ca et le Cd. Cette interaction est particulièrement importante puisqu'on peut associer directement le Cd à l'ostéomalacie. Selon certains chercheurs, cette maladie est principalement causée par un effet du Cd au niveau entérique menant à l'inhibition de l'absorption intestinale du Ca (Murata *et al.*, 1970). La réaction inverse a également été observée, c'est-à-dire, une interférence par le Ca avec l'absorption du Cd (Larsson et Piscator, 1971). Effectivement, l'administration d'une diète riche en Cd et pauvre en Ca à des rats a permis de démontrer des niveaux d'accumulation supérieurs de Cd dans les tissus. Ces études suggèrent

fortement qu'il y a vraisemblablement une interaction réciproque entre le Ca et le Cd pour un même processus d'absorption au niveau intestinal. La possibilité d'une compétition entre le Ca et le Cd pour les mêmes sites de transport a été suggérée à maintes reprises. Une équipe de chercheurs a exploré les effets possibles du Cd sur le transport de Ca stimulé par la vitamine D dans le duodénum du rat *in vitro* (Tsuruki *et al.*, 1978). Leur étude a permis de démontrer qu'en présence de Cd, il y a une inhibition compétitive du transport de Ca. Ces résultats ont été confirmés par l'observation d'une cinétique de type Michaelis-Menten inhibée par le Cd. Par la suite, plusieurs autres travaux ont été effectués sur le même sujet et abondent dans le même sens (Pigman *et al.*, 1997, 1997, Lecoeur *et al.*, 2002, Bannon *et al.*, 2003).

Finalement, il est connu que le Cd peut avoir un effet potentiellement dévastateur chez les organismes aquatiques. Les poissons exposés au Cd démontrent des signes d'hypocalcémie (Giles, 1984). En effet, le Cd, en causant une diminution des concentrations de Ca plasmatique, provoque une perturbation de l'ionorégulation. C'est ce mécanisme qui est principalement responsable de l'effet toxique du Cd chez les poissons (Roch et Maly, 1979). Comme chez les mammifères, il peut aussi avoir une action directe sur la cellule.

Les interactions du Cd avec la membrane plasmique sont donc nombreuses. Le Cd interfère avec le métabolisme du Ca dans les branchies, ce qui est dû à une compétition entre le Cd et le Ca pour les mêmes sites protéiques (mimétisme ionique) (Clarkson, 1993, Olsson, 1993). Nous pouvons interpréter le concept de mimétisme ionique du Cd comme étant approprié aux situations où la forme divalente Cd^{2+} se substitue au Ca^{2+} dans diverses situations (Zalups et Ahmad, 2002). Les ions Cd^{2+} et Ca^{2+} peuvent tous deux être transportés dans la cellule à travers des canaux calciques, par contre, les ions Cd^{2+} sont transportés beaucoup plus lentement (Verboost *et al.*, 1989). Comme nous le savons, l'influx calcique au travers de la membrane plasmique est essentiel à plusieurs processus physiologiques impliquant une signalisation cellulaire telles l'apoptose et la progression du cycle cellulaire (Hoenderop *et al.*, 2002). Ainsi, le Cd pourrait perturber la sécrétion de cortisol en compromettant l'influx calcique nécessaire à la voie de signalisation activée par l'ACTH.

Chez les vertébrés, l'ion Ca^{2+} joue un rôle clé dans la conversion du signal électrique en signal chimique dans le système nerveux. Lorsque l'ACTH se lie à son récepteur

membranaire, il y a dépolarisation de la membrane puis ouverture des canaux calciques voltage-dépendants entraînant ainsi l'influx de Ca^{2+} extracellulaire. Le taux accru de Ca^{2+} dans le cytosol déclenche une libération d'ions Ca^{2+} des réserves intracellulaires en ouvrant d'autres canaux à Ca^{2+} portés par la membrane du RE. Les ions Ca^{2+} sont continuellement pompés du cytosol vers le RE pour constituer une réserve intracellulaire de Ca^{2+} . Une bonne part des effets du Ca^{2+} s'exerce par le truchement de la calmoduline (protéine liant le Ca intracellulaire) activée par la séquestration d'ions Ca^{2+} dès que leur concentration atteint un seuil critique dans le cytosol. Le complexe Ca-calmoduline activé peut se lier à toute une série de protéines cible dont les kinases. Ainsi, toute cette cascade stimule de très nombreuses voies de signalisation cytosolique.

Chez les poissons, on considère la perturbation des taux plasmatiques de Ca^{2+} comme étant directement liée au mécanisme de toxicité fondamental du Cd. Verbost (1988) et son équipe ont démontré qu'à des concentrations variant de 5×10^{-8} à 1×10^{-7} M dans le milieu aquatique, le Cd inhibe spécifiquement l'influx calcique dans les branchies de truite arc-en-ciel. Ces résultats permettent de dire que le transport ATP-dépendant de Ca^{2+} à travers la membrane basolatérale est inhibé en présence de Cd. Si l'on assume que la pompe Ca^{2+} -ATPase branchiale est calmoduline-dépendante, tel que rapporté dans d'autres phénotypes cellulaires, le Cd pourrait donc inhiber ce transport de deux façons: indirectement en interagissant avec la calmoduline et directement en interagissant avec la pompe via son site enzymatique (Verbost *et al.*, 1988)

Raynal *et al.* (2005) ont mené des études d'accumulation cellulaire de ^{109}Cd dans des cellules adrénocorticales isolées de truites arc-en-ciel et de perchaudes. Les résultats obtenus démontrent: i) des niveaux d'accumulation cellulaire semblables chez les deux espèces; ii) l'implication d'un système de transport spécifique à haute affinité et faible capacité chez les deux espèces; iii) des niveaux d'accumulation supérieurs en absence de Ca chez la truite mais pas chez la perchaude. De plus, ces résultats ont permis de confirmer le transport préférentiel du Cd^{2+} comparativement aux chlorocomplexes dans le tissu interrénal de poissons. Il se pourrait donc que la plus grande susceptibilité à l'effet du Cd sur la sécrétion de cortisol observée *in vitro* (Lacroix et Hontela, 2004) soit reliée à une interaction Cd-Ca dominante chez la truite comparativement à la perchaude.

En se basant sur l'hypothèse selon laquelle le Cd est en compétition avec le Ca et en sachant que le Cd n'interagit pas avec la liaison de l'ACTH à son récepteur MC2 ni

n'interfère avec les étapes suivant la formation de prégnénolone dans la mitochondrie, on peut supposer que le Cd interfère dans la voie de signalisation à une autre étape déterminante. Nous pensons que le Cd peut inhiber l'influx Ca et que cet influx de Ca extracellulaire est tout aussi critique que la libération de Ca des pools internes pour la réponse à l'ACTH. Ainsi, mieux préciser le rôle du Ca dans la sécrétion cortisolique est très important afin de mieux comprendre les effets du Cd sur la voie de signalisation de sécrétion cortisolique médiée par l'ACTH.

2.4.2 Cd et Zn

Dans la nature, le Cd et le Zn sont étroitement liés et où l'on retrouve du Zn, on est certain de retrouver du Cd. Il n'est donc pas étonnant que l'on observe le même phénomène au niveau cellulaire. Contrairement au Cd, le Zn est reconnu comme étant un métal essentiel au métabolisme de la plupart des êtres vivants et plusieurs enzymes sont Zn-dépendantes. Le Cd semble avoir l'habileté de se substituer au Zn provoquant ainsi des changements importants dans l'activité enzymatique. Ainsi, le métabolisme du Cd est donc intimement lié à celui du Zn (Friberg *et al.*, 1974). Effectivement, la MT peut se lier à la fois au Cd et au Zn transportant ainsi conjointement les deux métaux dans les cellules. D'ailleurs, dans la littérature, l'hypothèse la plus souvent soulevée est que le transport de Cd, du moins au niveau intestinal, implique une compétition avec des éléments essentiels tels que le Ca ou le Zn pour des systèmes de transport spécifique. Une autre étude suggère même que le Cd serait également transporté par des transporteurs spécifiques au Zn dans les hépatocytes de rat (Blazka et Shaikh, 1991).

Pour la première fois, en 1957, Parizek a mené une étude sur l'administration simultanée du Zn et du Cd et sur la modulation de la toxicité du Cd par le Zn. Il a découvert que chez le rat, une dose élevée de Zn peut prévenir l'action du Cd sur les testicules. Par la suite, d'autres chercheurs ont confirmé ces résultats (Kar *et al.*, 1960, Mason et Young, 1967, Gunn *et al.*, 1968, Hoadley et Cousins, 1985, Guan *et al.*, 2003, Reeves et Cheney, 2004). Ces études nous démontrent que les effets toxiques aigus ainsi que les effets à long terme du Cd sur les testicules peuvent être contrés ou prévenus par des injections simultanées de Zn. D'autres chercheurs ont étudié les effets du Cd et du Zn ajoutés à la diète chez des rats traités pendant une période de 60 jours. Ils ont ainsi été en mesure de déterminer les activités de neuf enzymes différentes dans le foie. Ils ont constaté que le Cd diminue l'activité de la transaminase glutamique oxalo-acétique et que

le Zn ne semble pas être en mesure de prévenir cette diminution. Cependant, la diminution de l'activité de phosphorylation oxydative observée dans les mitochondries et directement liée à une exposition au Cd semble être contrée par le Zn (Bunn et Matrone, 1966, Guan *et al.*, 2003, Szpetnar *et al.*, 2004). Lors d'une exposition au Cd il est commun d'observer des niveaux élevés de Zn dans les organes (Schroeder *et al.*, 1967, Reeves et Cheney, 2004). Ceci est probablement causé par le fardeau additionnel placé sur le Zn pour neutraliser les effets du Cd. Ainsi, ces résultats nous démontrent l'existence de modulations réciproques entre les effets du Zn et du Cd.

Plusieurs travaux de recherche ont également porté sur les interactions entre le Cd et le Zn au niveau intestinal (Jumarie *et al.*, 1997, Elisma et Jumarie, 2001, Jumarie *et al.*, 2001). Jaeger et son équipe (1990) ont obtenu des résultats mettant en évidence une compétition entre le Cd et le Zn pour le transport intestinal chez le rat. Ils ont démontré que le Cd diminue le transport luminal de Zn dans les cellules intestinales mais que le transport séreusal de Cd est augmenté par la présence de Zn luminal. Cependant, il est difficile de statuer sur la nature de ces interactions Cd/Zn étant donné l'hétérogénéité du tissu intestinal. En effet, alors que certaines études menées *in vitro* sur segments perfusés démontrent des interactions de type non-compétitives entre le Cd et le Zn (Foulkes, 1985), d'autres menées sur des vésicules membranaires de bordure en brosse d'intestins porcins ont révélé une forte compétition entre ces deux éléments (Tacnet *et al.*, 1990). Dans les cellules humaines Caco-2, le Zn inhibe le transport de Cd préférentiellement sous forme de chlorocomplexes (Jumarie *et al.*, 1997; Elisma et Jumarie, 2001), ce qui exclue une compétition pour le système de transport NRAMP2, normalement responsable de l'absorption intestinale du Fe.

Comme chez les animaux, le métabolisme du Cd est intrinsèquement lié à celui du Zn chez les humains. Plusieurs études épidémiologiques ont été menées dans différents pays afin de répertorier les effets du Cd sur la fonction rénale, hépatique, reproductrice ainsi que ses effets sur le fœtus ou sur divers systèmes dont le système cardio-vasculaire et le système osseux. On a principalement mené ces travaux chez des travailleurs industriels susceptibles d'être plus fortement exposés au Cd. On a également effectué différentes mesures chez des individus demeurant dans des endroits-clé reconnus pour être contaminés en Cd. On a ainsi pu démontrer que le Cd s'accumule dans les reins et que pendant la période d'accumulation, seule de petites quantités de Cd sont excrétées

dans l'urine. La relation entre l'excrétion de Cd et le métabolisme du Zn a été bien illustrée par l'équipe de Suzuki et col. en 1965. Ils ont observé une diminution rénale de l'excrétion rénale de Zn accompagnée d'une augmentation de celle du Cd. La MT est présente dans les tissus rénaux humains et joue un rôle important dans la toxicocinétique du Cd. Chez l'humain peu exposé, l'excrétion urinaire du Cd est très faible et augmente en fonction de l'âge tandis que chez les travailleurs, l'excrétion peut varier selon le degré d'exposition et aussi selon la charge corporelle totale (Nordberg et Piscator, 1976, Baker *et al.*, 2005). Dans le rein, c'est au niveau du cortex que l'on retrouve les plus fortes concentrations de Cd. Une étude très récente a été effectuée pour vérifier les effets d'une exposition chronique au Cd sur la fonction rénale chez le rat. Cette étude a démontré que des injections intrapéritonéales de 500 µg/kg de Zn couplées à des injections de 500 µg/kg de Cd inhibent l'apoptose induite par le Cd et préviennent l'altération de l'expression de certaines protéines. Ainsi, cette recherche a réussi à démontrer que le Zn joue un rôle protecteur contre les effets toxiques du Cd dans la fonction rénale (Jacquillet *et al.*, 2005).

Peu d'études ont été effectuées sur les effets concurrents du Cd et du Zn sur les cellules rénales de poissons. Cependant, on pourrait s'attendre à un effet protecteur similaire du Zn mais pas à une protection par un prétraitement au Zn sur le Cd (Leblond et Hontela, 1999).

2.5 Conclusion

Il est maintenant évident que plusieurs xénobiotiques comme le Cd, présents dans les systèmes aquatiques, peuvent compromettre l'axe hypothalamo-hypophyso-interrénal chez les poissons. Comme on peut l'observer à la figure 2.3, les sites d'actions potentiels de perturbateurs endocriniens sont multiples dans la cellule stéroïdogénique. En premier lieu, ils peuvent inhiber ou diminuer la synthèse d'ACTH ou simplement interférer au niveau de sa liaison à son récepteur. Par la suite, ils peuvent avoir un effet inhibiteur ou délétère sur les enzymes stéroïdogéniques (P-450_{11β}, P-450_{17α} ou P-450_{C21}) présentes dans la mitochondrie ou dans le réticulum endoplasmique et finalement ils peuvent interférer au niveau des récepteurs cortisoliques dans les organes cibles (foie, reins) ce qui mène à une altération du métabolisme et d'excrétion du cortisol et de sa demi-vie dans l'organisme (Hontela, 1997).

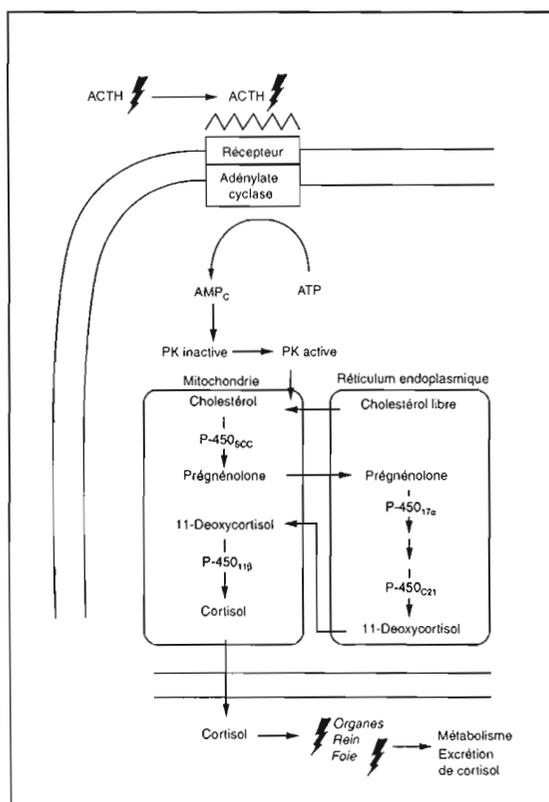


Figure 2.3 Sites d'actions de perturbateurs endocriniens (Hontela 1997).

Enfin, il est important de mentionner que les perturbateurs endocriniens comme le Cd peuvent également interférer avec les seconds messagers tels que l'AMPc ou le Ca. Effectivement, tel que mentionné précédemment, la synthèse du cortisol est principalement régie par l'ACTH qui est tributaire de l'action de l'AMPc à titre de second messenger. Cependant, bien que le rôle de l'AMPc comme second messenger soit implicite lors de la stéroïdogénèse, on sait maintenant que d'autres systèmes de signalisation intracellulaire sont impliqués dans la régulation de celle-ci. Effectivement, plusieurs études mettent en évidence le rôle du Ca comme second messenger dans la régulation de divers processus cellulaires (Cooke, 1999, Kondo, 2000, Gallo-Payet et Payet, 2003). Ces travaux ont démontré qu'une absence de Ca extracellulaire diminue ou peut même carrément arrêter la sécrétion des corticostéroïdes. On peut donc mieux comprendre l'importance primordiale du Ca à titre de second messenger. Ainsi, le Cd ayant le potentiel d'interférence à plusieurs niveaux peut également affecter la disponibilité de seconds messagers tels que le Ca. Il ne faut pas oublier non plus que le Cd se retrouve très rarement seul *in vivo* ou *in vitro*. Effectivement, on le retrouve souvent sous forme de mélange avec d'autres métaux susceptibles de porter entrave au différents processus physiologiques. De par sa grande similitude avec le Zn, il est courant d'observer des mélanges Cd/Zn. On peut supposer qu'un mélange Cd/Zn peut également affecter la disponibilité du Ca à titre de second messenger dans les cellules stéroïdogéniques.

En conclusion, il devient clair que mieux comprendre les effets du Cd sur l'influx calcique dans le tissu interrénal lors de la stéroïdogénèse représente un pas important dans la compréhension globale des mécanismes de perturbation endocrinienne.

CHAPITRE III:

OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

Ce projet de recherche vise principalement à caractériser le transport de Cd dans les cellules adrénocorticales cibles de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) *in vitro* afin d'estimer s'il perturbe la sécrétion de cortisol dès son entrée dans la cellule. Nous étudierons donc les inhibitions réciproques possibles entre le Cd et le Ca, présumément impliqué dans la sécrétion de cortisol, de même qu'entre le Cd et le Zn, un autre métal diminuant la sécrétion de cortisol. Enfin, un aspect important du projet consiste à mieux comprendre l'impact de la spéciation inorganique du Cd sur les phénomènes observés.

3.1 *Prémisses et hypothèse générale*

Étant donné la nature toxique du Cd et ses effets délétères sur les organismes aquatiques, il est normal de penser que le transport du Cd dans les cellules emprunte une voie normalement destinée à l'absorption d'éléments essentiels. Nous savons qu'*in vitro*, la EC₅₀ du Cd, soit la dose qui inhibe la sécrétion de cortisol de 50%, est beaucoup plus faible dans les cellules adrénocorticales de la truite arc-en-ciel (0,09 mM) que de la perchaude (0,26 mM) (Lacroix et Hontela, 2004). Nous savons également que des niveaux d'accumulation cellulaire semblables sont observés chez ces deux espèces et qu'un transport de ¹⁰⁹Cd accru est obtenu en absence de Ca extracellulaire dans les cellules adrénocorticales de truites arc-en-ciel mais pas de perchaudes (Raynal *et al.*, 2005).

Nous émettons donc l'hypothèse suivante : la différence de sensibilité observée *in vitro* entre ces deux espèces ne peut être expliquée par des niveaux d'accumulation supérieurs chez la truite mais pourrait révéler des variations de sensibilité au niveau de la voie de signalisation menant à la sécrétion de cortisol sous stimulation à l'ACTH. Ainsi, le Cd ne perturberait pas la capacité de la cellule à utiliser les pools intracellulaires de Ca

mais nous pensons qu'un influx de Ca extracellulaire est essentiel pour une sécrétion cortisolique optimale en réponse à l'ACTH.

3.2 *Hypothèses de recherche spécifiques*

Comme on le sait, le transport de métaux essentiels tels que le Ca ou le Zn implique une voie de transport spécifique dans la cellule. Le Cd^{2+} cationique, qui est chimiquement semblable à plusieurs de ces éléments essentiels, peut donc emprunter les mêmes systèmes de transport. Cependant, même si le Cd est considéré comme inhibiteur de canaux calciques ceci ne veut pas nécessairement dire qu'il va entrer dans la cellule: il peut tout simplement bloquer l'influx du Ca. Ainsi, nous émettons l'hypothèse suivante : le Cd perturbe la sécrétion de cortisol dans les cellules adrénocorticales de truite-arc-en-ciel en déstabilisant l'homéostasie calcique. On peut donc supposer que le Cd^{2+} entre en compétition avec le Ca^{2+} lors d'une dépolarisation de la membrane cellulaire suite à la liaison de l'ACTH à son récepteur membranaire. Cette compétition entraîne une diminution de l'influx calcique ce qui peut diminuer l'efficacité de la voie de signalisation menant à la sécrétion de cortisol.

Notre seconde hypothèse stipule que le Zn ne perturbe pas l'homéostasie calcique mais diminuerait la sécrétion de cortisol en agissant à un autre niveau dans la voie de signalisation. Effectivement, il est logique de penser que le Zn, à titre d'élément essentiel n'entre pas en compétition avec le Ca dans des conditions normales.

3.3 *Objectifs de la recherche*

L'objectif général de ce projet de recherche est de vérifier si le Cd et le Zn diminuent l'influx calcique.

Le premier objectif spécifique est de caractériser le transport du Ca dans la cellule adrénocorticale. Le deuxième objectif spécifique consiste à étudier les inhibitions réciproques possibles entre le Cd et le Ca pour le transport dans la cellule adrénocorticale de poisson et comment cette inhibition réciproque peut avoir un effet sur l'homéostasie calcique. Finalement, notre dernier objectif sera d'identifier les synergies et antagonismes possibles entre le Ca, le Zn et le Cd sur l'accumulation cellulaire.

CHAPITRE IV:

**RECIPROCAL INHIBITION OF CD AND CA UPTAKE
IN ISOLATED ADRENOCORTICAL CELLS OF THE RAINBOW
TROUT (ONCORHYNCHUS MYKISS)**

**Reciprocal inhibition of Cd and Ca uptake
in isolated adrenocortical cells of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**

Gagnon, E, Jumarie, C¹

¹Département des sciences biologiques,
Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville,
Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8

¹To whom correspondence should be addressed:
E-mail: jumarie.catherine@uqam.ca
Telephone : (514) 987-3000 (ext.7680)
Telecopier : (514) 987-4647

4.1 Abstract

It is now well recognized that some environmental pollutants, including cadmium (Cd) and zinc (Zn), can act as endocrine disruptors in fish. Direct action on steroidogenic cells has also been demonstrated in vitro. We have previously characterized Cd uptake in isolated adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and have provided some evidence for Cd/Ca interaction. Here we pursued our investigation on metal competition for uptake in the adrenocortical cells. Our results show that inorganic speciation conditions favour Cd uptake with optimal level of accumulation for Cd²⁺ compared to chlorocomplexes (CdCl_n²⁻ⁿ). The uptake time-course of Ca accumulation was studied for the first time in these fish cells and Ca was found to be much less efficiently accumulated compared to Cd. A specific saturable mechanism of transport was characterized for Ca uptake but voltage-gated as well as La-sensitive cationic channels are unlikely to contribute appreciably. A concentration-dependent reciprocal inhibition was observed between Ca and Cd, whereas Zn proved to inhibit Cd uptake exclusively. Additive inhibitory effect on Cd uptake was also obtained with co-exposure to Ca and Zn. Altogether our results reveal that Cd, but not Zn, may decrease Ca availability to the adrenocortical tissue. They also demonstrate that Zn may partially protect against Cd toxicity but Zn would not protect against Cd-induced perturbation of Ca homeostasis.

Key words: endocrine disruptors, adrenal tissue, cadmium, zinc, calcium, rainbow trout.

4.2 Introduction

Cadmium (Cd) is a persistent heavy metal pollutant that can alter the aquatic and terrestrial environment over hundreds of years. Its many industrial uses result in large dispersion throughout ecosystems (reviewed in Pinot *et al.* 2000). Cd enters the food chain and, because of its long half-life, is concentrated in various organisms. Cd is particularly harmful in teleost fish (reviewed in Sorensen 1991). Numerous studies reported tissue-specific Cd accumulation following chronic exposure in fish (Norey *et al.* 1990, Hollis *et al.* 2001, Kraemer *et al.* 2005). Similar to mammals, Cd uptake in fish elicits protective mechanisms involving binding proteins such as metallothioneins (MT) allowing sequestration to heat-stable proteins subcellular fraction (Chowdury *et al.* 2005, Kraemer *et al.* 2005). Biological detoxification of Cd in fish is thus closely linked to MT synthesis (Olsson 1993, Laflamme *et al.* 2000).

It is now well recognized that some environmental pollutants, including Cd, can act as endocrine disruptors in fish (Le Guével *et al.* 2000, Vétillard and Bailhache 2005). Recent studies showed that fish sampled at contaminated sites have an impaired capacity to secrete cortisol, synthesized by steroidogenic cells of the adrenal tissue, in response to stress (Hontela *et al.* 1995, Hontela 1998, Lévesque *et al.* 2002). Although the hypothalamo-pituitary-interrenal axis is an endocrine target of xenobiotics, including Cd (Lévesque *et al.*, 2003), Cd may also act directly on isolated steroidogenic cells responsible for cortisol secretion in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) and yellow perch, (*Perca flavescens*) (Leblond and Hontela 1999, Lacroix and Hontela, 2004). Moreover, some studies have demonstrated that Cd, as well as zinc (Zn), alter signal transduction pathways leading to cortisol secretion most probably at steps downstream from cAMP formation following stimulation by the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) (Leblond and Hontela, 1999; Lacroix and Hontela 2001).

Rainbow trout is one of the most sensitive fish species to environmental pollutants and particularly to Cd (Hansen *et al.* 2002). This is supported by long-term lethal concentrations (LC₅₀) estimated to 0.01 mg/l and 0.5 mg/l for trout and perch, respectively, following exposure to Cd in hard water (Alabaster and Lloyd 1982). A recent study further investigated differences in Cd sensitivity between steroidogenic cells isolated from the adrenocortical tissue of rainbow trout and yellow perch (Lacroix and

Hontela 2004). The results showed higher sensitivity to Cd-induced impaired cortisol secretion in rainbow trout cells compared to yellow perch since 2.8-fold higher EC_{50} values (Cd concentration leading to a 50% reduction in cortisol secretion) were obtained for perch cells following a 1-h exposure *in vitro* ($EC_{50} = 0.09$ mM and 0.26 mM for rainbow trout and yellow perch cells, respectively).

In mammals, it has been demonstrated that ACTH action is not exclusively mediated by cAMP but also by Ca^{2+} which plays a key role by close interactions through positive feedback loops enhancing steroid secretion (Gallo-Payet and Payet 2003). In fish, disturbance of plasma Ca^{2+} levels following exposure to Cd has been linked to direct mechanisms of Cd toxicity (Verboost 1988). The role of Ca^{2+} in teleost corticosteroidogenesis has been investigated *in vitro* using steroidogenic cells isolated from the adrenocortical tissue of rainbow trout: extracellular Ca^{2+} seems to be necessary for ACTH-stimulated cortisol secretion, and Ca^{2+} uptake through voltage-dependent Ca^{2+} channels are likely to be involved in signal transduction of ACTH stimulation (Lacroix and Hontela, 2006). The role Ca^{2+} plays in corticosteroidogenesis in fish clearly needs to be elucidated.

Uptake mechanisms responsible for the cellular accumulation of Cd remain to be identified. The most common hypothesis states that Cd uptake involves competition with essential elements such as Ca or Zn for specific transport systems. A recent study on the effects of Zn pre-exposure on Cd and Zn accumulation in two marine fish species reported that waterborne and dietary Zn exposure increased the metal uptake efficiency from ambient water, but had little effect on dietary metal uptake (Zhang and Whang 2005). Recently, we have shown that Cd is highly accumulated in dispersed adrenocortical fish cells of rainbow trout and yellow perch with the following characteristics: (i) similar accumulation levels in both species; (ii) the involvement of a specific transport system of high affinity and low capacity in both species; and (iii) higher accumulation levels in the absence of calcium (Ca) in trout but not in yellow perch (Raynal *et al.* 2005). However, Ca uptake, as well as how Cd may affect Ca transport, deserves to be thoroughly studied. Accordingly, the aims of our study are : i) to characterize Ca uptake in the adrenocortical cells isolated from rainbow trout; ii) to investigate whether reciprocal inhibitions take place between Cd and Ca for accumulation in these target cells, and iii) as Zn has also been shown to affect cortisol secretion *in vitro* (Leblond and Hontela 1999), to verify whether co-exposure to Cd and Zn may result in

additive effect on Ca transport. Because metal competition with Ca is expected to involve the free cation (M^{z+}), uptake experiments were performed under well controlled inorganic speciation conditions and data were analyzed relative to Cd^{2+} and Zn^{2+} species.

4.3 Materials and methods:

4.3.1 Chemicals

Minimal essential medium (MEM) was obtained from Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO). Collagenase/dispase mixture (collagenase from *Achromobacter iophagus* and dispase from *Bacillus polymyxa*) came from Boehringer Mannheim (Roche, Basel Switzerland). 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS 222) for anesthesia was purchased from ICN Pharmaceuticals (Costa Mesa, CA). Filters (pore size: 1.2 μm) (Millipore) were purchased from Fisher Scientific (Ottawa, Ontario, Canada). Labeled $^{109}CdCl_2$ (specific activity ranging from 2.6 to 3.8 mCi/mg) and labeled $^{45}CaCl_2$ (specific activity ranging from 5 to 50 mCi/mg) were obtained from Perkin Elmer Life Science (Woodbridge, Ontario, Canada).

4.3.2 Experimental animals

Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (body weight 100-150 g) were purchased from Labelle Piscicultures Inc. (Labelle, Quebec, Canada). Upon arrival to our aquatic facilities, fish were maintained in a 600 l freshwater tank at $15 \pm 1^\circ C$ with a constant flow rate of 3.8 l/min of filtered and oxygen-saturated water (hardness 70 mg/l $CaCO_3$). Fish were fed daily with a commercial trout food at the recommended rate (10 g/kg of fish). A two week acclimation period took place before the beginning of the experiments.

4.3.3 Preparation of head kidney cell suspension

The method described by Leblond et Hontela (1999) was used to prepare the cell suspensions. Fish were anaesthetized with MS222, bled from the caudal vasculature and perfused with a syringe containing saline solution (0,8% NaCl) to remove as much blood as possible. The adrenocortical tissue (head kidney) was then dissected out and deposited into a tube containing ice-cold MEM supplemented with 5 g/l BSA and 2.2 g/l $NaHCO_3$ (complete medium), pH adjusted to 7.4. The tissue fragments were washed two times

with complete medium and resuspended in 3 ml of fresh complete medium containing 2.5 mg/ml collagenase/dispase and incubated for 60 min with gentle agitation at room temperature. The cells were resuspended every 15 min with a transfer pipette. Following enzymatic digestion, the cell suspension was filtered with a 30 μm mesh cloth and the filtrate was washed 3 times (centrifugation at 300 x g for 5 min at room temperature and resuspension) with a Ringer solution containing (in mM): 111 NaCl, 1.8 CaCl₂, 2.7 KCl, 2.4 NaHCO₃, 5.5 dextrose, 25 Hepes adjusted to pH 7.4 with 1 mM NaOH. The total cell suspension was kept in a conical tube (25 ml Sarsted tube) and incubated in the Ringer solution for 1 h with gentle agitation. The cellular density was estimated using an hemacytometer and then adjusted to 5×10^6 cells/ml.

4.3.4 Measurement of ¹⁰⁹Cd and ⁴⁵Ca uptake

Cd and Ca uptake experiments were performed at room temperature in serum-free transport media referred to as chloride (Cl⁻) and nitrate (NO₃⁻) media containing respectively (in mM): 111 NaCl/NaNO₃, 2.7 KCl/KNO₃, 1.8 CaCl₂/Ca(NO₃)₂, 2.8 NaHCO₃, 5.5 dextrose and 25 Hepes buffered at pH 7.4 with NaOH 1N. When required, Ca was removed from those media and replaced by Na to maintain osmolarity. 0.5 μM (0.09 ppm) ¹⁰⁹Cd were added to either the chloride or nitrate transport medium; this concentration does not affect adrenocortical cell viability (LC₅₀ = 10.8 mM, Leblond and Hontela (1999)). Some experiments were conducted in the presence of increasing concentrations of unlabeled Cd ranging from 0 to 100 μM . 2.5 $\mu\text{Ci/ml}$. The ⁴⁵Ca was added to uptake media in addition with Ca to get a final total Ca concentration of 0.5 mM. In some experiments, Ca concentrations ranging from 0.5 mM to 10 mM were also used. Unless otherwise specified, uptake data are expressed relative to total Ca (⁴⁵Ca + Ca) and Cd (¹⁰⁹Cd + Cd) concentrations. In some other experiments, reciprocal inhibition between Ca and Cd as well as Zn have been tested using increasing concentrations of the respective unlabeled metal. Ca uptake was also conducted in the presence of 10 μM nifedipine or verapamil (two well-known voltage-gated Ca channel blockers) or 10 μM lanthanum (La) (blocker for non-selective non-voltage gated Ca channels). Transport media were always prepared in advance and allowed to reach equilibrium overnight in plasticware at room temperature. After specific selected time of incubation, 3 to 5 replicates each of 1 ml were sampled from the cell suspension, filtered through a single screen vacuum system and rapidly rinsed 3 times with ice-cold metal-

free chloride medium containing 2 mM EDTA to remove the excess radioactivity according to the procedure previously established (Jumarie *et al.*, 2001). Filters were then used for radioactivity determination using a gamma counter (Cobra II, Canberra Packard Canada), for ^{109}Cd , and a Wallac 1409 liquid scintillation counter (Wallac Oy, Turku, Finland), for ^{45}Ca . 50 μl from each replicates were kept for protein determination according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as the calibration standard and a Tecan SpectraFluor Plus spectrophotometer (Esbe Scientific Industries Inc., Canada).

4.3.5 Metal speciation and experimental conditions

The chemical species of metals in the transport media, namely metal speciation, were identified as previously (Jumarie *et al.*, 2001) using the MINEQL⁺ chemical equilibrium program (Schecher and McAvoy, 1994) and the NIST stability constants database (Martell *et al.*, 2001). Because of Cd complexation by Cl^- , 82% of the total dissolved metal is recovered as CdCl_n^{2-n} species (where n varies from 1 to 3) in a standard chloride medium. Therefore, in most experiments, Cl^- was changed for NO_3^- (which does not bind Cd as much as does Cl^-) to increase Cd^{2+} levels relative to chlorocomplexe formation ($\log K_c$ values for CdCl^+ and CdNO_3^+ are 1.98 and 0.50, respectively, where K_c is the formation constant for Cd complexation). This procedure results in a 5-fold increase in $[\text{Cd}^{2+}]$ (17% to 84% of the total dissolved metal) (Raynal *et al.*, 2005). Note that contrary to Cd, Zn and Ca speciation are not significantly modified regardless of the exposure medium used. Indeed both Cl^- and NO_3^- have similar and low affinity for both Zn and Ca ($\log K_c$ values ranging from 0.4 to 0.6) leaving over 80% of the total dissolved Ca and Zn present as the free cation Ca^{2+} and Zn^{2+} , respectively.

4.3.6 Data analysis

Uptake time-course data were analyzed according to the first-order rate Eq. (1)

$$U = U_{\max} (1 - e^{-kt}) + U_0 \quad (1)$$

where U_0 and U_{\max} are the uptake values measured at $t = 0$ (non-zero intercept value) and $t = \infty$ (equilibrium uptake value), respectively, and k represents the time constant of the overall process of accumulation ($t_{1/2} = \ln 2/k$).

The kinetic parameters of Cd and Ca uptake were determined by analyses of the one-time point measurements at 3 min (v_i) according to the Michaelis-Menten Eq. (2)

$$v_i = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} + K_D [S] \quad (2)$$

in which K_m and V_{\max} have their usual meaning (apparent affinity and maximal velocity of uptake, respectively), $[S]$ stands for the total concentration of Cd or Ca, and K_D represents all non-specific contributions to the 3-min uptake data.

The initial ($U_{[I]}$) uptake values of ^{109}Cd and ^{45}Ca as a function of increasing concentrations of inhibitory metals were analyzed according to Eq. (3),

$$U_{[I]} = \frac{U_{(0)}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} + K_D [T] \quad (3)$$

in which $U_{(0)}$ stands for the control uptake value (measured in the absence of unlabeled metal), K_i represents the concentration of the inhibitory metal for which half-maximal inhibition is observed (apparent K_i), $[I]$ represents the concentrations of the unlabeled inhibitory metal, $[T]$ is the concentration of tracer and K_D represents all non-inhibitable uptake component.

All uptake experiments were conducted in 3 to 5 replicates on 3 to 7 different cell preparations.

Nonlinear regression analyses were performed using Prism 3.0 software© 2001 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). The errors associated with kinetic parameters values given in the text represent the standard errors of nonlinear regression (SER). Statistical significance on the 5-min measurements were performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey-Kramer Highly Significant Difference (HSD) test ($\alpha = 0.05$). Statistical analyses were also done with the two-tailed Student t-test for unpaired data on small samples with Welch's correction or with the modified Dunnett Multiple Comparisons Test when appropriate. Statistical analyses were performed using InStat software © 2001 (GraphPad Software). Statistical significance was assessed at the $p < 0.05$ level.

4.4 Results

4.4.1 Time course of Cd and Ca uptake as a function of the inorganic metal speciation

We first estimated how much Cd and Ca are accumulated in rainbow trout adrenocortical cells. **Fig. 1A** shows the accumulation of 0.5 μM Cd in the nitrate (filled circles) and the chloride medium (open circles). The uptake time-course data over a 1-h exposure to Cd in both media were analyzed according to the first-order rate **Eq. (1)** (with $U_0 = 0$). Higher equilibrium accumulation value U_{max} was obtained in the nitrate medium (544 ± 25 vs. 464 ± 20 pmol/mg protein) but similar $t_{1/2}$ (~ 45 s) was estimated for both conditions. Uptake data measured in the serum-free culture medium MEM (inset) revealed much lower levels of Cd accumulation under organic exposure conditions compared to inorganic (either nitrate or chloride). These results suggest the existence of a preferential uptake mechanism for inorganic Cd species and possibly Cd^{2+} cation compared to CdCl_n^{2-n} . Because changing Cl^- for NO_3^- does not significantly modify Ca speciation, the uptake-time course of 0.5 mM Ca has been studied in a nitrate medium exclusively. Figure 1B shows that Ca is readily and significantly accumulated in the adrenocortical cells. Data analyses according to **Eq. (1)** revealed U_0 and U_{max} values of 9 ± 3 and 13.2 ± 3.1 nmol/mg protein, respectively, and a $t_{1/2}$ value around 20 min. Direct comparison between kinetic parameters values obtained for Cd and Ca uptake is difficult because of the much lower Cd level used in our studies. However, it appears clearly that total metal accumulation ratio $((U_0 + U_{\text{max}}) \text{ for Ca} / (U_{\text{max}}) \text{ for Cd})$ of about 40 is much lower than the concentration ratio $([\text{Ca}]/[\text{Cd}])$ of 1000), suggesting more efficient processes of accumulation for Cd compared with Ca.

4.4.2 Kinetic parameter of Cd and Ca accumulation

To further characterize Cd and Ca uptake, we have determined the kinetic parameters of the initial 3-min uptake of Cd ($0.5 \mu\text{M}$ ^{109}Cd + increasing levels of unlabeled Cd ranging from 0 to 100 μM) (**Fig. 2A**) and Ca ($2.5 \mu\text{Ci}$ $^{45}\text{Ca}/\text{ml}$ + unlabeled Ca concentrations ranging from 0 to 10 mM) (**Fig. 2B**) in the nitrate medium. Analyses of one-time point measurements according to **Eq. 2** gave the following parameter values: $V_{\text{max}} = 16 \pm 3.7$ and 11 ± 3.8 nmol/3min/mg protein; $K_m = 16 \pm 5.7 \mu\text{M}$ and 2 ± 1 mM; $K_D = 0.11 \pm 0.03$ and 0.78 ± 0.28 nmol/ μM /3min/mg protein for Cd and Ca uptake,

respectively. Although comparable V_{max} values were obtained, much higher affinity were estimated for Cd uptake compared to Ca (120-fold lower K_m value), whereas the non specific component was higher for Ca uptake. However, it is noteworthy that under nonsaturating conditions, the contribution of the nonspecific component ($K_D \times [S]$) to the total accumulation is about 10% for both Cd and Ca uptake.

4.4.3 Effects of channel blockers on Ca uptake

The impact of Ca channel blockers on the 5-min uptake of Ca has been tested under various experimental conditions using a nitrate exposure medium. As shown in **Fig. 3**, nifedipine, verapamil as well as lanthanum (La) failed to significantly inhibit Ca uptake, regardless of the presence of Na^+ (filled columns) or the presence of an excess of K^+ (dashed columns). Also, it is noteworthy that slightly higher uptake values were systematically obtained in the standard exposure medium compared to the K^+ medium. These results suggest that voltage-gated Ca channels do not contribute appreciably to Ca uptake in adrenocortical cells of rainbow trout. Also, Ca uptake is unlikely to involve La-sensitive uptake mechanism.

4.4.4 Cd and Ca reciprocal inhibition

Cd-Ca interaction for uptake have been tested by studying possible reciprocal inhibition on the initial 3-min uptake. Results obtained for Cd (**Fig. 4A**) and Ca (**Fig. 4B**) show a concentration-dependent reciprocal inhibition in the nitrate medium (filled circles). Data were analyzed according to **Eq. 3** with apparent K_i values of 0.9 ± 0.4 mM and 23 ± 17 μM for Cd and Ca uptake respectively. Therefore Ca concentration required to lower by half the initial 3-min uptake of only 0.5 μM Cd is 27-fold higher the half-inhibitory concentration of Cd for the 3-min uptake of 0.5 mM Ca.

Note that Ca failed to inhibit Cd uptake in the chloride medium where only 17% of Cd is present as Cd^{2+} (**Fig. 3A**, open circles), showing that Ca-Cd reciprocal inhibition is closely linked to metal speciation. These results suggest specific and exclusive inhibitory process of the uptake of Cd^{2+} but not CdCl_n^{2-n} , by Ca.

4.4.5 Effects of Zn on Cd and Ca uptake

Fig. 5A shows that the uptake of 0.5 μM Cd is inhibited by increasing concentrations of Zn but, in accordance with Fig. 1A, accumulation levels were always higher in the nitrate (filled circles) compared to the chloride medium (open circles). The data points obtained in both media were analyzed using Eq. 3 with the following values estimated in the nitrate and the chloride medium, respectively: $K_i = 0.7 \pm 1.1$ and 2.0 ± 1.0 μM , and $K_D = 648 \pm 25$ and 247 ± 21 $\text{pmol}/\mu\text{M}/5\text{min}/\text{mg}$ protein. These results reveal a 2.9-fold higher efficiency for Zn-induced inhibition of Cd uptake in the nitrate medium suggesting optimal inhibition of uptake of the free ion Cd^{2+} . Our results also reveal a 2.6-fold higher K_D value for Cd uptake in the nitrate medium, suggesting higher component of uptake insensitive to Zn under nitrate exposure conditions. Contrary to what have been observed for Cd uptake, increasing concentrations of Zn failed to modify the uptake of 0.5 mM Ca in a nitrate medium (Fig. 5B). Indeed, any uptake values measured in the presence of Zn were significantly different compared to the control value, suggesting that Zn does not interfere with Ca uptake in adrenocortical cells of the rainbow trout.

4.4.6 Effects of Zn on Cd and Ca reciprocal inhibition as a function of metal speciation

Potential additive inhibitory effects were tested using metal mixtures and results were compared to the inhibitory effect of unlabeled Cd or Ca used as specific inhibitors of ^{109}Cd and ^{45}Ca uptake, respectively. Therefore, in Fig. 6 uptake data are expressed relative to tracer exclusively. In accordance with previous results (Fig. 1A), the uptake of 0.5 μM ^{109}Cd was significantly higher in the nitrate medium (filled columns) compared to the chloride medium (dashed columns) (Fig. 6A). It is noteworthy, however, that 100 μM Cd had similar inhibitory effect regardless the medium used, demonstrating similar passive diffusion process in both media. In accordance with Fig. 4A, 5 mM Ca failed to inhibit ^{109}Cd uptake in the chloride medium but led to a small but significant 19% decrease when uptake measurements were conducted in the nitrate medium. Considering the K_m value estimated at ~ 15 μM (Fig. 2A), 100 μM Cd is expected to completely abolish the specific uptake of 0.5 μM ^{109}Cd ; i.e. tracer uptake measured in the presence of 100 μM Cd may be attributed to passive diffusion exclusively. Following correction of the uptake data for this nonspecific component of uptake, one may estimate that 5 mM Ca resulted in a 25% inhibition in the specific uptake of 0.5 μM ^{109}Cd in the nitrate medium.

Co-incubation with Ca and Cd led to similar levels of inhibition compared to Cd alone. Contrary to results shown in **Fig. 5A**, 100 μM Zn inhibited ^{109}Cd uptake only in the nitrate medium. Zn proved to be more efficient compared to Ca. The presence of Ca did not affect Zn-induced inhibition of ^{109}Cd uptake.

In accordance with **Fig. 2B** showing the involvement of a specific component in the accumulation of Ca, we found ^{45}Ca uptake to be highly sensitive to the presence of an excess of 5 mM unlabeled Ca. However, the nonspecific contribution to the total accumulation of ^{45}Ca was higher than previously estimated in **Fig. 2B**. Also, according to **Fig. 4B**, 100 μM Cd significantly decreased ^{45}Ca uptake by 1.5-fold. Co-incubation with Cd and Ca resulted in a maximal inhibitory effect similar to the Ca-induced inhibition, alone. According to **Fig. 5B**, Zn failed to affect ^{45}Ca uptake, and the inhibition observed under co-exposure with Zn and Ca may be attributed to Ca alone.

4.5 Discussion

In a previous study, we have shown that Cd is readily accumulated in adrenocortical cells of rainbow trout, with Cd^{2+} as well as CdCl_n^{2-n} both contributing to metal uptake (Raynal *et al.*, 2005). We now demonstrate that metal speciation significantly affects uptake processes: inorganic speciation conditions favoured both the rate and the level of metal accumulation compared to organic exposure conditions and optimal uptake levels were obtained in a nitrate medium optimizing $[\text{Cd}^{2+}]$ over chlorocomplex formation (Fig. 1). The present study, which was conducted at room temperature, reports much higher accumulation levels compared to our previous data obtained at 15 °C (Raynal *et al.*, 2005). Although 15 °C is expected to be optimal for enzyme and transport activities in teleost fish, differences in uptake levels may be related to temperature variation. This would further be supported by the observation of an equilibrium of accumulation reached within minutes in the present study, whereas accumulation did not plateau for the 1-h exposure period when conducted at 15 °C (Raynal *et al.*, 2005).

For the first time, we have characterized Ca uptake in isolated adrenocortical cells of rainbow trout. As for Cd, Ca uptake involved a specific mechanism of uptake but accumulation process for Ca were found much less efficient compared to Cd (Fig. 1) with a 135-fold lower affinity (Fig. 2). Note that the lower accumulation ratio ($U_0+U_{max}/[\text{Ca}]$) estimated for Ca uptake in Fig. 1 compared to Cd cannot be attributed to saturation; both

Ca and Cd concentrations were far below their respective K_m value. Ca uptake was further studied using various channels blockers. We found Ca uptake to be insensitive to the presence of an excess of extracellular K^+ which should readily collapse membrane potential. Also, voltage-gated Ca channels as well as La-sensitive non specific cationic channels are unlikely to be involved in Ca uptake in adrenocortical cells of rainbow trout (Fig.3). However, sufficient data support the involvement of such channels in Ca uptake in steroidogenic cells. Extracellular K^+ has been shown to stimulate corticosteroids production in the presence of Ca in bovine fasciculata cells (Yanagibashi *et al.*, 1990). This stimulation was inhibited by nifedipine. Interestingly, in this study the authors failed to reveal similar effect in rat fasciculata cells. Numerous other studies have demonstrated nifedipine- as well as verapamil-inhibited steroidogenesis in bovine adrenocortical cells (Yanagibashi *et al.* 1990, Burnay *et al.* 1994, Dupré-Aucouturier *et al.*, 2002). Similarly, ACTH and pregnenolone (PREG)-stimulated cortisol secretion in rainbow trout adrenocortical cells was found to be inhibited by nicardipine (Lacroix and Hontela, 2006). On the other hand, non-voltage gated Ca channels may also be involved since La^{3+} has been shown to inhibit both cAMP and corticosterone production in isolated bovine adrenal cortex cells in response to ACTH (Haksar *et al.*, 1976, Coyne *et al.*, 1997). In addition, there is some evidence for the involvement of thapsigargin-stimulated store-operated Ca channels in steroidogenesis in bovine adrenocortical fasciculata cells (Ebisawa *et al.*, 2000).

Contrary to mammals, steroidogenic cells in fish are dispersed throughout the adrenal tissue which also includes chromaffin and immune cells. Because of the resulting mixed cell preparation, the present data cannot be attributed to steroidogenic cells exclusively but rather should be interpreted in term of adrenal tissue as a target organ. Indeed, from a toxicokinetic point of view, metal availability to the adrenal tissue is relevant. For the first time we show reciprocal inhibition between Cd and Ca for accumulation in this target tissue (Fig. 4). Moreover, our speciation studies reveal the exclusive involvement of the free cation Cd^{2+} in this inhibitory process: clearly Cd^{2+} is able to modify Ca^{2+} uptake through cationic channels. Therefore, Cd may lower Ca availability to adrenocortical cells. Whether this lower availability may result in an impaired cortisol secretion needs to be verified. However, and regardless of Cd-Ca competition for uptake in the steroidogenic cells per se, significant lower Ca availability to the adrenocortical tissue is expected to affect Ca uptake in the steroidogenic cells. It is

noteworthy that Cd would not completely abolish Ca accumulation since the non-inhibitable component of Ca uptake (related to parameter K_D in Eq. 3) is higher compared to the non-specific component of total uptake (related to K_D in Eq. 2). Similar conclusion holds for the inhibition of Cd uptake by Ca.

In addition to Cd, Zn has also been shown to impair cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout *in vitro* (Leblond and Hontela, 1999). Here we show that, contrary to Cd, Zn does not affect Ca uptake in these cells (Fig. 5). Zn is an essential element and Zn uptake through Ca channel has never been reported. Therefore, Cd, but not Zn, could affect Ca homeostasis in the adrenal tissue of rainbow trout. However, Zn did inhibit partially Cd uptake; the part of Cd accumulation sensitive to Zn may be related to transport mechanism insensitive to Ca. This conclusion is further supported by the observation of additional effect of Zn on Ca-induced inhibition of Cd uptake (Fig. 6A).

In conclusion, we have demonstrated that Cd uptake in adrenocortical cells of rainbow trout is optimal under inorganic speciation conditions. For the first time our results reveal that Cd, but not Zn, may decrease Ca availability to the adrenal tissue. They also demonstrate that Zn may partially protect against Cd toxicity by lowering Cd accumulation. However, because Zn and Ca seem to affect different components of Cd uptake, Zn would not protect against Cd-induced perturbation of Ca homeostasis.

4.6 References:

- Alabaster, J.S., Lloyd, R. (1982). *Water Quality Criteria for Freshwater Fish*. Butterworths, London.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 :248-254.
- Burnay, M., Python, C.P., Vallotton, M.B., Capponi, A.M., Rossier, M.F. (1994). Role of the capacitative calcium influx in activation of steroidogenesis by angiotensin-II in adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology*. 135: 751-758.
- Chowdhury, M.J., Baldisserotto, B., Wood, C.M.(2005).Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in rainbow trout chronically acclimated to waterborne or dietary cadmium. *Arch Environ Contam Toxicol*. 48(3):381-90.
- Coyne MD, Rodriguez O, Wilson Y, Wang G, Lemos JR. (1997). Voltage dependent calcium and potassium currents in Y-1 adrenocortical cells are unresponsive to ACTH. *Endocr Res*. 23(4):245-75.
- Dupré-Aucouturier, S., Penhoat, A., Rougier, O., Bilbaut A. (2002). ACTH-induced Cl^{-} current in bovine adrenocortical cells: correlation with cortisol secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 282(2):E355-65.
- Ebisawa, T., Kondo, I., Masaki, E., Hori, S., Kawamura, M. (2000). Capacitative calcium entry is involved in steroidogenesis in bovine adrenocortical fasciculata cells. *J Endocrinol*. 167(3):473-8.
- Gallo-Payet, N., Payet, M.D. (2003). Mechanism of action of ACTH : Beyond cAMP. *Micro. Res. Tech*. 61 : 1-12.
- Haksar, A., Maudsley, D.V., Peron, F.G., Bedigian, E. (1976). Lanthanum: inhibition of ACTH-stimulated cyclic AMP and corticosterone synthesis in isolated rat adrenocortical cells. *J Cell Biol*. 68(1):142-53.
- Hansen, J.A., Welsh, P.G., Lipton, J., Cacula, D., Dailey, A.D. (2002). Relative sensitivity of Bull trout (*Salvelinus confluentus*) and Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to acute exposures of cadmium and zinc. *Environ. Toxicol. Chem*. 21: 67-75.
- Hollis, L., Hogstrand, C., Wood, C.M. (2001). Tissue-specific cadmium accumulation, metallothionein induction, and tissue zinc and copper levels during Chronic Sublethal Cadmium Exposure in Juvenile Rainbow Trout. *Arch. Environ. Contam Toxicol*. 41: 468-474.
- Hontela, A., Dumont, P., Duclost, D., Fortin, R. (1995). Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence river. *Environ. Toxicol. Chem*. 14(4) : 725-731.

- Hontela, A. (1998). Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites : in vivo and in vitro assesment. *Environ. Toxicol. Chem. Annual Review*. 17(1) : 44-48.
- Jumarie, C., Fortin, C., Houde, M., Campbell, P.G.C., Denizeau, F. (2001). Cadmium uptake by Caco-2 Cells : effects of Cd complexation by chloride, glutathione and phytochelatins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 170 : 29-38.
- Kraemer, L.D., Campbell, P.G., Hare, L. (2005). Dynamics of Cd, Cu and Zn accumulation in organs and sub-cellular fractions in field transplanted juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Environ. Pollut.* 138(2): 324-337.
- Lacroix A., Hontela, A. (2006). Role of calcium channels in cadmium-induced toxicity in interrenal cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.* Submitted.
- Lacroix A, Hontela A. (2004) A comparative assessment of the adrenotoxic effects of cadmium in two teleost species, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* and yellow perch, *Perca flavescens*, *Aquatic Toxicology* 67(1): 13-21.
- Lacroix, M., Hontela, A. (2001). Regulation of acute cortisol synthesis by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C in a teleost species, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Journ. Endocr.* 169 : 71-78.
- Laflamme, J.S., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Hontela, A. (2000). Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, and Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes. *Can. J. Fish, Aquat. Sci.* 57 : 1692-1700.
- Leblond V, Hontela, A. (1999). Effects of in Vitro Exposures to Cadmium, Mercury, Zinc and 1-(2-Chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane on Stereoidogenesis by Dispersed Interrenal Cells of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 157 : 16-22.
- Le Guével, R., Petit, F.G., Le Goff, P., Métivier, R., Valotaire, Y., Pakdel, F. (2000). Inhibition of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Estrogen Receptor Activity by Cadmium. *Biol. Reprod.* 63 : 259-266.
- Levesque, H.M., Moon, T.W., Campbell, P.G.C., Hontela, A. (2002). Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aqua. Toxicol.* 60 : 257-267.
- Levesque, H.M., Dorval, J., Hontela, A., Van Der Kraak, G.J., Campbell, P.G.C. (2003). Hormonal, morphological, and physiological responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to chronic environmental metal exposures. *J. Toxicol. Environ. Health.* 66(7) : 657-676.
- Martell, A.E., Smith, R.M., Motekaitis, R.J. (2001). NIST Standard Reference Database 46. Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes. U.S. Department of Commerce, Gaithersbrug, MD. Version 6.0.

- Norey, C.G., Brown, M.W., Cryer, A., Kay, J. (1990). A comparison of the accumulation, tissue distribution and secretion of cadmium in different species of freshwater fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 96C(1) : 181-184.
- Olsson, P.E. (1993). Metallothionein gene expression and regulation in fish, In, *Biochemistry and molecular biology of fishes, vol. 2*, édité par Hochachka et Mommsen. Elsevier Science Publishers B.V., pp. 259-278.
- Pinot, F., Kreps, S.E., Bachelet, M., Hainaut, P., Bakonyi, M., Polla, B.S. (2000). Cadmium in the environment : sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers *Reviews on Environ. Health.* 15 : 299-323.
- Raynal, N.J., Hontela, A., Jumarie, C. (2005). Cadmium uptake in isolated adrenocortical cells of rainbow trout and yellow perch. *Comp. Biochem. Physiol.* 140 (3-4): 374-382.
- Schecher, W.D., McAvoy, D. (1994). MINEQL⁺ : A Chemical Equilibrium Program for Personal Computers. Version 3.01. Environ. Research Software, Hallowell, ME.
- Sorensen, E.M. (1991). Cadmium In, *Metal Poisoning in Fish*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 175-234.
- Verboost, P.M., Flik, G., Lock, R.A.C., Wendelaar Bonga, S.E. (1988). Cadmium inhibits plasma membrane calcium transport, *J. Membrane Biol.*; 102 : 97-104.
- Vétilard, A., Bailhache, T. (2005). Cadmium: an endocrine disrupter that affects gene expression in the liver and brain of juvenile rainbow trout. *Biol Reprod.* 72(1):119-26.
- Yanagibashi, K., Kawamura M., Hall, P.F. (1990). Voltage-dependent Ca²⁺ channels are involved in regulation of steroid synthesis by bovine but not rat fasciculate cells. *Endocrinology.* 127: 311-318.
- Zhang, L., Wang, W.X. (2005). Effects of Zn pre-exposure on Cd and Zn bioaccumulation and metallothionein levels in two species of marine fish. *Aquat Toxicol.* 73(4):353-69.

Legends to figures

Figure 1: Time-course of the accumulation of 0.5 μM Cd (**A**) and 0.5 mM Ca (**B**) in adrenocortical cells of rainbow trout in a nitrate (filled circles) or a chloride medium (open circles). Points shown are means \pm SD evaluated on 3 determinations of the same cell preparation (A: 6 to 7 fishes, B: 4 fishes). The lines shown are the best-fit curves over data points obtained according to **Eq. (1)**. Inset in (**A**): Time-course of the accumulation of 0.5 μM Cd in the serum-free MEM medium. Points shown are means \pm SD evaluated on 3 determinations of the same cell preparation (3 fishes).

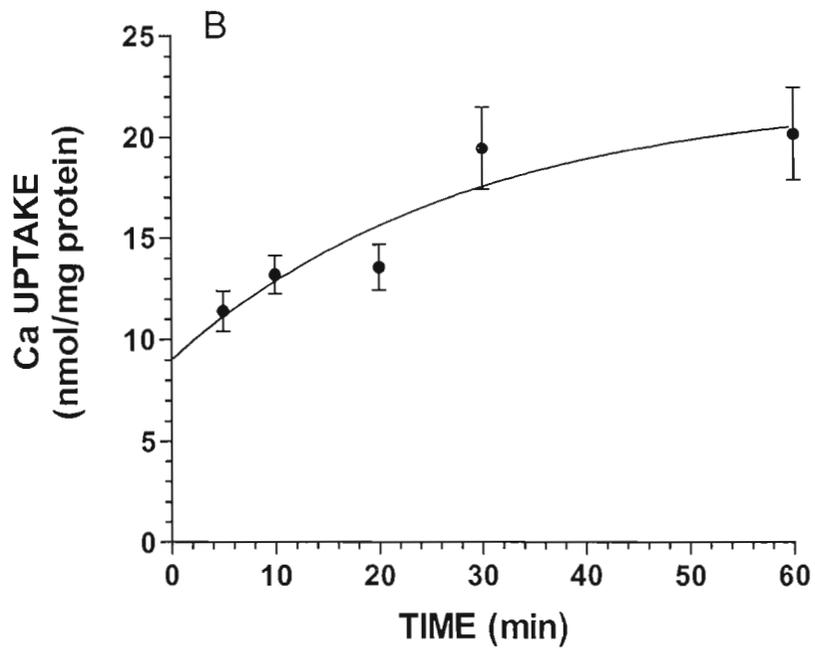
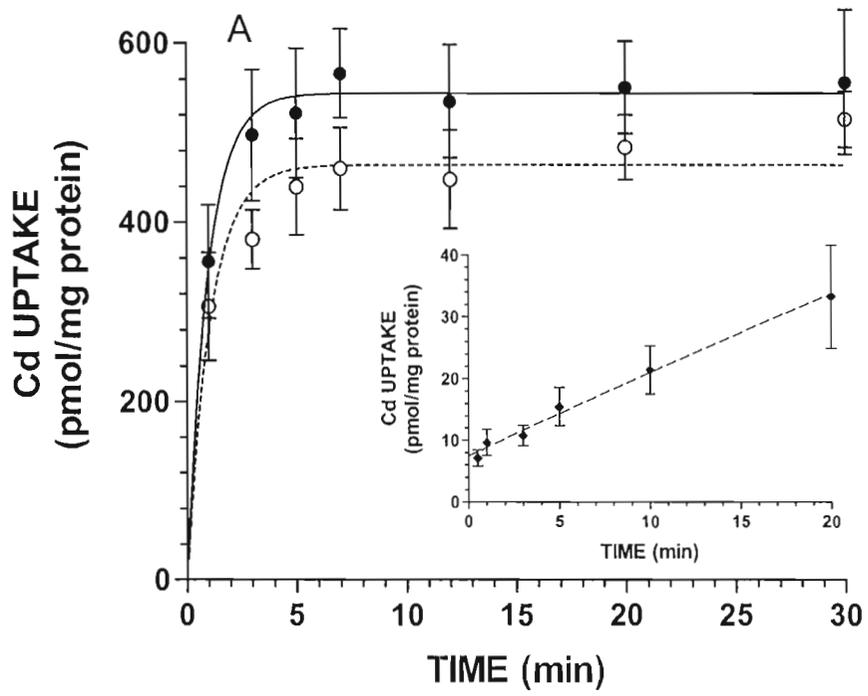
Figure 2: Determination of kinetic parameters for Cd (**A**) and Ca (**B**) uptake in adrenocortical cells of rainbow trout in a nitrate medium. Initial uptake values were estimated at 3 min using a fixed ^{109}Cd concentration of 0.5 μM and unlabeled Cd concentrations ranging from 0 to 100 μM (**A**) or 2.5 μCi $^{45}\text{Ca}/\text{ml}$ and unlabeled Ca concentrations ranging from 0 to 10 mM (**B**). The lines shown are the best-fit curves over data points obtained according to **Eq. (2)**. Values shown are means \pm SD evaluated on 3 determinations of the same cell preparation (4 fishes) (**A**) or on 4 determinations of the same cell preparation (6 fishes) (**B**).

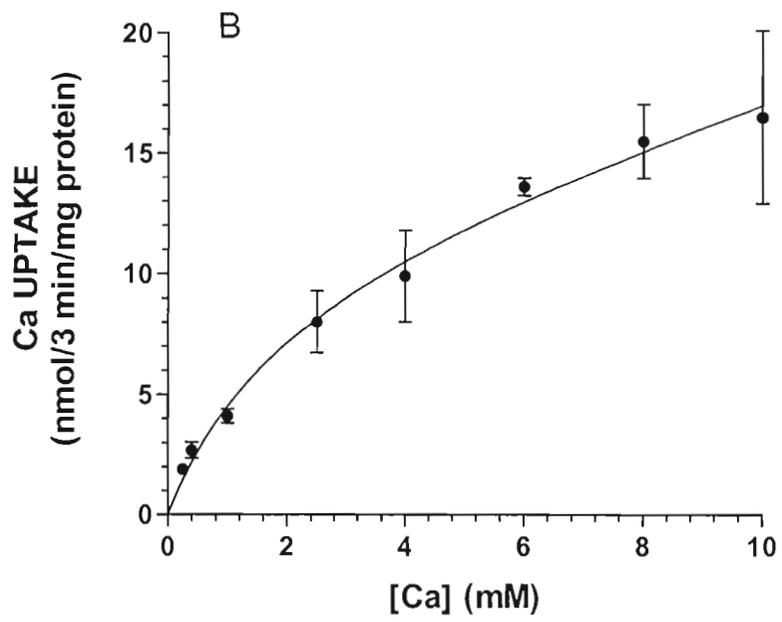
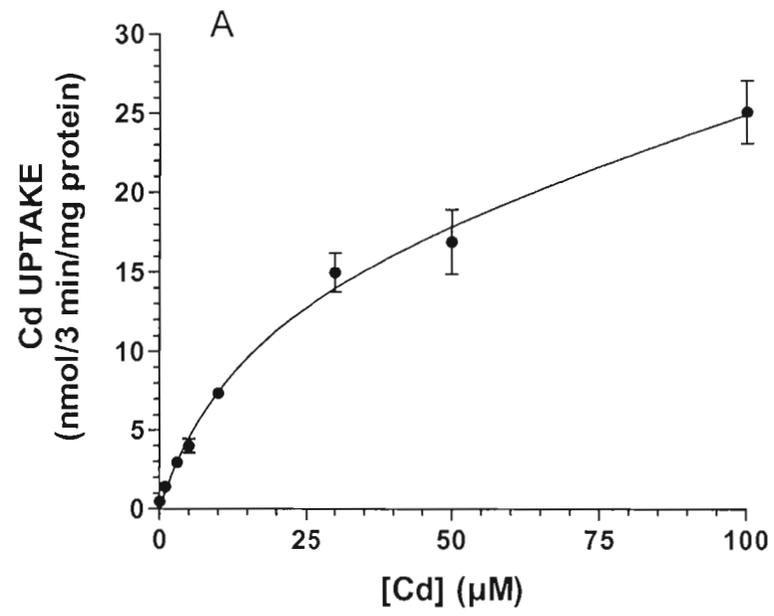
Figure 3: Short term (5 min) accumulation of 0.5 mM Ca in adrenocortical cells of rainbow trout measured in the presence of 10 μM nifedipine, 10 μM verapamil or 10 μM lanthanum in the nitrate medium. Experiments were conducted in a standard sodium (113 mM Na^+) (filled columns) or in a Na^+ -free potassium (147 mM K^+) exposure medium (dashed columns). In the last case, cell suspensions were also preincubated in the nitrate K^+ medium for 15 min prior to uptake measurements. Values shown are means \pm SD evaluated on 3 determinations of the same cell preparation (5 fishes).

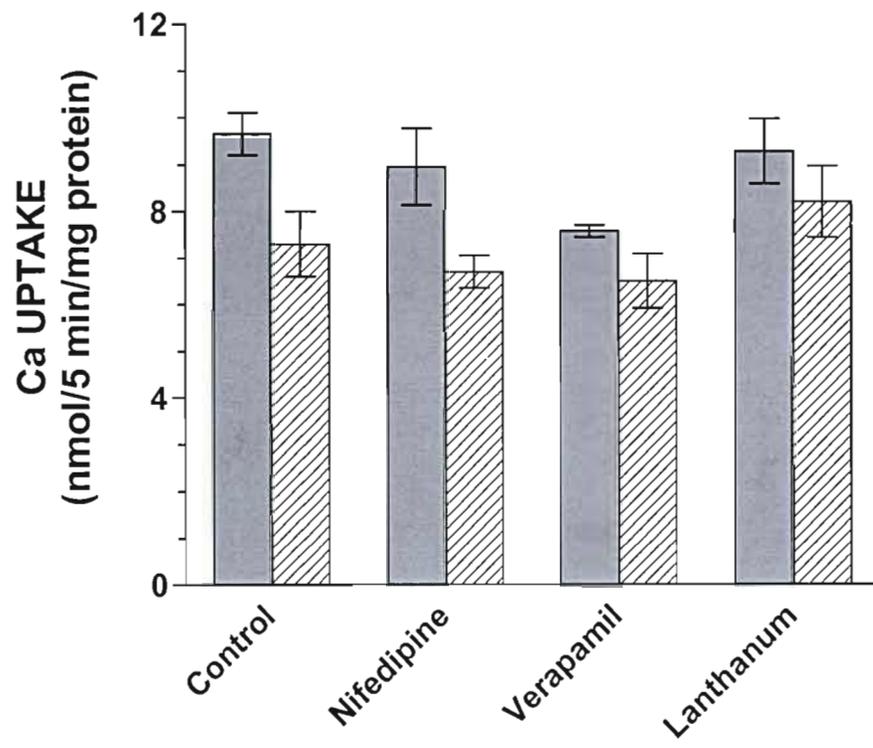
Figure 4: Short term (3 min) accumulation of 0.5 μM Cd (**A**) and 0.5 mM Ca (**B**) in adrenocortical cells of rainbow trout in the nitrate (filled circles) or the chloride medium (open circles) as a function of increasing concentrations of Ca (**A**) or Cd (**B**). The lines shown are the best-fit curves over data points obtained under nitrate conditions according to **Eq. (3)** with the following apparent constant of inhibition: $K_i = 0.9 \pm 0.4$ mM (**A**), and $K_i = 23 \pm 17$ μM (**B**). Points shown are means \pm SD evaluated on 4 determinations of the same cell preparation (6 to 7 fishes in **A**; 6 fishes in **B**).

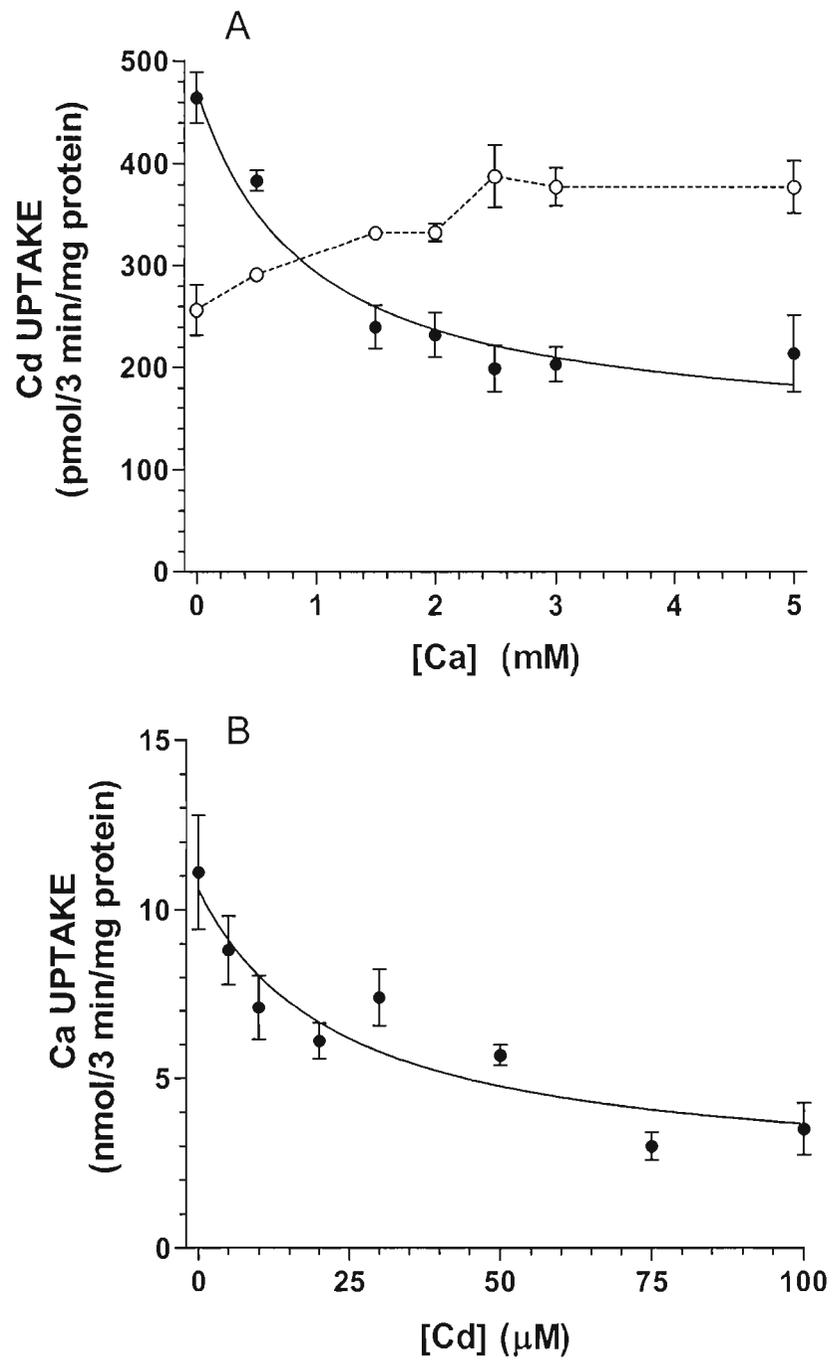
Figure 5: Short term (5 min) accumulation of $0.5 \mu\text{M}$ Cd (**A**) or 0.5 mM Ca (**B**) in adrenocortical cells of rainbow trout in the nitrate (filled circles) or the chloride medium (open circles) as a function of increasing concentrations of Zn. The lines shown in A) are the best-fit curves over data points obtained according to **Eq. (3)** with the following apparent constant of inhibition: $K_i = 2.0 \pm 1.0$ and $0.7 \pm 1.1 \mu\text{M}$ in the chloride and the nitrate medium, respectively (A). Points shown are means \pm SD evaluated on 4 determinations of the same cell preparation (6 fishes in **A**; 3 fishes in **B**).

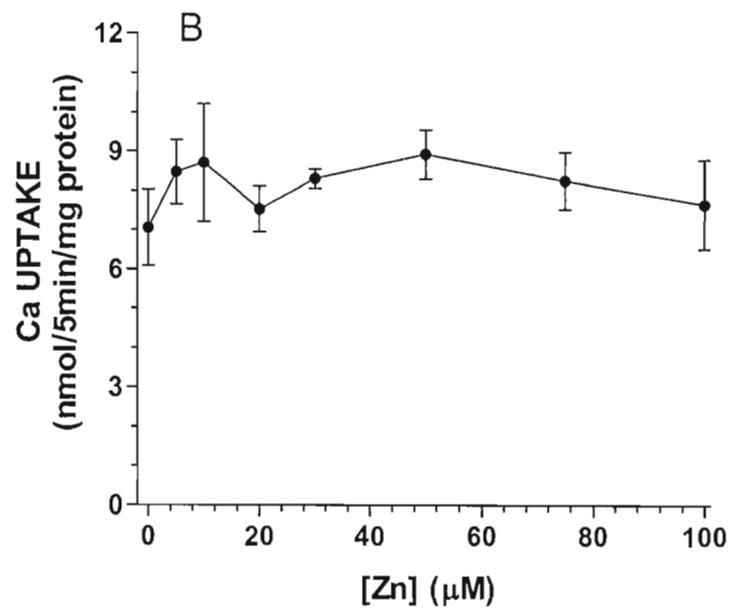
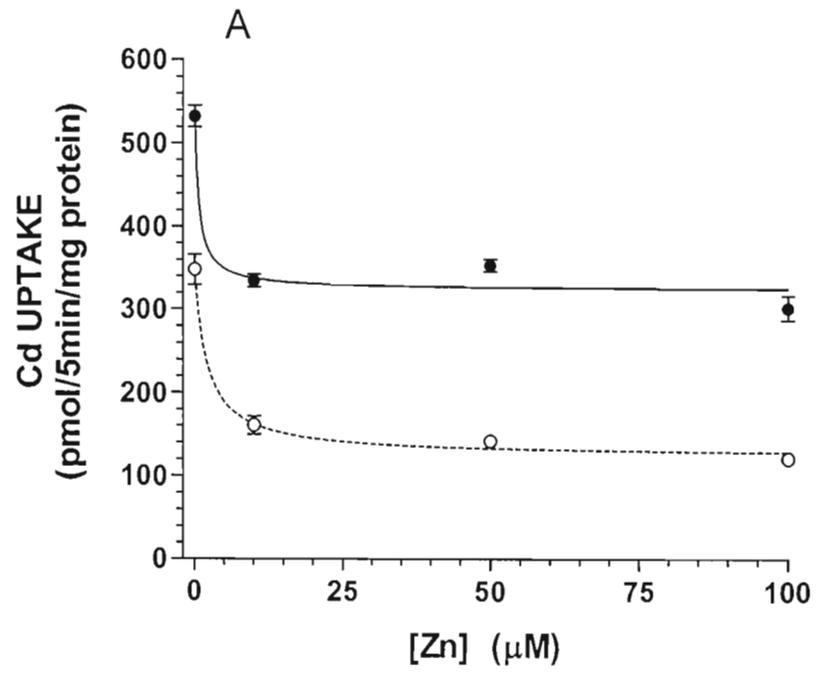
Figure 6: Short term (5 min) accumulation of $0.5 \mu\text{M}$ ^{109}Cd (**A**) or 0.5 mM ^{45}Ca ($2.5 \mu\text{Ci}$ $^{45}\text{Ca}/\text{ml}$) (**B**) in adrenocortical cells of rainbow trout measured in the chloride (dashed columns) or the nitrate medium (filled columns), in the absence (Ctrl) or in the presence of 5 mM Ca, $100 \mu\text{M}$ Cd or $100 \mu\text{M}$ Zn, added alone or in various combinations. Values shown are means \pm SD evaluated on 3 determinations of the same cell preparation (3 to 7 fishes in **A**; 4 fishes in **B**). *Significant differences ($p \leq 0.05$) compared with the appropriate control value. δ Significant differences ($p \leq 0.05$) compared with chloride medium under the same experimental conditions. Columns labelled with different letters (for the same exposure medium) are significantly different ($p = 0.05$).

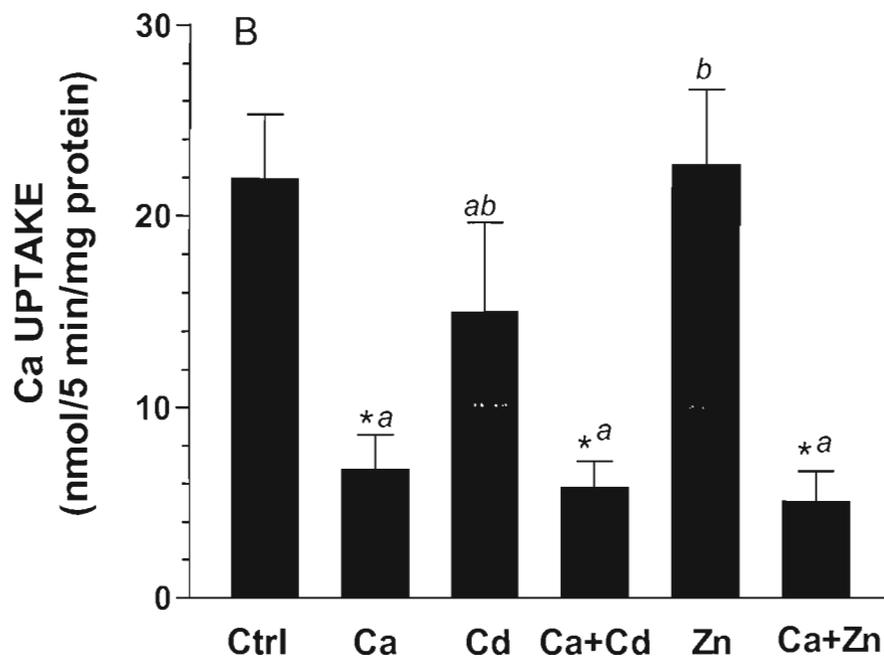
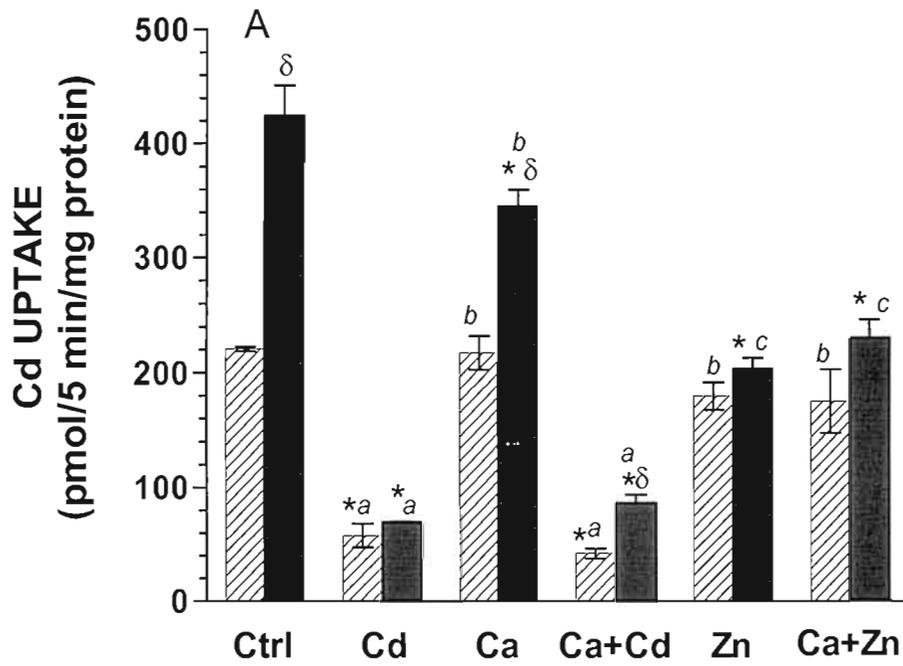












CHAPITRE V:

DISCUSSION

Ce projet de recherche est en continuité avec le projet de Raynal *et al.*, (2005) développé dans le laboratoire du Dr Catherine Jumarie. À partir de ces travaux, il a été possible d'élaborer de nouveaux objectifs afin de pousser plus à fond l'étude du transport de Cd dans le tissu interrénal et d'élucider certains aspects qui n'avaient jusqu'à maintenant jamais été explorés chez la truite arc-en-ciel. Rappelons que la problématique de recherche a initialement été développée en collaboration avec l'équipe du Dr Alice Hontela experte en toxicologie endocrinienne chez les organismes aquatiques. À partir des données recueillies *in vivo* et *in vitro*, il a été possible de circonscrire précisément une problématique.

5.1 Retour sur les objectifs de recherche

5.1.1 1^{er} objectif : Caractériser le transport de Ca dans la cellule adrénocorticale de truite arc-en-ciel.

Dans le cadre de cet objectif, et en parallèle avec les données déjà connues sur l'accumulation de Cd dans la cellule adrénocorticale, nous avons procédé en deux étapes. Premièrement, nous avons voulu voir si le Ca s'accumulait dans la cellule adrénocorticale en fonction du temps. Nous avons réussi à démontrer qu'effectivement, le Ca, comme le Cd, s'accumule en fonction du temps selon une mono-exponentielle croissante et que l'accumulation calcique semble tendre vers un équilibre après une période de soixante minutes. Deuxièmement, nous avons étudié l'accumulation sur une courte période de temps et avons ainsi révélé la présence d'un intercept non nul sur l'axe des y à $t = 0$ pouvant représenter une accumulation initiale très rapide de Ca.

Pour approfondir cet objectif de recherche et afin de mieux caractériser le mécanisme d'entrée du Ca dans les cellules adrénocorticales, nous avons décidé d'utiliser différents

bloqueurs de canaux calciques et de voir leurs effets sur le processus de transport membranaire étudié en conditions de linéarité d'accumulation (conditions dites zéro-trans). Les résultats obtenus ne supportent pas l'idée d'une contribution importante de canaux calciques voltage-dépendants ou sensibles au La dans l'accumulation de Ca dans le tissu interrénal. Étant donné la nature diffuse du tissu avec lequel nous travaillons et l'hétérogénéité de la préparation tissulaire comportant très peu de cellules stéroïdogéniques, l'observation de canaux voltage dépendants propre aux cellules endocrines est peu probable. Nous reviendrons sur ce point un peu plus loin. Cependant, il est important de se souvenir que l'existence de canaux calciques dans la cellule stéroïdogénique, productrice de cortisol, a été démontrée par des travaux antérieurs (Lacroix et Hontela, 2006).

Finalement, nous avons décidé de comparer les résultats d'accumulation cellulaire de Ca avec ceux obtenus pour le Cd. Il est important de noter que les études d'accumulation cellulaire de Cd ont été faites en fonction de la spéciation pour les raisons expliquées plus haut dans le présent mémoire. Ces résultats démontrent que les conditions d'exposition favorisant la formation de l'aqua-ion par rapport à celle des chlorocomplexes mènent à des niveaux d'accumulation cellulaire de Cd plus élevés. Quand on compare ces niveaux à ceux obtenus pour le Ca, on peut clairement observer une accumulation cellulaire supérieure de Cd en fonction du temps. Ainsi, le transport de Cd étant plus efficace, il est raisonnable de penser que même à de très faibles niveaux, le Cd peut être en partie responsable d'une diminution de l'influx calcique dans la cellule adrénocorticale.

Ainsi, toutes ces démarches nous ont permis de rencontrer le premier objectif et de mieux caractériser le transport de Ca dans le tissu adrénocortical de truite arc-en-ciel.

5.1.2 2^e objectif : Étudier les inhibitions réciproques possibles Cd/Ca pour le transport dans la cellule adrénocorticale et ses effets sur l'homéostasie calcique.

Nous avons pu déterminer que le Ca s'accumule dans les cellules adrénocorticales. Parallèlement, nous avons pu constater que le Cd s'accumule également dans le tissu adrénocortical. Ainsi, l'étape suivante consistait à voir si ces deux métaux pouvaient s'inhiber réciproquement lorsqu'on mesurait le transport de l'un en présence de l'autre. En premier lieu, nous avons voulu tester les effets du Ca sur le transport de Cd et avons constaté que l'accumulation cellulaire de Cd est inhibée dans des conditions favorisant la

formation de l'ion libre et ce, en fonction de concentrations croissantes de Ca. Par la suite, nous avons répété la même expérience mais cette fois-ci en voulant caractériser les effets du Cd sur l'accumulation cellulaire de Ca. Encore une fois, nous avons pu clairement établir que l'accumulation de Ca est inhibée par des concentrations croissantes de Cd. Ainsi, nous pouvons conclure qu'il existe effectivement une inhibition réciproque entre le Cd et le Ca pour le transport dans les cellules adrénocorticales et que celle-ci peut avoir un effet sur l'homéostasie calcique. De fait, si des ions Cd^{2+} se substituent au Ca^{2+} ou bloquent tout simplement l'accès du Ca^{2+} au système de transport, il y aura certainement une interférence avec l'influx calcique cellulaire. Cette interférence pourra se traduire de différentes façons en affectant les voies de signalisation intracellulaires.

5.1.3 3^e objectif : Identifier les synergies ou antagonismes possibles entre le Ca, le Zn et le Cd sur l'accumulation cellulaire.

Dans nos travaux de recherche, nous nous sommes penchés sur la notion de mélange de métaux en solution et l'effet que ceux-ci peuvent avoir sur l'accumulation de Ca dans la cellule adrénocorticale. Il a déjà été clairement démontré que le Cd s'accumule dans le tissu adrénocortical et qu'il peut avoir un impact négatif sur la sécrétion de cortisol (Hontela *et al.*, 1996, Lacroix et Hontela, 2004, Raynal *et al.*, 2005). De plus, Leblond et Hontela (1999) ont démontré que le Zn peut également interférer directement avec la sécrétion de cortisol par les cellules stéroïdogéniques de poissons. Nos travaux démontrent que, contrairement au Cd, le Zn n'a aucun impact sur l'accumulation cellulaire de Ca. Ainsi, il est possible de conclure, en réponse au troisième objectif, que le Cd peut effectivement interférer avec l'influx calcique et de ce fait perturber la voie de signalisation menant à la sécrétion de cortisol, mais qu'aucun effet additif n'est noté en présence de Zn. Puisque le Zn ne semble pas affecter l'entrée de Ca dans la cellule, on peut supposer que son action sur la sécrétion de cortisol se situe à une étape en aval ou en amont de celle de l'influx calcique.

Il est intéressant de noter que notre recherche révèle que le Zn inhibe à la fois le transport du Cd sous forme d'ion libre et de chlorocomplexes dans les cellules adrénocorticales. Ainsi, on peut conclure que le transport de Cd implique des voies d'entrée différentes, certaines sensibles au Ca, d'autres au Zn. Il est logique de penser que des éléments essentiels tels que le Zn et le Ca bénéficient de transporteurs spécifiques pour leur entrée dans la cellule et que, de façon générale, ces transporteurs se distinguent

les uns des autres afin de mieux conserver une homéostasie intracellulaire. Le Cd a donc l'opportunité d'emprunter ces deux voies d'entrée et peut donc avoir un impact direct sur l'homéostasie cellulaire.

Finalement, il est important de se rappeler que dans un contexte *in vitro*, il est plus facile de contrôler les divers facteurs pouvant moduler une réponse (et une perturbation) cellulaire. Cependant, il ne faut pas oublier que *in vivo*, tous ces éléments agissent conjointement et que plusieurs facteurs externes peuvent influencer sur le résultat final et qu'une situation *in vitro* ne reproduit jamais complètement une situation *in vivo* dans sa globalité.

Ainsi, en réponse aux trois objectifs de cette recherche nous pouvons conclure que l'accumulation de Cd inorganique dans les cellules adrénocorticales de truite arc-en-ciel implique un ou des systèmes spécifiques pouvant transporter l'aqua-ion et les chlorocomplexes et qu'une diminution de la sécrétion de cortisol induite par le Cd pourrait être, du moins en partie, expliquée par une diminution de la disponibilité du Ca aux cellules stéroïdogéniques présentes à l'intérieur du tissu interrénal. De plus, nous savons maintenant que le Zn peut diminuer l'accumulation de Cd dans le tissu interrénal sans toutefois nécessairement préserver l'homéostasie calcique des méfaits du Cd puisque différents systèmes semblent être impliqués dans les interactions Cd-Zn d'une part et Cd-Ca, d'autre part.

5.2 *Retour sur l'approche scientifique*

5.2.1 *Originalité de la technique*

La technique mise au point par Raynal *et al.*, (2005) pour mesurer le transport membranaire de Cd dans les cellules du tissu interrénal a fait l'objet de certaines modifications dans le cadre du présent projet de recherche. En premier lieu, nous avons éprouvé plusieurs difficultés avec le système de filtration sur microplaque. Effectivement, au tout début de notre étude, dans sept manipulations sur une série de dix, nous avons observé un arrêt de filtration dans les puits qui semblaient être saturés par une trop grande densité cellulaire. Nous avons donc décidé de passer de 4 millions de cellules par puits à 2,5 millions de cellules par puits. Malheureusement, le problème a persisté et nous avons dû envisager une autre solution, notamment à cause du faible rapport signal-bruit

résultant d'une diminution de densité cellulaire. Il est évident que le système sur microplaque comportait certains avantages, notamment, l'obtention parallèle de 5 réplicats pour un même temps d'exposition. Cependant, cet avantage était contré par la perte de matériel, dont les préparations cellulaires, et la perte de temps résultant d'essais de moins en moins concluants. Nous avons donc décidé de mettre au point une technique de filtration à filtre unique. Ceci offrait l'avantage d'une plus grande pression de filtration (et donc d'efficacité de l'étape d'arrêt) ainsi que d'une plus grande surface de filtre (augmentant du coup et le nombre de cellules et la sensibilité des mesures). Évidemment, le remaniement de la technique a nécessité plusieurs mises au point concernant la quantité de cellules par filtre et le niveau de reproductibilité. Après plusieurs essais, nous avons fixé à 5 millions de cellules par filtre le nombre optimal sans observer aucune difficulté quant à l'étape de filtration. La reproductibilité nous a été confirmée d'un réplicat à l'autre: seulement 3 à 5 réplicas par expérience se sont avérés suffisants tandis que 5 expériences indépendantes ont systématiquement été entreprises. De plus, toutes les manipulations ont été effectuées par la même personne. Ceci s'est avéré être la formule gagnante puisqu'après plus de quatre-vingt manipulations, nous avons pu utiliser presque la totalité des résultats obtenus dans le cadre de ce projet.

Nous avons également apporté certains autres changements à la technique initiale. Notamment, nous avons décidé de travailler à température pièce plutôt qu'à 15°C même si cette température est plus proche de la température physiologique des truite arc-en-ciel et donc généralement considérée comme optimale pour certaines réactions enzymatiques de l'espèce. La raison de notre choix repose d'abord et avant tout sur des problèmes méthodologiques. Il était physiquement difficile de conserver les échantillons à une température de 15°C pendant la digestion cellulaire et pendant le transport membranaire. Ainsi, nous avons dû faire le choix de conserver nos échantillons à température pièce (celle-ci variait entre 18 et 20°C). Cependant, les résultats obtenus ne diffèrent pas qualitativement de ceux observés dans les travaux de recherche antérieurs. Comme discuté dans l'article, ce qui est plus notable est une différence dans les niveaux d'accumulation (supérieurs à température pièce) et la rapidité avec laquelle l'équilibre d'accumulation est atteint dans le cadre de certaines manipulations.

5.2.2 *Modèle cellulaire*

Il est évident que le travail avec des animaux apporte toujours un degré de difficulté différent de celui de travailler avec une lignée cellulaire. Les truites arc-en-ciel gardées en captivité dans un bassin font face à certaines situations pouvant modifier leur croissance, leur prise de poids et leur niveau de stress. Cependant, nous avons essayé tout au long de cette étude de procéder au prélèvement du tissu interrénal sur des animaux qui étaient semblables physiquement (poids, longueur) afin de maximiser le degré de reproductibilité.

L'autre niveau de difficulté consiste dans la préparation cellulaire elle-même. En effet, le tissu interrénal chez le poisson est composé de différentes sous-population cellulaires dont les cellules stéroïdogéniques, les cellules immunitaires et les cellules chromaffines. Dans le cadre de ce projet de recherche, des mesures de sécrétion de cortisol, propres aux cellules stéroïdogéniques exclusivement, n'ont pas été effectuées. Ceci a été fait par l'équipe du Dr Hontela. Ainsi donc, nos résultats doivent être interprétés en terme d'accumulation au tissu interrénal pris dans sa globalité; il nous est impossible de préciser dans quelle mesure les phénomènes observés sont spécifiques aux cellules stéroïdogéniques ou révèlent des propriétés des cellules adrénocorticales dans leur ensemble. Toutefois, dans le cadre d'une approche toxicocinétique, le modèle utilisé est adéquat puisque les cellules stéroïdogéniques sont disséminées à l'intérieur du tissu interrénal et que la disponibilité d'une substance à ces cellules est tributaire de la disponibilité globale au tissu. Ainsi, si l'on peut observer l'accumulation de contaminants tels que le Cd dans ce tissu, nous pouvons supposer que la stéroïdogénèse sera éventuellement compromise.

5.2.3 *Analyses en cytométrie de flux (FACS)*

Afin de mieux élucider les interactions possibles entre le Cd, le Zn et le Ca dans les cellules adrénocorticales de truite arc-en-ciel, nous avons étudié les changements de concentrations intracellulaires en Ca en utilisant la technique de cytométrie en flux et la sonde Fluo3 spécifique au Ca. Cette sonde, en se couplant aux ions Ca devient fluorescente ce qui permet l'observation et la mesure de l'activité calcique selon les niveaux de fluorescence observés dans les cellules. De plus, nous avons également décidé d'investiguer plus en profondeur l'effet des bloqueurs de canaux calciques sur l'influx de

Ca dans les cellules adrénocorticales à l'aide de cette technique. La cytométrie en flux comporte certains avantages notables : une plus grande sensibilité en temps, un degré de précision élevé. La plus grande sensibilité sur le temps permet l'observation, en temps réel, de phénomènes tels que l'ouverture de canaux, qui se fait souvent très rapidement, et qui n'est pas nécessairement observable dans les études d'accumulation cellulaire à l'aide d'isotopes radioactifs. Nos résultats préliminaires obtenus dans le cadre de cette étude sont intéressants. Par exemple, nous avons pu observer que l'influx calcique peut effectivement être influencé par le Cd mais pas par le Zn. De nombreuses mises au point sont nécessaires pour adapter la technique à notre problématique de recherche. Nos premiers résultats encouragent les efforts futurs investis à cette fin.

5.2.4 *Projet de recherche par rapport à la problématique initiale*

Dans les projets de recherche qui ont précédé celui-ci, on a soulevé toute la problématique de contamination environnementale par rapport à une nouvelle gamme de polluants : les perturbateurs endocriniens. On a canalisé les efforts vers le milieu aquatique puisqu'il se trouve être l'hôte de prédilection desdits contaminants environnementaux et ce par le biais du ruissellement, des pluies acides, des particules en suspension, etc. De là, la pertinence de travailler avec le Cd puisque l'on sait très bien que celui-ci se retrouve abondamment dans l'environnement à cause des rejets industriels. On sait maintenant que le Cd fait partie de la famille des perturbateurs endocriniens puisqu'il répond aux critères de définition. Ce projet de recherche s'inscrit donc très bien dans la préoccupation globale que soulève la contamination par les perturbateurs endocriniens.

L'approche *in vitro* préconisée pour étudier les effets du Cd dans le tissu interrénal ne prétend pas se substituer à ce qui peut être observé chez les organismes aquatiques *in vivo*. Cependant, cette approche permet d'éliminer certains paramètres, du moins de les contrôler. De plus, connaître la façon dont le Cd peut s'accumuler dans la cellule adrénocorticale permettra certainement à des équipes futures de proposer des solutions visant à contrer certains des effets nocifs, du moins à mieux estimer les niveaux d'émission compatibles avec une santé endocrinienne optimale chez les espèces aquatiques. En étudiant les effets toxiques étape par étape *in vitro*, il est possible de cerner plus précisément celles qui peuvent être affectées dans divers processus physiologiques. Cette approche apporte donc une vision dite "mécanistique" de la toxicité globale. De plus, notre travail de recherche a également abordé la notion de mélange de

métaux pour reproduire le plus fidèlement possible ce qui est susceptible de se produire dans le milieu naturel. L'utilisation de très simples mélanges nous a toutefois permis de discerner les effets des uns par rapport aux autres.

Finalement, l'utilisation d'une espèce considérée comme sentinelle, soit la truite arc-en-ciel, est en accord avec les priorités écotoxicologiques traitant à la fois de considérations écologiques et toxicologiques. En effet, la présente étude a su démontrer par le biais des manipulations de transport membranaire, que certains phénomènes physiologiques tels que l'accumulation calcique dans le tissu interrénal, peut être perturbée par la présence du Cd. Si de tels phénomènes sont observables chez une espèce sentinelle, c'est-à-dire plus sensible aux contaminations environnementales, il serait intéressant de les étudier chez une autre espèce plus résistante pour pouvoir établir des comparaisons. Ainsi, il est très pertinent de considérer la contamination environnementale dans un contexte écologique plus large puisque ceci permettra ultimement d'apporter des solutions appropriées à un problème d'une très grande complexité.

5.2.5 Perspectives futures

Lorsque l'on entreprend un travail de recherche au niveau de la maîtrise, il faut être conscient d'une certaine limite dans le temps et dans les objectifs de recherche réalisables. Ce projet a su cerner certains aspects de la problématique globale qui doivent cependant être investigués plus en profondeur. Par exemple, il serait important de refaire les manipulations d'accumulation cellulaire de Ca sous stimulation à l'ACTH pour pouvoir distinguer si l'ACTH active certains systèmes de transport (dont des canaux) pour le Ca. Dans le cas d'une réponse positive, il serait important de vérifier les effets du Cd sur cette accumulation stimulée. Ainsi, on serait peut-être mieux en mesure de cibler l'étape où le Cd interfère dans la voie de signalisation. Il serait aussi intéressant de mettre au point une technique permettant d'isoler à hauts rendements les cellules stéroïdogéniques dans le tissu interrénal. Une technique de purification sur gradient de Percoll a déjà été mise au point par l'équipe du Dr Hontela, mais le degré de contamination des préparations cellulaires ainsi obtenues demeure très élevé. L'obtention d'une population cellulaire distincte permettrait une évaluation beaucoup plus précise de paramètres tels que l'accumulation cellulaire propre aux cellules stéroïdogéniques. Finalement, il serait souhaitable d'étudier en profondeur comment le Zn interfère avec la sécrétion de cortisol. Ainsi, en connaissant la façon dont il peut perturber la

stéroïdogénèse, on pourrait contrer ses effets néfastes et mettre à profit ses effets bénéfiques lors d'une contamination au Cd.

CONCLUSION

En conclusion, nous pouvons dorénavant affirmer que le Cd interfère bel et bien avec l'homéostasie calcique dans les cellules adrénocorticales de truite arc-en-ciel. En effet, comme nous l'avons démontré, le Cd interfère directement avec le Ca lors du transport membranaire résultant en une accumulation cellulaire calcique inférieure. Cette diminution peut certainement mener à une disponibilité affaiblie en Ca pour les cellules stéroïdogéniques disséminées à l'intérieur même du tissu interrénal et ainsi perturber la stéroïdogénèse. Il est important de se souvenir que la spéciation du Cd joue un rôle clé dans les effets toxicologiques observés. Effectivement, les niveaux d'accumulation cellulaire de Cd sont plus élevés dans un milieu favorisant la formation de l'aqua-ion par rapport à celle des chlorocomplexes. Néanmoins, nous avons démontré que ces derniers participent aussi à l'accumulation de Cd inorganique dans les cellules adrénocorticales qui implique un ou des systèmes spécifiques. Nous avons également constaté une inhibition réciproque entre l'accumulation de Cd et de Ca. Ainsi, le rôle de l'influx calcique dans la sécrétion de cortisol chez la truite arc-en-ciel doit être précisé. Finalement, nos résultats suggèrent que la diminution de sécrétion de cortisol induite par le Cd pourrait être, du moins en partie, expliquée par une inhibition de l'influx calcique.

À juste titre, puisque le Cd est responsable de l'induction de problèmes sévères chez les populations aquatiques, il serait impératif de vérifier si les normes d'exposition présentes sont effectivement compatibles avec une santé hormonale optimale chez ces populations. De plus, étant donné la montée croissante des contaminants en circulation dans l'écosystème terrestre, il sera important de penser à adopter de nouvelles mesures applicables à l'environnement dans sa globalité. Certaines mesures existent déjà mais à cause des multiples effets sublétaux des polluants, il est nécessaire que ces mesures soient continuellement réévaluées en fonctions des nouvelles connaissances afin de s'assurer qu'elles protègent efficacement nos écosystèmes.

RÉFÉRENCES

Adamsson, E. (1979). Long-term sampling of airborne cadmium dust in an alkaline battery factory. *Scand. J. Work Environ. Health*. 5: 178-187.

Alabaster, J.S., Lloyd, R. (1981). Cadmium Dans, *Water Quality Criteria for Freshwater Fish*, édité par Food and Agriculture Organization of the United Nations. Butterworths, London, pp. 221-251.

Andres, S., Ribeyre, F., Tourencq, J.N., Boudou, A. (2000). Interspecific comparison of cadmium and zinc contamination in the organs of four fish species along a polymetallic pollution gradient (Lot River, France). *The Science of the Total Environment*. 248 : 11-25.

Astruc, M. (1989). Chemical Speciation of Trace Metals, Dans, *Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies volume 1*, édité par A. Boudou et F. Ribeyre, CRC Press, Boca Raton, Floride, pages 97 à 107.

Baker, J.R., Edwards, R.J., Lasker, J.M., Moore, M.R., Satarug, S. (2005). Renal and hepatic accumulation of cadmium and lead in the expression of CYP4F2 and CYP2E1. *Toxicol Lett*. 159(2):182-191.

Baker, T.K., VanVooren, H.B., Smith, W.C., Carfagna, M.A. (2003). Involvement of calcium channels in the sexual dimorphism of cadmium-induced hepatotoxicity, *Toxicology Letters*. 137 : 185-192.

Bannon, D.I., Abounader, R., Lees, P.S.J., Bressler, J.P. (2003). Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 284: C44-C50.

Barry, G.S. (1974). Cadmium, Dans: *Canadian Minerals Yearbook*, édité par Department of Energy Mines and Resources.

Bertine, K.K., Goldberg, E.D. (1971). Fossil fuel combustion and the major sedimentary cycle, *Science*. 173:233-235

Bezak, D. (1991a). Heavy Metals in Air – Flin Flon, December 1988 – March 1991, Report No. 91-02, Section de la qualité de l'air, ministère de l'Environnement du Manitoba, 22 pages.

Bhattacharya, S. (2000). Signal Transduction by xenobiotics in fish. *Indian J. Exp. Biol*. 38(8) : 753-761.

Blazka, M.E., Shaikh, Z.A. (1991). Differences in cadmium and mercury uptakes by hepatocytes : role of calcium channels. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 110 : 355-363.

Bobillier-Chaumont, S., Maupoil, V., Berthelot, A. (2005). Metallothionein induction in the liver, kidney, heart and aorta of cadmium and isoproterenol treated rats. *J Appl Toxicol*. Epub ahead of print.

Borgman, U. (1983). Metal speciation and toxicity of free metal ions to aquatic biota, Dans, *Aquatic Toxicology*, édité par Nriagu JO. John Wiley & Sons, New York, USA, p. 47.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 :248-254.

Brezonik, P.L., King, S.O., Mach, C.E. (1991). The influence of water chemistry on trace metal bioavailability and toxicity to aquatic organisms, Dans, *Metal Ecotoxicology : Concepts and applications*, édité par Newman MC et McIntosh AW. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, USA, p.1.

Brodeur, J.C., Daniel, C., Ricard, A.C., Hontela, A. (1998). In vitro response to ACTH of the interrenal tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology*. 42 : 103-113.

Brooks, R.R., Rumsby, M.G. (1976). Studies on the uptake of cadmium by the oyster (*Ostrea sinuate*) (Lamarck). *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 15: 53-61.

Brown, J.R., Chow, L.Y. (1975). The comparison of heavy metals in fish samples taken from Baie du Dore, Lake Huron, and Toronto Harbour, Lake Ontario. *Abst. Proc. Internat. Conf. On Heavy Metals in the Environment*, pp. C-256-C-257.

Brown, M.W., Thomas, D.G., Shurben, D., Solbe, J.F. de L.G., Kay, J., Cryer, A. (1986). A comparison of the differential accumulation of cadmium in the tissues of three species of freshwater fish, *Salmo gairdneri*, *Rutilus rutilus*, and *Noemacheilus barbatulus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 84C: 213-217.

Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A., Heckelman, P.E. (1989). *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, édité par Merck and Company Inc., Rahway, NJ, USA.

Bunn, C.R., Matrone, T. (1966). In vivo interactions of cadmium, copper, zinc and iron in the mouse and the rat. *J. Nutr.* 90: 395-402.

Campbell, P.G.C. (1995). Interactions between trace metals and aquatic organisms : a critique of the free-ion activity model, Dans, *Metals speciation and bioavailability on aquatic systems*, édité par Tessier A., Turner DR. Niley New York, pp. 45-56.

Canadian Environmental Protection Act. (1994). Priority Substances List, Assesment Report, Cadmium and its Compounds.

Capen, C.C. (2001). Toxic Responses of the Endocrine System, Dans *Casarett & Doull's Toxicology, the basic science of poisons*, édité par McGraw Hill. McGraw-Hill Companies, Inc. USA, pp. 711-758.

Cherian, M.G., Vostal, J.J. (1977). Biliary excretion of cadmium in rat, I. Dose-dependent biliary excretion and the form of cadmium in the bile. *J. Toxicol. Environ. Health.* 2 : 945-954.

Cherian, M.G. (1977). Biliary excretion of cadmium in rat, II. The role of metallothionein in the hepatobiliary transport of cadmium, *J. Toxicol. Environ. Health.* 2 : 955-961.

Clarkson, T.W. (1993). Molecular and ionic mimicry of toxic metals, *Annual Review Pharmacol. Toxicol.* 33 : 345-371.

CNRC: Conseil National de Recherches du Canada, Comité associé du CNRC sur les critères scientifiques concernant l'état de l'environnement. (1977). Les effets du cadmium dans l'environnement canadien, Publication n°. CNRC 16744 du Secrétariat de l'environnement.

Colby, H.D., Longhurst, P.A. (1992). Toxicology of the adrenal gland, Dans, *Endocrine Toxicology*, édité par Atterwill CK, Flack JD. Cambridge University Press, London, pp. 243-281.

Cooke, B.A. (1999). Signal transduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms in the control of steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 151: 25-35.

Cotton, F.A., Wilkinson, G. (1972). Zinc, cadmium and mercury, Dans, *Advanced inorganic chemistry*. Interscience publishers, p.503.

Culbard, E.B., Thornton, I., Watt, J., Wheatley, M., Moorcroft, S., Thompson, M. (1988). Metal contamination in British urban dusts and soils. *J. Environ. Qual.* 17: 226-234.

Dang, Z.C., Berntssen, M.H.G., Lundebye, A.K., Flik, G., Wendelaar Bonga, S.E., Lock, R.A.C. (2001). Metallothionein and cortisol receptor expression in gills of Atlantic salmon, *Salmo salar*, exposed to dietary cadmium. *Aquatic Toxicology.* 53 :91-101.

Davies, E., Kenyon, C.J., Fraser, R. (1985). The role of calcium ions in the mechanism of ACTH stimulation of cortisol synthesis. *Steroids.* 45(6) : 551-560.

Dorian, C., Gattone, V.H., Klaassen, C.D. (1995). Discrepancy between the nephrotoxic potencies of cadmium-methallothionein and cadmium chloride and the renal concentration of cadmium in the proximal convoluted tubules. *Toxicol. Appl. Pharm.* 130 : 161-168.

Eberlee, J., Sheffer, M., Gauthier, C., Archambault, G. (1997). La santé et l'environnement : partenaires pour la vie. Santé Canada. Ministre des travaux publics et Services gouvernementaux. Ottawa, Ontario, Canada.

Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC). (1998). Endocrine disruptor screening and testing advisory committee final report. <http://www.epa.gov/scipoly/ospendo/history/finalrpt.htm>.

Eisler, R. (1985). Cadmium hazards to fish, wildlife and invertebrates : A synoptic review. *U.S. Fish & Wildlife Service Biological Report.* Vol. 85. Washington D.C. U.S. Department of the Interior.

Elinder, C.G. (1985). Uses, occurrence and intake. Dans: *Cadmium and Health: An Epidemiological and Toxicological Appraisal, Volume I, Exposure Dose and Metabolism*,

édité par Friberg, Elinder, Kjellström et Nordberg, Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, pages 22-63.

Elisma, F., Jumarie, C. (2001). Evidence for cadmium uptake through Nramp2 : metal speciation studies with Caco-2 cells. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 285 : 662-668.

Endo, T., Kimura, O., Sakata, M. (1996). Effects of zinc and copper on uptake of cadmium by LLC-PK1 cells. *Bio. Pharm. Bull.* 19(7): 944-948.

Environnement Canada. (1983). Lignes directrices concernant la qualité des eaux de surface, Volume 1 Les substances chimiques inorganiques, Le cadmium.

Enyeart JJ, Mlinar B, Enyeart JA. T-Type Ca^{2+} channels are required for adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by bovine adrenal zona fasciculata cells, *Molecular Endocrinology*; 7(8) : 1031-1040, 1993.

Eustace, I.J. (1974). Zinc, cadmium, copper and manganese in species of finfish and shellfish caught in the Derwent Estuary, Tasmania. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 25: 209-220.

Fishbein, L. (1974). Mutagens and potential mutagens in the biosphere II. Metals – mercury, tin, lead and cadmium. *Sci. Total Environ.* 2(4): 341-371.

Fleischer M. *et al.* Environmental impact of cadmium: a review by the panel on hazardous trace substances, *Environ. Health Perspect.*; 7 : 253, 1974.

Foulkes, E.C. (1985). Interaction between metals in rat jejunum: implications on the nature of cadmium uptake. *Toxicology.* 37: 117-125.

Friberg L, Piscator M, Nordberg GF, Kjellstrom T. *Cadmium in the environment*, 2nd Edition. CRC Press, Cleveland, Ohio, USA, 1974.

Friberg L, Elinder CG, Kjellström T, Nordberg GF. General summary and conclusions and some aspects of diagnosis and treatment of chronic cadmium poisoning, Dans: *Cadmium and Health: An Epidemiological and Toxicological Appraisal, Volume II, Effects and Responses*, édité par Friberg, Elinder, Kjellström et Nordberg, Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, pages 247-255, 1986.

Freeman, H.C., Idler, D.R. (1975). The effect of polychlorinated biphenyl on steroidogenesis and reproduction in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Biochem.* 53: 666-670.

Fukuda, N., Honda, M., Hatano, M. (1988). Role of calcium ion in ACTH-induced steroidogenesis in humans. *J. steroid Biochem.* 31(3) : 337-344.

Fulkerson W, Goeler HE. (dir. de publ.). (1973). Cadmium: the dissipated element, *Report ORNL-NSF-EP 21*.

Gallo-Payet, N., Payet, M.D. (2003). Mechanism of action of ACTH : Beyond cAMP. *Micro. Res. Tech.* 61 : 1-12.

- Gauvin, M.J. (1986). Cadmium Dans: *Canadian minerals yearbook*. Direction des ressources minerals, Énergie, Mines et Ressources Canada, Ottawa.
- Gedamu, L., Zafarullah, M. (1993). Molecular analyses of rainbow trout metallothionein and stress protein genes : structure, expression and regulation, Dans, *Biochemistry and molecular biology of fishes, vol. 2*, édité par Hochachka et Mommsen. Elsevier Science Publishers B.V., pp. 241-258.
- Gerson, R.J., Shaikh, Z.A. (1984). Differences in the uptake of cadmium and mercury by rat hepatocytes primary cultures. *Bioch. Pharma.* 33(2) : 199-203.
- Giles, M.A. (1984). Electrolyte and water balance in plasma and urine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during chronic exposure to cadmium. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41: 1678-1685.
- Glennas, A., Rugstad, H.E. (1984). Cadmium uptake and metabolism in cultured cells. *Environ. Health Persp.* 54 : 45-50.
- Goyer, R.A., Clarkson, T.W. (2001). Toxic Effects of Metals, Dans *Casarett & Doull's Toxicology, the basic science of poisons*, édité par McGraw Hill. McGraw-Hill Companies, Inc. USA, pp. 811-867.
- Guan, Z., Kukoyi, B., Feng, P., Kennedy, M.C., Franklin, R.B., Costello, L.C. (2003). Kinetic identification of a mitochondrial zinc uptake transport process in prostate cells. *J Inorg Biochem.* 97(2):199-206.
- Gunn, S.A., Gould, T.C., Anderson, W.A.D. (1968b). Mechanisms of zinc, cysteine and selenium protection against cadmium-induced vascular injury to mouse testis. *J. Reprod. Fertil.*, 15: 65-71.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., Hediger, M.A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 388 : 482-488.
- Haidara, K., Moffatt, P., Denizeau, F. (1999). Metallothionein induction attenuates the effects of glutathione depletors in rat hepatocytes. *Toxicol Sci.* 49(2): 297-305.
- Hardisty, M.W., Huggins, R.J., Kartar, S., Sainsbury, M. (1974). Ecological implications of heavy metals in fish from the Severn Estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 5: 12-15.
- Harrison, S.E., Klaverkamp, J.F. (1989). Uptake, elimination and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by rainbow trout (*Salmon gairdneri* Richardson) and lake whitefish (*Coregonus clupeaformis* Mitchill). *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 87-97.
- Harvey, P.W. (1996). An overview of Adrenal Gland Involvement in Toxicology, Dans, *Adrenal in Toxicology*, édité par Taylor & Francis Books Ltd., pp. 3-17.
- Henderson, I.W., Hazon, N., Hughes, K. (1985). Hormones, ionic regulation and kidney function in fishes, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 39 : 245-265.

- Hiatt, V., Huff, J.E. (1975). The environmental impact of cadmium : an overview, *Int. J. Environ. Stud.* 7 : 277.
- Hinkle, P.M., Kinsella, P.A., Osterhoudt, K.C. (1987). Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *J. Biol. Chem.*; 262 : 16333.
- Hoadley, J.E., Cousins, R.J. (1985). Effects of dietary zinc depletion and food restriction on intestinal transport of cadmium in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 180(2):296-302.
- Hoenderop, J.G.J., Nilius, B., Bindels, R.J.M. (2002). EcaC : the gatekeeper of transepithelial Ca²⁺ transport. *Bioch. Biophys. Acta.* 1600 : 6-11.
- Hollis, L., Hogstrand, C., Wood, C.M. (2001). Tissue-specific cadmium accumulation, metallothionein induction, and tissue zinc and copper levels during chronic sublethal cadmium exposure in juvenile rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. and Toxicol.* 41: 468-474.
- Hontela, A., Dumont, P., Duclost, D., Fortin, R. (1995). Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence river. *Environ. Toxicol. Chem.* 14(4) : 725-731.
- Hontela, A., Daniel, C., Ricard, A.C. (1996). Effects of acute and subacute exposures to cadmium on the interrenal and thyroid function in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 35 : 171-182.
- Hontela, A. (1997). Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics : Role of glucocorticosteroid hormones. *Reviews in Toxicology, Environ. Toxicol.* 1 : 1-46.
- Hontela, A. (1998). Interrenal Dysfunction in fish from contaminated sites : in vivo and in vitro assesment. *Environ. Toxicol. Chem. Annual Review.* 17(1) : 44-48.
- Hutchison, T.H., Pickford, D.B. (2002). Ecological risk assessment and testing for endocrine disruption in the aquatic environment *Toxicology.* 181-182 : 383-387.
- Jackson, T.A. (1978). The Biogeochemistry of heavy metals in Polluted Lakes and Streams at Flin Flon, Canada and a Proposed Method for Limiting Heavy Metal Pollution of Natural Waters, *Environ. Geol.*, 2: 173-189.
- Jacquillet, G., Barbier, O., Cougnon, M., Tauc, M., Namorado, M.C., Martin, D., Reyes, J.L., Poujeol, P. (2005). Zinc protects renal function during cadmium intoxication in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Jun 7; [Epub ahead of print].
- Jaeger, D.E. (1990). Absorption interactions of zinc and cadmium in the isolated perfused rat intestine. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* 4(2):101-5.
- Jiang, P., Chang, L., Pan, C.S., Qi, Y.F., Tang, C.S. (2005). Protective role of metallothionein in stress-induced gastric ulcer in rats. *World J Gastroenterol.* 14;11(18):2739-2743.

- Jin, T., Nordberg, G., Sehlin, J., Vesterberg, O. (1996). Protection against cadmium-metallothionein nephrotoxicity in streptozotocin-induced diabetic rats : role of increased metallothionein synthesis induced by streptozotocin. *Toxicology*. 106 : 55-63.
- Jumarie, C., Campbell, P.G.C., Berteloot, A., Houde, M., Denizeau, F. (1997). Caco-2 cell line used as an *in vitro* model to study cadmium accumulation in intestinal epithelial cells. *Journ. Membr. Biol.* 158 : 31-48.
- Jumarie, C., Fortin, C., Houde, M., Campbell, P.G.C., Denizeau, F. (2001). Cadmium uptake by Caco-2 Cells : effects of Cd complexation by chloride, glutathione and phytochelatins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 170 : 29-38.
- Kavlock, R.J. (1999). Overview of endocrine disruptor research activity in the United States. *Chemosphere*. 39(8):1227-1236.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T. and Tilson, H.A. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives*. 104(4):715-740.
- Kar, A.B., Das, R.P., Mukerji, B. (1960). Prevention of cadmium induced changes in the gonads of rat by zinc and selenium: a study in antagonisms between metals in the biological systems. *Proc. Natl. Inst. Sci. India Part B Biol. Sci.* 26, Suppl. 40.
- Kendall, R.J., Anderson, T.A., Baker, R.J., Bens, C.M., Carr, J.A., Chiodo, L.A., Cobb, G.P., Dickerson, R.L., Dixon, K.R., Frame, L.T., Hooper, M.J., Martin, C.F., McMurry, S.T., Patino, R., Smith, E.E., Theodorakis, C.W. (2001). Ecotoxicology, Dans *Casarett & Doull's Toxicology, the basic science of poisons*, édité par McGraw Hill. McGraw-Hill Companies, Inc. USA, pp. 1013-1045.
- Kennedy, C.J. Xenobiotics Dans, *Biochemistry and molecular biology of fishes, vol. 5*, édité par Hochachka et Mommsen. Elsevier Science B.V. 1995, pp. 281-312.
- Kjellström, T. Lind, B., Linnman, L., Elinder C.G. (1975). Variation of cadmium concentration in Swedish wheat and barley: an indicator of changes in daily cadmium intake during the 20th century. *Arch Environ. Health*. 30: 321-338.
- Kjellstrom, T., Nordberg, G.F. (1978). A kinetic model of cadmium metabolism in the human being. *Environ. Res.* 16: 248(1978), cite au renvoi 41.
- Kojima, I., Kojima, K., Rasmussen, H. (1985b). Role of calcium and cAMP in the action of adrenocorticotropin on aldosterone secretion. *J. Biol. Chem.* 260 :4248-4256.
- Kondo, I. (2000). Protein kinase C potentiates capacitative Ca²⁺ entry that links to steroidogenesis in bovine adrenocortical cells, *Jpn J. Pharmacol.* 82 : 210-217.
- Lacroix, M., Hontela, A. (2001). Regulation of acute cortisol synthesis by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C in a teleost species, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Journ. Endocr.* 169 : 71-78.

- Lacroix, M., Hontela A. (2003). The organochlorine *o,p'*-DDD disrupts the adrenal steroidogenic signaling pathway in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 190 : 197-205.
- Lacroix A, Hontela A. (2004) A comparative assessment of the adrenotoxic effects of cadmium in two teleost species, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* and yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquatic Toxicology* 67(1): 13-21.
- Lacroix A., Hontela, A. (2006). Role of calcium channels in cadmium-induced toxicity in interrenal cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.* Soumis.
- Laflamme, J.S., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Hontela, A. (2000). Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, and Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes. *Can. J. Fish, Aquat. Sci.* 57 : 1692-1700.
- Lafuente, A., Esquifino, A.I. (1999). Cadmium effects on hypothalamic activity and pituitary hormone secretion in the male. *Toxicol. Letters.* 110 : 209-218.
- Laird, S.M., Hinson, J.P., Vinson, G.P., Mallick, N., Kapas, S., Teja, R. (1991). Control of steroidogenesis by the calcium messenger system in human adrenocortical cells, *J. Mol. Endocrinol.* 6 : 45-51.
- Langston, W.J., Bebianno, M.J., Burt, G.R. (1998). Metal handling strategies in molluscs, Dans, *Metal Metabolism in Aquatic Environments*, édité par Langston WJ, Bebianno MJ. Chapman & Hall, London, pp. 219-283.
- Larsson, S., Piscator, M. (1971). Effect of cadmium on skeletal tissue in normal and calcium-deficient rats. *Israel J. Med. Sci.* 7:495-498.
- Lauwerys, R. (1978). CEC Criteria (Dose/Effect Relationship) for cadmium. Pergamon, Oxford.
- Leblond V, Hontela, A. (1999). Effects of *in vitro* exposures to cadmium, mercury, zinc and 1-(2-Chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane on steroidogenesis by dispersed interrenal cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 157 : 16-22.
- Leblond, V.S., Bisson, M., Hontela A. (2001). Inhibition of cortisol secretion in dispersed head kidney cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by endosulfan, an organochlorine pesticide. *Gen. Comp. Endocrinol.* 121 : 48-56.
- Lecoœur, S., Huynh-Delerme, C., Blais, A., Duché, A., Tomé, D., Kolf-Clauw, M. (2002). Implication of distinct proteins in cadmium uptake and transport by intestinal cells HT-29. *Cell Biol. Toxicol.* 18 : 409-423.
- Le Guével, R., Petit, F.G., Le Goff, P., Métivier, R., Valotaire, Y., Pakdel, F. (2000). Inhibition of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Estrogen Receptor Activity by Cadmium. *Biol. Reprod.* 63 : 259-266.

Léonard A. (1990). Les mutagènes de l'environnement et leurs effets biologiques. Masson Décarie, pp. 23-37.

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

Levesque, H.M., Dorval, J., Hontela, A., Van Der Kraak, G.J., Campbell, P.G.C. (2003). Hormonal, morphological, and physiological responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to chronic environmental metal exposures. *J. Toxicol. Environ. Health.* 66(7) :657-676.

Limaye, D.A., Shaikh, Z.A. (1999). Cytotoxicity of cadmium and characteristics of its transport in cardiomyocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154: 59-66.

Lovett, R.J., Gutenmann, W.H., Pakkala, I.S., Youngs, W.D., Lisk, D.J. (1972). A survey of the total cadmium content of 406 fish from 49 New York State fresh waters. *J. Fish. Res. Board Can.* 29: 1283-1290.

Lymburner, D.B. (1974). Environmental contaminants inventory study no. 2. The production, use and distribution of cadmium in Canada, Dans: *Report Series no. 39*, Centre canadien des eaux intérieures, Direction des eaux intérieures, Ottawa.

Majewski, H.S., Giles, M.A. (1981). Cardiovascular-respiratory response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during chronic exposure to sublethal concentrations of cadmium. *Water Res.* 15: 1211-1217

Margoshes, M., Vallee, B.L. (1957). A cadmium protein from renal cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79 : 4813.

Mason, K.E., Young, J.O. (1967). Effectiveness of selenium and zinc in protecting against cadmium-induced injury of rat testis. *Symposium : Selenium in Biomedicine*. Édité par Muth, Westport, Connecticut, U.S.A.

Marieb, H., Laurendeau, G. (1993). Anatomie et Physiologie Humaine, Éditions du Renouveau Pédagogique, Montréal, 1014 pages.

Maroni, G., Wise, J., Young, J.E., Otto, E. (1987). Metallothionein gene duplications and metal tolerance in natural populations of drosophila melanogaster. *Genetics.* 117 : 739-744.

Matsuo, A.Y., Wood, C.M., Val, A.L. (2005). Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. *Aquat. Toxicol.* 74(4): 351-364.

McCarthy, L.S., Houston, A.H. (1976). Effects of exposure to sublethal levels of cadmium upon water-electrolyte status in the goldfish (*Carassius auratus*). *J. Fish Biol.* 9 : 11-19.

McKee, J.E., Wolf, H.W. (1963). Water quality criteria. Second Edition, The Resources Agency of California, State Water Quality Control Board. Publication No. 3-A.

- McNelly, R.N., Neimanis, V.P., Dwyer, L. (1980). Références sur la qualité des eaux, Dans, *Guide des paramètres de la qualité des eaux*, Direction générales des eaux intérieures, Environnement Canada.
- Méranger, J.C., Subramanian, K.S. et Chalifoux, C. (1981a). Survey for Cadmium, Cobalt, Chromium, Copper Nickel, Lead, Zinc, Calcium and Magnesium in Canadian Drinking Water Supplies, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64: 44-53.
- Mokdad, R., Debec, A., Wegnez, M. (1987). Metallothionein genes in *Drosophila melanogaster* constitute a dual system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 84: 2658-2662.
- Morel, F.M.M. (1983). Principles of Aquatic Chemistry. Wiley-Interscience, New York, USA.
- Morgan, J.E., Norey, C.G., Morgan, A.J., Kay, J. (1989). A comparison of the cadmium-binding proteins isolated from the posterior alimentary canal of the earthworms *Dendrodrilus rubidus* and *Lumbricus rubellus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 92C: 15-21.
- Murata, I., Hirono, T., Soeki, Y. (1970). Cadmium enteropathy, renal osteomalacia (Itai Itai disease) in Japan. *Bull. Soc. Int. Chir.* 1: 34-42.
- Murphy, B.R., Atchison, G.J., McIntosh, A.W. (1978). Cadmium and zinc in muscle of bluegill (*Lepomis macrochirus*) and largemouth bass (*Micropterus salmoides*) from an industrially contaminated lake. *Environ. Pollut.* 17 : 253-257.
- NAQUADAT/ENVIRODAT, données sur la teneur en cadmium des eaux des surface (1987-1992) (1992). Base de données nationale sur la qualité des eaux, Environnement Canada.
- Nordberg, G.F., Piscator, M. (1976). Influence of long-term cadmium exposure on urinary excretion of protein and cadmium in mice. *Environ. Physiol. Biochem.* 2: 37-49.
- Norey, C.G., Brown, M.W., Cryer, A., Kay, J. (1990). A comparison of the accumulation, tissue distribution and secretion of cadmium in different species of freshwater fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 96C(1) : 181-184.
- Nriagu, J.O. (1979). Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace elements to the atmosphere. *Nature* 279: 409-411.
- Nriagu, J.O. (1989) Assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature* 338: 47-49.
- Nriagu, J.O., Pacyna, J.M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333: 134-139.
- Oberdöster, G. (1992). Pulmonary deposition, clearance and effects of inhaled soluble and insoluble cadmium compounds, Dans: Nordberg, G.F., Herber, R.F.M., Alessio, L., eds. Cadmium in the Human Environment: Toxicity and Carcinogenicity. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 118: 189-204.

Olsson, P.E. (1993). Metallothionein gene expression and regulation in fish, Dans, *Biochemistry and molecular biology of fishes*, vol. 2, édité par Hochachka et Mommsen. Elsevier Science Publishers B.V., pp. 259-278.

OMS: Organisation mondiale de la santé. (1992b). Cadmium – Environmental Aspects, Critères d'hygiène de l'environnement, n° 135, Programme international sur la sécurité des substances chimiques, Genève.

O'Norris, D.O. (1996). Comparative aspects of vertebrate adrenals, Dans, *Vertebrate Endocrinology*, 3rd edn. San Diego, CA: Academic Press.

O'Norris, D.O., Felt, S.B., Woodling, J.D., Dores, R.M. (1997). Immunocytochemical and Histological Differences in the Interrenal Axis of Feral Brown Trout, *Salmo trutta*, in Metal-Contaminated Waters. *Gen. Compar. Endocrin.* 108 : 343-351.

O'Norris, D.O., Donahue, S., Dores, R.M., Lee, J.K., Maldonado, T.A., Ruth, T., Woodling, J.D. (1999). Impaired Adrenocortical Response to stress by brown trout, *Salmo trutta*, living in metal-contaminated waters of the Eagle river, Colorado. *Gen. Compar. Endocrin.* 113 : 1-8.

Page, A.L., Bingham, F.T. (1973). Cadmium residues in the environment. *Res. Rev.* 48:1-44.

Parizek, J. (1957). The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc. *J. Endocrinol.* 15: 56-67.

Patino, R., Bradford, C.S., Shreck, C.B. (1986). Adenylate cyclase activators and inhibitors, cyclic nucleotide analogs, and phosphatidylinositol : effects on interrenal function of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) *in vitro*. *Gen. Compar. Endocrin.* 63 : 230-235.

Pigman, E.A., Blanchard, J., Laird, H.E. (1997). A study of cadmium transport pathways using the Caco-2 cell model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142: 243-247.

Pinot, F., Kreps, S.E., Bachelet, M., Hainaut, P., Bakonyi, M., Polla, B.S. (2000). Cadmium in the environment : sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers *Reviews on Environ. Health.* 15 : 299-323.

Piscator, M. (1985). Dietary exposure to cadmium and health effect: impact of environmental changes. *Environ. Health Perspect.*, 63: 127.

Portman, J.E. (1972). The levels of certain metals in fish from coastal waters around England and Wales. *Aquaculture.* 1: 91-96.

Raynal, N.J., Hontela, A., Jumarie, C. (2005). Cadmium uptake in isolated adrenocortical cells of rainbow trout and yellow perch. *Comp. Biochem. Physiol.* 140 (3-4): 374-382.

Reeves, P.G., Chaney, R.L. (2004). Marginal nutritional status of zinc, iron, and calcium increases cadmium retention in the duodenum and other organs of rats fed rice-based diets. *Environ Res.* 96(3):311-322.

- Ricard, A.C., Daniel, C., Anderson, P., Hontela, A. (1998). Effects of Subchronic Exposure to Cadmium Chloride on Endocrine and Metabolic Functions in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34 : 377-381.
- Roch, M., Maly, E.J. (1979). Relationship of cadmium-induced hypocalcemia with mortality in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and the influence of temperature on toxicity. *J. Fish. Res. Board Can.* 36: 1297-1303.
- Roesijadi, G., Robinson, W.E. (1994). Metal Regulation in Aquatic Animals: Mechanisms of Uptake, Accumulation and Release Dans, *Aquatic Toxicology*. CRC Press Inc. USA, pp. 387—420.
- Sangalang, G.B., O'Halloran, M.J. (1972). Cadmium-induced testicular injury and alterations of androgen synthesis in the brook trout. *Nature.* 240: 470-471.
- Schoenmakers, T.J.M., Klaren, P.H.M., Flik, G., Lock, R.A.C., Pang, P.K.T., Wendelaar Bonga, S.E. (1992). Actions of cadmium on basolateral plasma membrane proteins involved in calcium uptake by fish intestine. *J. Membr. Biol.* 127-161.
- Schroeder, H.A., Nason, A.P., Tipton, I.H., Balassa, J.J. (1967). Essential trace metals in man: zinc. Relation to environmental cadmium. *J. Chronic Dis.* 20: 179-187.
- Sherwood, G.D., Rasmussen, J.B., Rowan, D.J., Brodeur, J., Hontela, A. (2000). Bioenergetic costs of heavy metal exposure in yellow perch (*Perca flavescens*): *in situ* estimates with a radiotracer (¹³⁷Cs) technique. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57 : 441-450.
- Silverthorn, D.U. (1998). Introduction to the Endocrine System, Dans, *Human Physiology: An integrated approach*. Prentice-Hall International, Upper Saddle River, New Jersey, USA, pp. 173-196.
- Simkiss, K., Taylor, M., Mason, A.Z. (1982). Metal Detoxification and Bioaccumulation. *Mar. Biol. Lett.* 3: 87-201.
- Sittig, M. (1975). Cadmium, Dans, *Environmental Sources and Emissions Handbook*, édité par Noyes Data Corporation, London (England) et Park Ridge (New Jersey), pages 32 à 38.
- Smith, A.L. (1987). Levels of Metals and Metallothionein in Fish from the Columbia River Near the International Boundary. Direction de la qualité des eaux, Environnement Canada, Vancouver (C.-B.), 133 pages.
- Sorensen, E.M. (1991). Cadmium Dans, *Metal Poisoning in Fish*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 175-234.
- Staessen, J.A., Buchet, J.P., Ginucchio, G., Lauwerys, R.R., Lijnen, P., Roels, H., Fagard, R. (1996). Public health implications of environmental exposure to cadmium and lead: an overview of epidemiological studies in Belgium. Working groups. *J. Cardiovasc. Risk.* 3: 26-41.

- Steinnes, E. (1990). Lead, Cadmium and Other metals in Scandinavian Surface Waters, with emphasis on Acidification and Atmospheric Deposition. *Environ. Toxicol. Chem.* 9:825-831.
- Stohs, S.J., Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.* 18(2) : 321-336.
- Suzuki, S., Suzuki, T., Ashizawa, M. (1965). Proteinuria due to inhalation of cadmium stearate dust. *Ind. Health.* 3: 73-82.
- Swiergosz-Kowalewska, R. (2001) Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. *Micro. Res. Tech.* 55 :208-222.
- Szpetnar, M., Pasternak, K., Boguszevska, A. (2004). Bioflavonoids and glutamine in diet and the Mg, Ca, Cu, Zn concentrations in heavy metals intoxicated rats' skins. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med]*.59(1):495-499.
- Tacnet, F., Watkins, D.W., Ripoche, P. (1990). Studies of zinc transport into brush-border membrane vesicles isolated from pig small intestine. *Biochim. Biophys. Acta.* 1024: 323-330.
- Taylor, S.R. (1964). Abundance of chemical elements in the continental crust: a new table. *Geo. Cosmo. Acta.* 28:1273-1285.
- Tsuruki, F. Otawara, Y., Wung, H.L., Moriuchi, S., Hosoya, N. (1978). Inhibitory effect of cadmium on vitamin-D stimulated calcium transport in rat duodenum in vitro. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 24: 237-242.
- Verboost, P.M., Flik, G., Lock, R.A.C., Wendelaar Bonga, S.E. (1988). Cadmium inhibits plasma membrane calcium transport, *J. Membrane Biol.*; 102 : 97-104.
- Verboost, P.M., Van Rooij, J., Flik, G., Lock, R.A.C., Wendelaar Bonga, S.E. (1989). The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *J. Exp. Biol.* 145:185-197.
- Vétillard, A., Bailhache, T. (2005). Cadmium: an endocrine disrupter that affects gene expression in the liver and brain of juvenile rainbow trout. *Biol Reprod.*72(1):119-26.
- Wendelaar Bonga, S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.*; 77(3) : 591-625.
- Wendelaar Bonga, S.E. (1993). Endocrinology Dans, *The Physiology of fishes*. CRC Press Inc., USA, pp. 469-502.
- Yeats, P.A., Bewers, J.M. (1987). Evidence for anthropogenic Modification of Global Transport of Cadmium Dans, *Cadmium in the Aquatic Environment*, J. Nriagu et J.B.Sprague, édité par John Wiley and Sons, Toronto, pages 19-34.
- Zalups, R., Ahmad, S. (2003). Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol. Appl. Pharmaco.* 186 : 163-188.

World Health Organization (WHO). (2002). *Global Assessment of the state-of-the-science of Endocrine Disruptors*. WHO/PCS/EDC/02.2. International Program on Chemical Safety.16