

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉVALUATION DE L'ÉTAT DU SYSTÈME RÉDOX ET DES RÉTINOÏDES
COMME BIOMARQUEURS CHEZ LA PERCHAUDE (*PERCA FLAVESCENS*),
EN LIEN AVEC LE DÉCLIN DE LA POPULATION DU LAC SAINT-PIERRE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

CATHERINE LANDRY

FÉVRIER 2017

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.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice Monique Boily de m'avoir permis de prendre part à ce passionnant projet, d'avoir su orienter mes capacités en fonction du travail à effectuer. J'ai beaucoup apprécié sa générosité, son soutien, sa disponibilité, sa patience et surtout, son partage des connaissances. Je tiens également à remercier mon co-directeur Philip Spear pour sa confiance et sa reconnaissance envers mes aptitudes qui m'ont poussé à entreprendre ce projet de maîtrise.

L'élaboration de cette étude n'aurait pas été possible sans l'aide des pêcheurs commerciaux et des techniciens de la faune sous la supervision de Philippe Brodeur du Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs pour la capture des perchaudes, ainsi que l'équipe technique sous la supervision de Magali Houde d'Environnement Canada. Je tiens, tout particulièrement, à remercier Philippe Brodeur, Maeva Giraudo et Magali Houde pour leur implication dans cette étude, et pour m'avoir initiée au travail de terrain. De beaux moments que j'ai partagés en leur compagnie au « bord de l'eau »!

Il m'importe également de souligner l'importance des membres du TOXEN, et de tous les gens que j'ai côtoyés au Département des sciences biologiques et au laboratoire, avec l'implication des étudiants stagiaires: Julie Arteau, Guillain Gaillard et Maria Hébert, ainsi que notre aide technique, Isabelle Lecavalier-Mondor. Une appréciation particulière s'adresse à Maxime Gauthier pour la belle amitié que nous partageons, amitié issue de sa compagnie, de son optimisme et de son soutien à travers mes doutes. Mes remerciements vont aussi à Catherine Jumarie, pour les jasettes entre mes séances de laboratoire et à Angela Paquet-Walsh, étudiante à

l'UQTR et dont le projet porte sur les larves de perchaude, ce qui nous a permis d'échanger sur nos projets respectifs.

Il va sans dire qu'un tel projet ne peut se réaliser sans un support financier qu'il convient de souligner. Cette recherche a été réalisée avec le support du Groupe National Consultatif sur les Contaminants du Ministère de la Pêche et des Océans (MPO) et à une subvention Découverte (CRSNG) octroyés à M. Boily. Je suis heureuse d'avoir obtenu le soutien et la reconnaissance de la Fondation UQAM par le biais de deux bourses d'excellences FARE (Bourse Reconnaissance UQAM en sciences), ainsi que deux bourses du Département des sciences biologiques.

Finalement, je voudrais remercier mon amoureux, Philippe, ma famille et mes amis pour leur support et leur amour inconditionnel. C'est à l'aboutissement d'un tel travail que je réalise que mon entourage a été précieux, inestimable, et que chaque personne a contribué à faire une différence.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
TABLES DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xv
RÉSUMÉ.....	xix
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	5
1.1 Déclin de la perchaude et intégrité de l'écosystème au lac Saint-Pierre.....	5
1.2 Système rédox.....	9
1.2.1 Mécanismes pro-oxydants.....	10
1.2.2 Dommages oxydatifs : La peroxydation des lipides.....	12
1.2.3 Mécanismes antioxydants.....	15
1.3 Objectifs et hypothèses.....	26
1.3.1 Effet de la contamination et des pressions anthropiques sur la morphométrie et la condition physiologique de la perchaude au LSP ..	27
1.3.2 Effet de la contamination et des pressions anthropiques sur l'état du système rédox et des rétinoïdes au LSP.....	27
CHAPITRE II	
APPROCHE EXPÉRIMENTALE ET MÉTHODOLOGIE.....	29
2.1 Sites d'échantillonnages.....	30
2.2 Échantillonnages : Captures, mesures morphométriques et prélèvements.....	32
2.3 Méthodes analytiques des biomarqueurs pour 2013.....	33
2.3.1 Quantification par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).....	33

2.3.2	Dosage des TBARS dans le muscle	36	
2.4	Méthodes analytiques des biomarqueurs pour 2014	37	
2.4.1	Quantification par chromatographie liquide à ultrahaute performance (CLUHP)	38	
2.4.2	Dosage des TBARS dans le muscle et le foie	40	
2.5	Analyses statistiques.....	41	
CHAPITRE III			
RÉSULTATS ET DISCUSSION RELATIFS AUX LARVES, JUVÉNILES ET ADULTES ÉCHANTILLONNÉS EN 2013			43
3.1	Résumé	44	
3.2	Abstract	46	
3.3	Introduction	47	
3.4	Materials and methods.....	50	
3.4.1	Study sites.....	50	
3.4.2	Capture of fish and tissue sampling.....	51	
3.4.3	Carotenoids, retinoids and tocopherol in liver and larvae	51	
3.4.4	Plasma retinoids.....	54	
3.4.5	Lipid peroxidation	54	
3.4.6	Statistical analysis.....	55	
3.5	Results and discussion.....	55	
3.5.1	Morphometric parameters.....	55	
3.5.2	TBARS and α -tocopherol	57	
3.5.3	Carotenoids and retinoids	59	
3.6	Conclusion.....	64	
3.7	Acknowledgements	64	
3.8	References	73	
CHAPITRE IV			
RÉSULTATS ET DISCUSSION RELATIFS AUX ADULTES ÉCHANTILLONNÉS EN 2014			81
4.1	Paramètres morphométriques	82	
4.2	TBARS et α -tocophérol.....	86	

4.3 Caroténoïdes	88
4.4 Métabolisme des rétinoïdes	91
CONCLUSION.....	99
ANNEXE A	
TRANSFERT DE MÉTHODES: QUANTIFICATION DES CAROTÉNOÏDES, DES RÉTINOÏDES ET DE L' A-TOCOPHÉROL PAR CHROMATOGRAPHIE À ULTRAHAUTE PERFORMANCE (CLUHP)	103
ANNEXE B	
ADAPTATION DE MÉTHODE: DOSAGE DES SUBSTANCES RÉAGISSANTS À L' ACIDE THIOBARBITURIQUE (TBARS) EN MICROPLAQUE.....	111
ANNEXE C	
TABLEAUX DE CORRÉLATION DE LA CAMPAGNE DE 2014.....	117
RÉFÉRENCES	125

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Diagramme conceptuel des principales pressions écologiques et anthropiques au lac Saint-Pierre susceptibles d'influencer la dynamique de population de la perchaude.	8
1.2	Mécanismes de production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO).	11
1.3	Processus généraux de peroxydation des lipides.	14
1.4	Réactions catalytiques des enzymes antioxydants.	15
1.5	Structures chimiques des tocophérols et des tocotriénols.	17
1.6	Structure des principaux (A) carotènes (caroténoïdes hydrocarbonés) et (B) xanthophylles (caroténoïdes oxygénés).	20
1.7	Structures chimiques des principaux rétinoïdes.	22
1.8	Voie d'absorption et de distribution des rétinoïdes chez les vertébrés.	25
1.9	Voie de signalisation cellulaire des rétinoïdes.	25
2.1	Localisation des sites d'échantillonnages de perchaudes (étoiles) pour les campagnes de 2013 et de 2014 le long du fleuve Saint-Laurent.	31
3.1	Location of yellow perch sampling sites in 2013 (open circle) along of the St. Lawrence River.	65
3.2	Basic vertebrate retinoid metabolism.	65
3.3	Principal component analysis (PCA) of morphometric parameters (length, weight and circumference) and age for adult yellow perch sampled in the St. Lawrence River following an increasing degree of anthropogenic influences.	67

3.4	TBARS (nmol/g, clear) and α -tocopherol ($\mu\text{g/g}$, shaded) measured in yellow perch sampled in the St. Lawrence River following an increasing degree of anthropogenic influences.	68
3.5	DROH (3,4- didehydro-all- <i>trans</i> -retinol, $\mu\text{g/g}$, clear) and DPAL (3,4-didehydroretinyl palmitate, $\mu\text{g/g}$, shaded) measured in yellow perch sampled in the St. Lawrence River following an increasing degree of anthropogenic influences.	70
4.1	Analyses en composantes principales (ACP) des paramètres morphométriques (L, longueur, P, poids et C, circonférence) et de (\hat{A}) âge chez les perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression anthropogénique.	85
4.2	TBARS (A) et α -tocophérol (B) mesurés dans le muscle (boîtes claires) et le foie (boîtes ombrées) des perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression anthropogénique.	87
4.3	Rétinoïdes hépatiques mesurés chez les perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression anthropogénique.	92
4.4	Ratio hépatique de palmitate de rétinol/rétinol (PAL/ROH, boîtes claires) et de palmitate de déhydrorétinol/déhydrorétinol (DPAL/DROH, boîtes ombrées) obtenus pour les perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent et suivant un gradient de pression anthropogénique.	94
4.5	Relation multivariée entre le palmitate de déhydrorétinol (DPAL), le rétinol (ROH) et le site des perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent et suivant un gradient de pression anthropogénique.	94
4.6	Voies de saturation du A) tout- <i>trans</i> -rétinol ou B) 3,4-déhydro-tout- <i>trans</i> -rétinol par les rétinols saturases (mRetSat et zReSat).	97
A.1	Chromatographes réalisés par CLUHP à partir de plasma de perchaudes	104

A.2	Chromatogrammes réalisés sur le CLUHP à partir du foie de barbotte.	105
B.1	Représentation graphique du pourcentage de récupération associé aux différentes étapes de la méthode de dosage des TBARS en microplaque dans le muscle de perchaude.	113
B.2	Mesure de la turbidité associée aux différentes étapes de la méthode de dosage des TBARS en microplaque dans un échantillon de muscle de perchaude.	115
B.3	Évaluation de la peroxydation des lipides par dosage des TBARS dans le muscle de perchaude et le foie de barbotte selon la méthode en microplaque adaptée de Camejo <i>et al.</i> (1998) (histogrammes clairs) versus celle d'écrite par Hedrei Helmer <i>et al.</i> (2015) (histogrammes hachurés).	116

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
3.1	Sex, means \pm SD of morphometric parameters, age and Fulton factor (K) of the larvae, juveniles and adults yellow perch sampled in the St. Lawrence River following an increasing degree of anthropogenic influences.	66
3.2	Means \pm SD of carotenoids in whole larvae (ng/g) and in liver (μ g/g) of the juveniles and adults yellow perch sampled in the St. Lawrence River following an increasing degree of anthropogenic influences.	69
3.3	Means \pm SD of retinoids in whole larvae (ng/g) and in liver (μ g/g) of the juveniles and adults yellow perch sampled in the St. Lawrence River following an increasing gradient of anthropogenic influences.	71
3.4	Means \pm SD of retinoids in plasma (ng/ μ L) of the juveniles and adults yellow perch sampled in the St. Lawrence River following an increasing degree of anthropogenic influences.	72
4.1	Sexe, paramètres morphométriques (moyenne \pm écart-type de la longueur, du poids et de la circonférence), âge et coefficient de Fulton (K) des perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression croissant.	84
4.2	Moyenne \pm écart-type des caroténoïdes hépatiques (ng/g) mesurés chez les perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression.	89
4.3	Moyenne \pm écart-type des rétinoïdes du plasma (μ g/100 μ l) mesurés chez les perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression croissant.	96
A.1	Paramètres d'identification et de caractérisation des	106

caroténoïdes, rétinoïdes et α -tocophérol mesurés dans le foie et le plasma de perchaude par CLUHP.

A.2	Moyenne \pm écart-type des aires sous la courbe (mAUC) mesurées dans le temps pour 1 à 3 extractions de foie de barbotte pour des séquences de 4 à 6 injections consécutives.	108
B.1	Paramètres de régression spécifiques à la courbe standard de TTMP pour la méthode de dosage TBARS en microplaque.	112
B.2	Peroxydation des lipides publiée pour différents tissus et différentes espèces de poissons.	116
C.1	Corrélations entre les valeurs de TBARS (muscle et foie) et d' α -tocophérol (foie) mesurées chez les perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression croissant.	118
C.2	Corrélations entre les valeurs en caroténoïdes hépatiques mesurées chez les perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression croissant.	119
C.3	Corrélations entre les valeurs en caroténoïdes hépatiques et celles des biomarqueurs du système rédox (TBARS et α -tocophérol) mesurés chez les perchaudes adultes capturés en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression croissant.	120
C.4	Corrélations entre les valeurs en caroténoïdes (foie) et en rétinoïdes (foie et plasma) mesurés chez les perchaudes adultes capturés en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression croissant.	121
C.5	Corrélations entre les valeurs en rétinoïdes et celles des biomarqueurs du système rédox (TBARS et α -tocophérol) mesurés chez les perchaudes adultes capturés en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression croissant..	122
C.6	Corrélations entre l'indice de condition de Fulton (K) et les biomarqueurs chez les perchaudes adultes capturées en 2014 dans le fleuve Saint-Laurent.	123

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACP	Analyse en composantes principales
AR	Acide rétinoïque
ARAT	Acyl CoA:Rétinol acyltransférase
α -TTP	<i>α-tocopherol transport protein</i> (protéine de transport de l' α -tocophérol)
BPC	Biphényles polychlorés
CAT	Catalase
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CLUHP	Chromatographie liquide à ultrahaute performance
CO1	Caroténoïdes oxygénase 1
CP	Composante principale
CYP450	Cytochrome P450
DOC	Sodium déoxycholate
DPAL	Palmitate de déhydrorétinol
DRALD	Déhydrorétinaldéhyde
DROH	Déhydrorétinol
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
EROD	Ethoxyrésorufin-O-dééthylase
GR	Glutathion réductase

GSH	Glutathion
HER	Hydrolase des esters de rétinoïdes
K	Coefficient de Fulton
LBD	Lipoprotéine de basse densité
LHD	Lipoprotéine de haute densité
LRAT	Lecithine-rétinol acyltransférase
LTBD	lipoprotéine de très basse densité)
MDA	Malondialdéhyde
PAL	Palmitate de rétinol (<i>retinyl palmitate</i>)
Px	Peroxydases
RALD	Rétinaldéhyde
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque
RARE	<i>Retinoic acid response elements</i> (Éléments de réponse de l'acide rétinoïque)
RBP	<i>Retinol binding protein</i> (protéine liant le rétinol)
ROH	Rétinol
RXR	Récepteur X des rétinoïdes
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	<i>Thiobarbituric acid</i> (acide thiobarbiturique)
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substance</i> (substances réagissant à l'acide thiobarbiturique)
TCA	Acide trichloroacétique
TTR	Transthyréline

UV

Ultra-violets

RÉSUMÉ

Depuis le milieu des années 1990, la population de perchaude (*Perca flavescens*) du lac Saint-Pierre connaît une baisse importante de son abondance. Malgré des mesures restrictives réglementant la pêche (depuis 1997) et un moratoire (depuis 2012), la population de perchaude tend toujours à diminuer dû au faible taux de renouvellement des jeunes classes d'âges (0 à 2 ans). Une multitude de facteurs sont mis en cause (e.g. exploitation de la ressource, mauvaise qualité de l'eau, détérioration des habitats de reproduction et de croissance, espèces exotiques envahissantes, etc.). La contamination de l'eau et les activités anthropiques représenteraient des facteurs dont l'importance aurait été sous-estimée. L'apport en contaminants agricoles prédomine au lac Saint-Pierre, en plus de la pollution résiduelle des grandes villes (Montréal et Laval), des effluents des municipalités et des industries riveraines. Plusieurs de ces contaminants ont démontré une perturbation de l'homéostasie du système rédox et de la vitamine A (rétinoïdes) connue pour son rôle dans la croissance, la reproduction et le développement embryonnaire.

Ce projet de recherche a été élaboré en 2013 afin d'investiguer l'état de santé de diverses populations de perchaudes du fleuve Saint-Laurent exposées à un gradient de pression anthropique croissant d'amont en aval: Lac Saint-François < Lac Saint-Louis < Lac Saint-Pierre. La morphométrie (taille, poids, circonférence et coefficient de Fulton), le système rédox (peroxydation des lipides, α -tocophérol et caroténoïdes) et les rétinoïdes ont été comparés entre ces trois lacs fluviaux, et ce, pour deux années d'échantillonnage consécutives (2013 et 2014). En 2013, l'étude a été menée pour trois stades de développement: larves (< 1 an), juvéniles (1 à 2 ans) et adultes (\geq 3 ans), alors qu'en 2014, l'étude a été reconduite seulement pour les perchaudes adultes. L'analyse des caroténoïdes, de l' α -tocophérol et des rétinoïdes hépatiques et plasmatiques a été effectuée en 2013 par chromatographie liquide à haute performance (CLHP), dont la méthode a été adaptée sur un système de chromatographie liquide à ultrahaute performance (CLUHP) pour 2014. La peroxydation des lipides a été mesurée par dosage des substances réagissant à l'acide thiobarbiturique (TBARS, *thiobarbituric acid reactive substances*).

Les résultats obtenus pour les populations échantillonnées sont cohérents avec le gradient de contamination et de pression anthropique, où les perchaudes du lac Saint-Pierre se distinguent par une condition physiologique affaiblie. Le coefficient de

Fulton évalué chez les perchaudes adultes est significativement plus faible aux sites les plus perturbés, et ce, pour 2013 ($F_{(4;46)} = 7,66; p \leq 0,001$) et 2014 ($H_{(3;101)} = 20,33; p \leq 0,001$). En 2013, nous avons observé une baisse des esters de déhydroretinol chez les trois stades à l'étude: larves ($H_{(3;71)} = 17,78; p \leq 0,001$), juvéniles ($H_{(4;35)} = 20,47; p \leq 0,001$) et adultes ($H_{(4;45)} = 22,08; p \leq 0,001$). Un résultat similaire a été obtenu pour les adultes échantillonnées en 2014 ($H_{(3;102)} = 45,97; p \leq 0,001$), et ce, combiné à de faibles valeurs en déhydroretinol hépatique ($H_{(3;101)} = 37,76; p \leq 0,001$) et plasmatique ($H_{(3;84)} = 20,13; p \leq 0,001$) suggérant une altération du métabolisme de la vitamine A chez la population du lac Saint-Pierre. Bien que le test des TBARS n'a pas permis de statuer de l'état du système rédox, d'autres résultats suggèrent une augmentation du potentiel pro-oxydant chez les perchaudes du lac Saint-Pierre: en 2013, une baisse en lycopène observée chez les perchaudes juvéniles ($H_{(4;36)} = 13,16; p < 0,05$) et adultes ($H_{(4;43)} = 14,52; p < 0,01$) ainsi que chez les adultes en 2014 ($H_{(3;100)} = 43,89; p \leq 0,001$) avec de faibles valeurs d' α -tocophérol ($H_{(3;103)} = 22,06; p \leq 0,001$). Selon les résultats obtenus (morphométrie et biomarqueurs biochimiques), les perchaudes du lac Saint-Pierre présentent un état de santé préoccupant en comparaison aux perchaudes des autres sites. Cette étude a permis d'apporter des éléments complémentaires aux études réalisées jusqu'à maintenant sur la perchaude du lac Saint-Pierre, ainsi que des outils de biosurveillance pour les autres populations de perchaude ou autres espèces de poisson du fleuve.

Mots clés : α -tocophérol, caroténoïdes, vitamine A, stades de développement, écotoxicologie aquatique.

INTRODUCTION

Depuis le milieu des années 1990, l'effondrement de la population de perchaude (*Perca flavescens*) au lac Saint-Pierre (LSP) persiste en dépit des nombreuses mesures restrictives et des divers plans de gestion visant au rétablissement de cette ressource halieutique (Magnan, 2002 ; Magnan *et al.*, 2008 ; Thibault, 2008). L'une des caractéristiques marquantes du déclin de la perchaude réside dans la faible abondance des jeunes classes d'âge (0-2 ans) particulièrement au sud du LSP (Mailhot *et al.*, 2015).

Bien que l'industrie de la pêche ait contribué au déclin de la perchaude, plusieurs facteurs sont également mis en cause: détérioration des habitats pour la reproduction et la croissance, apparition d'espèces exotiques (ex.: le gobie à taches noires et la tanche), altération de la qualité des eaux et les changements climatiques (de la Chenelière *et al.*, 2014 ; Magnan *et al.*, sous presse). Selon le *Compte-rendu de l'Atelier d'échanges sur l'intégrité écosystémique du lac Saint-Pierre* (2015), l'implication de certains paramètres spécifiques, notamment les pesticides, les contaminants émergents, les conditions hydroclimatiques, etc., aurait été sous-estimée dans l'échec du recrutement de la perchaude.

La qualité des masses d'eau est un facteur important dans l'intégrité écosystémique du LSP, étant étroitement liée à l'apport en contaminants et en nutriments provenant des tributaires de part et d'autres du Chenal de navigation (Hudon *et al.*, 2011 ; Hudon et Carignan, 2008). Les sources de contamination au nord du LSP sont caractérisées par la pollution résiduelle provenant de l'effluent de la ville de Montréal, des rejets des municipalités riveraines et des rivières adjacentes, telles que

la Rivière Maskinongé et du Loup, riches en apports agricoles (La Violette, 2004). Quant au sud du LSP, il est principalement caractérisé par des apports en contaminants agricoles dus à l'exploitation intensive des plaines inondables et aux effluents des bassins versants des rivières Richelieu, Yamaska et Saint-François (Hudon *et al.*, 2011 ; La Violette, 2004 ; Richard *et al.*, 2011). Des études récentes réalisées dans ces bassins versants ont d'ailleurs démontré des impacts importants sur le ouaouaron (*Lithobates catesbeianus*), où les individus provenant des sites les plus pollués en contaminants agricoles présentaient des problèmes de croissance (Marcogliese *et al.*, 2009), d'infections aux parasites, d'immunocompétence (Marcogliese *et al.*, 2009), ainsi qu'un déséquilibre des rétinoïdes (vitamine A) (Boily *et al.*, 2009). D'autres études écotoxicologiques effectuées chez le poisson ont également associé la présence de xénobiotiques (métaux et pesticides) à des perturbations du système rétinoïdien (Alsop *et al.*, 2003 ; Defo *et al.*, 2012 ; Doyon *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 2002). Essentiels à plusieurs fonctions biologiques telles que la différenciation cellulaire, le développement embryonnaire, la croissance et la reproduction (Alsop *et al.*, 2005 ; Alsop *et al.*, 2008 ; Oliveira *et al.*, 2013), l'étude des rétinoïdes s'avère incontournable en regard de la problématique de la perchaude, aux prises avec un problème de recrutement. De plus, plusieurs xénobiotiques ont démontré des propriétés oxydo-réductrices qui accroissent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), telles que les métaux, quinones, colorants (Livingstone, 2001; Hontela et Dorval, 2004), atrazine (Nwani *et al.*, 2010), glyphosate (Sinhorin *et al.*, 2014), néonicotinoïdes (Ge *et al.*, 2015), pour n'en nommer que quelques-uns. La production excessive d'ERO peut porter atteinte aux composantes biologiques comme les lipides, l'ADN, les protéines, etc. (Valavanidis *et al.*, 2006) et, conséquemment, affecter la condition physiologique de l'organisme. L'évaluation du système rédox permet ainsi une estimation du degré de stress auquel sont soumis les individus exposés.

Dans la présente étude, menée en partenariat avec le ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (MFFP), ainsi qu'avec Environnement et Changement Climatique Canada (ECCC), l'objectif a été d'investiguer l'état du système redox, par l'évaluation comparative de la peroxydation des lipides et la quantification d'antioxydants non-enzymatiques, tels que la vitamine E (α -tocophérol) et les caroténoïdes, ainsi que l'état du métabolisme de la vitamine A (rétinoïdes) entre différentes populations de perchaudes du fleuve Saint-Laurent, dont celle du LSP. Afin de mieux comprendre les impacts de la contamination et des activités anthropiques sur l'état de santé de la perchaude du LSP, les biomarqueurs et les paramètres morphométriques (longueur, poids et circonférence) ont été évalués selon une approche comparative basée sur le gradient de pression anthropique croissant d'amont en aval le long du fleuve Saint-Laurent, où le LSP correspond au site le plus impacté.

Cette étude a été effectuée sur 2 années, soit une première campagne en 2013 et une seconde en 2014. La seconde campagne s'insère dans le cadre d'un projet de recherche sur le « Développement d'outils diagnostiques (biomarqueurs) pour les poissons exposés aux pesticides » regroupant plusieurs experts et chercheurs. Ce projet supporté par le Groupe National Consultatif sur les contaminants du ministère de Pêches et Océans Canada (GNCC-MPO) et dirigé par Monique Boily, nous a permis de raffiner les méthodes analytiques visant ainsi une potentialisation de la performance de celles utilisées en 2013.

Le présent document fait état de l'établissement des éléments théoriques nécessaires à la compréhension et à l'interprétation des analyses, suivi des objectifs et hypothèses. En second lieu sont détaillés le travail de terrain (échantillonnage des perchaudes) et les méthodes analytiques utilisées en laboratoire. Les résultats de la campagne de 2013 sont insérés dans le document sous forme d'un article scientifique qui a été soumis à la revue *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Ed. Elseviers. Quant aux

résultats de l'échantillonnage de 2014, ils sont discutés par rapport à la campagne précédente en s'appuyant sur les mêmes biomarqueurs. L'ensemble des résultats permet de brosser un portrait de l'état de santé de la perchaude du LSP, par rapport aux autres populations du fleuve. Cette étude, basée principalement sur des biomarqueurs biochimiques comme outils diagnostiques, apporte des éléments complémentaires à toutes les études écologiques réalisées jusqu'à maintenant sur la perchaude du LSP. Qui plus est, avec quelques ajustements méthodologiques, les biomarqueurs développés pourront servir non seulement pour une biosurveillance des populations de perchaude, mais également pour d'autres espèces de poisson qui font l'objet de suivis des populations.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

Ce 1^{er} chapitre fait état des éléments théoriques relatifs au déclin de la population de perchaude du lac Saint-Pierre et aux facteurs mis en cause, ainsi que la théorie se rapportant au système rédox et aux rétinoïdes. Subséquemment s'ensuit l'établissement des objectifs spécifiques à la présente étude et aux hypothèses émises en regard de la problématique touchant le lac Saint-Pierre.

1.1 Déclin de la perchaude et intégrité de l'écosystème au lac Saint-Pierre

Le lac Saint-Pierre (LSP), dernier grand élargissement d'eau douce du fleuve Saint-Laurent, s'étend de la ville de Sorel-Tracy jusqu'à la municipalité de Nicolet. Le LSP et son archipel forment un réseau hydrographique de 469 kilomètres carrés avec une profondeur moyenne de 2,7 m, comparativement à 13,7 m de profondeur pour le chenal de navigation qui le divise (Frénette et Vincent, 2003; La Violette, 2004). Avec son vaste réseau hydrologique et une douzaine d'hectares de plaines inondables, le LSP abrite une grande biodiversité comme le confirme sa classification de réserve mondiale de la biosphère (UNESCO, 2012). Malheureusement, le LSP voit à l'heure actuelle l'une de ces principales ressources halieutiques, la perchaude, s'épuiser. En effet, de récents bilans rapportent un amoindrissement de la population de perchaude au niveau de l'abondance et de l'échec au recrutement depuis les dix dernières années (Magnan *et al.*, sous presse). De nombreux constats et avis scientifiques relatent ce déclin témoignant d'une préoccupation grandissante quant à l'avenir de cette

ressource au LSP (Guenette *et al.*, 1994 ; Magnan, 2002 ; Magnan *et al.*, 2008 ; Thibault, 2008; Magnan *et al.*, sous presse).

La problématique entourant le déclin de la perchaude au LSP est beaucoup plus complexe qu'il n'y paraît. Elle a d'abord été abordée dans une optique d'exploitation de la ressource, en regard de son importance socio-économique clairement établie pour la région. L'industrie de la pêche profitait alors de ces retombées économiques depuis les années 1980. Dans les années 90, l'inquiétude d'une surexploitation de la perchaude au LSP a mené à l'instauration de plusieurs mesures restrictives et de plans de gestion visant une exploitation durable (Guenette *et al.*, 1994 ; Magnan, 2002). Au début du 2^e millénaire, plusieurs suivis sur l'état des stocks, opérés par le ministère responsable de la faune (actuellement le MFFP) en association avec la Chaire de recherche du Canada en écologie des eaux douces indiquaient toujours un "non rétablissement" de l'état de la population de perchaude (Magnan *et al.*, 2008 ; Thibault, 2008; Magnan *et al.*, sous presse). En mai 2012, un moratoire, interdisant la pêche commerciale et sportive pour une durée de 5 ans a été instaurée au LSP, et s'est étendu jusqu'à Saint-Pierre-les-Becquets en 2013 (MRNF, 2012b ; MDDEFP, 2013)

En dépit des nombreuses mesures restrictives et de gestions d'exploitation mises en place, le constat semble le même à ce jour. Bien qu'ayant joué un rôle irréfutable dans la situation actuelle de la perchaude, l'industrie de la pêche ne semble pas être le seul facteur en cause. Selon Magnan *et al.* (2008), des pressions écologiques et anthropiques modifieraient la dynamique et la qualité de l'habitat pouvant affecter la population de perchaude. De plus, selon le rapport « Portrait global de l'état du Saint-Laurent » paru en 2008 par un comité de concertation, la vulnérabilité de « l'intégrité écosystémique » du fleuve Saint-Laurent est mise de l'avant, où diverses pressions écologiques et anthropiques altèrent la qualité des eaux et des sédiments, ainsi que la biodiversité, etc. (Magnan, 2002; Comité de concertation Suivi de l'état du Saint-

Laurent, 2008; Hudon et Carignan, 2008). D'un côté, la présence de plusieurs espèces envahissantes change la dynamique de l'écosystème. Notamment, reconnu comme grand compétiteur des sources alimentaires, consommateur d'œufs et de larves, et pour sa capacité de frayer plusieurs fois par année, le gobie à taches noires (*Neogobius melanostomu*) serait impliqué dans l'amointrissement des stocks de poisson d'espèces sportives (MRNF, 2012a ; Bernatchez et Giroux, 2000). La tanche (*Tinca tinca*) qui a fait son apparition dans la rivière Richelieu dès 1991 représente un compétiteur de taille pour l'aire de reproduction en zone peu profonde, ainsi que pour la nourriture (Masson *et al.*, 2013 ; Bernatchez et Giroux, 2000). Le cormoran à aigrettes (*Phalacrocorax auritus*) nichant sur les îlots rocaillieux destinés à la navigation au LSP est un important prédateur de petits poissons, dont certains percidés. Son explosion démographique constitue une pression écologique notable sur la dynamique des communautés aquatiques (MRNF, 2013). D'un autre côté, la mauvaise qualité de l'eau en provenance des tributaires et l'élévation de la température modifient le paysage aquatique et favorisent l'apparition de cyanobactéries (Hudon *et al.*, 2011 ; La Violette, 2004 ; Magnan *et al.*, 2008). La qualité des masses d'eau alimentant le LSP est un élément considérable dans la modification de l'habitat et de la disponibilité des nutriments (Hudon *et al.*, 2011). Des apports importants en xénobiotiques proviennent des territoires adjacents au LSP et des principaux tributaires. Plusieurs xénobiotiques sont d'ailleurs reconnus pour modifier l'habitat et la disponibilité en nutriments, certains peuvent également avoir une incidence directe sur la santé des individus en perturbant l'homéostasie de l'organisme (Livingstone, 2001). La qualité des eaux peu profondes est étroitement liée à l'apport en contaminants et en nutriments provenant des tributaires de part et d'autre du chenal de navigation (Hudon *et al.*, 2011 ; Hudon et Carignan, 2008). Au sud, l'exploitation du territoire des bassins versants des rivières Richelieu, Yamaska et Saint-François sont reconnus pour leurs activités agricoles intensives, tandis qu'au nord du chenal, les sources de contamination proviendraient majoritairement des municipalités riveraines et de la pollution résiduelle de Laval et de Montréal, couplé

aux affluents agricoles des bassins versants des rivières Maskinongé et du Loup (Hudon et Carignan, 2008 ; La Violette, 2004). En plus, les pressions anthropiques touchent directement l'écosystème du lac Saint-Pierre en modifiant le paysage des plaines inondables. Cette portion riche et très prolifique se voit de plus en plus menacée par les activités humaines (agricole, route, etc.) (Richard *et al.*, 2011). L'exploitation grandissante du territoire inondable jumelée à l'augmentation de la température et aux fluctuations hydrologiques entraînent une réduction de l'étendue globale des plaines inondables. Ces plaines naturellement formées d'herbacées, d'arbustes et d'arbres font office d'aires de reproduction pour plusieurs espèces aquatiques, dont la perchaude (Bernatchez et Giroux, 2000 ; Hudon *et al.*, 2011 ; La Violette, 2004 ; Richard *et al.*, 2011). La figure 1.1 présente un résumé, générée à partir de plusieurs constat publiés, des altérations de l'intégrité écosystémique auxquelles les perchaudes doivent faire face au lac Saint-Pierre.

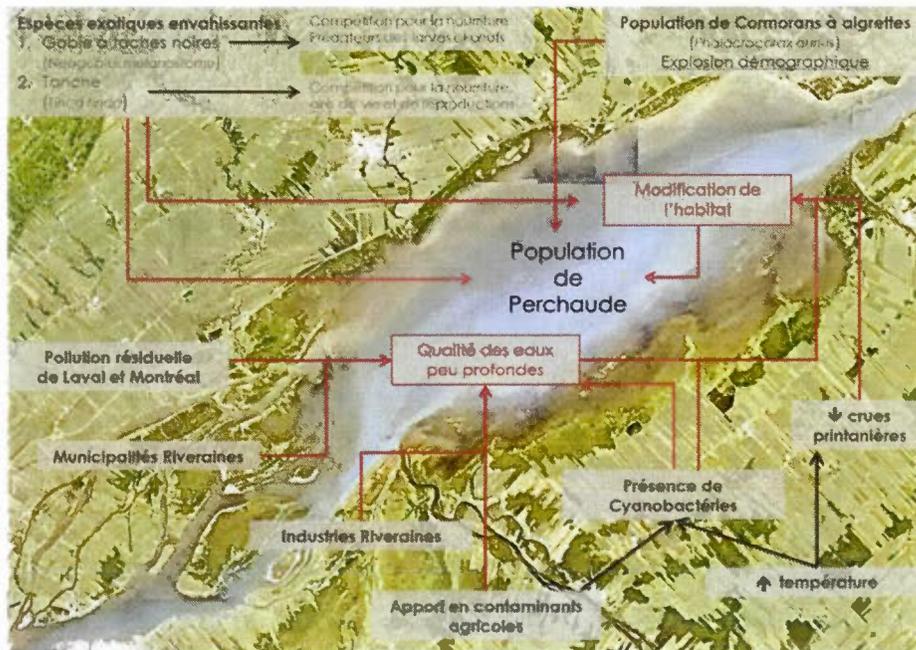


Figure 1.1: Diagramme conceptuel des principales pressions écologiques et anthropiques au lac Saint-Pierre susceptibles d'influencer la dynamique de population de la perchaude. Basé sur des constats déjà publiés: Magnan (2002); La Violette (2004); Hudon et Carignan (2008); Richard *et al.* (2011); Hudon *et al.* (2012); Masson *et al.* (2013); MRNF (2013).

Somme toute, l'effondrement de la population de perchaudes au LSP est caractérisé par une réduction de l'abondance et par un amoindrissement du renouvellement générationnel. Bien que l'industrie de la pêche ait indéniablement joué un rôle dans ce déclin, d'autres facteurs semblent impliqués dans le maintien de la problématique. Plusieurs investigations ont été mises de l'avant afin de vérifier l'implication des pressions anthropiques et écologiques sur la population de perchaude au LSP. D'ailleurs, en mars 2015, un atelier d'échanges sur l'intégrité écosystémique du lac Saint-Pierre, tenu à l'Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR) dans le cadre du Plan d'action Saint-Laurent, a réuni plusieurs experts et chercheurs activement impliqués dans la problématique du LSP, dont l'objectif était de relever et d'évaluer l'implication et le degré d'importance des différents facteurs pouvant altérer l'intégrité du LSP. Il s'est avéré que les apports en contaminants provenant des principaux tributaires, ainsi que l'exploitation agricole dans les plaines inondables ont été identifiés comme des facteurs importants de stress, et les informations relatives à leurs effets sur l'intégrité du LSP semblent limitées. En effet, l'implication de certains paramètres spécifiques, notamment les pesticides, les contaminants émergents, etc., aurait été sous-estimée, nécessitant de plus amples investigations.

1.2 Système rédox

Le métabolisme énergétique des organismes aérobiques, tant aquatiques que terrestres, implique la capture d' O_2 , ainsi que la formation et le relâchement de CO_2 . Ce faisant, les organismes sont exposés au potentiel toxique des différents métabolites de l' O_2 , soit les ERO (Lodish et al., 2005). Plusieurs de ces métabolites, tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$), sont des radicaux libres possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur le dernier orbital, leur conférant une grande instabilité et un haut taux réactionnel (Fang *et al.*, 2002 ; Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Hontela et Dorval, 2004). Ces puissants oxydants peuvent engendrer des dommages cellulaires considérables, entraînant des dysfonctionnements physiologiques importants.

Plusieurs mécanismes antioxydants neutralisent le potentiel toxique des ERO. Ces mécanismes contribuent donc à la « redox-homéostasie » (Ames *et al.*, 1993 ; Valavanidis *et al.*, 2006). Il est donc question de stress oxydant lorsqu'il y a déséquilibre entre les mécanismes pro-oxydants, c'est-à-dire producteurs de ERO, et les mécanismes antioxydants. Ce déséquilibre peut être occasionné lorsque la production en radicaux libres augmente de façon à dépasser les capacités antioxydantes de l'organisme ou à une insuffisance ou à un dysfonctionnement des mécanismes antioxydants (Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Hontela et Dorval, 2004 ; Livingstone, 2001 ; Valavanidis *et al.*, 2006). Les mécanismes pro-oxydants ainsi favorisés endommagent le matériel biologique cible, tels que les lipides, l'ADN et les protéines. L'évaluation du stress oxydant témoigne ainsi du déséquilibre entre les mécanismes pro-oxydant et antioxydant, et correspond à un premier indice sommaire du niveau de stress chez un organisme.

1.2.1 Mécanismes pro-oxydants

Plusieurs processus biologiques endogènes sont impliqués dans la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ames *et al.*, (1993) ont décrit les quatre principaux mécanismes pro-oxydants de l'organisme, soit 1) le métabolisme énergétique par le biais de la respiration cellulaire, et par 2) l'implication des peroxyosomes dans le métabolisme des acides gras et des protéines, 3) la réaction inflammatoire, ainsi que 4) le métabolisme oxydatif du cytochrome P450 (Ames *et al.*, 1993 ; Guegnen *et al.*, 2006 ; Lodish *et al.*, 2005 ; Padros *et al.*, 2004). De plus, la formation de radicaux d'hydroxyle est générée lorsqu'un anion superoxyde et un peroxyde d'hydrogène sont en présence de certains métaux essentiels. Le fer et le cuivre possèdent un puissant pouvoir d'oxydo-réduction ce qui entraîne la formation de radicaux d'hydrogène suivant les réactions de Fenton et de Haber-Weiss (Hontela et Dorval, 2004; Valavanidis *et al.*, 2006). Plusieurs auteurs s'accordent pour affirmer que le radical d'hydrogène ($\cdot\text{OH}$), bien que sa durée de vie et sa diffusion soient faibles, constitue l'ERO le plus réactif et le plus dommageable (Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Hontela et

Dorval, 2004 ; Valavanidis *et al.*, 2006). La figure 1.2 illustre les principaux mécanismes de production endogène des ERO.

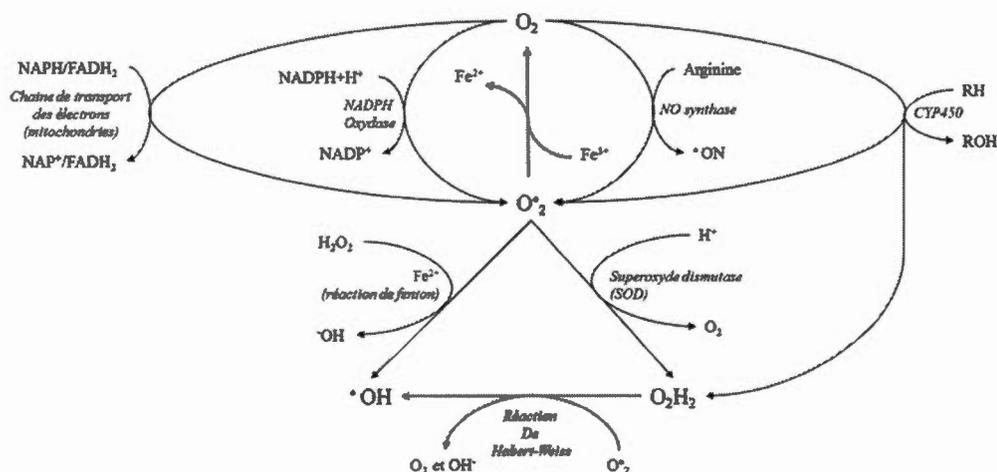


Figure 1.2: Mécanismes de production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Inspirée de Fang *et al.* (2002), Hontela et Dorval (2004) et Ames *et al.* (1993).

Certains xénobiotiques sont reconnus pour leur capacité pro-oxydante (Hontela et Dorval, 2004; Livingstone, 2001 ; Valavanidis *et al.*, 2006). En effet, de nombreux contaminants chimiques possèdent une toxicité associée à la production d'«oxyradicaux» (Hontela et Dorval, 2004). Livingstone (2001) a publié une revue décrivant l'implication de certains contaminants dans la production d'ERO pouvant provoquer des dommages considérables au matériel biologique. Une seconde revue de Valavanidis *et al.* (2006) rapporte les mêmes constatations concernant l'implication de contaminants chimiques dans l'augmentation D'ERO. Ces auteurs mettent en évidence le fort potentiel de différents contaminants (métaux, quinones, colorants, herbicides et composés aromatiques), et de leurs implications dans le déséquilibre du système redox par leurs propriétés oxydo-réductrices. Les dommages oxydatifs du matériel biologique suite à une telle exposition viennent nettement modifier l'état de santé des organismes. En effet, les radicaux libres échappant au système antioxydant peuvent conduire à l'oxydation des groupements thiol de certaines enzymes et coenzymes, à la peroxydation des phospholipides

membranaires et à une altération du matériel génétique (Hontela et Dorval, 2004; Livingstone, 2001; Valavanidis *et al.*, 2006). Livingstone (2001) rappelle que les organismes aquatiques sont exposés à de nombreux xénobiotiques au niveau des sédiments, de la colonne d'eau et de leur nourriture. Le lessivage des terres agricoles, les débordements d'aqueducs, les rejets industriels, etc., sont des sources de contaminants pouvant affecter la santé de nombreux organismes aquatiques et modifier à long terme la dynamique des écosystèmes (Holt, 2000).

1.2.2 Dommages oxydatifs : La peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides est l'un des principaux biomarqueurs du niveau de stress oxydant (Morrow et Roberts II, 1996 ; Pilacik *et al.*, 2002). Ce phénomène implique les lipides possédant au moins deux doubles liaisons carbone-carbone, soit les polyinsaturés (Marnett, 1999 ; Lodish *et al.*, 2005). Les lipides polyinsaturés sont les cibles de prédilection des radicaux libres, tels que les radicaux d'hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) et les hydroperoxydes ($\text{HO}_2\cdot$), ainsi que des radicaux lipidiques ($\text{LOO}\cdot$), en raison de la grande vulnérabilité du groupement méthylène ($-\text{CH}_2-$), positionné entre deux doubles liaisons (figure 1.3) (Cillard et Cillard, 2006 ; Dix et Aikens, 1993 ; Marnett, 1999). Le processus complet de la peroxydation des lipides présenté à la figure 1.3 se déroule suivant trois étapes :

i) La première étape, l'initiation, implique l'arrachement/abstraction par un radical libre d'un atome d'hydrogène (H) du groupement méthylène compris entre deux doubles liaisons d'un lipide polyinsaturé ayant au moins 3 doubles liaisons (figure 1.3). L'acide gras ainsi oxydé forme un radical lipidique ($\text{L}\cdot$) : $\text{LH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{L}\cdot + \text{H}_2\text{O}$ (Cillard et Cillard, 2006 ; Dix et Aikens, 1993 ; Marnett, 1999 ; Valavanidis *et al.*, 2006). ii) S'ensuit l'étape de la propagation. Celle-ci inclut, en premier lieu, un réarrangement stéréochimique du radical lipidique, soit une modification des doubles liaisons afin de tendre à une stabilité moléculaire (Janero, 1990 ; Marnett, 1999). Suite à ce réarrangement, une molécule de dioxygène est alors additionnée au radical

lipidique, entraînant la formation d'un radical peroxyde lipidique (LOO^\bullet) : $\text{L}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{LOO}^\bullet$ (figure 1.3) (Dix et Aikens, 1993 ; Valavanidis *et al.*, 2006). Le « destin » de ce nouveau radical peroxyde lipidique serait en fonction de sa position sur le segment lipidique contenant les doubles liaisons (Janero, 1990 ; Marnett, 1999). Ainsi, si le peroxyde est situé au cœur de ce segment, une réaction de cyclisation est alors préconisée. Si le groupement peroxyde se situe à l'une des extrémités du segment, l'oxydation d'un nouveau lipide entraînera la formation d'un hydroperoxyde lipidique (Valavanidis *et al.*, 2006 ; Janero, 1990 ; Marnett, 1999). Cette dernière réaction est ce qui décrit principalement l'étape de propagation par Dix et Aikens (1993). En effet, un cycle d'« autoxylation » par les radicaux peroxydes lipidiques est enclenché (figure 1.3). iii) L'étape ultime, la terminaison, peut résulter de l'interaction entre deux radicaux lipidiques, ou de la formation de produits non radicaux, tels que le malondialdéhyde (MDA) et des isopropanols dérivant d'une seconde cyclisation (figure 1.3) (Janero, 1990 ; Marnett, 1999 ; Valavanidis *et al.*, 2006). Cependant, la terminaison peut être enclenchée par un mécanisme antioxydant (AH) venant bloquer alors la chaîne de propagation ($\text{LOO}^\bullet + \text{AH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{A}^\bullet$) (figure 1.3) (Cillard et Cillard, 2006).

La peroxydation des phospholipides peut entraîner une perte de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la membrane plasmique, affectant ainsi les signaux de transduction, la reconnaissance et le transport moléculaire, un déséquilibre du potentiel membranaire, etc. (Dix et Aikens, 1993). De plus, les produits non radicaux peuvent provoquer de nombreux dommages au matériel biologique de la cellule. Par exemple, le MDA peut réagir avec les groupements amines (NH_2) des protéines, les lipides et les acides nucléiques de l'ADN. Ces adduits entraînent une altération de la structure et de la fonction des protéines et l'altération de l'expression de certains gènes (Cillard et Cillard, 2006 ; Marnett, 1999).

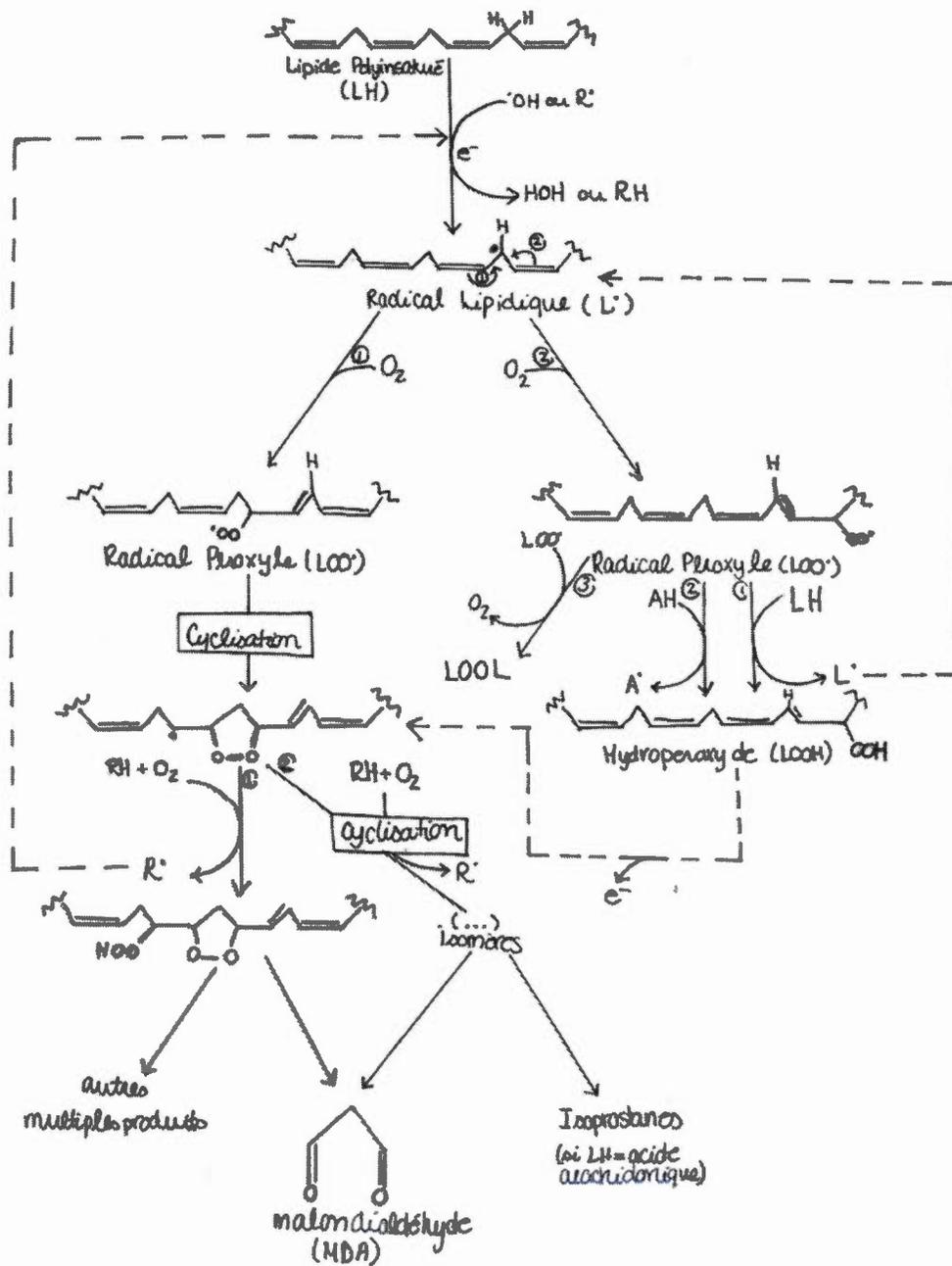


Figure 1.3: Processus généraux de peroxydation lipides. Inspirée de Janero (1990), Dix et Aikens (1993), Marnett (1999), Valavanidis *et al.* (2006) et Cillard et Cillard (2006).

1.2.3 Mécanismes antioxydants

Le système antioxydant constitue un système de défense de l'organisme pour contrer l'oxydation du matériel biologique par les ERO. Conséquemment, tout composé empêchant ou limitant l'action oxydative des radicaux libres correspond à un antioxydant (Gardès-Albert *et al.*, 2006 ; Hontela et Dorval, 2004 ; Sies, 1997). Il est possible de subdiviser les antioxydants selon leur nature enzymatique et non-enzymatique. Les défenses antioxydantes enzymatiques permettent la neutralisation du potentiel oxydant des ERO par le biais de différentes réactions catalytiques (Hontela et Dorval, 2004). Les peroxydases (Px), glutathion réductase (GR), superoxyde dismutase (SOD) et catalase (CAT) sont les principales enzymes du système antioxydant (voir figure 1.4).

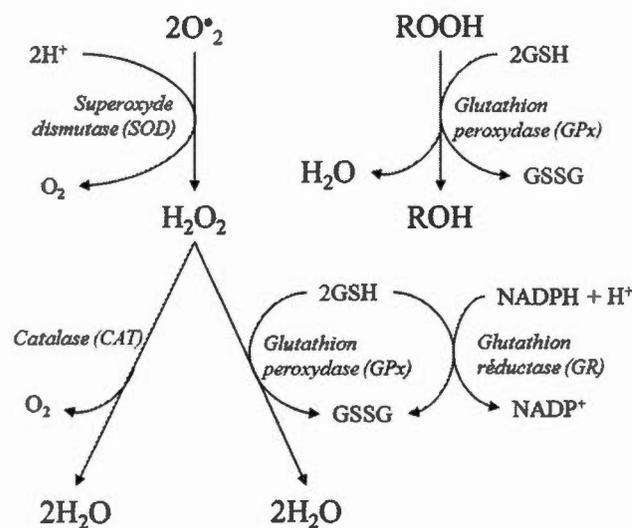


Figure 1.4: Réactions catalytiques des enzymes antioxydantes. Tirée Hontela et Dorval (2004). Superoxyde dismutase (SOD) permet l'oxydoréduction de deux anions superoxydes (O_2^-) pour former une molécule de dioxygène (O_2) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2); Catalases (CAT) réduisent 2 H_2O_2 pour former 2 molécules d'eau (H_2O); Peroxydases (Px) réduisent conjointement un hydroperoxyde ($ROOH$) ou un H_2O_2 avec un peroxyde organique (GSH , forme réduite) formant deux molécules H_2O et disulfure de glutathion ($GSSG$, forme oxydée); Glutathion réductase permet de recycler $GSSG$ en GSH .

Les défenses antioxydantes nonenzymatiques regroupent une grande diversité de molécules pouvant agir comme réducteur ou capteur de radicaux libres (Hontela et Dorval, 2004). Ces molécules peuvent être endogènes ou exogènes. Dans les composés endogènes, il y a le glutathion (GSH) qui constitue un excellent donneur d'électrons (Hontela et Dorval, 2004), ainsi que la métallothionéine. Cette dernière n'est pas un antioxydant à proprement parler, mais permet de restreindre les éléments métalliques pro-oxydants (Fe^{2+} , Cu^+ , Cd^{2+} , etc.) en les séquestrant (Pinel-Alloul *et al.*, 2004). D'ailleurs, cette protéine est reconnue en écotoxicologie comme un excellent biomarqueur d'exposition à une contamination en métaux (Pinel-Alloul *et al.*, 2004). La vitamine E et les caroténoïdes sont quant à eux de très puissants antioxydants lipidiques qui dépendent exclusivement de la diète. Ces molécules, ainsi que leurs métabolites, sont considérées comme de bons biomarqueurs chimiques de stress oxydant, et parallèlement, de bons bioindicateurs de la disponibilité ou de la qualité nutritionnelle du milieu (Comb, 2012a, 2012b ; Gardès-Albert *et al.*, 2003).

1.2.3.1 Vitamine E

La vitamine E regroupe tous les éléments dérivés de tocophérols et de tocotriénols possédant une activité biologique relative à l' α -tocophérol. Elle représente un groupe de puissants antioxydants liposolubles (Brigelius-Flohe et Traber, 1999 ; Cuvelier *et al.*, 2003). Il existe 4 isomères de tocophérols et de tocotriénols (α , β , γ et δ), dont l'ensemble est structurellement composé de cycle chromanol méthylé et d'une chaîne latérale de 16 carbones (C16) qui est insaturée chez les tocotriénols et saturée chez les tocophérols (figure 1.5). Les différentes isoformes (α , β , γ et δ) sont relatives aux nombres (mono-, di- ou tri-) et à l'arrangement des groupements méthyles (Cuvelier *et al.*, 2003). Les différents isomères des tocophérols et des tocotriénols sont présentés à la figure 1.5.

d'une micelle par les sels biliaires dans la lumière intestinale, facilitant la diffusion des nutriments lipophiles au sein des cellules épithéliales de l'intestin grêle, d'où ils sont ensuite intégrés dans un chylomicron (Comb, 2012a ; Tortora et Derrickson, 2007). Conséquemment, l'absorption de la vitamine E est dépendante d'une alimentation et d'une absorption adéquate en lipides. Arrivé au foie, une discrimination positive privilégiant l' α -tocophérol et, en moindre mesure, le γ -tocophérol s'opèrent par le biais d'une protéine de transfert « α -tocopherol transfer protein» (α -TTP). En effet, l' α -TTP se lie avec l' α -tocophérol en provenance du chylomicron et le redistribue dans la circulation sanguine par le biais d'une lipoprotéine (LTBD, LBD, LHD) (Comb, 2012a). Elle est ainsi distribuée aux cellules cibles selon le mécanisme commun des lipides, alors que les autres formes sont généralement éliminées dans la bile ou l'urine. L' α -tocophérol constituant 90% de la vitamine E de l'organisme se loge alors dans les membranes cellulaires et dans celles des organelles, prêt à opérer son rôle d'antioxydant (Comb, 2012a ; Liebler *et al.*, 1996).

La propriété antioxydante de la vitamine E provient de son cycle chromanol (Traber et Atkinson, 2007 ; Wu et Croft, 2007), où son rôle s'effectue principalement en «piégeant» les radicaux peroxydes (ROO^{\cdot}) et particulièrement les radicaux peroxydes lipidiques (LOO^{\cdot}). La vitamine E permet donc de « stopper » l'étape de propagation de la peroxydation des lipides en favorisant la voie de terminaison (Brigelius-Flohe et Traber, 1999 ; Gardès-albert *et al.*, 2003 ; Liebler *et al.*, 1996).

Le métabolisme oxydatif de l' α -tocophérol entraîne la formation de métabolites de type quinone (Brigelius-Flohe et Traber, 1999). Ces métabolites subissent une seconde métabolisation pour permettre leur excréation, considérant leur fort potentiel pro-oxydant. Donc, à partir des α -tocophérolquinones (α -TQ) dérivant de l'action antioxydante de la vitamine E, il y a formation de métabolites de Simon. Ceux-ci correspondent à l'acide α -tocophéronique et ses latones (Brigelius-Flohe et Traber,

1999). De plus, il y a une métabolisation indépendante du rôle antioxydant des α -tocophérol. En effet, certains isomères du cytochrome P450 (CYP450) sont impliqués dans la métabolisation de l' α -tocophérol en α -carboxyéthyl-hydroxychroman (α -CEHC) (Brigelius-Flohe et Traber, 1999 ; Wu et Croft, 2007). Sa formation serait davantage associée à une hypervitaminose, afin de protéger l'organisme du pouvoir pro-oxydant de la vitamine E. En effet, Brigelius-Flohe et Traber (1999) mentionnent que le fort potentiel redox de la vitamine E peut s'exercer tant au niveau anti- que pro-oxydant dépendamment des molécules « partenaires » présentes. Cependant, en présence d'antioxydants complémentaires, tels que l'acide ascorbique (vitamine C) et les caroténoïdes, son pouvoir pro-oxydant serait restreint et même inexistant. D'un autre côté, la vitamine E peut être emmagasinée dans le foie, mais également dans les muscles et les tissus adipeux (Comb, 2012a), afin de limiter son pouvoir pro-oxydant. Les niveaux de vitamine E dans les muscles semblent être en parfaite corrélation avec les niveaux plasmatiques, alors qu'il a été démontré qu'en période de déficit prolongé les concentrations en α -tocophérol des adipocytes restaient relativement stables bien que celles du plasma et des muscles diminuaient provoquant un dysfonctionnement neuromusculaire, soit l'ataxie (Machlin *et al.*, 1979 ; Comb, 2012a). Une telle carence peut également survenir selon la disponibilité ou la qualité alimentaire ou par une altération fonctionnelle de la α -TTP (Ouahchi *et al.*, 1995 ; Qian *et al.*, 2005).

1.2.3.2 Caroténoïdes et rétinoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments organiques naturels allant du jaune au rouge ambré. De façon analogue au métabolisme de la vitamine E, ils sont synthétisés par les organismes photosynthétiques, ainsi que par certaines bactéries et champignons (Stahl et Sies, 2003 ; Yahia et Ornelas-Paz, 2010). Plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés et classés selon leur composition chimique. Ces pigments sont composés d'un squelette carboné C40 insaturé qui a été modifié par une cyclisation à chacune des deux extrémités (figure 1.6). La classe des carotènes regroupe les caroténoïdes hydrocarbonés (figure 1.6-A) et celle des xanthophylles regroupe ceux possédant au

moins un atome d'oxygène (figure 1.6-B) (Britton, 1995 ; Stahl et Sies, 2003 ; Yahia et Ornelas-Paz, 2010). De plus, chaque caroténoïde se présente sous différents isomères, selon leur disposition en forme *cis*- ou *trans*- (Britton, 1995). De façon générale, la forme *cis*- est reconnue pour être plus stable que la forme *trans*-, dû à l'interaction « stérique » entre le groupement méthyle (CH₃) et l'atome d'hydrogène.

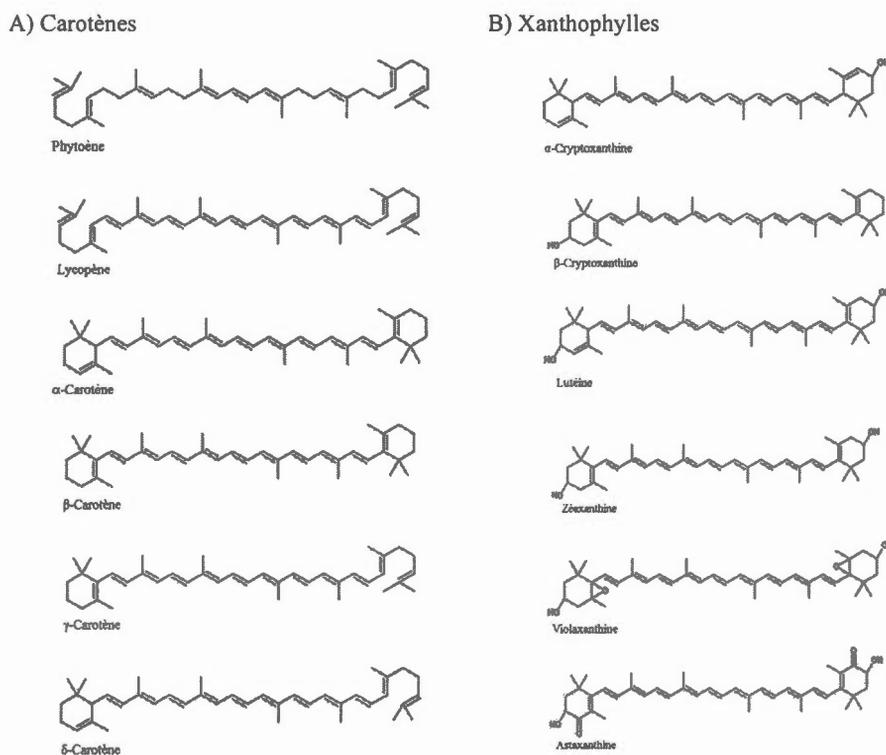


Figure 1.6: Structure des principaux (A) carotènes (caroténoïdes hydrocarbonés) et (B) xanthophylles (caroténoïdes oxygénés). Tirée de Yahia et O.Paz (2010)

Les caroténoïdes sont bien connus en physiologie végétale pour leur rôle « oxydoprotecteur » des photosystèmes, et maintenant, pour leur rôle antioxydant et provitamine A en physiologie animale. Les propriétés d'absorbance et antioxydantes de ces pigments végétaux sont dû à leur chaîne centrale constituée d'une alternance entre doubles et simples liaisons. Selon Britton (1995), cet arrangement « constitue

un système conjugué dans lequel les électrons sont efficacement délocalisés sur toute la longueur de la chaîne ». D'ailleurs, leurs rôles physicochimiques seraient attribuables à leurs capacités structurelles de générer un radical. L'électron non apparié du radical tend à atteindre un état stable par un phénomène de résonance le long de la chaîne centrale (Bendich et Olson, 1989 ; Britton, 1995 ; Edge *et al.*, 1997). Les caroténoïdes sont d'excellents capteurs ERO, tout particulièrement de singlet d'oxygène (O_2^*), de radical hydroxyle ($\cdot OH$) et de radical peroxy ($ROO\cdot$) (Britton, 1995 ; Edge *et al.*, 1997). Les caroténoïdes jouent un rôle important dans le système antioxydant, tout particulièrement lors de phénomènes de peroxydations lipidiques. Ils sont impliqués à différents niveaux afin d'arrêter l'étape de propagation (Bendich et Olson, 1989 ; Burton, 1994 ; Edge *et al.*, 1997). Au premier niveau, les caroténoïdes réagissent directement avec le radical peroxy lipidique. Ce radical s'additionne à la chaîne centrale et tend à se stabiliser par résonance, formant ainsi un « radical carbone-central ». Ce radical nouvellement formé réagit avec un second radical peroxy, entraînant la formation d'un produit non radicalaire propre à l'étape de terminaison (Bendich et Olson, 1989 ; Britton, 1995). Au second niveau, les caroténoïdes sont impliqués dans un « système redox » faisant interagir différents antioxydants ensemble, tels que la vitamine E, les caroténoïdes et la vitamine C (Edge *et al.*, 1997). Ce système permet d'optimiser l'efficacité de l'activité antioxydante de chacun par un effet synergique, tout en limitant leur potentiel pro-oxydant.

Toutefois, l'intérêt porté aux caroténoïdes ne se limite pas à cette fonction. En effet, certains caroténoïdes sont dits provitamine A (rétinoïdes), tel que la cryptoxanthine, l' α -carotène et le β -carotène, en plus de l'astaxanthine, canthaxanthine, zéaxanthine, la lutéine et la tunaxanthine chez les poissons. Ces caroténoïdes, en plus de leur rôle antioxydant, peuvent en effet être métabolisés en rétinoïdes. Les rétinoïdes regroupent tous les composés relatifs au rétinol (vitamine A1) et au déhydrorétinol (vitamine A2) (figure 1.7). Ils sont formés d'un squelette carboné (C20) comportant un cycle β -ionone à l'une des extrémités (Sporn *et al.*, 1984). La particularité des

composés « déhydro » réside dans le double lien additionnel en position 3,4 au sein de leur cycle (figure 1.7). La forme déhydro- semble être la forme de rétinoïde la plus retrouvée chez certaines espèces de poisson téléostéen tant au niveau hépatique que plasmatique (Alsop *et al.*, 2005 ; Gesto *et al.*, 2012). La perchaude est d'ailleurs caractérisée comme une espèce type-déhydrorétinol (Defo *et al.*, 2012).

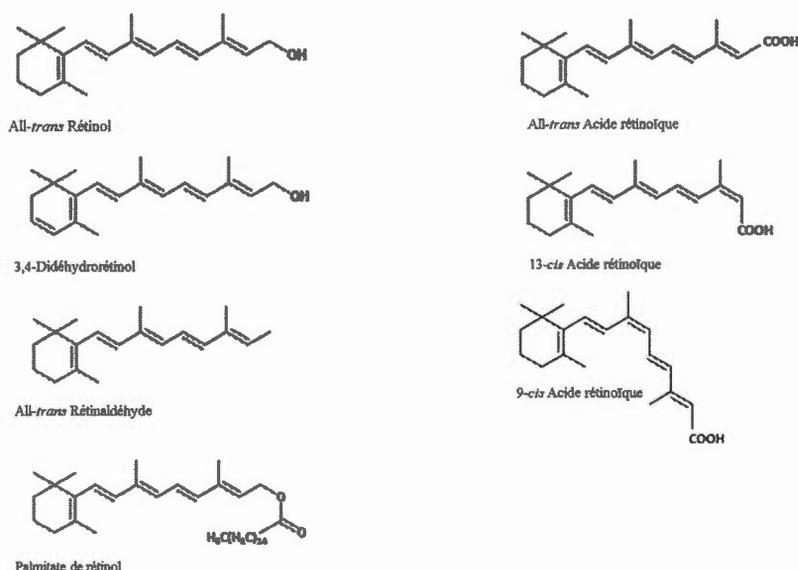


Figure 1.7: Structures chimiques des principaux rétinoïdes. Tirée de Sporn *et al.* (1984) et de Comb (2012c).

Les caroténoïdes provitamine A peuvent donc être oxydés par une caroténoïdes oxygénase (CO1) en rétinaldéhyde (RALD) ou déhydrorétinaldéhyde (DRALD) dans la muqueuse intestinale (figure 1.8). L'aldéhyde ainsi formé est réduit puis estérifié par une lecithine-rétinol acyltransférase (LRAT) ou une acyl CoA:rétinol acyltransférase (ARAT) pour former des esters de rétinol ou de déhydrorétinol, tel que le palmitate de rétinol (PAL) ou de déhydrorétinol (DPAL) (figure 1.8). Les esters de rétinoïdes sont alors transportés jusqu'au foie par des chylomicrons pour y être stockés avec les autres caroténoïdes, la vitamine E et les lipides alimentaires ou ils sont hydrolysés par une hydrolase des esters de rétinoïdes (HER) en rétinol ou déhydrorétinol afin d'être distribués aux tissus périphériques via la circulation

sanguine (figure 1.8) (Bendich et Olson, 1989 ; Comb, 2012c ; Frolik, 1984 ; Matsuno, 1991 ; Parker, 1996). Alors que les caroténoïdes voyagent dans la circulation par le biais de lipoprotéines, les rétinoïdes comme le rétinol hépatique se lient à une protéine de transport spécifique (*Retinol-binding-protein*, RBP), qui est elle-même liée à une molécule de transthyrétine (TTR), jusqu'aux cellules (figure 1.8) (Boily *et al.*, 2004). Bien que les caroténoïdes soient les précurseurs des rétinoïdes, les esters de rétinoïdes stockés forment une source nutritionnelle additionnelle en vitamine A chez les organismes omnivores/carnivores (Alsop *et al.*, 2005).

Les rétinoïdes sont impliqués dans plusieurs fonctions biologiques telles que la différenciation cellulaire, le développement embryonnaire, la croissance, la reproduction, la vision, ainsi que dans l'homéostasie générale de l'organisme et dans la régénération des tissus (Comb, 2012c ; Gesto *et al.*, 2012). C'est principalement l'acide rétinoïque (AR) qui constitue la forme active des rétinoïdes (Frolik, 1984). La liaison des principaux isomères avec leurs récepteurs nucléaires permet leur dimérisation, puis entraîne une réponse cellulaire suite à la juxtaposition du dimère à l'élément de réponse de l'acide rétinoïque (*Retinoic Acid Response Elements*, RARE) (figure 1.9) (Alsop *et al.*, 2005 ; Boily *et al.*, 2004 ; Frolik, 1984). Boily *et al.* (2004) relie la grande variété des rôles physiologiques reconnus aux rétinoïdes par « le grand nombre de combinaisons possibles » entre les isomères de l'AR avec les isoformes du récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) et du récepteur X des rétinoïdes (RXR), ainsi que pour leur potentiel de dimérisation avec d'autres récepteurs nucléaires comme le récepteur de l'hormone thyroïdienne (*Thyroid hormone receptor*, THR) ou le récepteur de la vitamine D (*vitamin D receptor*, VDR) par exemple. La figure 1.9 tirée d'Alsop *et al.* (2005) présente la voie de signalisation de l'acide rétinoïque qui met en relation différentes enzymes et récepteurs spécifiques impliqués.

Les niveaux en AR subissent une fine régulation afin d'être maintenus en concentrations stables dans l'organisme. Un excès ou un manque peut mener à de graves conséquences biologiques, dont des malformations au cours du développement embryonnaire (Comb, 2012c ; Lall et Lewis-McCrea, 2007). C'est pourquoi les niveaux sont finement régulés par une voie catabolique; AR en surplus est oxydé par le CYP450 en métabolites plus polaires (4-oxo-AR, 4-OH-AR, etc.), qui subséquentment seront conjugués à l'acide glucuronique puis excrétés (figure 1.9) (Comb, 2012c ; Novak *et al.*, 2008). Une carence en rétinoïdes peut également entraîner une diminution du taux de croissance (Taveekijakarn *et al.*, 1994), du succès reproducteur (Alsop *et al.*, 2008), des troubles de la vision, un dysfonctionnement du système immunitaire, etc. (Comb, 2012c). Une telle déplétion en vitamine A peut survenir par une augmentation du catabolisme des rétinoïdes dû à l'induction de CYP450 (Arcand-Hoy et Metcalfe, 1999 ; Zhang *et al.*, 2002) ou à l'oxydation nonenzymatique associée à l'augmentation du potentiel pro-oxydant du système biologique (Payne *et al.*, 1998). Il a d'ailleurs été démontré chez diverses espèces aquatiques qu'une exposition à des contaminants, comme des contaminants agricoles (Boily *et al.*, 2009) et des métaux (Zhang *et al.*, 2002), seraient des perturbateurs du métabolisme des rétinoïdes en provoquant une déplétion des niveaux en rétinoïde circulant et hépatique. Alsop *et al.* (2005) ont publié une revue sur la biologie et la toxicologie des rétinoïdes chez le poisson mettant en perspective l'impact de différents contaminants sur l'altération de l'état des rétinoïdes, et ce, à différents niveaux du métabolisme. De plus, la revue de Shirakami *et al.*, (2012) a souligné une variété de xénobiotiques (pesticides, dioxines, biphényles polychlorés) pouvant perturber le métabolisme hépatique des rétinoïdes. Toutefois, la disponibilité des précurseurs et des esters, ainsi que la qualité de la diète peuvent avoir un impact majeur sur les niveaux en vitamine A (Alsop *et al.*, 2008 ; Comb, 2012c).

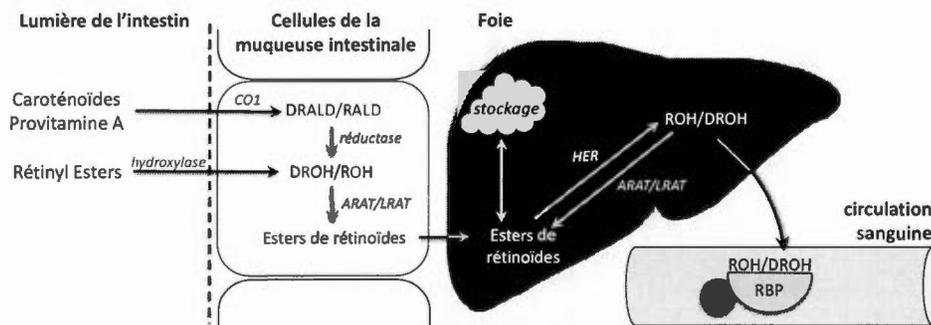


Figure 1.8: Voie d'absorption et de distribution des rétinoïdes chez les vertébrés. CO1, caroténoïdes oxygénases 1; ARAT, acyl CoA :rétinol acyltransférase; LRAT, lecithin-rétinol acyltransférase; HER, hydrolase des esters de rétinoïdes; RBP, retinol-binding-protein protéine de transport du rétinol; TTR, transthyrétine; DRAL, déhydrorétinaldéhyde; RALD, rétinaldéhyde; DROH, déhydrorétinol; ROH, rétinol Basée selon Alsop *et al.* (2005) et Comb (2012c).

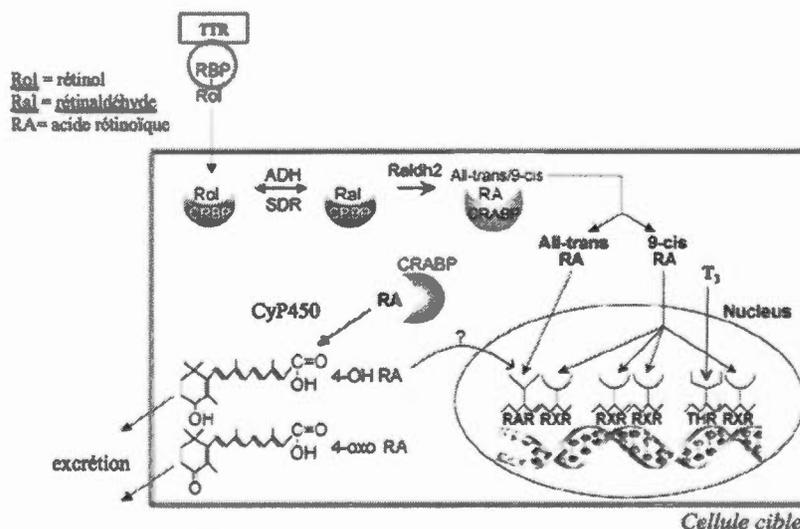


Figure 1.9: Voie de signalisation cellulaire des rétinoïdes. Tirée d'Alsop *et al.* (2005). À partir de l'internalisation du rétinol jusqu'au déclenchement d'une réponse génétique suite à la dimérisation de récepteurs nucléaires associés à un acide rétinoïque (AR) (13-cis-AR, tout-trans-AR ou 9-cis-AR) Protéine de transporteur Retinol-binding protein (RBP) lié à une transthyrétine (TTR); Transporteurs intracellulaires cytosolique cellular retinol-binding protein (CRBP) et cellular retinoic acid-binding protein (CRABP); Enzymes de conversion alcool déshydrogénase (ADH), short-chain déshydrogénase/réductase (SDR), rétinol déshydrogénase (RaldH), et cytochrome P450 (CYP450); Récepteurs nucléaires récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) et récepteur x des rétinoïdes (RXR); Régulation hormone thyroïdienne thyroid hormone receptor (THR) et Triiodothyronine (T_3) (Alsop *et al.*, 2005; Boily *et al.*, 2004).

1.3 Objectifs et hypothèses

L'écotoxicologie met en étroite relation les éléments biotiques et abiotiques, de façon à permettre une évaluation des conséquences biologiques de substances toxiques au sein d'un écosystème (Van Coillie et Parent, 2011). Les biomarqueurs qui sont souvent à la base des études toxicologiques fournissent des éléments biochimiques et biologiques résultant d'une exposition à des agresseurs toxiques *in situ* (Peakall, 1994). Essentiellement, ils sont basés sur la distinction entre l'homéostasie (condition physiologique normale) où un organisme est capable de compenser pour un stress par rapport à une situation où la limite des capacités de compensation est atteinte (Peakall et Walker, 1994). C'est dans cette optique que se situe le cas de la présente étude sur la population de perchaude du lac Saint-Pierre.

Cette recherche vise à établir un aperçu de l'état de santé de la population de perchaude du LSP dans un contexte de suivi écotoxicologique. En considérant l'incidence potentielle des contaminants agricoles, municipaux et industriels affluant au LSP et leurs impacts sur l'homéostasie de la perchaude. Plusieurs biomarqueurs ont été comparés entre différentes populations de perchaude le long du fleuve Saint-Laurent. Ces biomarqueurs sont associés à l'état du système rédox par l'évaluation de la peroxydation des lipides (dosage équivalent du malondialdéhyde, MDA), d'éléments du système antioxydant (dosages de la vitamine E et des caroténoïdes) ainsi que du métabolisme des rétinoïdes. Considérant la grande variété de contaminants présents dans l'écosystème du lac Saint-Pierre le but de cette étude n'est pas d'établir des relations de cause à effet, mais bien de dresser un premier portrait de l'état de santé de la perchaude selon un gradient de perturbation anthropique, où le lac Saint-Pierre présenterait le plus haut degré.

1.3.1 Effet de la contamination et des pressions anthropiques sur la morphométrie et la condition physiologique de la perchaude au LSP

Compte tenu des apports considérables en contaminants provenant des principaux tributaires et de l'exploitation des plaines inondables, **il était attendu que la condition physiologique, évaluée par le coefficient de Fulton (relation entre la taille et le poids), soit affaiblie chez les perchaudes provenant du LSP.** Les études de Defo *et al.* (2012) et de Spear *et al.* (2009) rapportant qu'en milieu contaminé les indices de croissance sont moindres qu'en milieu non contaminé, ainsi que le faible taux de croissance de la population de perchaude du LSP rapporté par Mailhot *et al.* (2015) supportent cette hypothèse.

1.3.2 Effet de la contamination et des pressions anthropiques sur l'état du système rédox et des rétinoïdes au LSP.

Avec les nombreuses perturbations agissant sur l'intégrité du LSP, nous nous attendions à un déséquilibre du système rédox et des rétinoïdes. La peroxydation des lipides étant l'un des premiers dommages oxydatifs pouvant être mesurés chez les organismes soumis à de hauts niveaux de stress (voir revue de Valavanidis *et al.*, 2006), **il était attendu que la mesure de la peroxydation des lipides soit plus élevée au site le plus perturbé, soit au LSP, témoignant d'une hausse du stress oxydant.** Plusieurs études ont d'ailleurs démontré des hausses significatives de la peroxydation des lipides chez les poissons exposés à certains pesticides, dont la deltaméthrine (Sayeed *et al.*, 2003 ; Yonar et Sakin, 2011), l'endosulfane (Pandey *et al.*, 2001) et l'imidaclopride (Ge *et al.*, 2015).

Les caroténoïdes et l' α -tocophérol étant de forts antioxydants et dépendant de la diète, **il était attendu qu'une augmentation de la peroxydation des lipides soit corrélée avec une baisse des niveaux en caroténoïdes ou en α -tocophérol. Une telle relation devrait être plus accentuée au LSP, considérant l'importance des apports en contaminants.** En effet, plusieurs pesticides sont reconnus pour favoriser une hausse de la production d'ERO chez différentes espèces aquatiques: l'atrazine

(Nwani *et al.*, 2010), le glyphosate (Sinhorin *et al.*, 2014) et les néonicotinoïdes (Ge *et al.*, 2015) sont largement retrouvés dans les effluents du LSP, dont la Rivière Yamaska, Saint-François et Nicolet, ainsi que Maskinongé et du Loup (Giroux, 2015).

Les études de Arcand-Hoy et Metcalfe (1999) et de Zhang *et al.* (2002) démontrent que les rétinoïdes peuvent être altérés suite à l'induction de CYP450 par certains contaminants. Selon Payne *et al.* (1998), il existe un lien potentiel entre le stress oxydant et un amoindrissement des niveaux hépatiques en rétinoïdes. De plus, l'étude de Boily *et al.* (2009) rapporte une perturbation du métabolisme des rétinoïdes hépatiques entre l'estérification (LRAT/ARAT) et l'hydrolyse des esters (HER) chez les ouaouarons (*Lithobates catesbeiana*) fortement exposés à la contamination agricole. **Donc, il était attendu que les perchaudes démontrent un amoindrissement global des rétinoïdes (plasmatique et hépatiques) suivant le gradient de pression présumé le long du fleuve Saint-Laurent, où des effets plus marqués seraient observables chez les perchaudes du LSP.**

Considérant l'étroite relation entre les rétinoïdes avec la croissance et le système rédox (Alsop *et al.*, 2008 ; Defo *et al.*, 2012 ; Spear *et al.*, 2009), des corrélations significatives **étaient attendues entre les rétinoïdes, les caroténoïdes, l' α -tocophérol et le coefficient de condition de Fulton. Plus spécifiquement, une réduction de la condition physiologique témoignant d'un déséquilibre de l'état du système oxydant et des rétinoïdes chez les perchaudes du LSP était attendue.**

CHAPITRE II

APPROCHE EXPÉRIMENTALE ET MÉTHODOLOGIE

Ce 2^e chapitre fait état de l'approche expérimentale et de la méthodologie qui ont été utilisées afin de répondre aux objectifs de l'étude, où l'analyse comparative repose sur un gradient de pression anthropique dans le fleuve Saint-Laurent. Des perchaudes ont donc été échantillonnées, et ce, pour 2 années consécutives, soit en 2013 et en 2014, afin d'explorer l'effet de ce gradient sur l'état physiologique et biochimique des perchaudes par l'évaluation des paramètres morphométriques et des biomarqueurs du système rédox (peroxydation des lipides, caroténoïdes, rétinoïdes et α -tocophérol).

La quantification par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inverse avec détection aux ultra-violets (UV) des caroténoïdes, rétinoïdes et α -tocophérol est largement utilisée en écotoxicologie aquatique. La répartition de ces composés chez certains organismes aquatiques, dont les téléostéens, ainsi que l'altération de leur métabolisme en présence de contaminants à maintes fois été analysées par quantification au CLHP permettant une comparaison intéressante avec la littérature (Doyon *et al.*, 1998 ; Tocher *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2002). Le principe de la méthode CLHP est basé sur la polarité des composés, où l'utilisation d'une colonne analytique permet leur séparation selon leur affinité avec la phase mobile versus la phase stationnaire et leur longueur d'onde. Le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS, *thiobarbituric acid reactive substance*) est une méthode simple et efficace de quantifier l'aldéhyde prépondérant résultant de la peroxydation des lipides, soit le MDA (Esterbauer et Cheeseman, 1990

; Morrow et Roberts II, 1996 ; Pilacik et al., 2002). Le principe de cette méthode réside dans la formation d'un « pigment rosé » issu d'une réaction en milieu acide et à haute température d'une molécule de MDA avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA). Cette réaction entraîne la formation d'un complexe coloré détectable par spectrophotométrie (Esterbauer et Cheeseman, 1990 ; Draper *et al.*, 1993 ; Ohkawa *et al.*, 1979).

Bien que les échantillonnages et les analyses statistiques soient demeurés similaires d'une année à l'autre, les méthodes analytiques utilisées en 2013 ont été raffinées afin d'optimiser le rendement et minimiser la quantité de tissu nécessaire pour les analyses de 2014. Les détails relatifs à ces changements sont présentés en annexe.

2.1 Sites d'échantillonnages

Les perchaudes ont été échantillonnées pour 2 années consécutives, soit en 2013 et en 2014, à 6 et à 5 sites respectivement, le long du fleuve Saint-Laurent (voir figure 2.1). Les sites ont été comparés selon un gradient de pression anthropique d'amont en aval selon l'ordre suivant; lac Saint-François (LSF) < lac Saint-Louis (LSL) < lac Saint-Pierre (LSP). Le LSF est caractérisé par les propriétés physico-chimiques ainsi que les apports industriels et urbain provenant majoritairement (98%) des Grands Lacs. Le LSL, dont le territoire adjacent est dominé par des zones urbaines et industrielles, reçoit trois masses d'eau: au nord par la rivière des Outaouais, au centre par les eaux des Grands Lacs et au sud par les tributaires Saint-Louis et Châteauguay (La Violette, 2004). Le LSP est aussi alimenté par trois masses d'eau distinctes provenant de plusieurs grands tributaires représentant un apport en contaminants très varié (Frénette et Vincent, 2003 ; Hudon et Carignan, 2008 ; La Violette, 2004). Le sud du LSP reçoit les apports des rivières Richelieu, Yamaska et Saint-François dont les bassins versants sont reconnus pour l'exploitation agricole intensive. La portion sud du LSP reçoit des apports considérables en contaminants agricoles de ces trois tributaires, mais également de l'exploitation des plaines inondables (Hudon et

Carignan, 2008 ; La Violette, 2004 ; Richard *et al.*, 2011). Au nord, la contribution en contaminants agricoles est limitée aux rivières Maskinongé et du Loup, la qualité des eaux étant majoritairement influencée par la pollution résiduelle de Montréal et des municipalités riveraines (La Violette, 2004).

Contrairement au LSF, les LSL et LSP sont caractérisés par des masses d'eau hétérogènes de part et d'autre du chenal de navigation. Ces masses d'eau se différencient par le débit, les apports en contaminants et leurs propriétés physico-chimiques (Frénette et Vincent, 2003 ; Hudon et Carignan, 2008 ; La Violette, 2004). Il s'est avéré impératif, dans notre échantillonnage, d'évaluer l'influence potentielle de ces divergences entre les rives sud (S) et le nord (N) pour le LSL et le LSP (figure 2.1). De plus, pour l'échantillonnage de 2013, un 6e site a été ajouté, soit l'Île Beauregard (IB). Ce site, localisé en aval de l'usine d'épuration de la ville de Montréal (figure 2.1), est reconnu pour être altéré par une forte contamination urbaine et industrielle (Houde *et al.*, 2014 ; Marcogliese *et al.*, 2015).

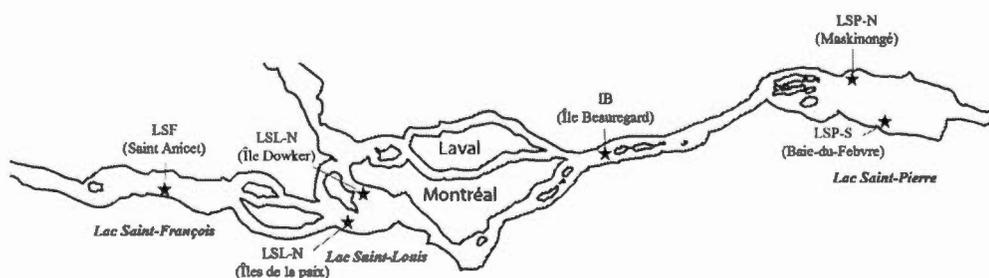


Figure 2.1: Localisation des sites d'échantillonnages de perchaudes (étoiles) pour les campagnes de 2013 et de 2014 le long du fleuve Saint-Laurent. LSF, lac Saint-François ; LSL-N, lac Saint-Louis nord; LSL-S, lac Saint-Louis sud ; LSP-N, lac Saint-Pierre nord; LSP-S, lac Saint-Pierre sud; IB, Île Beauregard.

2.2 Échantillonnages : Captures, mesures morphométriques et prélèvements

Au printemps 2013 et 2014, entre 15 et 30 perchaudes, ont été capturées à chacun des sites au moyen d'une seine ou de verveux. Les poissons ont été euthanasiés avec une solution d'eugénol. Les captures et le traitement des poissons étaient conformes aux exigences du Comité Institutionnel de Protection des Animaux de l'UQAM (CIPA#879). Le poids (g), la longueur (mm) et la circonférence (mm) ont été mesurés, et l'indice de condition de Fulton (K) a été calculé selon l'équation suivante: $K = 10^5 \times \text{poids(g)}/\text{taille(mm)}$ (Barnham et Baxter, 1998). Le foie entier ainsi que des échantillons de muscle (0,1 à 0,5 g) ont été prélevés pour chaque perchaude capturée. Les tissus ont été immédiatement mis sur glace sèche, puis conservé au -80°C jusqu'au moment des analyses en laboratoire. Le sexe a été déterminé suite à l'analyse histologique des gonades effectuée par le Centre Québécois sur la santé des animaux sauvages (CQSAS) de la faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal. L'âge des perchaudes capturées a été estimé par le MFFP selon la méthode de dénombrement des anneaux de croissance sur les opercules décrite dans Deschamps (2013). En se référant à la théorie rapportée par Brown *et al.* (2009) et par Bernatchez et Giroux (2000), les perchaudes âgées entre 1 et 2 ans ont été classées comme juvéniles et celles âgées de 3 ans et plus ont été classées comme adultes. Un volume de sang (300 à 800 µl) a également été prélevé à partir de la veine caudale avec des aiguilles pré-héparinées. Les échantillons de sang ont été conservés sur glace 10 min avant d'être centrifugés à $5\,000 \times g$ durant 3 min. Le plasma a été transféré dans un nouveau tube et immédiatement déposé sur glace sèche. Les échantillons de plasma ont été conservé au -80°C jusqu'aux moment des analyses en laboratoire. En 2013, une collecte de larves de perchaude a été effectuée par "push net" tel que décrit dans Bertolo *et al.* (2012). Les larves (entières) ont été congelées sur glace sèche, puis conservées dans un congélateur à -80°C jusqu'aux analyses des biomarqueurs. Cette collecte n'a pas été reconduite en 2014.

2.3 Méthodes analytiques des biomarqueurs pour 2013

2.3.1 Quantification par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

L'ensemble des manipulations relatif à la quantification des caroténoïdes, rétinoïdes et α -tocophérol a été effectué sous lumière jaune afin de prévenir la photo-dégradation des composés.

2.3.1.1 Caroténoïdes, rétinoïdes et α -tocophérol dans le foie et les larves entières

Pour 2013, la méthode d'extraction des caroténoïdes, des rétinoïdes et de l' α -tocophérol du foie des perchaudes a été effectuée selon la méthode de Spear et Moon (1986). Brièvement, pour chaque échantillon, 200 mg de foie ont été préalablement déshydratés avec 2,0 g de sodium sulfate anhydre (Na_2SO_4) (Anachemia Science, Lachine, Qc, Canada) par broyage au mortier et pilon. La poudre résultante a été transférée dans un tube de borosilicate à bouchon vissable, dans lequel a été ajouté un volume de 5 ml d'hexane (Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada) contenant 0,1% d'hydroxytoluène butylé (BHT) (Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada). Subséquemment, chaque tube de borosilicate a été remué durant 15 min, puis centrifugé à $1\ 625 \times g$ durant 5 min. Un volume de 500 μl de surnageant a été récupéré et transféré dans une éprouvette, puis évaporé à sec avec un concentrateur évaporateur (Eppendorf™, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) à 45°C durant 10 min. Le condensé ainsi obtenu a été suspendu dans 200 μl d'acétonitrile (ACN) (Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada), puis vortexé durant 30 sec avant l'injection au CLHP.

L'extraction des caroténoïdes, des rétinoïdes et de l' α -tocophérol des larves entières a été effectuée selon la méthode de Hedrei Helmer *et al.* (2014). Chaque larve a été mesurée (≈ 24 mm) et pesée ($\approx 0,180$ g), puis homogénéisée dans un tube en verre par Polytron (Kinematica AG, Bohemia, NY, USA) sur glace avec 3 ml de PBS contenant 0,1% d'acide ascorbique (Fisher Scientific, Saint-Laurent, QC, Canada).

Un volume de 2 ml d'homogénat a été transféré dans un tube de borosilicate. Un volume de 1 ml d'éthanol contenant 0,1% de BHT a été ajouté au volume d'homogénat, puis vortexé durant 30 sec. Trois extractions successives ont été réalisées. La première extraction, consistait en l'ajout de 4 ml d'une solution d'hexane-acétone (50%:50%) comprenant 0,1% de BHT. Pour les deux dernières extractions, un volume de 3 ml de la solution hexane-acétone a été utilisé. Après chaque volume ajouté, le mélange a été vortexé durant 90 min et centrifugé à $2\,000 \times g$ durant 5 min, puis à la fin de chaque série d'extraction, un volume de 1,7 ml de surnageant a été récupéré et transféré dans une éprouvette. L'extrait a alors été successivement évaporé à 45°C durant 10 min. Le condensé ainsi obtenu a été suspendu dans 400 μ l d'ACN, vortexé durant 30 sec, puis centrifugé à $250 \times g$ durant 3 min avant injection au CLHP.

La quantification des rétinoïdes, des caroténoïdes et de l' α -tocophérol dans le foie et dans les larves entières s'est effectué en 2013 sur deux systèmes de CLHP en parallèle, soit un premier système pour la quantification des rétinoïdes et un second système pour la quantification de caroténoïdes et de l' α -tocophérol.

CLHP 1: Rétinoïdes

Dans le premier système de CLHP, la méthode de détection a été basée sur celle de Doyon *et al.* (1998). Un volume de 50 μ l de chaque extrait a été injecté dans un système CLHP en phase inverse (Water Corporation, Milford, MA, USA) équipé d'un programme Empower, des pompes Waters 510, ainsi que d'un détecteur Waters 486 programmé à 326 nm pour la détection des rétinoïdes. Les rétinoïdes ont été séparés avec une colonne analytique ACE C18 de 4,6 mm x 250 mm avec des billes de 5 μ m de diamètre (Canadian Life Science, Peterborough, ON, Canada). La phase mobile qui a été utilisée suivant un gradient linéaire de 95% d'H₂O:15% de méthanol (MeOH) à 68% de MeOH:32% d'acétate éthyle (Sigma-Aldrich Ltd, Oakville, ON,

Canada) après 6 min. Cette condition a été maintenue pendant 21 min, pour revenir à la condition initiale à 27 min pour un temps d'élution totale de 29 min. Un débit constant a été maintenu à 1 ml/min. Les aires sous la courbe de tous les composés ont été identifiées et quantifiées avec des standards chimiques (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Sous ces conditions, cinq rétinoïdes ont été détectés: tout-*trans*-3,4-didéhydrorétinol (DROH, 6,5 minutes), tout-*trans*-rétinol (ROH; 7,3 min), palmitate 3,4-didéhydrorétinol (DPAL, 17,2 min) et tout-*trans* palmitate de rétinol (PAL; 18,8 min).

CLHP 2: Caroténoïdes et α -tocophérol

Dans le second système, la méthode de détection des caroténoïdes et de l' α -tocophérol a été basée sur celle d'Hedrei Helmer *et al.* (2014). Un volume de 70 μ l d'extrait de foie ou de 50 μ l d'extrait de larve a été injecté dans un système CLHP équipé d'un détecteur Waters 2487 programmé à 445 et 292 nm pour la détection des caroténoïdes et de l' α -tocophérol respectivement. Les analytes ont été séparés par une colonne analytique Chromegabond C30 de 4,6 mm x 250 mm avec des billes de 5 μ m de diamètre (Canadian Life Science, Peterborough, ON, Canada). La phase mobile qui a été utilisée suivant un gradient linéaire de 84% d'ACN:9% d'MeOH:7% d'H₂O à 68% de MeOH:32% d'acétate éthyle après 12 min. Cette condition était maintenue pendant 11 min, pour revenir à la condition initiale à 24 min pour un temps d'élution totale de 35 min. Un débit constant a été maintenu à 1,5 ml/min. Les aires sous la courbe ont été identifiées et quantifiées avec des standards chimiques de caroténoïdes (DHI Lab Products, Hørsholm, Danemark) et d' α -tocophérol (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Sous ces conditions, huit caroténoïdes ont été détectés: la fucoxanthine (5,7 min), diatoxanthine (9,8 min), lutéine (10,2 min), zéaxanthine (10,5 min), cryptoxanthine (15,2 min), lycopène (18,9 min), α -carotène (21,5 min) et β -carotène (21,9 min), en plus de l' α -tocophérol (14,8 min).

2.3.1.2 Rétinoïdes dans le plasma

Les extractions et la quantification des rétinoïdes plasmatiques, pour les échantillons de 2013, ont été effectuées selon la méthode de Bérubé *et al.* (2005) sans modification, excepté pour le volume évaporé à sec qui était de 2,8 mL. Les condensés ont été resuspendus dans 100 µl ACN puis vortexés durant 30 min avant d'être injectés. Un volume de 80 µl a été injecté dans un système CLHP, tel que décrit pour les rétinoïdes hépatiques (CLHP 1). Les analytes ont été séparés avec une colonne analytique ACE C18 de 4,6 mm x 250 mm avec des billes de 5 µm de diamètre (Canadian Life Science, Peterborough, ON, Canada). Sous ces conditions, cinq rétinoïdes ont été détectés, : tout-*trans* 3,4-didéhydroretinol (DROH, 14,3 minutes), 13-*cis* acide rétinoïque (13-*cis* AR; 18,1 min), tout-*trans* retinol (ROH; 19,8 min), 9-*cis* acide rétinoïque (9-*cis* AR; 20,3 min) et tout-*trans* acide rétinoïque (tout-*trans* AR; 21,5 min). Considérant les très faibles niveaux d'acides rétinoïque quantifiés dans le plasma, il s'est avéré plus adéquat de les grouper, et ainsi une addition des aires sous la courbe a été faite.

2.3.2 Dosage des TBARS dans le muscle

Pour 2013, la peroxydation des lipides a été évaluée dans le muscle de perchaude, ainsi que dans les larves entières par dosage des TBARS basé sur la méthode de Ohkawa *et al.* (1979). Le muscle (masse \approx 250 mg) a été homogénéisé dans 2 ml de solution de phosphate à pH neutre (PBS). L'homogénat (1,5 ml) a été centrifugé à $4\ 000 \times g$ durant 10 min à 4°C. Pour les larves, l'homogénat a été préparé avec environ 180 mg de tissu dans 3 ml de PBS contenant 0,1% d'acide ascorbique et a été centrifugé à $10\ 000 \times g$ durant 10 min à 4°C. Le surnageant (200 µl) de chaque échantillon a été transféré dans une éprouvette. Les étapes subséquentes ont été effectuées exactement tel que décrit dans Hedrei Helmer *et al.* (2014). Les niveaux en TBARS (nmol/g de tissu) ont été déterminés par fluorescence en utilisant un lecteur de microplaque (Tecan, Morrisville, NC, USA) muni du logiciel i-Control 9

programmé à une excitation de 532 nm et une émission de 553 nm pour un volume total de 200 µl de surnageant par puits dans une microplaque de quartz (Hellma Canada Ltd, Markham, ON, Canada). Une courbe standard a été préparée en duplicat à partir d'une solution de 1,1,3,3,3-tétraméthoxypropane (TTMP, Sigma-Aldrich LTD, Oakville, On, Canada), afin d'obtenir des concentrations finales variant de 5 à 300 nM.

2.4 Méthodes analytiques des biomarqueurs pour 2014

La campagne de 2014, s'inscrivant également dans un projet plus global sur l'investigation des effets biologiques des contaminants sur les espèces aquatiques supporté par le Ministère de Pêche et Océan Canada, a défini des objectifs méthodologiques supplémentaires à la présente étude voulant l'optimisation des méthodes analytiques utilisées en 2013. La quantification des caroténoïdes, des rétinoïdes et la vitamine E (α -tocophérol) dans le foie a donc été optimisé avec un système de chromatographie liquide à ultrahaute performance (CLUHP), plus rapide et plus sensible (Granado-Lorencio *et al.*, 2010). Dans le même souci d'optimiser la détection des rétinoïdes du plasma, nous avons également adapté une méthode sur le système CLUHP. Ce raffinement de méthode a permis d'optimiser le temps d'analyse et de minimiser la quantité de tissu nécessaire. De plus, le transfert de méthode a permis de centraliser les analyses en utilisant un seul système de chromatographie. Les détails relatifs aux transferts de méthodes sont présentés à l'annexe A. L'évaluation de la peroxydation des lipides a également été optimisée pour une méthode hybride entre celle d'Hedrei Helmer *et al.* (2014) et celle de Camejo *et al.* (1998). La méthode de dosage des TBARS en microplaque ainsi mise au point a permis de réduire le temps d'analyse tout en augmentant le nombre d'échantillons par analyse, ainsi que de minimiser la quantité de tissu nécessaire. Les détails relatifs à l'adaptation de méthode des TBARS sont présentés à l'annexe B.

2.4.1 Quantification par chromatographie liquide à ultrahaute performance (CLUHP)

Le CLUHP utilisé (Agilent Technologies Canada, Toronto, ON) était un système à alésage étroit de la série 1200 composé d'un dégazeur, d'une pompe binaire et d'un injecteur automatique. Les analytes ont été séparés avec une colonne Zorbax Eclipse Plus C-18 de dimension 3,0 X 50 mm avec des billes de 1,8 μm de diamètre (Rapid Resolution HT; Agilent Technologies Canada, Toronto, ON) munie d'une colonne de garde de type Poroshell 120 SB-C18 de dimension 3,0 X 5,0 mm avec des billes de 2,7 μm de diamètre (UHPLC Guard; Agilent Technologies Canada, Toronto, ON). Les analytes ont été détectés avec un détecteur UV à balayage (diodearray, DAD; Agilent Technologies Canada, Toronto, ON) en lecture continue. Le système était équipé du logiciel Chemstation (OpenLab CDS Chemstation edition LC-LC/MS systems; Rev C.01.07 SR1 [113]; Agilent Technologies Canada, Toronto, ON). L'ensemble des manipulations ont également été effectuées sous lumière jaune.

2.4.1.1 Caroténoïdes, rétinoïdes et α -tocophérol dans le foie

Pour les échantillons de foie de 2014, l'extraction des caroténoïdes, des rétinoïdes et de l' α -tocophérol a été effectuée suivant la méthode de Spear et Moon (1986), dont les volumes utilisés suite à la centrifugation de $1\ 625 \times g$ durant 5 min ont été modifiés pour s'adapter au système CLUHP. En effet, un volume de 1,5 ml de surnageant a été récupéré dans une éprouvette (75 x 12 mm) et évaporé à 45°C durant 15 min par concentrateur évaporateur. Le condensé a été suspendu dans 200 μl d'ACN puis vortexé durant 30 sec avant d'être transféré dans un vial ambré de 2,0 ml (Canadian Life Science, Toronto, ON, Canada) contenant un "insert" de 350 μl (Canadian Life Science, Toronto, ON, Canada). Un volume de 20 μl a été injecté dans le système du CLUHP. La phase mobile utilisée, adaptée de la méthode Hedrei Helmer *et al.* (2014), suit un gradient linéaire allant de 80% d'ACN, avec 10% de MEOH et 10% H₂O au temps zéro jusqu'à 85% de MEOH et de 15% d'acétate

d'éthyle après 8 min, et ce, durant 20 min pour un retour progressif au solvant initial à 21 min. Les conditions définitives ont été maintenues jusqu'à 25 min. Le débit a été maintenu constant à 0,4 ml/min. Sur ce système les temps de rétention des caroténoïdes (445nm) étaient les suivants: 2,1 min pour la fucoxanthine, 4,8 min pour la diatoxanthine, 5,3 min pour la zéaxanthine, 5,3 min pour la lutéine, 10,4 min pour l' α -crytoxanthine, 10,6 min pour la β -cryptoxanthine, 13,5 min pour le lycopène, 15,3 min pour l' α -carotène et 15,8 min pour la β -carotène. Le DROH et le DPAL ont été détectés à 350 nm à des temps de rétention de 1,8 min et 13,1 min respectivement alors que le ROH a été détecté à 2,3 min et le PAL à 14,4 min à 325 nm. Enfin, le temps de rétention de l' α -tocophérol était de 9,9 min à 292 nm. Les aires sous la courbe relatives aux isoformes α et β ont été groupées, tant pour les cryptoxanthines que les carotènes lors des analyses statistiques. La zéaxanthine et la lutéine ont également été combinées formant le groupe « autres xanthophylles ».

2.4.1.2 Rétinoïdes dans le plasma

Pour les échantillons de plasma de 2014, l'extraction des rétinoïdes a été effectuée selon la méthode décrite par Bérubé *et al.* (2005), avec des volumes coupés de moitié, soit un volume de 100 μ l de plasma, 100 μ l de méthanol (contenant 1,1 mg/ml de BHT), 500 μ l de solutions d'extractions ($\times 3$), et un volume de 400 μ l ($\times 1$) et de 500 μ l ($\times 2$) de surnageant ont été récupérés pour l'évaporation. Le condensé final a été resuspendu dans 75 μ l d'acétonitrile (ACN) puis vortexé durant 30 sec avant d'être transféré dans un Vial ambré de 2,0 ml comprenant un insert de 150 μ l (Canadian Life Science, Toronto, ON, Canada). Un volume de 20 μ l a été injecté dans le système de CLUHP. La phase mobile utilisée, adaptée de la méthode de Gauthier et al. (en rédaction), suit un gradient de 50% ACN et 50% H₂O augmentant à 70% ACN pour 30% H₂O durant 2 min, puis à 85% ACN et 15% H₂O jusqu'à 6 min. Cette condition est maintenue pendant 8 min (soit jusqu'à temps = 14 min). La phase mobile revient en gradient linéaire à la condition initiale au temps 20, soit à 50%

ACN et 50% H₂O. Cette condition est maintenue jusqu'à 25 min avec un débit constant de 0,5 ml/min. La phase mobile a été acidifiée avec de l'acide formique (0,1%). Le temps de rétention pour le DROH était de 6,6 min. Pour l'acide rétinoïque, nous avons obtenu un temps de rétention de 7,3 min pour le 13-*cis* AR, 7,4 min pour le 9-*cis* AR et 7,5 min pour le tout-*trans* AR. Le DROH et les AR ont été détecté à 350 nm. Le tout-*trans* ROH a été détecté à 325 nm à un temps de rétention de 7,6 min et celui du RALD de 8,5 min à 380 nm. Les aires du 13-*cis* AR et 9-*cis* AR ont été additionnées pour former le groupe «*cis* AR », ainsi que pour les aires du tout-*trans* ROH et le tout-*trans* RA formant le groupe « autres rétinoïdes ».

2.4.2 Dosage des TBARS dans le muscle et le foie

Les échantillons de muscle et de foie ont été homogénéisés selon la proportion 0,125 g/ml de tampon phosphate (PBS) à pH 7,5 comprenant 0,1% (*w/v*) d'acide ascorbique (Fisher Scientific, Saint-Laurent, QC, Canada) et des inhibiteurs de protéases, soit l'antipain et la pepstatine (Sigma-Aldrich Ltd, Oakville, ON, Canada). L'homogénat a été centrifugé à 4 000 × *g* durant 10 min à 4°C. Le surnageant a été épuré selon la méthode de précipitation des protéines au sodium déoxycholate (DOC) et à l'acide trichloracétique (TCA) décrite par Peterson (1977). Pour 200 µl de surnageant, un volume 100 µl de DOC (Acros Organics Chemicals, New Jersey, NJ, É-U) à 0,15% (*w/v*) a été ajouté puis vortexé durant 30 sec pour être ensuite incubé sur glace durant 10 min. Un volume de 100 µl de TCA (Anachemia Science, Lachine, QC, Canada) à 72% (*w/v*) a ensuite été ajouté et le tout agité vigoureusement durant 30 sec. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 9 000 × *g* durant 15 min à 4°C. Le dosage des TBARS a été effectué selon la méthode décrite par Camejo *et al.* (1998) à partir du surnageant obtenu. La microplaque a été refermée et recouverte de papier aluminium avant d'être incubée à 80-90°C sur un bloc chauffant (Fisher Scientific, Saint-Laurent, QC, Canada) durant 60 min. Une incubation sur glace durant 10 min a été effectuée afin d'arrêter la réaction. La lecture de la réaction a ensuite été faite au spectrophotomètre (Power Wave HT microplate Spectrophotometer; BioTek,

Winooski, VT, US) à une longueur d'onde de 530 nm et celle de la turbidité à 650 nm. Cette seconde lecture permet ainsi de soustraire l'effet de la turbidité tel que proposé par Camejo *et al.* (1998). Une courbe standard a été préparée en duplicat afin d'obtenir 5 quantités variant de 0,14 à 2,25 nmole de TTMP par puits.

2.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques des données obtenues pour les campagnes d'échantillonnages de 2013 et de 2014 ont été effectuées avec le logiciel JMP-Pro 11.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, US). Étant donné que le sexe n'a démontré aucune influence sur les paramètres à l'étude, les données ont été considérées comme une seule population statistique. Des analyses statistiques indépendantes selon le stade de développement ont toutefois été effectuées. Pour 2013, des analyses ont été effectuées selon le stade larvaire (moins de 1 an), le stade juvénile (1 à 2 ans) et le stade adulte (3 ans et plus), alors qu'en 2014, les analyses statistiques ont été réalisées seulement pour le stade adulte (3 ans et plus). En effet, aucune collecte de larve n'a été effectuée lors de la campagne de 2014 et seulement 3 juvéniles (1 à 2 ans) ont été capturés, soit 1 au LSF, 1 au LSL-N et au 1 au LSP-S. Ces derniers n'ont donc pas été considérés lors des analyses statistiques. De plus, bien que l'effort de pêche ait été similaire à celui porté aux autres sites, seulement 2 perchaudes ont été capturées au LSL-N en 2014. Nous avons donc ajouté les données relatives à l'adulte échantillonné au LSL-N avec ceux du LSL-S lors de l'analyse statistique, de manière à former un groupe identifié comme le site LSL. Étant donné que les méthodes analytiques utilisées étaient différentes entre les campagnes d'échantillonnage 2013 et 2014, nous avons limité la comparaison entre les années à une comparaison qualitative.

Les paramètres morphométriques ainsi que les biomarqueurs ont été comparés entre les sites par ANOVA (F) ($\alpha = 0,05$). Si le modèle était significatif ($p \leq 0,05$), un test de comparaisons par paires a été réalisé avec le test t de Student ($\alpha = 0,05$). Dans le

cas où les conditions d'utilisation n'étaient pas satisfaisantes, soit la normalité de la distribution et l'égalité des variances, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (H) ($\alpha = 0,05$) a été effectué. Lorsque le modèle était significatif, une comparaison par paires a également été faite avec le test de Dunn ($\alpha = 0,05$). Des corrélations non paramétriques de Spearman (ρ) ont été effectuées afin d'explorer les relations entre les paramètres. Enfin, pour mieux examiner les variations entre les paramètres morphologiques et l'âge, des analyses en composantes principales (ACP) ont été effectuées pour les adultes de chaque site. De plus, en 2014, avec l'augmentation de la puissance statistique, reliée à l'augmentation du nombre d'effectifs, nous avons exploré plus avant l'effet du site sur l'état des rétinoïdes par une modélisation linéaire multivariée des niveaux en DPAL selon les niveaux en DROH et les sites. Afin de satisfaire aux conditions d'application de cette analyse, dont l'homoscédasticité des résidus, une transformation logarithmique des variables continues a été apportée conduisant à une modélisation factorielle mettant en relation : LogDPAL avec LogDOH , Sites et LogDROH*Sites ($\alpha = 0,05$).

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION RELATIFS AUX LARVES, JUVÉNILES ET ADULTES ÉCHANTILLONNÉS EN 2013

Ce 3e chapitre fait état des résultats relatifs aux mesures morphométriques (poids, longueur, circonférence et coefficient de condition), à l'âge, ainsi qu'aux différents biomarqueurs à l'étude (TBARS, α -tocophérol, caroténoïdes et rétinoïdes) spécifiques à la campagne de 2013. L'objectif global pour cette première campagne d'échantillonnage était d'explorer, selon chacun des stades de développement, l'effet du gradient de contamination et de pression anthropique sur l'état de santé des perchaudes en fonction des réponses physiologiques et biochimiques. L'analyse et l'interprétation ont permis de juger de la croissance, ainsi que de l'état des systèmes rédox et des rétinoïdes. Ces résultats s'inscrivent dans un article soumis à la revue *Ecotoxicology and Environmental Safety (EES)* sous le titre : *Carotenoids, retinoids and redox system in yellow perch subjected to various anthropogenic influences along the St. Lawrence River.*

3.1 Résumé

La population de perchaude du lac Saint-Pierre (LSP) a connu une baisse importante au milieu des années 1990. L'effet combiné de plusieurs facteurs de stress (détérioration de l'habitat pour la reproduction et la croissance, présence d'espèces envahissantes et la mauvaise qualité de l'eau) semble exercer une forte pression sur la population de perchaude, actuellement caractérisée par un faible taux de recrutement. Afin d'avoir une meilleure idée de l'impact sur la population du LSP, les perchaudes de ce site ont été comparées avec d'autres populations de perchaudes du fleuve Saint-Laurent le long d'un gradient de perturbation anthropique croissant d'amont en aval: Lac Saint-François (LSF) < Lac Saint-Louis (LSL) < LSP. La morphométrie (taille, poids, circonférence et coefficient de condition), le système redox (TBARS, vitamine E et caroténoïdes) et les rétinoïdes (vitamine A) ont été comparés entre ces différents secteurs fluviaux selon le stade de développement: larvaire (< 1 an), juvénile (1 à 2 ans) et adulte (≥ 3 ans). Le coefficient de Fulton (K) était semblable entre les sites chez les juvéniles ($F_{4,36} = 0.99$; $p = 0.428$), mais il était significativement plus bas chez les adultes du LSP ($F_{4,46} = 7.66$; $p \leq 0.001$), suggérant une condition physiologique affaiblie. Aux sites les plus perturbés, tel que le LSP, la peroxydation des lipides tendait à être plus élevée chez les adultes, tandis que les niveaux en lycopène se sont avérés moindres chez les juvéniles ($H_{4,36} = 13.2$; $p < 0.05$) et les adultes ($H_{4,43} = 14.5$; $p < 0.01$). L'analyse des rétinoïdes a révélé que chez cette espèce, 90% des rétinoïdes sont de forme « déhydro » (vitamine A2). Les niveaux en palmitate de didéhydrorétinol sont significativement plus faibles chez les perchaudes capturées au LSP comparativement aux autres sites, et ce, chez les larves ($H_{3,71} = 28,38$; $p \leq 0.001$), ainsi que dans le foie des juvéniles ($H_{4,35} = 20,47$; $p \leq 0.001$) et des adultes ($H_{4,45} = 22,08$; $p \leq 0.001$). Ces résultats suggèrent une altération de l'état du système redox et des rétinoïdes. Globalement, les résultats reflètent le gradient de pression testé, où les perchaudes provenant des sites les plus impactés (en aval) présentent une condition physiologique et biochimique affaiblies comparativement aux autres secteurs (en amont). Les paramètres sélectionnés pour cette étude sont des indicateurs de l'état de santé de populations de poissons pouvant être inclus dans les programmes de suivi environnemental dédiés aux espèces vivant dans les écosystèmes d'eau douce.

**CAROTENOIDS, RETINOIDS AND REDOX SYSTEM IN YELLOW PERCH
SUBJECTED TO VARIOUS ANTHROPOGENIC INFLUENCES ALONG
THE ST. LAWRENCE RIVER**

Landry C¹, Houde M², Brodeur P³, Spear P¹, Boily M^{1*}

¹Centre de Recherche en toxicologie de l'environnement (TOXEN). Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal (UQAM), C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3P8.

²Centre Saint-Laurent, Environnement et Changement Climatique Canada, 105 McGill, Montréal, QC, Canada, H2Y 2E7.

³Direction régionale Mauricie et Centre-du-Québec, Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs. 100 Laviolette, Trois-Rivières, QC, Canada, G9A 5S9.

*** Corresponding author:**

Monique Boily
Département des sciences biologiques
C.P.8888, Succ. Centre-Ville
Montréal (Québec) H3C 3P8
Téléphone (514) 987-3000
Bureau, poste 5605
boily.monique@uqam.ca

Soumis dans
Ecotoxicology and Environmental Safety
No de Manuscrit: EES-16-1656

3.2 Abstract

The yellow perch population in Lake Saint-Pierre (LSP) has been experiencing a significant decline since the mid-1990s. The combined effect of several stressors (deterioration of habitats for reproduction and growth, invasive species and poor water quality) seems to exert great pressure on the yellow perch population in LSP, characterized by low recruitment. To get a better idea of the impact on LSP perch, fish from this site were compared with other populations of yellow perch from the St. Lawrence River along a gradient of increasing human disturbances from upstream to downstream: Lake Saint-François (LSF) < Lake Saint-Louis (LSL) < LSP. Morphometry (size, weight, circumference and Fulton factor), the redox system (TBARS, vitamin E and carotenoids) and retinoids (vitamin A) were compared between larvae (< 1 year), juveniles (1–2 years old) and adults (≥ 3 years) from these sectors of the St. Lawrence River. Fulton's condition factor was similar between sites for juveniles ($F_{4,36} = 0.99$; $p = 0.428$) but were significantly lower in LSP adults ($F_{4,46} = 7.66$; $p \leq 0.001$), suggesting a weakened physiological condition. In most contaminated sites as LSP, lipid peroxidation tended to be higher in adults whereas the lipophilic antioxidant lycopene were lower in juveniles ($H_{4,36} = 13.2$; $p < 0.05$) and adults ($H_{4,43} = 14.5$; $p < 0.01$) stages. Retinoid analysis revealed that for this species of fish, more than 90% of retinoids were in the "dehydro" form (vitamin A2). Didehydroretinyl palmitate (reserve) levels were significantly lower for LSP fish compared to other sites, not only in larvae ($H_{3,71} = 28.38$; $p \leq 0,001$) but also in the livers of juveniles ($H_{4,35} = 20.47$; $p \leq 0.001$) and adults ($H_{4,45} = 22.08$; $p \leq 0.001$). These results suggest an altered metabolism in the redox and retinoid systems. The overall results reflect the "pressure" gradient that we have tested, where the perch from the most affected sites (downstream) had impaired physiological and biochemical conditions compared to other sectors (upstream). The parameters that we selected for this study are all indicators of fish population health status and could be included in environmental monitoring programs dedicated to fish species living in freshwater ecosystems.

Keywords

Biomarker, Dehydroretinol, Tocopherol, TBARS, Carotenes, Xanthophylls, Lake Saint-Pierre

3.3 Introduction

The population of yellow perch in Lake Saint-Pierre (St. Lawrence River, see figure 3.1) has been declining for over 20 years despite many restrictive measures and various management plans. In addition to pressure from the fishing industry, other factors may play a role in the decline of this important socioeconomic species, such as deterioration of habitats for reproduction and growth, introduction of exotic species and poor water quality (de la Chenelière *et al.*, 2014 ; Magnan *et al.*, in press). A major feature of the yellow perch decline appears to be the low abundance of young fish (0–2 years), especially in the southern part of LSP (Magnan *et al.*, in press). This area is known to receive waste from agricultural watersheds (Richelieu, Yamaska and Saint-François) under wide-row cultivation, mainly maize and soy (Hudon *et al.*, 2011 ; La Violette, 2004 ; Richard *et al.*, 2011). Earlier studies conducted in the Yamaska watershed showed a significant impact on the health of the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*), namely growth retardation (Spear *et al.*, 2009), parasitic infections, low immune competence and high acetylcholinesterase activity (Marcogliese *et al.*, 2009). In addition, the contents of retinoids (vitamin A) for these frogs were altered. In males, total retinyl ester and retinol from the liver were decreased, as was retinol in plasma. Other ecotoxicological studies have made an association between urban or agricultural contaminants and fish retinoid system disturbances (Alsop *et al.*, 2003 ; Defo *et al.*, 2012 ; Doyon *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 2002). In the case of LSP yellow perch struggling with deficient recruitment, the study of retinoids seems more than appropriate, as retinoids are essential to biological functions such as early development (Oliveira *et al.*, 2013), growth and reproduction (Alsop *et al.*, 2005, 2008).

Retinoids are derived from food-related carotenoids. The following provitamin A carotenoids have been identified in fish: cryptoxanthin, α -carotene, β -carotene, astaxanthin, canthaxanthin, zeaxanthin, lutein and tunaxanthin (Kaisuyama *et al.*, 1988 ; Matsuno, 1991). From a metabolic point of view (see figure 3.2),

these precursors are oxidized in retinaldehyde (RALD) or dehydroretinaldehyde (DRALD) in the intestinal mucosa by the carotenoid oxygenase 1 (CO1) (Comb, 2012c). The aldehyde formed is reduced by a reductase and then esterified by lecithin-retinol acyltransferase (LRAT) or acyl CoA:retinol acyltransferase (ARAT) to form retinyl palmitate (PAL) or dehydroretinyl palmitate (DPAL) (Comb, 2012c ; Novak *et al.*, 2008 ; Shirakami *et al.*, 2012). Active functions of vitamin A are carried out through retinoic acid (RA). In the cell, the RA regulates the expression of several genes by means of a specific region, retinoic acid response elements (RARE) (figure 3.2), operated by various isoforms of RAR (retinoic acid receptor, α , β and γ) and RXR (retinoid X receptor, α , β and γ) (Comb, 2012c ; Novak *et al.*, 2008). In vertebrates, the main supply of vitamin A is found in the liver and in some fish (e.g. trout), the dehydro forms dominate in the liver and plasma (Alsop *et al.*, 2005 ; Gesto *et al.*, 2012).

Besides serving as precursors to vitamin A, carotenoids neutralize free radicals (see review by Kiokias et Gordon (2004) that result from endogenous metabolism related to energy production (mitochondria and peroxisomes), inflammatory reactions, cytochrome P450 oxidative action and Fenton's reaction (Ames *et al.*, 1993 ; Fang *et al.*, 2002 ; Girotti, 1998). The antioxidant protection of carotenoids is associated with their central molecular chain, which consists of alternating double (C=C) and single bonds (C-C) (Britton, 1995 ; Kiokias et Gordon, 2004). According to Britton (1995), this arrangement is a system in which the electrons and ROS can be efficiently dislodged and neutralized. For example, the carotenoids lycopene is excellent for capturing singlet oxygen (1O_2), hydroxyl radicals ($^{\bullet}OH$) and peroxy radicals (ROO^{\bullet}) (Di Mascio *et al.*, 1991).

Vitamin E is also a nonenzymatic antioxidant. Biosynthesized by photosynthetic organisms (plants, algae and some cyanobacteria), vitamin E derivatives include all elements of tocopherols and tocotrienols (Brigelius-Flohe et Traber, 1999 ; Cuvelier

et al., 2003). Their antioxidant role is mainly to “trap” peroxy radicals (ROO^\bullet), particularly lipid peroxy radicals (LOO^\bullet), which can metabolize lipids (Brigelius-Flohe et Traber, 1999 ; Girotti, 1998 ; Liebler *et al.*, 1996). Although several tocopherol isomers have been identified in vertebrates (α , γ and δ) (Cuvelier *et al.*, 2003), a positive discrimination favors the α -tocopherol form (90%) through a specific transfer protein or “ α -tocopherol transfer protein” (α -TTP) (Comb, 2012a). Lipoproteins ensure the distribution of α -tocopherol, which is mainly stored in the cell membranes of the liver but also in muscle and adipose tissue (Comb, 2012a).

Several pesticides found in agricultural watersheds, including LSP, have been shown to increase ROS production in fish, including atrazine (Nwani *et al.*, 2010), glyphosate (Sinhorin *et al.*, 2014) and neonicotinoids (Ge *et al.*, 2015) just to name a few. Excessive ROS production affects biological components such as lipids, DNA and proteins (see review by Valavanidis *et al.*, 2006) and consequently, the whole organism. Although the redox system and pro-oxidant and antioxidant involvement have been the subject of several publications on aquatic organisms, few studies have focused on comparing the elements of this system at different development stages in the same species of fish. In this study, we analyzed nonenzymatic antioxidants such as carotenoids, retinoids and vitamin E (α -tocopherol) in larval, juvenile and adult perch. At the same time, we measured lipid peroxidation to estimate oxidative damage. Morphometric data (weight, length, circumference and Fulton condition) and the age of juveniles and adults were collected to better characterize growth. Our objective was to investigate several biomarkers in yellow perch depending on stages of development and gain a better understanding of the impact of contamination and human pressure on physiological and biochemical responses.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Study sites

Yellow perch populations were studied at six sites on the St. Lawrence River along a west-east gradient of perturbation (anthropogenic disturbances combined with poor water quality) (see figure 3.1). LSF was considered to have the lowest degree of perturbation, followed by LSL with a moderate degree and LSP with the highest degree of perturbation. In this study, the northern and southern shores of LSL and LSP were considered distinct sites due to the presence of the navigation channel (St. Lawrence Seaway), which has limited mixing of water masses from the two sides since its construction in 1850 (Frenette *et al.*, 2003). A single sampling site was used at LSF, which is narrower and less influenced by the navigation channel. This site is characterized by physicochemical properties and resources of a major water supply (98%) from the Great Lakes (La Violette, 2004). The LSL watershed is dominated by urban and industrial activities; the north shore is largely supplied by the Ottawa River while the south shore receives inputs from Saint-Louis and Châteauguay tributaries (La Violette, 2004). LSP is fed by several large tributaries representing various sources of contamination. To the south, agricultural activities predominate in the Richelieu, Yamaska and Saint-François tributaries (Frenette *et al.*, 2003 ; Hudon et Carignan, 2008). Although the north shore is also subject to contributions of agricultural contaminants, quality is largely influenced by residual pollution from the cities of Montreal and Laval, as well as urban and industrial exploitation in adjacent territories (Hudon et Carignan, 2008 ; La Violette, 2004). The sixth site, Beauregard Island (IB), is located near the city of Montreal (see figure 3.1) and receives a large portion of its effluents. The IB site was of interest for our study because it has recently been recognized that the ecosystem in this area is experiencing urban and industrial pressure (Houde *et al.*, 2014 ; Marcogliese *et al.*, 2015).

3.4.2 Capture of fish and tissue sampling

In June 2013, yellow perch were caught by beach seine or hoop nets and anesthetized with a clove oil solution (250 mg/L). Morphometric measurements, weight (g), length (mm) and body circumference (mm) were noted, and the Fulton condition factor ($K = 10^5 \times \text{weight (g)}/\text{size (mm)}^3$) was computed following Barnham and Baxter (2003). The whole liver and a sample of muscle tissue (0.1–0.5 g) were collected from each individual. The tissue was immediately frozen on dry ice and stored at -80°C until biochemical analysis was performed. The sex of the fish was determined following histological evaluation of the gonads by the Centre Québécois sur la santé des animaux sauvages (CQSAS) at the Université de Montréal's Faculty of Veterinary Medicine. Estimation of the perch's age in years was performed by the Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (MFFP) by counting the number of growth annuli in operculum, based on Deschamps (2013). According to (Brown *et al.*, 2009) and Bernatchez and Giroux (2000) recommendations, fish between one to two years were classified as juveniles and fish aged three years or older as adults. Blood (300–800 μL) was collected from the caudal vein using a heparinized needle and kept on ice for 10 min before being centrifuged for three min at $5000 \times g$. Plasma was transferred to a 0.5 mL vial, frozen on dry ice and stored at -80°C until analysis was performed.

Perch larvae were collected at the LSL and LSP sites using push nets only (two-meter-long plankton-type net; 500-mm mesh) as described in (Bertolo *et al.*, 2012). After capture, whole larvae were immediately frozen on dry ice and stored at -80°C .

The collections and handling of fish conformed to animal care permits issued by the Université du Québec à Montréal and the Société de la faune et des parcs du Québec.

3.4.3 Carotenoids, retinoids and tocopherol in liver and larvae

The method for extracting carotenoid and retinoid compounds from livers (juvenile and adult) was based on Spear and Moon (1986) and carried out under yellow light to

prevent isomerization of the compounds. Briefly, 200 mg of the liver was dehydrated with 2 g of anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4) (Anachemia Science, Lachine, QC, Canada) using a mortar and pestle. The resulting powder was then transferred into a screw-cap borosilicate tube into which 5 mL of hexane containing 0.1% of butylated hydroxytoluene (BHT) (Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada) was added. Tubes were mixed for 15 min and centrifuged at $1625 \times g$ for 5 min. An aliquot of 0.5 mL of supernatant was taken and evaporated to dryness in an Eppendorf Vacufuge Concentrator (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) at 45°C for 10 min. The pellet was dissolved in 200 μL of acetonitrile, vortexed for 30 seconds and injected into the HPLC system.

Whole larvae were weighed (≈ 0.180 g), measured (≈ 24.0 mm) and homogenized on ice in a borosilicate tube with 3 mL of PBS containing 0.1% ascorbic acid (Fisher Scientific, Saint-Laurent, QC, Canada). A volume of 2 mL of larva homogenate was transferred into a 5.0 mL borosilicate tube. A volume of 1 mL of ethanol containing 0.1% BHT was added, and the tube was vortexed for 30 seconds. Three successive extractions were performed. The first extraction consisted of adding 4 mL of hexane/acetone (50:50) with 0.1% of BHT. For the last two, 3 mL of the hexane/acetone solution was used. After each addition, the mixture was vortexed for 90 min and centrifuged at $2000 \times g$ for 5 min. At the end of each extraction, a volume of 1.7 mL of supernatant was transferred to test tubes and evaporated to dryness in an Eppendorf Vacufuge Concentrator at 45°C for 10 min. The residue was diluted with 400 μL of acetonitrile (100%), vortexed for 30 seconds and centrifuged at $250 \times g$ for 3 min before being injected into the HPLC system.

HPLC-1: Retinoids

Retinoid detection was based on (Doyon *et al.*, 1998) method. A volume of 50 μL from the sample extraction was injected into a reverse-phase HPLC system (Water Corporation, Milford, MA, USA) equipped with an Empower program, a model 510

pump and a model 486 absorbance detector set at 326 nm for retinoid detection. Retinoids were separated with an ACE analytic C18 column to 4.6 x 250 mm, 5 μ m particles (Canada Life Science, Peterborough, ON, Canada). The mobile phase was as follows: Solvent A: MeOH:H₂O (95:5) linearly for 6 min to final solvent B: MeOH:ethyl acetate (68:32) for 21 min, then returned to initial solvent at 27 min. A two-minute linear gradient was used to return to 100% solvent A. The flow rate was 1 mL/min. for the total 29-minute elution time. Peaks were identified with commercial standards (Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada). Under these conditions, five endogenous retinoids were detected: all-*trans*-3,4-didehydroretinol (DROH, 6.5 min), all-*trans*-retinol (ROH; 7.3 min), 3,4-didehydropalmitate (DPAL, 17.2 min) and all-*trans* retinyl palmitate (RP, 18.8 min).

HPLC-2: Carotenoids and α -tocopherol

The method for detecting carotenoids and tocopherol was based on Hedrei Helmer *et al.* (2014). A volume of 70 μ L from the liver extraction or 50 μ L from the larvae extraction was injected into an HPLC system equipped with a Waters 2487 detector set to 445 and 292 nm for the detection of carotenoids and α -tocopherol respectively. Analytes were separated using a Chromegabond C30 column to 4.6 x 250 mm, 5 μ m particles (Canada Life Science, Peterborough, ON, Canada). The mobile phase was as follows: Solvent A: ACN-MeOH-H₂O (84:9:7) linearly for 12 min to final solvent B: MeOH-ethyl acetate (68:32) for 11 min. A one-minute linear gradient was used to return to 100% solvent A. The flow rate was 1.5 mL/min. for the total 35-minute elution time. The compounds were identified with commercial standards of carotenoids (DHI, Hørsholm, Denmark) and α -tocopherol (Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada). Under these conditions, seven carotenoids were detected: fucoxanthin (5.7 min), diatoxanthin (9.8 min), lutein (10.2 min), zeaxanthin (10.5 min), cryptoxanthin (15.2 min), lycopene (18.9 min), α -carotene (21.5 min) and β -carotene (21.9 min). Alpha-tocopherol was detected at 14.8 min.

3.4.4 Plasma retinoids

Extraction and quantification of plasma retinoids were performed according to Bérubé *et al.* (2005) without modification, except that combined organic phases (2.8 mL) were evaporated to dryness in an Eppendorf Vacufuge Concentrator (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) at 45°C for 15 min. The retinoids were dissolved in 100 µL of acetonitrile and vortexed for 30 seconds. A volume of 80 µL was injected into an HPLC system equipped with a Waters 481 detector set at 350 nm. Peaks were separated with an ACE analytic C18 column to 4.6 x 250 mm, 5 µm particles (Canada Life Science, Peterborough, ON, Canada). Under these conditions, six retinoids were detected: all-*trans*-3,4-didehydroretinol (DROH, 14.3 min), 13-*cis* retinoic acid (18.1 min), all-*trans*-retinol (ROH; 19.8 min), 9-*cis* retinoic acid (20.3 min), all-*trans* retinoic acid (21.5 min) and all-*trans*-retinaldehyde (23.6 min).

3.4.5 Lipid peroxidation

The lipid peroxidation was evaluated in the muscle of juveniles and adults, and in whole larvae by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) based on Ohkawa *et al.* (1979) method. The muscle (250 mg) was homogenized in a 2-mL PBS buffer using a Kinematica Polytron PT 1600E Benchtop Homogenizer (Kinematica AG, Bohemia, NY, USA). The homogenate (1.5 mL) was centrifuged at 4000 × g for 10 min at 4°C. For the larvae, the homogenate was prepared with 180 mg in 3 mL of PBS containing 0.1% of ascorbic acid and was centrifuged at 1000 x g for 10 min at 4°C. The supernatant (200 µL) of each sample was transferred to a glass tube. Subsequent steps were performed under the exact conditions described in Hedrei Helmer *et al.* (2014). The TBARS levels (nmol/g of tissue) was determined by means of a fluorescence reading using i-control 1.9 Microplate Reader Software (Tecan, Morrisville, NC, USA) at an excitation of 532 nm and an emission of 553 nm for a total volume of 200 µL of supernatant/well, using a 96-wells, quartz microplate (Hellma Canada Ltd., Markham, ON, Canada). A standard curve was prepared in

duplicate from a 1,1,3,3-tetramethoxypropane solution (Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada).

3.4.6 Statistical analysis

Data analyses were conducted using JMP Pro 11.0.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Because no influence of sex was found on any studied parameters, the data were grouped as one statistical population. Independent statistical analysis was performed for the three development stages of yellow perch: larval, juvenile and adult. The principal component analysis (PCA) was performed for adult perch in order to better examine the variation among developmental parameters (length, weight, circumference and age) between three sectors: LSF, IB and LSP. The variance of each component was represented by its eigenvalue and evaluated using Bartlett's test ($\alpha = 0.05$). Eigenvalues lower than 1.0 were excluded from the model according to the Kaiser-Guttman criterion. Carotenoid, retinoid, α -tocopherol and TBARS means were compared between sites using ANOVA (F). When the model was significant ($p \leq 0.05$), pairwise comparison tests were conducted using Student's t -test. In the event of a skewed distribution of data, the nonparametric Kruskal-Wallis test (H) ($\alpha = 0.05$) was used and when significant, was followed by Dunn's pairwise comparison test ($\alpha = 0.05$). Spearman (ρ) correlations (corrected by Bonferroni) were performed to explore relationships between parameters.

3.5 Results and discussion

3.5.1 Morphometric parameters

Examination of perch larvae revealed significant differences between sampling sites. The body mass of larvae from the LSP-N and LSP-S sites was higher than at the LSL-N site, whereas only the larvae from the LSP-S proved to be longer than LSL-N larvae (table 3.1). For juvenile perch, age and mass were similar between sites, but circumference measurements were significantly higher for the LSP-S sample compared to the LSF sample (table 3.1). When comparing the length of juvenile

perch, a significant model was computed, but the post-hoc Dunn test ($p > 0.05$) could not confirm any differences between sites.

In adult perch, morphometry parameters proved to be much more heterogeneous across sectors. Adults caught at the LSP-N site had significantly higher values for length, weight and circumference compared to the larvae from the LSL-S site (table 3.1). This heterogeneity could be attributed to the age of the fish (table 3.1). Adults from the LSP-N site were significantly older than adults from the LSL and IB sites.

For larvae and juveniles, a lack of statistical power prevented us from better examining morphometric parameters by principal component analysis (PCA), because for these stages of development in particular, growth can be a confounding factor. However, PCA was performed on adults by grouping data into three sectors: LSF, LSP and IB (figure 3.3). Adult weight from the LSL site was weakly influenced by circumference (figure 3.3-A), while length and circumference affected the weight of adults captured at LSP (figure 3.3-C). Age was only observed to have an influence on weight at the IB site (figure 3.3-B). The relationship evaluated by PCA between morphometric variables was in line with the gradient of perturbation as follows: LSL < IB < LSP with 64.2% < 69.2% < 80.9% respectively. Considering the strong anthropogenic pressures on the IB site, which is downstream from Montreal and Laval islands, we expected a similar situation to that observed at LSP. However, the type of contamination differed between these two sectors. The IB site was characterized by urban and industrial xenobiotics (PBDEs, pharmaceuticals, PCBs, etc.) (Houde *et al.*, 2014 ; Marcogliese *et al.*, 2015) while agricultural contaminants (pesticides and fertilizers) dominated at the LSP site, located south of the navigation channel (Giroux, 2015 ; Hudon et Carignan, 2008 ; La Violette, 2004). LSP receives discharge from the three major watersheds used for agricultural purposes in Quebec (Richelieu, Yamaska and Saint-François), as well as water from the flood plain (shoreline areas flooded in spring and cultivated in summer) (Hudon et Carignan,

2008 ; La Violette, 2004). The mean values for the weight of yellow perch were higher at LSP (N and S) but in reality only the value from the LSP-N site was statistically higher than the value at IB site (table 3.1). This result could be related to the age of individuals which was also statistically higher at LSP-N.

The number of fish in our study, somehow limited, does not allow to draw any clear conclusions about the population structure. However, a more exhaustive monitoring conducted by Mailhot *et al.* (2015) states that between 2002 and 2011, growth of the yellow perch at LSP decreased compared to other populations in the St. Lawrence River. On another side, in our study, the Fulton's condition factor was significantly lower among LSP-S adults, with a downward trend at the LSP-N site compared to the LSL-S and IB sites (table 3.1). Future samplings could be supplemented with the relative condition factor (Kn) formulated to account for the violation of the assumption of an isometric growth (Couture et Rajotte, 2003). This additional information would confirm or reject the morphometric relationships observed in perch as a suspected human pressure gradient from upstream to downstream in the St. Lawrence River.

3.5.2 TBARS and α -tocopherol

Oxidative stress is widely used in ecotoxicological studies as an indicator of exposure to contaminants with pro-oxidant potential. Lipid peroxidation (TBARS) is one of the first kinds of physiological damage that can be measured in animals under stressful conditions (see review by Valavanidis *et al.*, 2006). In this study, we considered TBARS values in connection with α -tocopherol, a nonlipophilic antioxidant involved in protecting membrane lipids (Di Mascio *et al.*, 1991). Contrary to our expectations, lipid peroxidation did not follow the upstream-downstream contamination gradient for larvae and juveniles. Given the high stress level at LSP, we expected a higher lipid peroxidation at this site compared to all others. In fact, TBARS values were significantly lower at LSP-S compared to LSL-N (figure 3.4-A), as well as for

juveniles from the LSL-N and LSP-S sites compared to the LSF site (figure 3.4-B). For larvae, we observed a positive and significant relationship between TBARS and vitamin E values ($r = 0.558$; $p < 0.001$). In juveniles, the hepatic α -tocopherol content was characterized by a large variation leading to no significant differences between sites (figure 3.4-B), nor was there a significant relationship between α -tocopherol and TBARS ($r = 0.221$; $p = 0.177$). In adults, TBARS tended to increase from upstream to downstream, and a significant difference was observed between sites. Perch caught at the LSL-S site had higher values than perch from the IB site (figure 3.4-C). The relationship between TBARS and vitamin E was negative but nonsignificant ($r = -0.235$; $p = 0.115$). According to our assumptions, the expected negative relationship between TBARS and α -tocopherol, where the low levels of α -tocopherol was coupled to high levels of TBARS (Mourente *et al.*, 2000).

In some studies, a TBARS test was used in combination with the measurement of enzymatic antioxidants (superoxide dismutase, SOD, catalase, CAT, glutathione peroxidase, GPx), which form a significant line of defense against reactive oxygen species (Di Mascio *et al.*, 1991 ; Girotti, 1998). In fish exposed to deltamethrin and endosulfan, a significant increase in TBARS and a decrease in antioxidant enzymatic activities was revealed (Pandey *et al.*, 2001 ; Sayeed *et al.*, 2003 ; Yonar et Sakin, 2011). Similar effects were observed in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to imidacloprid, that is, a marked increase in lipid peroxidation and decreased CAT, SOD and GPx activities (Ge *et al.*, 2015). We must also consider that the concentration and distribution of α -tocopherol and the peroxidation of lipids depend on lipid levels. Lipid measurement could be used to normalize the TBARS or α -tocopherol values instead of protein concentration or tissue mass. In a study by Jentzsch *et al.* (1996), a strong positive relationship between TBARS and triglycerides values ($r = 0.75$; $p = 0.003$) was observed, suggesting that a high level of triglycerides increases MDA production, resulting in an increase in TBARS levels. Furthermore, the concentration of vitamin E seems to vary depending on the type of

tissue. In a study by Machlin *et al.* (1979) on guinea pigs (*Cavia porcellus*), α -tocopherol was sequestered in adipocytes and was not mobilized in cases of food deficiency, resulting in significant decreases of this vitamin in plasma, as well as in liver and heart tissue. Although α -tocopherol regulation is not fully understood, its metabolism (absorption, transport and storage) is closely linked to lipid metabolism. A study of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by Mourente *et al.* (2000) demonstrated the importance of the polyunsaturated fatty acids (PUFA)/vitamin E ratio in predicting the potential of lipid peroxidation. Animals exposed to a PUFA-enriched diet with low vitamin E showed high levels of TBARS. In future studies, measuring enzymatic activities (SOD, CAT, etc.) and lipid concentration, as well as with determining TBARS in several tissues (liver, heart, gonads, red cells, etc.), would improve our understanding of oxidation damage in yellow perch.

3.5.3 Carotenoids and retinoids

To our knowledge, this was the first time that carotenoids have been measured in yellow perch larvae. This early stage of development was characterized by the dominance of α -carotene, representing $40.32\% \pm 6.25$ of total carotenoids. Recognized as an important precursor to retinoids (Alsop *et al.*, 2005 ; Comb, 2012c ; Moren *et al.*, 2002), α -carotene mean values were similar between sites (table 3.2), while cryptoxanthin and fucoxanthin mean values were significantly higher at the LSP-N site than at the LSL-N site (table 3.2). Zeaxanthin levels were also higher at the LSP-N site and were significantly different from the LSL-N and the LSP-S sites (table 3.2). Cryptoxanthin, fucoxanthin and zeaxanthin were not, however, the dominant forms of carotenoids in larvae and represented only $0.04\% \pm 0.03$, $0.03\% \pm 0.02$ and $0.03\% \pm 0.02$ respectively. With respect to provitamin A carotenoids, contrary results to those found for larvae were observed for juveniles with zeaxanthin, concentrations of which were significantly lower at the LSP-N site than at the LSL-N site (table 3.2). In adults, zeaxanthin and cryptoxanthin values were also significantly lower in the LSP-N sample compared to the LSL-S sample (table 3.2). The α -

carotene levels were significantly higher in the adults from the LSP-N and LSL-S sites compared to the IB site, whereas the β -carotene concentrations were lower at the LSP-N site than at the LSP-S and LSL-N sites (table 3.2).

Lycopene was the major form of carotenoids in juveniles and adults, with $61.98\% \pm 5.58$ and $52.87\% \pm 6.07$ respectively (table 3.2). While it is not recognized as a provitamin A carotenoid, lycopene is known for its strong antioxidant potential with a constant “quenching” (K_q) of 31 000, nearly twice that of β -carotene and 100 times that of vitamin E (Di Mascio *et al.*, 1991). This property of lycopene is caused by opening its β -ionone cycle, which more effectively optimizes neutralization of reactive oxygen species. For example, after exposing carp (*Cyprinus carpio*) to sub-lethal doses of deltamethrin with or without extra lycopene, Yonar et Sakin (2011) observed a better redox balance, reduced lipid peroxidation and increased enzymatic activity in fish receiving the lycopene supplement. These effects were recorded in the liver, kidney, gills and blood. In human beings, the health benefits of lycopene are well known, particularly in protecting against atherosclerosis, certain types of cancer and UV damage (Comb, 2012b ; Matos *et al.*, 2000 ; Rao et Rao, 2007). Matos *et al.* (2000) highlighted the role of lycopene in preserving the redox balance in CV1-P monkey cells exposed to ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA), plus ascorbate with or without lycopene. Cells supplemented with lycopene experienced reduced lipid peroxidation (77%) and DNA damage (86%) compared to cells without lycopene, indicating the carotenoid’s effectiveness in protecting against free radical attacks. In our study, a comparative analysis of lycopene between sites revealed significant differences. At LSP, juveniles had the lowest levels of lycopene. The values from the LSP-N site were significantly lower compared to the LSL-N site (table 3.2). A similar result was observed in adults from the LSP site, where lycopene levels were significantly lower at the LSP-N site than at the LSL-S site (table 3.2). No significant relationship could be found between lycopene and TBARS. However, these two analyses were conducted in different tissues—TBARS was measured in the muscle,

while lycopene was measured in the liver. It would therefore be appropriate to add liver TBARS measurement to our future tests in order to verify the relationship between TBARS and lycopene.

In the yellow perch species, the dominant molecular form of retinoids was a dehydro type not only in adults, but also in larvae and juveniles. The characteristic of dehydro compounds (e.g. dehydroretinol, DROH, vitamin A2) compared to retinol (ROH, vitamin A1) lies in the double bond in the 3,4-position of the β -ionone ring. A few studies have demonstrated that vitamin A1 or A2 production in fish could be influenced by the source of carotenoids used as precursors. In tilapia (*Tilapia nilotica*), xanthophylls provitamins A such as zeaxanthin and lutein were predominantly metabolized to DROH, while with α -carotene and β -carotene, DROH formation was subject to the prior formation of ROH (Kaisuyama et Matsuno, 1988 ; Matsuno, 1991). It is interesting to note that in our study, carotenes (α -carotene and β -carotene) dominated the xanthophylls (lutein, cryptoxanthin and zeaxanthin), but since major retinoids in yellow perch are dehydros, one may think that the xanthophylls, not carotenes, served as provitamins A. In vertebrates, vitamin A surplus from the diet is esterified and stored in the liver, kidneys and other fatty organs. In whole larvae, DROH levels were significantly higher at the LSP-N and LSL-S sites than at the LSL-N site (figure 3.5-A). At the same time, DPAL concentrations were significantly lower in the LSP-N and LSP-S larvae than in LSL-N larvae (figure 3.5-A). Similar results were observed for retinyl palmitate (PAL) (table 3.3). Overall, it seemed that in sites experiencing greater pressure, retinoid stock (DPAL) was highly mobilized, generating high concentrations of DROH, particularly for larvae from the LSP-N and LSP-S sites (figure 3.5-A). These results could suggest an imbalance of LRAT (DROH esterification) and HER (DPAL hydrolysis) enzyme activities. In a study on the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*), Boily *et al.* (2009) demonstrated that frogs exposed to agricultural contamination had a lower hepatic PAL/ROH ratio. Assays of liver microsomes from these individuals

revealed that ester hydrolysis activity (HER) was much greater than esterification activity (LRAT). A variety of xenobiotics (pesticides, dioxins and PCBs) have been associated with an imbalance of LRAT/HER activities in several vertebrate species, including fish (see review by Novak *et al.*, 2008). Given that the development and growth of larvae in LSP takes place in the coastal area where agricultural contaminants are ubiquitous, and in the absence of other explanatory factors, it is plausible to suggest that some contaminants may have interfered with retinoid-specific enzymes and led to altered concentrations of retinoids in larvae. For now, we do not know the consequences of a high DROH concentration in larvae. The fact that individual analyses of liver and plasma could not be performed for these extremely small fish limits our understanding of retinoid metabolism for this stage of development. However, we know that an unesterified DROH surplus can follow the metabolic pathway leading to the retinoid acid formation, a molecule known to disrupt gene regulation and cause defects during embryonic development (Doyon *et al.*, 1999 ; Lall et Lewis-McCrea, 2007).

As observed in larvae, liver vitamin A was found to be lower among juveniles and adults captured from LSP (figures 3.5-B and 3.5-C). Specifically, DPAL (figures 3.5-B and 3.5-C) and PAL (table 3.3) levels were significantly lower in juveniles from LSP (north and south) compared to LSF. The DPAL content at LSP-N was also significantly lower than at the LSL-N site. In adults, the DPAL (figure 3.5-C) and PAL (table 3.3) levels followed the same trend at LSL and LSP, with low levels at LSP. A significant difference was observed only between the LSP and IB sites; fish caught at IB had higher DPAL levels than fish from the LSP sites (north and south) (figure 3.5-C). When testing DROH and ROH in juveniles and adults, no significant differences were found in the liver (figure 3.5-B, 3.5-C and table 3.3) or plasma (table 3.4). These results suggest an over-mobilization of the reserve to maintain basal concentrations of the essential vitamin A. Payne *et al.* (1998) demonstrated a potential link between oxidative stress and a lessening of liver esters. The authors

have studied the effects of high iron contamination in Wabush Lake versus a reference lake (Lake Shabogomo), both located in Labrador (Newfoundland, Canada). Trout (*Salvelinus namaycush*) caught in Wabush Lake had low liver concentrations of retinyl palmitate and retinol, as well as damage from DNA oxidation. Although iron is known to promote oxidative stress, certain herbicides (atrazine, glyphosate, neonicotinoids, etc.) can also have this effect (Ge *et al.*, 2015 ; Nwani *et al.*, 2010 ; Sinhorin *et al.*, 2014). Retinoids may then be altered by nonenzymatic oxidation reactions and the induction of key enzymes involved in xenobiotic detoxification. In a study published in 2002, Zhang *et al.* sampled silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in a lake contaminated with POPs (PCBs, PAHs, etc.) and measured ethoxyresorufin-O-deethylase activity (EROD) and liver retinoids. EROD activity was negatively related to both retinol and retinyl palmitate, suggesting that liver retinoid content could be influenced by the induction of CYP450 enzymes following exposure to organochlorinated compounds (OCs). In addition, some OCs, such as chlordane, dieldrin, aldrin and endrin, present a high potential for induction of CYP450 in liver cell line HepG2 (Lemaire *et al.*, 2005).

We have already mentioned that retinoids and carotenoid precursors are associated with diet and therefore are available to resources in aquatic ecosystems. One must also consider the stage of development. A work by Brown *et al.*, (2009) on the biology of perch described food specific to each stage of development. After the disappearance of the yolk sac, the larvae feed primarily on zooplankton, then gradually begin including large invertebrates in their diet up to the juvenile stage. The diet for adults is more diversified, consisting of invertebrates, larvae, fish eggs and small fish. These factors could explain, at least in part, the significant differences between carotenoids and retinoids in our study. However, ecosystem quality is a key component of available resources, and all disturbances (contaminants, resource exploitation, etc.) of the ecosystem are likely to modulate the habitat structure and

consequently the environmental carrying capacity (Hudon *et al.*, 2011 ; Massicotte *et al.*, 2015).

3.6 Conclusion

The objective of this study was to compare perch populations in the St. Lawrence River and establish a link between a gradient of disturbance and responses to morphological and biochemical parameters. This study allowed us to confirm this link, particularly at the LSP site, which was greatly impacted by chemical contamination and human activities (Giroux, 2015 ; Hudon et Carignan, 2008 ; La Violette, 2004). This site differed from others in terms of effects on the condition factor (general index of physiology) in adults. The peroxidation of lipids as TBARS could be improved by the analysis of unsaturated lipids. We have also highlighted that for juveniles and adults of this species, lycopene could play a major role as an antioxidant. Finally, for the three stages of development that we studied (larval, juvenile and adult), we observed an alteration of retinoids, particularly at the most disturbed sites. Considering that retinoids are essential for reproduction, embryonic development and growth, attention must be paid to those compounds for animals experiencing a population decline, which is precisely the case for yellow perch at LSP.

3.7 Acknowledgements

This research was funded by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) under a grant to M. Boily. The authors would like to thank Maeva Giraudo, Mélanie Douville, Maxime Gauthier and Isabelle Lecavalier-Mondor for technical assistance. C. Landry was the recipient of studentships from the Fondation UQAM at the Université du Québec à Montréal.

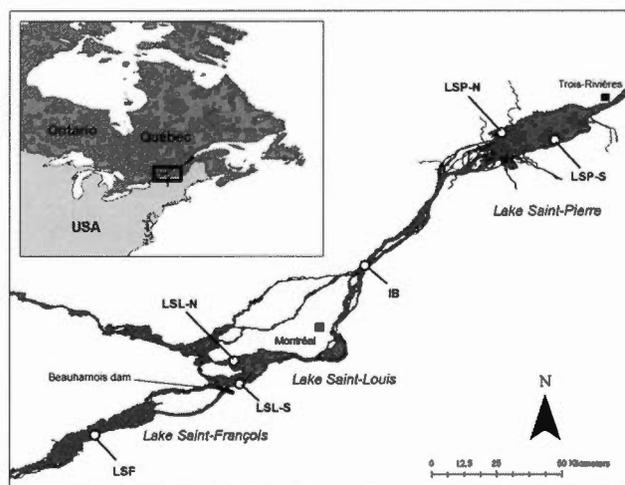


Figure 3.1: Location of yellow perch sampling sites in 2013 (open circle) along of the St. Lawrence River. LSF, Lake Saint-François; LSL-N, Lake Saint-Louis north; LSL-S, Lake Saint-Louis south; IB, Island Beaugard; LSP-N, Lake Saint-Pierre north; LSP-S, Lake Saint-Pierre south

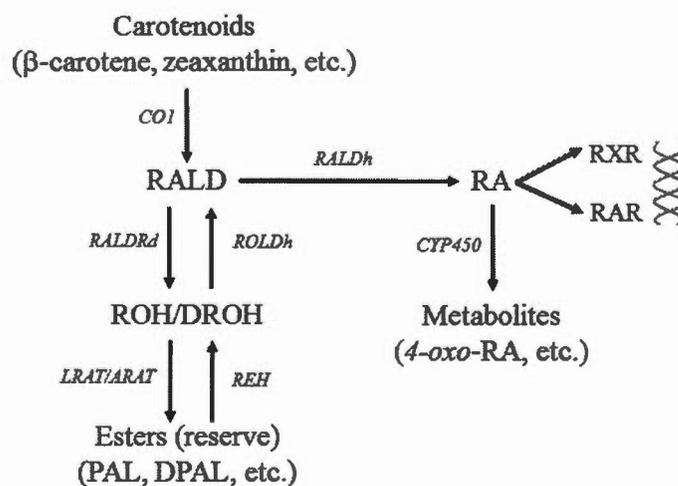


Figure 3.2: Basic vertebrate retinoid metabolism. CO1, carotenoids oxygenase 1; RALD, retinaldehyde; RALDRd, retinal reductase; ROH, retinol; DROH, dehydroretinol; LRAT, lecithin:retinol acyltransferase; ARAT, acyl CoA:retinol acyltransferase; PAL, retinyl palmitate; DPAL, dehydroretinyl palmitate; REH, retinyl ester hydrolase; ROLDh, retinol dehydrogenase; RALDh, retinal dehydrogenase; RA, retinoic acid; CYP450, cytochrome P450; RAR, retinoic acid receptor; RXR, retinoid X receptor.

Table 3.1: Sex, means \pm SD of morphometric parameters, age and Fulton factor (K) of the larvae, juveniles and adults yellow perch sampled in the St. Lawrence River following an increasing degree of anthropogenic influences.

Stage	Parameters	Sampling sites					Statistical Models
		Low		Moderate		High	
Larvae	LSF	n=0	LSL-N n=15	LSL-S n=4	IB n=0	LSP-N n=28	LSP-S n=29
	Length (mm)	—	19.8 \pm 1.7 ^a	22.8 \pm 10.2 ^{ab}	—	22.9 \pm 5.0 ^a	26.4 \pm 3.4 ^b
	Weight (g)	—	0.09 \pm 0.02 ^a	0.14 \pm 0.14 ^{ab}	—	0.18 \pm 0.10 ^b	0.24 \pm 0.08 ^b
Juveniles	LSF	n=15	LSL-N n=8	LSL-S n=3	IB n=0	LSP-N n=4	LSP-S n=10
	Sex*	15F/0M	5F/2M (1U)	3F/0M	—	2F/0M (2U)	7F/3M
	Age (years)	1.7 \pm 0.5	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0	—	2.0 \pm 0.0	1.9 \pm 0.3
	Length (mm)	154.7 \pm 17.0	158.2 \pm 15.0	164.0 \pm 10.5	—	188.0 \pm 29.2	184.6 \pm 27.1
	Weight (g)	45.21 \pm 11.12	46.38 \pm 16.42	49.53 \pm 5.77	—	74.78 \pm 33.28	70.10 \pm 30.79
Adults	LSF	n=15	LSL-N n=8	LSL-S n=13	IB n=13	LSP-N n=11	LSP-S n=5
	Sex*	15F/0M	7F/1M	13F/0M	13F/0M	2F/1M (8U)	2F/3M
	Age (years)	—	3.0 \pm 0.0 ^a	3.1 \pm 0.3 ^a	3.1 \pm 0.3 ^a	4.5 \pm 0.9 ^b	3.8 \pm 0.8 ^{ab}
	Length (mm)	—	180.1 \pm 29.1 ^{ab}	172.5 \pm 10.3 ^b	190.9 \pm 14.8 ^b	213.6 \pm 31.5 ^a	201.6 \pm 36.3 ^a
	Weight (g)	—	70.79 \pm 37.89 ^{ab}	63.82 \pm 27.30 ^{ab}	82.91 \pm 20.98 ^a	111.3 \pm 53.54 ^b	87.30 \pm 55.05 ^{ab}
K	LSF	n=15	LSL-N n=8	LSL-S n=13	IB n=13	LSP-N n=11	LSP-S n=5
	Circumference (mm)	89.8 \pm 7.9 ^a	1.13 \pm 0.10	1.13 \pm 0.12	1.18 \pm 0.11 ^a	1.07 \pm 0.08	1.05 \pm 0.06
	—	1.11 \pm 0.13	—	—	—	—	—
Statistical Models	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—

* F: Female, M: Male and U: undefined

— Indicates that no measure has been reported

Age and morphometric parameters (length, weight and circumference) were compared between sites by Kruskal-Wallis (H) analysis followed by Dunn's test.

K (Fulton factor) were compared between sites by ANOVA (F) followed by HSD Tukey-Kramer's test.

Means not sharing the same letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

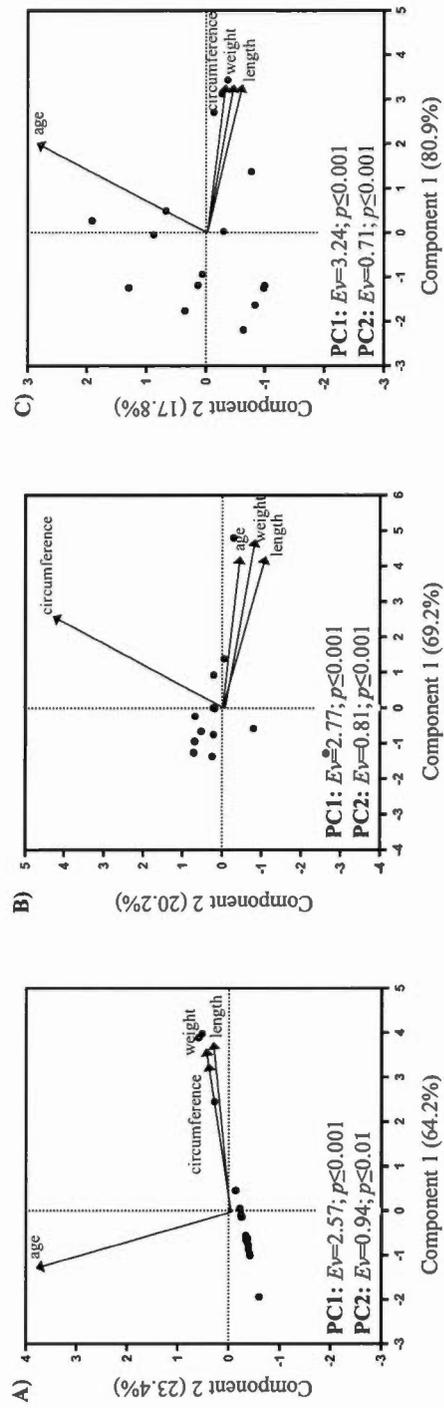


Figure 3.3: Principal component analysis (PCA) of morphometric parameters (length, weight and circumference) and age for adult yellow perch sampled in the St. Lawrence River following an increasing degree of anthropogenic influences. E_v , Eigenvalues for (A) Lake Saint-Louis, (B) Island Beaugard and (C) Lake Saint-Pierre were evaluated by Bartlett's test ($\alpha=0.05$).

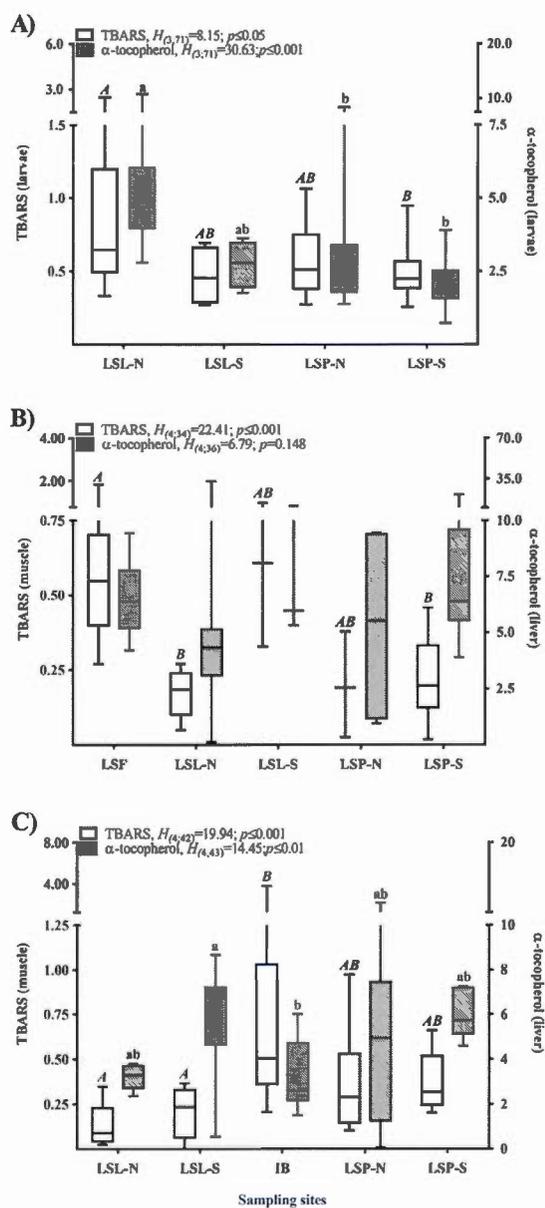


Figure 3.4: TBARS (nmol/g, clear) and α -tocopherol ($\mu\text{g/g}$, shaded) measured in yellow perch sampled in the St. Lawrence River following an increasing degree of anthropogenic influences. (A) Larvae (whole), (B) juveniles and (C) adults. Data were compared between sites with Kruskal-Wallis analysis followed by Dunn's test ($\alpha=0.05$). Boxes extend from 25th to 75th percentile; line is the median and whiskers show the largest to smallest observed values. Boxes not sharing the same letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

Table 3.2: Means \pm SD of carotenoids in whole larvae (ng/g) and in liver (μ g/g) of the juveniles and adults yellow perch sampled in the St. Lawrence River following an increasing degree of anthropogenic influences.

Stage	Parameters	Sampling sites						Statistical models	
		Low		Moderate		High			
		LSF n=0	LSL-N n=14	LSL-S n=4	TB n=0	LSP-N n=27	LSP-S n=29		
Larvae	Cryptoxanthin	—	0.55 \pm 0.27 ^a	1.72 \pm 2.11 ^{ab}	—	1.47 \pm 1.22 ^b	0.91 \pm 0.80 ^{ab}	$H_{(3,7)}=9.19$; $p<0.05$	
	Diatoxanthin	—	7.26 \pm 5.27	16.72 \pm 17.71	—	8.47 \pm 9.47	4.43 \pm 4.33	$H_{(3,7)}=5.14$; $p=0.162$	
	Fucoxanthin	—	0.44 \pm 0.57 ^a	1.66 \pm 1.60 ^{ab}	—	0.83 \pm 0.69 ^b	0.64 \pm 0.42 ^{ab}	$H_{(3,7)}=8.07$; $p<0.05$	
	Lutein	—	3.95 \pm 3.12	11.54 \pm 11.21	—	4.18 \pm 4.03	6.73 \pm 6.82	$H_{(3,7)}=6.07$; $p=0.108$	
	Lycopene	—	3.07 \pm 2.07	3.53 \pm 2.19	—	2.48 \pm 2.18	2.33 \pm 1.97	$H_{(3,7)}=3.54$; $p=0.315$	
	Zeaxanthin	—	0.46 \pm 0.33 ^a	1.01 \pm 0.60 ^{ab}	—	1.19 \pm 1.09 ^b	0.62 \pm 0.55 ^a	$H_{(3,7)}=12.12$; $p<0.01$	
	α -Carotene	—	13.46 \pm 6.76	16.92 \pm 11.67	—	12.41 \pm 9.06	12.30 \pm 9.85	$H_{(3,7)}=1.90$; $p=0.593$	
	β -Carotene	—	0.04 \pm 0.06	0.08 \pm 0.10	—	0.19 \pm 0.32	0.22 \pm 0.31	$H_{(3,7)}=0.68$; $p=0.877$	
	Juveniles	Cryptoxanthin	n=15	0.21 \pm 0.13	0.55 \pm 0.91	n=3	0.17 \pm 0.06	0.13 \pm 0.05	$H_{(4,36)}=9.11$; $p=0.059$
		Diatoxanthin	—	0.27 \pm 0.25 ^a	0.04 \pm 0.05 ^{ab}	—	0.01 \pm 0.00 ^{ab}	0.06 \pm 0.11 ^{ab}	$H_{(4,36)}=10.22$; $p<0.05$
Fucoxanthin		—	0.33 \pm 0.33	0.07 \pm 0.08	—	0.07 \pm 0.13	0.13 \pm 0.11	$H_{(4,36)}=4.30$; $p=0.367$	
Lutein		—	0.01 \pm 0.00	0.04 \pm 0.03	—	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.02	$H_{(4,36)}=8.64$; $p=0.071$	
Lycopene		—	1.15 \pm 0.67 ^{ab}	2.86 \pm 4.45 ^a	—	0.94 \pm 0.17 ^{ab}	0.73 \pm 0.28 ^{ab}	$H_{(4,36)}=13.16$; $p<0.05$	
Zeaxanthin		—	0.02 \pm 0.03 ^{ab}	0.02 \pm 0.02 ^a	—	0.01 \pm 0.00 ^{ab}	0.00 \pm 0.00 ^{ab}	$H_{(4,36)}=14.25$; $p<0.01$	
α -Carotene		—	0.18 \pm 0.11	0.71 \pm 0.88	—	0.24 \pm 0.13	0.18 \pm 0.13	$H_{(4,36)}=3.83$; $p=0.429$	
β -Carotene		—	0.02 \pm 0.03	0.06 \pm 0.08	—	0.03 \pm 0.05	0.07 \pm 0.06	$H_{(4,36)}=7.73$; $p=0.102$	
Adults		Cryptoxanthin	n=0	—	0.16 \pm 0.06 ^{ab}	n=12	0.14 \pm 0.05 ^{ab}	0.12 \pm 0.02 ^{ab}	$H_{(4,43)}=12.91$; $p<0.05$
		Diatoxanthin	—	0.02 \pm 0.03	0.02 \pm 0.01	—	0.02 \pm 0.02	0.07 \pm 0.10	$H_{(4,43)}=2.53$; $p=0.639$
	Fucoxanthin	—	0.07 \pm 0.07	0.06 \pm 0.06	—	0.10 \pm 0.10	0.01 \pm 0.00	$H_{(4,43)}=7.61$; $p=0.107$	
	Lutein	—	0.01 \pm 0.02	0.01 \pm 0.02	—	0.00 \pm 0.00	0.02 \pm 0.03	$H_{(4,43)}=6.71$; $p=0.152$	
	Lycopene	—	1.12 \pm 0.38 ^{ab}	1.48 \pm 1.03 ^a	—	0.82 \pm 0.36 ^{ab}	0.62 \pm 0.15 ^{ab}	$H_{(4,43)}=14.52$; $p<0.01$	
	Zeaxanthin	—	0.01 \pm 0.01 ^{ab}	0.02 \pm 0.01 ^a	—	0.01 \pm 0.01 ^{ab}	0.01 \pm 0.01 ^{ab}	$H_{(4,43)}=14.89$; $p<0.01$	
	α -Carotene	—	0.19 \pm 0.10 ^{ab}	0.56 \pm 0.62 ^b	—	0.13 \pm 0.05 ^a	0.16 \pm 0.18 ^{ab}	$H_{(4,43)}=20.31$; $p\leq 0.001$	
	β -Carotene	—	0.10 \pm 0.07 ^a	0.01 \pm 0.01 ^{ab}	—	0.03 \pm 0.03 ^{ab}	0.10 \pm 0.09 ^a	$H_{(4,43)}=23.61$; $p\leq 0.001$	

— Indicates that no measure has been reported.

Carotenoids levels measured in whole larvae and in liver of juveniles and adults yellow perch were compared between sites by Kruskal-Wallis (H) analysis followed by Dunn's test. Means not sharing the same letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

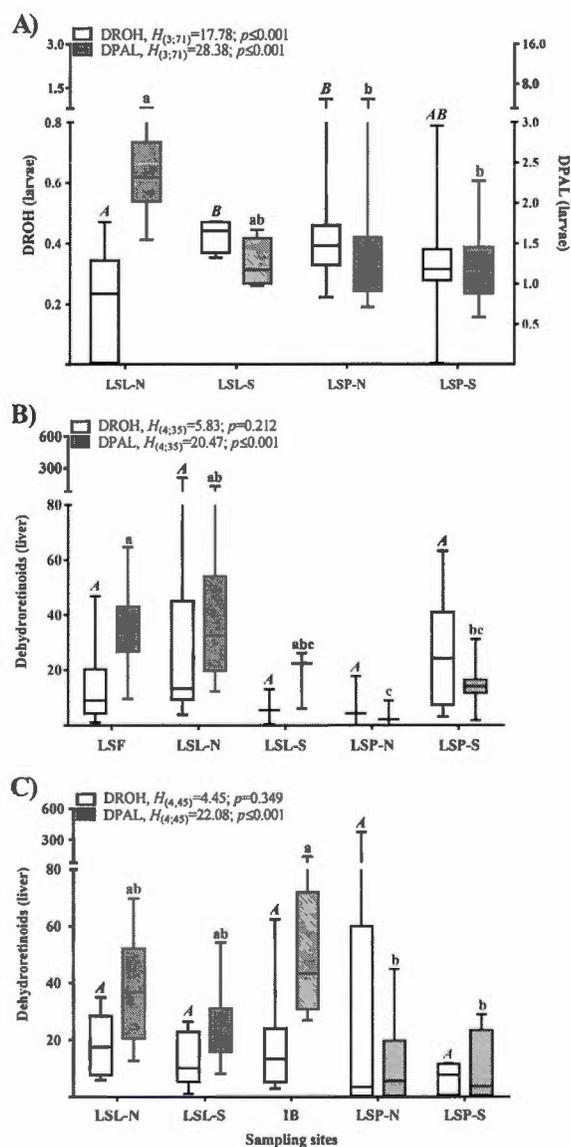


Figure 3.5: DROH (3,4- didehydro-all-*trans*-retinol, $\mu\text{g/g}$, clear) and DPAL (3,4-didehydroretinyl palmitate, $\mu\text{g/g}$, shaded) measured in yellow perch sampled in the St. Lawrence River following an increasing degree of anthropogenic influence. (A) Larvae (whole), (B) juveniles and (C) adults. Data were compared between sites with Kruskal-Wallis analysis followed by Dunn's test ($\alpha=0.05$). Boxes extend from 25th to 75th percentile; line is the median and whiskers show the largest to smallest observed values. Boxes not sharing the same letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

Table 3.3: Means \pm SD of retinoids in whole larvae (ng/g) and in liver (μ g/g) of the juveniles and adults yellow perch sampled in the St. Lawrence River following an increasing degree of anthropogenic influences.

Stage	Parameters	Sampling sites						Statistical models
		Low		Moderate		High		
		LSF n=0	LSL-N n=14	LSL-S n=4	IB n=0	LSP-N n=27	LSP-S n=29	
Larvae	ROH	—	0.75 \pm 0.23	0.02 \pm 0.02	—	0.04 \pm 0.05	0.05 \pm 0.05	$H_{(3,7)}=0.63$; $p=0.888$
	PAL	—	0.62 \pm 0.36 ^a	0.20 \pm 0.09 ^{ab}	—	0.10 \pm 0.07 ^b	0.08 \pm 0.04 ^b	$H_{(3,7)}=37.52$; $p<0.001$
Juveniles	ROH	n=15 0.03 \pm 0.04	n=8 0.59 \pm 1.31	n=3 0.01 \pm 0.00	n=0	n=3 0.01 \pm 0.00	n=10 0.22 \pm 0.38	$H_{(4,35)}=10.32$; $p<0.05$
	PAL	2.85 \pm 1.26 ^a	2.50 \pm 1.58 ^{ab}	1.12 \pm 0.72 ^{ab}	—	0.25 \pm 0.27 ^b	1.04 \pm 0.80 ^b	$H_{(4,35)}=16.82$; $p<0.01$
Adults	ROH	n=0	n=8 0.43 \pm 0.89	n=11 0.04 \pm 0.08	n=12 0.08 \pm 0.10	n=11 0.43 \pm 0.64	n=5 0.11 \pm 0.17	$H_{(4,45)}=1.26$; $p=0.869$
	PAL	—	0.22 \pm 0.10 ^{ab}	1.97 \pm 0.91 ^{ab}	3.60 \pm 2.08 ^a	1.71 \pm 2.85 ^b	0.72 \pm 1.01 ^b	$H_{(4,45)}=15.95$; $p<0.01$

ROH (all-trans-retinol) and PAL (Retinyl palmitate)

— Indicates that no measure has been reported

Levels were measured in whole larvae and in liver of juveniles and adults yellow perch were compared between sites by Kruskal-Wallis analysis followed by Dunn's test. Means not sharing the same letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

Table 3.4: Means \pm SD of retinoids in plasma (ng/ μ L) of the juveniles and adults yellow perch sampled in the St. Lawrence River following an increasing degree of anthropogenic influences.

Stage	Parameters	Sampled sites			Statistical models
		Moderate	High	High	
Juveniles		LSL-N n=8	LSP-N n=4	LSP-S n=9	
	DROH	0.219 \pm 0.090	0.207 \pm 0.164	0.182 \pm 0.108	$H_{(3,19)}=0.41$; $p=0.936$
	ROH	0.002 \pm 0.004	0.007 \pm 0.010	0.001 \pm 0.002	$H_{(3,19)}=4.68$; $p=0.197$
Adults	RA	0.002 \pm 0.002	0.011 \pm 0.014	0.002 \pm 0.001	$H_{(3,19)}=5.80$; $p=0.122$
		n=8	n=11	n=5	
	DROH	0.194 \pm 0.082	0.206 \pm 0.110	0.177 \pm 0.045	$H_{(3,29)}=0.15$; $p=0.985$
	ROH	0.002 \pm 0.004	0.001 \pm 0.002	0.012 \pm 0.025	$H_{(3,29)}=2.10$; $p=0.552$
	RA	0.002 \pm 0.001	0.002 \pm 0.001	0.024 \pm 0.050	$H_{(3,29)}=3.60$; $p=0.308$

DROH (3,4-didehydro-all-*trans*-retinol), ROH (all-*trans*-retinol) and RA (retinoic acids)

Means were compared between sites by Kruskal-Wallis analysis followed by Dunn's test. Means not sharing the same letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

3.8 References

Alsop, D., Hewitt, M., Kohli, M., Brown, S., Van Der Kraak, G., 2003. Constituents within pulp mill effluent deplete retinoid stores in white sucker and bind to rainbow trout retinoic acid receptors and retinoid X receptors. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2969–76. doi:10.1897/02-566.

Alsop, D., Matsumoto, J., Brown, S., Van Der Kraak, G., 2008. Retinoid requirements in the reproduction of zebrafish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 51–62. doi:10.1016/j.ygcen.2007.11.008.

Alsop, D., Van Der Kraak, G.J., Brown, S.B., Eales, J.G., 2005. *Environ. Toxicol. Biochem. Mol. Biol. Fishes* 6, 413–428. doi:10.1016/S1873-0140(05)80018-9.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. et Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxydants, and the dégénérative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* : vol 90 : p. 7915-7922. doi:10.1073/pnas.90.17.7915.

Barnham, C. et Baxter, A., March 1998. Condition factor, for salmonid fish. *Fisheries Notes*, ISSN 1440-2254, 3p.

Bernatchez, L. et Giroux, M., 2000. Les poissons d'eau douce du Québec et leur répartition dans l'est du Canada. *Broquet* : Ottawa : 350p. ISBN: 2-89000-493-7.

Bertolo, A., Blanchet, F.G., Magnan, P., Brodeur, P., Mingelbier, M., Legendre, P., 2012. Inferring processes from spatial patterns: the role of directional and non-directional forces in shaping fish larvae distribution in a freshwater lake system. *PLoS One* 7, e50239. doi:10.1371/journal.pone.0050239.

Bérubé, V.E., Boily, M.H., DeBlois, C., Dassylva, N., Spear, P.A., 2005. Plasma retinoid profile in bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural intensity of sub-watersheds in the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada. *Aquat. Toxicol.* 71, 109–120. doi:10.1016/j.aquatox.2004.10.018.

Boily, M., Thibodeau, J., Bisson, M., 2009. Retinoid metabolism (LRAT, REH) in the liver and plasma retinoids of bullfrog, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural contamination. *Aquat. Toxicol.* 91, 118–125. doi:10.1016/j.aquatox.2008.11.006.

Brigelius-Flohe, R., Traber, M.G., 1999. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 13, 1145–1155.

Britton, G., 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* 9, 1551–1558.

- Brown, T.G., Runciman, B., Bradford, M.J., and Pollard, S. 2009. A biological synopsis of yellow perch (*Perca flavescens*). *Can. Manuscr. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 2883: v + 28 p.
- Combs, G.F., 2012a. Vitamin E, in: Combs, G.F. (Ed), *The vitamins*. Elsevier: Academic Press: London: pp. 181-211. doi:10.1016/B978-0-12-381980-2.00007-4
- Combs, G.F., 2012b. Quasi-Vitamins, in: Combs, G.F. (Ed), *The vitamins*. Elsevier: Academic Press: London: pp. 395-433. doi: 10.1016/b978-0-12-381980-2.00018-9
- Combs, G.F., 2012c. Vitamin A, in: Combs, G.F. (Ed), *The vitamins*. Elsevier: Academic Press: London: pp. 93-137. doi: 10.1016/b978-0-12-381980-2.00005-0
- Couture, P., Rajotte, J.W., 2003. Morphometric and metabolic indicators of metal stress in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from Sudbury, Ontario: a review. *J. Environ. Monit.* 5, 216–221. doi:10.1039/b210338a.
- Cuvelier, C., Dotreppe, O., Istasse, L., 2003. Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann. Med. Vet.* 147, 315–324.
- de la Chenelière, V., Brodeur, P., Mingelbier, M., 2014. Restauration des habitats du lac Saint-Pierre: un prérequis au rétablissement de la perchaude. *Le Nat. Can.* 128, 50–62. doi:10.7202/1025070ar.
- Defo, M.A., Pierron, F., Spear, P.A., Bernatchez, L., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2012. Ecotoxicology and Environmental Safety Evidence for metabolic imbalance of vitamin A2 in wild fish chronically exposed to metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 85, 88–95. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.08.017.
- Deschamps, D. 2013. Protocole d'échantillonnage du Réseau de suivi ichtyologique du fleuve Saint-Laurent: Lac Saint-Pierre 2013. Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs 46p. + 38 annexes.
- Di Mascio, P., Murphy, M.E., Sies, H., 1991. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. Soc. Clin. Nutr. Nutr.* 53, 194S–200S.
- Doyon, C., Boileau, S., Fortin, R., Spear, P. a, 1998. Rapid HPLC analysis of retinoids and dehydroretinoids stored in fish liver: comparison of two lake sturgeon populations. *J. Fish Biol.* 53, 973–986. doi: 10.1111/j.1095-8649.1998.tb00457.x.
- Doyon, C., Fortin, R. et Spear, P. A., 1999. Retinoic acid hydroxylation and teratogenesis in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) from the St. Lawrence River and Abitibi region, Quebec. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56, 1428-1436. doi 10.1139/cjfas-56-8-1428.

- Fang, Y.-Z., Yang, S., Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872–879. doi:10.1016/S0899-9007(02)00916-4.
- Frenette, J.J., Arts, M.T., Morin, J., 2003. Spectral gradients of downwelling light in a fluvial lake (Lake Saint-Pierre, St-Lawrence River). *Aquat. Ecol.* 37, 77–85. doi:10.1023/A:1022133530244.
- Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., Wang, J., 2015. Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Agric. Food Chem.* 63, 1856–1862. doi:10.1021/jf504895h.
- Gesto, M., Castro, L.F.C., Reis-Henriques, M.A., Santos, M.M., 2012. Tissue-specific distribution patterns of retinoids and didehydroretinoids in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 161, 69–78. doi:10.1016/j.cbpb.2011.09.006.
- Girotti, A.W., 1998. Action in Biological Systems. *J. Lipid Res.* 39, 1529–1542.
- Giroux, I. (2015). Présence de pesticides dans l'eau au Québec: Portrait et tendances dans les zones de maïs et de soya – 2011 à 2014, Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction du suivi de l'état de l'environnement, ISBN . 978-2-550-73603-5, 47 p. + 5 ann. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Hedrei Helmer, S., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C., Boily, M., 2014. Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 8010–8021. doi:10.1007/s11356-014-2879-7.
- Houde, M., Giraud, M., Douville, M., Bougas, B., Couture, P., De Silva, A.O., Spencer, C., Lair, S., Verreault, J., Bernatchez, L., Gagnon, C., 2014. A multi-level biological approach to evaluate impacts of a major municipal effluent in wild St. Lawrence River yellow perch (*Perca flavescens*). *Sci. Total Environ.* 497-498, 307–318. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.059.
- Hudon, C., Carignan, R., 2008. Cumulative impacts of hydrology and human activities on water quality in the St. Lawrence River (Lake Saint-Pierre, Quebec, Canada). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 65, 1165–1180. doi:10.1139/F08-069.
- Hudon, C., Cattaneo, A., Tourville Poirier, A.-M., Brodeur, P., Dumont, P., Mailhot, Y., Amyot, J.-P., Despatie, S.-P., Lafontaine, Y., 2011. Oligotrophication from wetland epuration alters the riverine trophic network and carrying capacity for fish. *Aquat. Sci.* 74, 495–511. doi:10.1007/s00027-011-0243-2.

Jentsch, A.M., Bachmann, H., Fürst, P. et Biesalski, H.K. (1996) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free radical biology & médecine* : vol 20 no 2 : p.251-256.

Kaisuyama, M., Matsuno, T., 1988. Carotenoid and vitamin A, and metabolism of carotenoids, β -carotene, canthaxanthin, astaxanthin, zeaxanthin, lutein and tunaxanthin in tilapia *tilapia nilotica*. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* 90, 131–139. doi:10.1016/0305-0491(88)90049-1.

Kiokias, S., Gordon, M.H., 2004. Antioxidant Properties of Carotenoids In Vitro and In Vivo. *Food Rev. Int.* 20, 99–121. doi:10.1081/FRI-120037155.

Lall, S. P. et Lewis-McCrea, L. M., 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish - An overview. *Aquaculture*, 267(1-4), 3-19 : doi : 10.1016/j.aquaculture.2007.02.053

La Violette, N., 2004. Les lacs fluviaux du Saint-Laurent: Hydrologie et modifications humaines. *Le Nat. Can.* 128, 98–104.

Lemaire, G., Balaguer, P., Michel, S., Rahmani, R., 2005. Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by organochlorine pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202, 38–49. doi:10.1016/j.taap.2004.06.004.

Liebler, D.C., Burr, J.A., Philips, L., Ham, A.J.L., 1996. Gas Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Vitamin E and Its Oxidation Products. *Anal. Biochem.* 236, 27–34. doi:10.1006/abio.1996.0127.

Machlin, L.J., Keating, J., Nelson, J., Brin, M., Filipski, R., Miller, O.N., 1979. Availability of adipose tissue tocopherol in the Guinea pig. *J. Nutr.* 109: 105-109.

Mailhot, Y., Dumont, P., Paradis, Y., Brodeur, P., Vachon, N., Mingelbier, M., Lecomte, F. and Magnan, P., 2015. Yellow Perch (*Perca flavescens*) in the St. Lawrence River (Québec, Canada): population dynamics and management in a river with contrasting pressures. In : Couture, P. and G.G. Pyle (eds.). *Biology of perch*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Magnan, P., P. Brodeur, N. Vachon, Y. Mailhot, P. Dumont et Y. Paradis. in press. État du stock de perchaude du lac Saint-Pierre en 2011 et bilan du plan de gestion de 2008. Comité aviseur scientifique sur la gestion de la perchaude du lac Saint-Pierre, Université du Québec à Trois-Rivières et ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec.

Marcogliese, D.J., Blaise, C., Cyr, D., de Lafontaine, Y., Fournier, M., Gagné, F., Gagnon, C., Hudon, C., 2015. Effects of a major municipal effluent on the St. Lawrence River: A case study. *Ambio* 44, 257–274. doi:10.1007/s13280-014-0577-9.

Marcogliese, D.J., King, K.C., Salo, H.M., Fournier, M., Brousseau, P., Spear, P., Champoux, L., McLaughlin, J.D., Boily, M., 2009. Combined effects of agricultural activity and parasites on biomarkers in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Aquat. Toxicol.* 91, 126–134. doi:10.1016/j.aquatox.2008.10.001.

Massicotte, P., Bertolo, A., Brodeur, P., Hudon, C., Mingelbier, M., Magnan, P., 2015. Influence of the aquatic vegetation landscape on larval fish abundance. *J. Great Lakes Res.* 41, 873–880. doi:10.1016/j.jglr.2015.05.010.

Matos, H.R., Di Mascio, P., Medeiros, M.H., 2000. Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. *Arch. Biochem. Biophys.* 383, 56–59. doi:10.1006/abbi.2000.2035.

Matsuno, T., 1991. Xanthophylls as precursors of retinoids. *Pure Appl. Chem.* 63, 81–88. doi:10.1351/pac199163010081.

Moren, M., Neass, T., Hamre, K., 2002. Conversion of β -carotene, canthaxanthin and astaxanthine to vitamin A in atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) juveniles. *Fish. Physiol. Biochem.* 27: 71-80.

Mourente, G., Diaz-Salvago, E., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2000. Effects of dietary polyunsaturated fatty acid / vitamin E (PUFA / tocopherol ratio on antioxidant defence mechanisms of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L ., Osteichthyes , Sparidae). *Fish Physiol. Biochem.* 23, 337–351.

Novak, J., Benisek, M., Hilscherova, K., 2008. Disruption of retinoid transport, metabolism and signaling by environmental pollutants. *Environ. Int.* 34, 898–913. doi:10.1016/j.envint.2007.12.024.

Nwani, C.D., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, P., Lakra, W.S., 2010. Lethal concentration and toxicity stress of Carbosulfan , Glyphosate and Atrazine to freshwater air breathing fish *Channa punctatus* (Bloch). *Int. Aquat. Res.* 2, 105–111.

Ohkawa, H. Ohishi, N. et Yagi, K., 1979. Assay for lipid perodes in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95 : p.351-358.

Oliveira, E., Casado, M., Raldúa, D., Soares, A., Barata, C., Piña, B., 2013. Retinoic acid receptors' expression and function during zebrafish early development. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 138, 143–51. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.03.011.

Pandey, S., Ahmad, I., Parvez, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., 2001. Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* bloch: 1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper preexposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 345–352. doi:10.1007/s002440010258.

Payne, J.F., Malins, D.C., Gunselman, S., Rahimtula, A., Yeats, P.A., 1998. DNA oxidative damage and vitamin A reduction in fish from a large lake system in Labrador, Newfoundland, contaminated with iron-ore mine tailings. *Mar. Environ. Res.* 46, 289–294. doi:10.1016/S0141-1136(98)00011-7.

Rao, A. V., Rao, L.G., 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.* 55, 207–216. doi:10.1016/j.phrs.2007.01.012.

Richard, G., Côté, D., Mingelbier, M., Jobin, B., Morin, J. , Brodeur, P., 2011. Utilisation du sol dans la plaine inondable du lac Saint-Pierre (fleuve Saint-Laurent) durant les périodes 1950, 1964 et 1997 : interprétation de photos aériennes, numérisation et préparation d'une base de données géoréférencées, Québec, Gouvernement du Québec, 42 p. Rapport technique préparé pour le ministère des Ressources naturelles et de la Faune et Environnement Canada.

Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 295–301. doi:10.1016/S0147-6513(03)00009-5.

Shirakami, Y., Lee, S.A., Clugston, R.D., Blaner, W.S., 2012. Hepatic metabolism of retinoids and disease associations. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1821, 124–136. doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.023.

Sinhorin, V.D.G., Sinhorin, A.P., Teixeira, J.M. dos S., Miléski, K.M.L., Hansen, P.C., Moreira, P.S.A., Kawashita, N.H., Baviera, A.M., Loro, V.L., 2014. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106, 181–187. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.04.040.

Spear, P.A., Boily, M., Giroux, I., DeBlois, C., Leclair, M.H., Levasseur, M., Leclair, R., 2009. Study design, water quality, morphometrics and age of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in sub-watersheds of the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada. *Aquat. Toxicol.* 91, 110–117. doi:10.1016/j.aquatox.2008.09.011.

Spear, P. A., Moon, T. W., 1986. Thyroid-vitamin A interactions in chicks exposed to 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl: Influence of low dietary vitamin A and iodine. *Environ. Res.* 40: 188–198.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–189. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.03.013.

Yonar, M.E., Sakin, F., 2011. Ameliorative effect of lycopene on antioxidant status in *Cyprinus carpio* during pyrethroid deltamethrin exposure. *Pestic. Biochem. Physiol.* 99, 226–231. doi:10.1016/j.pestbp.2010.12.008.

Zhang, J., Xu, Y., Li, W., Schramm, K.W., Kettrup, A., 2002. Alterations in retinoids, tocopherol, and microsomal enzyme activities in the liver of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) from Ya-Er lake, China. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 660–667. doi:10.1007/s001280305.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS ET DISCUSSION RELATIFS AUX ADULTES ÉCHANTILLONNÉS EN 2014

Ce 4^e chapitre fait état des résultats relatifs aux mesures morphométriques (poids, longueur, circonférence et coefficient de Fulton), à l'âge, ainsi qu'aux différents biomarqueurs à l'étude (TBARS, α -tocophérol, caroténoïdes et rétinoïdes) spécifiques à la campagne de 2014. L'objectif global pour cette seconde campagne d'échantillonnage était de vérifier la reproductibilité des effets du gradient de contamination et de pression anthropique sur l'état de santé des perchaudes en regard des réponses physiologiques et biochimiques obtenues en 2013. Considérant la puissance statistique amplifiée par l'augmentation du nombre de captures en 2014, il était également attendu de faire ressortir l'interrelation entre les différents biomarqueurs et la condition physiologique des adultes, afin de compléter les analyses de 2013. Ainsi, l'analyse et l'interprétation des résultats de 2014 ont permis de confirmer l'état de croissance, ainsi que l'état du système rédox et des rétinoïdes observés en 2013. De plus, ces résultats s'inscrivent également dans un projet plus global, qui tend à investiguer les effets biologiques des contaminants sur les espèces aquatiques, supporté par le Ministère des Pêches et Océans Canada. Étant donné que des modifications majeures aux méthodes analytiques ont été apportées pour les échantillons de 2014 permettant l'optimisation de leur performance et de leur rendement comparativement à celles de 2013, l'interprétation des résultats entre les deux années s'est limitée à une comparaison qualitative.

4.1 Paramètres morphométriques

Les perchaudes adultes capturées en 2014 présentent des morphologies distinctes entre les sites (tableau 4.1). En effet, les perchaudes capturées au LSP-S sont plus longues que celles mesurées au LSL et au LSF, avec une masse corporelle et une circonférence significativement plus élevées que celles relevées au LSL (tableau 4.1). Sans être significatives, des tendances similaires pour la taille et le poids sont observées chez les adultes provenant du LSP-N comparativement à ceux du LSL et du LSF (tableau 4.1). L'âge moyen estimé pour les perchaudes adultes capturées en 2014 s'avère similaire entre les sites (tableau 4.1).

Les relations entre les paramètres morphométriques et l'âge rapportées par l'analyse en composantes principales (ACP) pour la campagne de 2013 (figure 3.3) sont également observées en 2014, où les relations entre les paramètres morphométriques évalués par ACP semblent se renforcer suivant le gradient de pression : LSL < LSP. L'interrelation entre les paramètres morphométriques au LSL est représentée par une composante principale 1 (CP1) de 75% (figure 4.1-B), où le poids et la circonférence sont étroitement liés. L'angle approximatif de 90° observé chez les adultes du LSL entre l'âge et les paramètres morphométriques témoigne d'une faible influence de l'âge des perchaudes sur leur morphométrie à ce site (figure 4.1-B). Au LSP, avec des CP1 de 89,1% au nord (figure 4.1-C) et de 85,6% au sud (figure 4.2-D), nous pouvons observer que la longueur, le poids et la circonférence sont fortement liés, tant au LSP-S qu'au LSP-N. Chez les perchaudes capturées au LSP, l'âge semble avoir une influence relative plus importante qu'au LSL sur la morphométrie des perchaudes capturées (figure 4.1-C et 4.1-D). Les résultats d'ACP obtenus pour le LSF (figure 4.1-A) ne concordent toutefois pas avec ce renforcement de l'interrelation entre les paramètres morphométriques et l'âge en fonction du gradient de pression observé pour la campagne de 2013. En effet, les perchaudes adultes capturées au LSF, considéré comme étant le site le moins impacté, présentent une forte interrelation entre leurs paramètres morphométriques et l'âge, avec une CP1 de

94,0% (figure 4.1-A), et où le poids corporel et la circonférence sont fortement reliés comparativement à la longueur. De façon analogue aux perchaudes adultes capturées au site IB en 2013, où la taille et la longueur des perchaudes sont fortement reliées à l'âge (figure 3.3-B), les perchaudes capturées au LSF en 2014 présentent une forte relation entre l'âge, la circonférence, le poids et la longueur (figure 4.1-A). Le profil en contaminants est un facteur qui a été relevé important lors de l'analyse des échantillons de 2013 sur l'interaction entre les paramètres morphométriques (section 3.5.1). En 2014, d'autres facteurs d'influence seraient à considérer. Selon Purchase *et al.* (2005), des facteurs écologiques comme la température, l'hydrologie, la morphologie du lac, etc. sont susceptibles d'influencer la croissance. L'examen de ces facteurs ne font pas partie des objectifs poursuivis dans la présente étude.

Toutefois, l'hétérogénéité morphologique observée chez les perchaudes en 2013 entre les secteurs fluviaux, et ce particulièrement au LSP-S (section 3.5.1), est également observée en 2014. Contrairement à ce qui était attendu, les perchaudes échantillonnées au LSP sont morphologiquement plus "massives" et plus longue, et ce, pour les 2 années consécutives. En effet, selon Mailhot *et al.* (2015), des paramètres morphométriques plus faibles au LSP comparativement aux autres sites auraient été attendu, témoignant ainsi d'un faible taux de croissance au LSP, tel qu'observé entre 2002 et 2011. Néanmoins, l'évaluation des coefficients de condition de Fulton concorde avec nos attentes. Les coefficients de condition de Fulton évalués en 2014 vont également dans le même sens que ceux obtenus chez les adultes capturées en 2013 (table 3.1), où le coefficient de Fulton s'avère significativement plus faible au LSP (N et S) comparativement à ceux du LSL (table 4.1). Bien que les coefficients obtenus pour les perchaudes du LSF soient statistiquement similaires à ceux du LSL et du LSP, les moyennes obtenues nous portent à croire que les perchaudes du LSF ont une meilleure condition physiologique que les sites en aval (table 4.1).

Tableau 4.1: Sexe, paramètres morphométriques (moyenne \pm écart-type de la longueur, du poids et de la circonférence), âge et coefficient de Fulton (K) des perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression croissant.

Paramètres	Sites			Modèles statistique
	Faible	Modéré	Élevé	
Sexe*	LSF n = 16	LSL n = 31	LSP-N n = 29	LSP-S n = 30
Âge (années)	13F/2M (11) 4,4 \pm 1,5	27F/4M 4,3 \pm 0,7	28F/1M 4,3 \pm 1,3	26F/3M (11) 4,7 \pm 1,1
Longueur (mm)	207,5 \pm 41,0 ^{1,a}	201,6 \pm 16,4 ^a	220,8 \pm 29,4 ^{ab}	234,0 \pm 25,7 ^b
Poids (g)	122,7 \pm 85,3 ^{ab}	102,4 \pm 28,0 ^a	127,1 \pm 62,9 ^{ab}	149,1 \pm 52,7 ^b
Circonférence (mm)	125,0 \pm 28,9 ^{ab}	121,5 \pm 13,8 ^a	128,9 \pm 18,4 ^{ab}	138,1 \pm 17,9 ^b
K	1,19 \pm 0,16 ^{ab}	1,21 \pm 0,09 ^a	1,11 \pm 0,07 ^b	1,12 \pm 0,09 ^b

* Identification du sexe des perchaudes: femelle (F), mâle (M) et indéterminé (I)

Les données ont été comparées entre les sites par l'analyse de Kruskal-Wallis (H) suivie du test de Dunn
Les moyennes ne comportant pas les mêmes lettres sont significativement différentes entre elles ($\alpha = 0,05$).

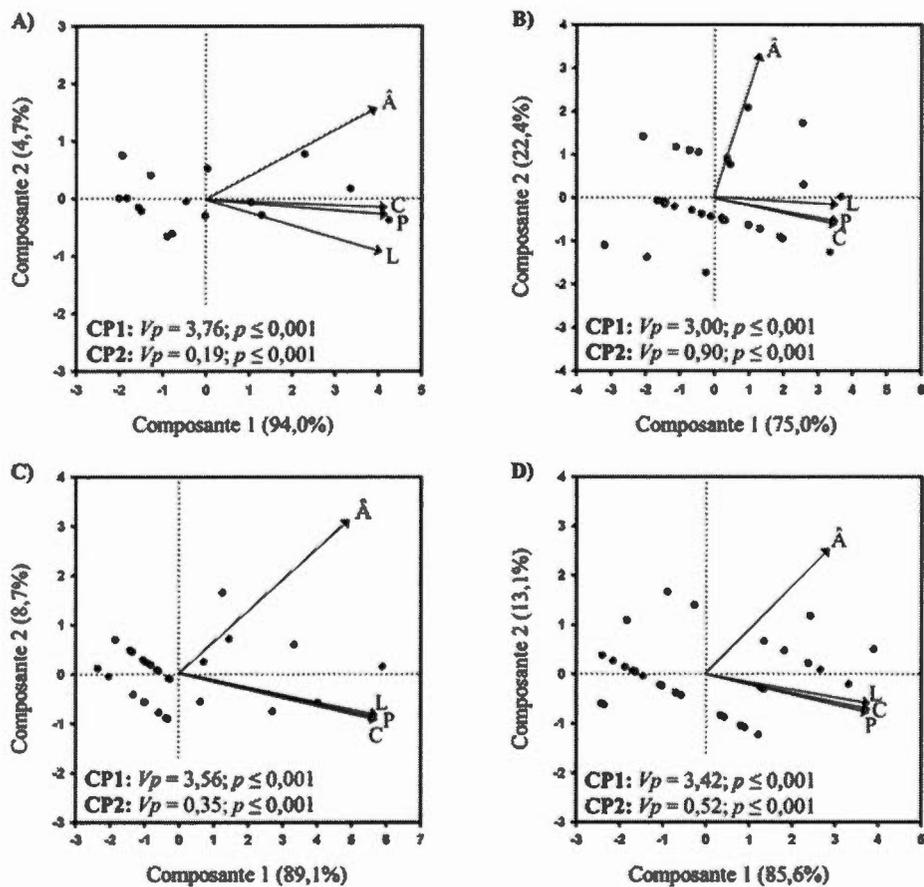


Figure 4.1: Analyses en composantes principales (ACP) des paramètres morphométriques (L, longueur, P, poids et C, circonférence) et de (\hat{A}) âge chez les perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression anthropogénique. Les valeurs propres V_p , pour le (A) Lac Saint-François, (B) Lac Saint-Louis, (C) Lac Saint-Pierre nord, et (D) Lac Saint-Pierre sud ont été évaluées par le test de Bartlett ($\alpha = 0,05$).

4.2 TBARS et α -tocophérol

Alors que pour les échantillons de 2013 le dosage des TBARS a été effectué seulement pour le muscle des perchaudes, en 2014 l'évaluation de la peroxydation des lipides a été réalisée pour le foie et le muscle. L'analyse des TBARS dans le muscle n'a pas confirmé les observations de 2013, car aucune différence significative n'a été relevée entre les sites (figure 4.2-A). Toutefois, en 2014, l'analyse des TBARS dans le foie (figure 4.2-A) présente un schéma similaire à celui obtenu pour les TBARS mesurés dans le muscle des juvéniles de 2013 (figure 3.4-B), où, globalement, les niveaux de peroxydation des lipides sont plus faibles au LSP. Cependant, une réelle différence significative est observée pour le site du LSP-S par rapport au LSL (figure 4.2-A). Ces résultats sont contraires aux hypothèses que nous avons formulées, c'est-à-dire une augmentation de la peroxydation des lipides suivant le gradient de pression présumé témoignant ainsi d'une augmentation du stress oxydant en fonction des sites les plus impactés.

Pour les données de 2013, nous avons considéré l' α -tocophérol en lien avec les TBARS en raison de son effet antioxydant, mais les résultats n'allaient pas dans le sens du gradient de pression (figure 3.4). Les résultats de 2014 confirment toutefois notre hypothèse voulant que les niveaux en α -tocophérol diminuent suivant le gradient, où les sites les plus contaminés présentent des niveaux plus faibles. Au LSP (N et S), le contenu du foie en α -tocophérol est significativement plus faible comparativement au LSL (figure 4.2-B). De même, il y a une différence significative entre le LSP-S et le LSF (figure 4.2-B). Chez les perchaudes de 2014, la différence entre les niveaux d' α -tocophérol entre les sites est marquante et concordante avec la littérature. Par exemple, dans l'étude *in vivo* de Baker *et al.* (1998), les auteurs ont rapporté une diminution de 63% de l' α -tocophérol hépatique mesuré chez le mullet (*Chelon labrosus*) suite à une exposition *per os* pendant 10 semaines (2400 mg Cu/Kg nourriture sèche/jour) comparativement à un groupe témoin. Les auteurs rapportent également une hausse significative de 304% des TBARS mesurées chez le

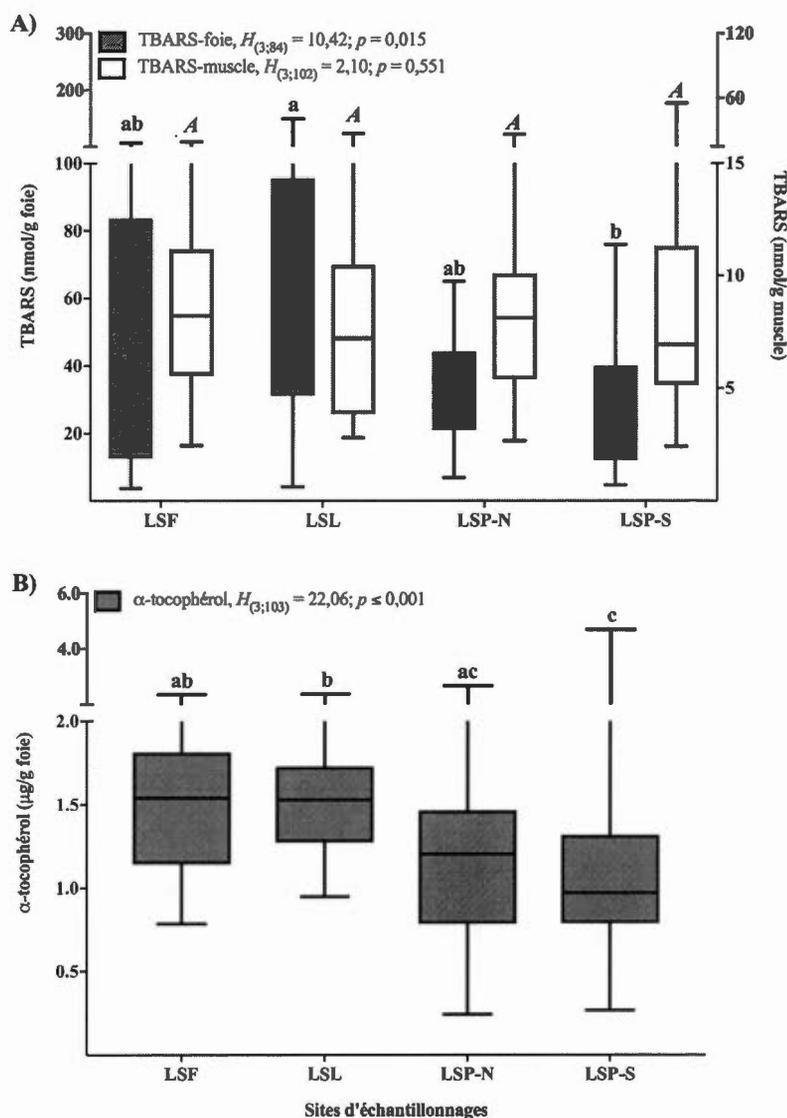


Figure 4.2: TBARS (A) et α -tocophérol (B) mesurés dans le muscle (boîtes claires) et le foie (boîtes ombrées) des perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression anthropogénique. Les données ont été comparées entre les sites par un test non paramétrique Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn ($\alpha = 0,05$). Les boîtes à moustaches identifiées par une lettre différente sont significativement différentes. Les extrémités des boîtes correspondent aux 25e et 75e percentiles et la ligne interne à la médiane; les moustaches montrent l'étendue de la plus petite à la plus grande valeurs observées.

groupe exposé. Il est donc possible, dans notre échantillonnage de 2014, que la diminution d' α -tocophérol que nous avons observée soit le résultat de sa mobilisation (utilisation) afin de neutraliser les dommages oxydants. Considérant les faibles niveaux en TBARS retrouvés à ce site, il est également possible que la variation soit assujettie à d'autres facteurs, telle que la biodisponibilité. Nous avons présumé que le lien " α -tocophérol-TBARS" serait plus facilement observable avec les TBARS mesurés dans le foie plutôt que dans le muscle, mais une seule corrélation s'est avérée significative et où les niveaux hépatiques en α -tocophérol étaient négativement corrélés avec les données TBARS au LSF (tableau C.1).

Considérant l'ensemble des résultats relatif au système rédox (2013 et 2014), il devient inévitable de coupler ces analyses à d'autres paramètres liés aux antioxydants enzymatiques (e.g CAT, GPx, SOD, etc.) (Ge *et al.*, 2015 ; Girotti, 1998 ; Pandey *et al.*, 2001) ainsi qu'au métabolisme des lipides (Jentzsch *et al.*, 1996 ; Machlin *et al.*, 1979 ; Mourente *et al.*, 2000) afin d'optimiser notre compréhension du système rédox de la perchaude (voir section 3.5.2).

4.3 Caroténoïdes

Conformément à ce qui a été relevé pour la campagne de 2013 (section 3.5.3), le lycopène s'avère également le caroténoïde hépatique dominant chez les adultes en 2014 (tableau 4.2). Ceci confirme donc l'intérêt de poursuivre ultérieurement des investigations concernant l'importance biologique du lycopène chez les espèces aquatiques, notamment dans la protection contre les effets toxiques des contaminants (Yonar et Sakin, 2011). Pour notre campagne de 2014, nous n'avons pas été en mesure de relier le lycopène aux éléments du système rédox mesurés chez la perchaude (tableau C.2). En effet, aucune corrélation ne s'est avérée significative entre le lycopène, les TBARS (tant hépatique que musculaire) ou l' α -tocophérol (tableau C.2), sauf au LSP (tableau C.2). En effet, chez les perchaudes du LSP (N et

Tableau 4.2: Moyenne \pm écart-type des caroténoïdes hépatiques (ng/g) mesurés chez les perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression.

Caroténoïdes	Sites						Modèles statistique
	Faible		Modéré		Élevé		
	LSF n = 16	LSL n = 31	LSP-N n = 29	LSP-S n = 30			
Fucoxanthine	53,28 \pm 22,39 ^{ab}	73,80 \pm 45,46 ^b	42,09 \pm 15,35 ^a	41,11 \pm 12,07 ^a	$H_{(3;75)} = 15,83$; $p = 0,001$		
Diatoxanthine	61,41 \pm 50,56 ^a	30,59 \pm 20,34 ^a	10,76 \pm 6,33 ^b	23,72 \pm 27,38 ^b	$H_{(3;56)} = 17,79$; $p < 0,001$		
Autres xanthophylles α et β -cryptoxanthine	63,85 \pm 42,00	60,49 \pm 22,37	72,94 \pm 48,16	62,91 \pm 22,58	$H_{(3;67)} = 0,62$; $p = 0,891$		
Lycopène	58,91 \pm 31,42	29,92 \pm -	40,69 \pm 18,41	29,85 \pm -	-		
α et β -carotène	469,77 \pm 253,99 ^a	354,31 \pm 155,79 ^a	172,10 \pm 115,14 ^b	162,33 \pm 86,33 ^b	$H_{(3;100)} = 43,89$; $p < 0,001$		
	51,89 \pm 21,11	37,63 \pm 12,26	49,58 \pm 22,12	33,09 \pm 6,31	$H_{(3;40)} = 8,01$; $p = 0,046$		

- Indique qu'aucun résultat n'a pas été rapporté

Autres xanthophylles correspond à la zéaxanthine et lutéine.

Les données ont été comparées entre les sites par l'analyse de Kruskal-Wallis (H) suivie du test de Dunn ($\alpha = 0,05$).

Les moyennes ne comportant pas les mêmes lettres sont significativement différentes entre elles.

S) les niveaux en lycopène sont positivement corrélés avec ceux en α -tocophérol, suggérant une interdépendance entre ces deux puissants antioxydants afin d'optimiser l'efficacité leur activité antioxydante (Edge *et al.*, 1997), témoignant potentiellement d'un état rédox précaire au LSP.

Par ailleurs, les caroténoïdes quantifiés chez les perchaudes de 2014 mettent toutefois en évidence trois d'entre eux, soit pour la fucoxanthine, la diatoxanthine et le lycopène (tableau 4.3). Les niveaux de fucoxanthine sont significativement plus faibles chez les perchaudes du LSP (N et S) comparativement à ceux du LSL. De même, de plus faibles concentrations de diatoxanthine et de lycopène sont observées au LSP (N et S) comparativement à celles du LSL et du LSF. Des résultats similaires ont d'ailleurs été obtenus pour les perchaudes capturées en 2013 (tableau 3.2). Il est intéressant de souligner qu'en raison du très faible nombre de corrélations significatives obtenues entre les caroténoïdes (tableau C.3), celles observées impliquent majoritairement ces trois caroténoïdes: le lycopène est corrélé avec la fucoxanthine chez les adultes du LSL et du LSP-N, alors que les "autres xanthophylles" (zéaxanthine et lutéine) sont corrélés avec la diatoxanthine (tableau C.3) au LSP (N et S).

À ce point-ci, il convient de souligner que la quantification des caroténoïdes dans le foie des perchaudes a été rendue difficile en raison des faibles concentrations détectées. Contrairement à la barbotte (dont des échantillons de foie et de plasma ont servi à la mise au point des méthodes d'analyse), la perchaude semble être une espèce possédant une réserve hépatique limitée et moins diversifiée en composés caroténoïdes, et ce, indépendamment du site. Même le fait d'analyser les échantillons avec un système de chromatographie CLUHP, plus sensible, en 2014, n'a pas amélioré nos résultats. Sur les 106 échantillons de foie prélevés en 2014, seul le lycopène a été détecté dans la majorité des extraits, soit dans 97%. La fucoxanthine a été détectée dans 73% des échantillons, alors que les carotènes ont été détectés dans

40% et la diatoxanthine dans 56% des extraits. De plus, les cryptoxanthines ont été détectées dans seulement 8,5% des extraits. Cette limitation confirme d'autant plus l'importance du lycopène chez la perchaude. Ces résultats pourraient également suggérer l'importance d'autres organes de réserve pour les caroténoïdes, tels que les reins ou les tissus adipeux.

Il s'avère toutefois intéressant de souligner qu'il n'y a pas de différence significative en ce qui concerne les caroténoïdes "provitamine A", où le contenu en carotènes (α et β) et autres xanthophylles (zéaxanthine et lutéine) sont similaires entre les sites d'échantillonnage (tableau 4.2). L'influence du gradient de pression anthropogénique est donc seulement observable pour des caroténoïdes au potentiel antioxydant, comme le lycopène.

4.4 Métabolisme des rétinoïdes

En 2013, nous avons rapporté que la réserve hépatique des perchaudes du LSP était amoindrie comparativement aux sites en amont (figure 3.5 et tableau 3.3). Non seulement nous obtenons un résultat similaire en 2014, mais à cela il faut ajouter, pour le LSP, de basses teneurs en ROH et en DROH hépatiques. En effet, en 2014, les esters de rétinoïdes dans le foie s'avèrent plus faibles au LSP comparativement aux sites en amont (figure 4.3-A), où les niveaux mesurés au LSP (N et S) en palmitate de rétinol (PAL) sont significativement plus faibles qu'au LSL, ainsi que ceux en palmitate de déhydrorétinol (DPAL) comparativement au LSL et au LSF (figure 4.3-A). Les concentrations en DROH hépatiques mesurées s'avèrent moindres chez les perchaudes capturées au LSP (N et S) par rapport au LSL et au LSF (figure 4.3-B), ainsi que les niveaux en ROH mesurés au LSP-S comparativement au LSP-N, au LSL et au LSF (figure 4.3-B). Le fait d'obtenir des résultats semblables pour deux années consécutives renforce l'hypothèse liée au catabolisme des rétinoïdes (section 3.5.3) par une oxydation non enzymatique (Payne *et al.*, 1998) et par l'induction

d'enzymes clés dans le métabolisme de détoxification (Zhang *et al.*, 2002), ayant comme conséquence une déplétion en vitamine A aux sites les plus contaminés.

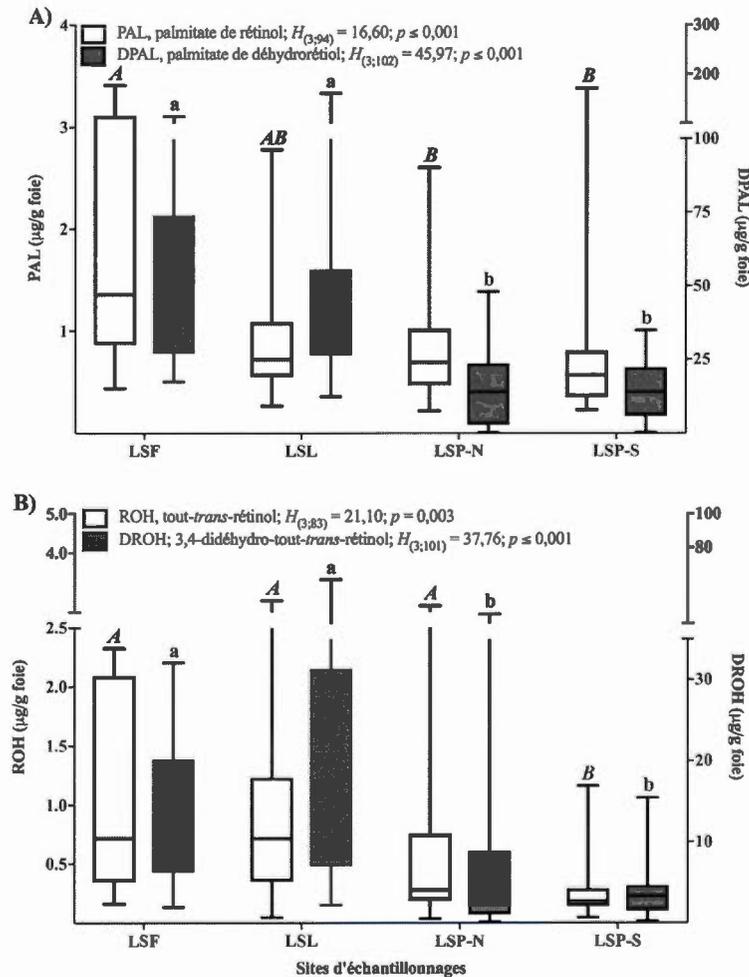


Figure 4.3: Rétinoïdes hépatiques mesurés chez les perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression anthropogénique. (A) Palmitate de rétinol (boîtes claires) et palmitate de déhydrorétinol (boîtes ombrées). (B) Rétinol (boîtes claires) et déhydrorétinol (boîtes ombrées). Les données ont été comparées entre les sites par un test de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn ($\alpha = 0,05$). Les boîtes à moustaches identifiées par une lettre différente sont significativement différentes. Les extrémités des boîtes correspondent aux 25e et 75e percentiles et la ligne interne à la médiane; les moustaches montrent l'étendue de la plus petite à la plus grande valeurs observées.

En augmentant l'effectif en 2014 (et la puissance statistique), nous avons exploré plus à fond l'effet du site sur les composés rétinoïdes en générant les ratios DPAL/DROH et PAL/ROH. Notre but était d'explorer l'implication possible des activités enzymatiques LRAT (estérification du DROH et ROH) et HER (hydrolisation des esters DPAL et PAL) à chacun des sites d'échantillonnages. Selon Boily *et al.* (2009), une forte exposition en contaminants agricoles entraîne une diminution du ratio PAL/ROH suggérant une diminution du ratio d'activité LRAT/HER. Selon les résultats obtenus pour la perchaude en 2014, les ratios sont relativement semblables entre les sites, sauf chez les perchaudes capturées au LSL qui présentent un ratio DPAL/DROH significativement plus faible que ceux du LSF et du LSP-S (figure 4.4), ainsi qu'un ratio PAL/ROH plus faible qu'au LSP-S. Ces résultats ne permettent toutefois pas de statuer précisément sur l'état de l'équilibre LRAT/HER au LSP. Afin de vérifier si la mobilisation de la réserve (conversion métabolique des esters en composés rétinoïdes polaires pour le transport extrahépatique) est semblable entre les sites à l'étude, les données ont été soumises à une analyse multivariée (voir section 2.5). La modélisation présentée à la figure 4.5 décrit la relation entre les valeurs de DPAL et de DROH (transformées en \log_{10}) en fonction des sites. Le modèle rend compte de LogDPAL en fonction de LogDROH, et de l'interaction entre les deux (LogDROH*Sites) (figure 4.5). Le modèle linéaire obtenu est hautement significatif expliquant 88,9% ($R^2 = 0,889$) de la variation observée en DPAL. L'analyse des coefficients révèle que le contenu en DROH correspond au paramètre ayant la plus forte influence sur celui en DPAL (somme des carrés = 39,93; $F = 211,35$; $p \leq 0,001$), où les sites sont une source d'influence (somme des carrés = 5,78; $F = 10,20$; $p \leq 0,001$), incluant l'interaction entre les niveaux en DROH et les sites (LogDROH*Sites) comme un facteur à considérer pour ce modèle (somme des carrés = 6,07; $F = 10,71$; $p \leq 0,001$). Ce résultat complémentaire suggère que le site de capture influence bel et bien les teneurs en rétinoïdes mesurés chez la perchaude, où le LSP (N et S) semble se démarquer des sites en amont. Ultérieurement, afin de

s'assurer de l'effet des sites sur la mobilisation de la réserve, des analyses des enzymes impliquées (LRAT/ARAT et HER) devront être réalisées.

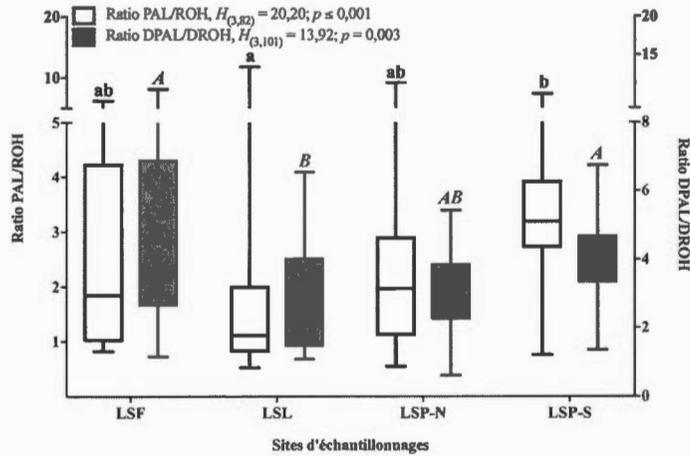


Figure 4.4: Ratio hépatique de palmitate de rétinol/rétinol (PAL/ROH, boîtes claires) et de palmitate de déhydrorélinol/déhydrorélinol (DPAL/DROH, boîtes ombrées) obtenus pour les perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent et suivant un gradient de pression anthropogénique. Les données ont été comparées entre les sites par un test non paramétrique Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn ($\alpha = 0,05$). Les boîtes à moustaches qui ne partagent pas les mêmes lettres sont significativement différentes. Les extrémités des boîtes correspondent aux 25e et 75e percentiles et la ligne interne (horizontale) à la médiane; les moustaches montrent l'étendue de la plus petite à la plus grande valeur observée.

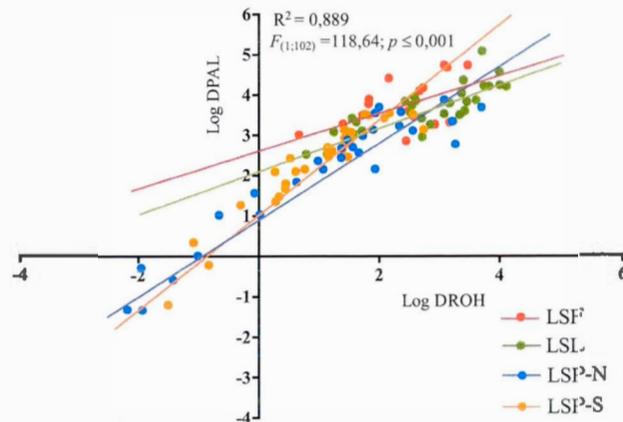


Figure 4.5: Relation multivariée entre le palmitate de déhydrorélinol (DPAL), le didéhydrorélinol (DROH) et le site des perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent et suivant un gradient de pression anthropogénique. La relation a été évaluée par modélisation linéaire multivariée pour chacun des paramètres (Log DROH, sites et LogDROH*Sites) sur le LogDPAL ($\alpha = 0,05$).

Les résultats pour les rétinoïdes plasmatiques sont présentés au tableau 4.3. Des différences significatives ont été observées entre les sites pour le DROH, les formes "cis" de l'acide rétinoïque et pour les autres rétinoïdes. Comme observées dans le foie, les concentrations de DROH plasmatiques sont plus faibles chez les perchaudes du LSP, où ceux du LSP-S sont significativement différents de ceux mesurés au LSL et LSF, alors que ceux mesurés au LSP-N sont significativement différents de ceux du LSL. Les valeurs des autres rétinoïdes, soit le tout-*trans* ROH et le tout-*trans* AR, augmentent au LSP (N et S) comparativement à celles mesurées dans le plasma des perchaudes provenant du LSL et du LSF (tableau 4.3). La limite méthodologique relative à la co-élution entre l'AR tout-*trans* et le ROH tout-*trans* (voir annexe A) restreint l'interprétation des résultats relatif au métabolisme des rétinoïdes. D'un côté, s'il s'agit d'une augmentation du ROH, cela pourrait être relié au métabolisme des précurseurs ou à celui DROH \leftrightarrow ROH. En effet, selon l'étude de Katsuyama et Matsuno (1988) et celle de Yamashita *et al.* (1996), préalablement décrites à la section 3.5.3, la conversion en DROH ou ROH est dépendante du type de caroténoïdes provitamine A. Les xanthophylles seraient majoritairement convertis en DROH, alors que les carotènes devraient passer par une première conversion en ROH avant d'être désaturés. Toutefois, aucune différence significative n'est observée dans nos mesures de caroténoïdes provitamines A entre les sites (tableau 4.2). Il serait donc possible que l'augmentation de ROH soit attribuable au métabolisme DROH \leftrightarrow ROH favorisant le ROH au détriment du DROH, tel que observé au LSP (tableau 4.3). Les études de Moise *et al.* (2007) ont mis en évidence, chez le poisson zèbre, des rétinol saturases qui catalysent la formation de ROH en DROH par le biais d'intermédiaires (dihydrorétinol, soit 13,14-dihydrorétinol et/ou 7,8-dihydrorétinol,) (figure 4.6). Une telle réaction métabolique pourrait expliquer en partie l'augmentation du ROH plasmatique (tableau 4.3) mesurée chez les perchaudes,

Tableau 4.3: Moyenne \pm écart-type des rétinoïdes du plasma ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) mesurés chez les perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression croissant.

Rétinoïdes	Sites						Modèles statistique
	Faible		Modéré		Élevé		
	LSF n = 13	LSL n = 28	LSL n = 28	LSP-N n = 22	LSP-S n = 24		
DROH	37,01 \pm 13,93 ^{ab}	35,73 \pm 8,16 ^b	27,09 \pm 10,73 ^{ac}	24,52 \pm 10,06 ^c			$H_{(3;84)} = 20,13; p \leq 0,001$
AR (9-cis et 13-cis)	5,50 \pm 1,79 ^a	4,50 \pm 1,40 ^{ab}	3,98 \pm 1,12 ^{ab}	2,91 \pm 0,45 ^b			$F_{(3;26)} = 4,12; p = 0,017$
RALD	1,80 \pm 1,71	2,46 \pm 1,63	2,74 \pm 1,18	2,03 \pm 1,06			$H_{(3;29)} = 6,08; p = 0,108$
Autres rétinoïdes (ROH et <i>at</i> -AR)	7,26 \pm 5,38 ^a	6,44 \pm 4,05 ^a	18,33 \pm 7,24 ^b	20,44 \pm 8,97 ^b			$F_{(3;83)} = 14,85; p \leq 0,001$

3,4-didéhydro-tout-*trans*-rétinol (DROH), acides rétinoïdes (AR), Rétinaldéhyde (RALD), tout-*trans*-rétinol (ROH).

Les données relatives au DROH et RALD ont été comparées entre les sites par l'analyse de Kruskal-Wallis (H) suivie du test de Dunn. Les données relatives à la forme *cis* de l'AR et aux autres rétinoïdes ont été comparées entre les sites par ANOVA (F) suivi du test de Tukey-Kramer. Les moyennes ne comportant pas les mêmes lettres sont significativement différentes entre elles ($\alpha = 0,05$).

Il serait intéressant d'investiger l'activité de saturation/désaturation ROH – DROH pour la perchaude, pour lesquelles les formes "dehydro" dominant, ainsi que de tester l'influence de certains contaminants sur ce métabolisme particulier.. Par ailleurs, si nous pouvions mesurer une concentration plus élevée en AR, cela confirmerait l'hypothèse d'une augmentation du catabolisme des caroténoïdes/rétinoïdes, tel que le suggèrent les niveaux en rétinoïdes hépatiques mesurés en 2013 et en 2014.

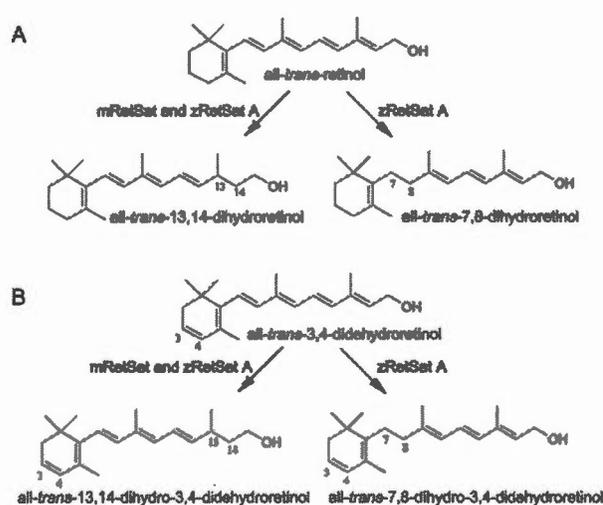


Figure 4.6: Voies de saturation du A) tout-*trans*-rétinol ou B) 3,4-déhydro-tout-*trans*-rétinol par les rétinoïdes saturases (mRetSat et zRetSat). Tirée de Moise *et al.* (2007).

L'hypothèse amenée en 2013 concernant le catabolisme des rétinoïdes provoqué suite à l'augmentation de processus pro-oxydant pourrait être supportée pas les multiples corrélations significatives retrouvées entre les caroténoïdes et les rétinoïdes (tableau D.4). Des corrélations ont en effet été relevées entre les rétinoïdes hépatiques et des caroténoïdes non provitamine A, tels que la fucoxanthine et le lycopène (tableau C.4).

Ceci peut alors refléter un lien entre l'état du système rédox et les rétinoïdes hépatiques considérant le rôle antioxydant de ces deux caroténoïdes de même que des relations significatives entre l' α -tocophérol et les rétinoïdes hépatiques pour les perchaudes du LSP, et plus particulièrement pour le LSP-S (tableau C.5).

Chez les adultes une déplétion en vitamine A pourrait porter atteinte au potentiel reproducteur. En effet, Alsop *et al.* (2008) ont démontré *in vivo* l'importance de la vitamine A dans le succès reproducteur chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). Suite à une diète carencée en rétinoïdes pendant 6 semaines, les poissons ont démontré une baisse de production d'œufs (73%) par rapport au groupe témoin, sans que toutefois le taux de fertilisation ne soit affecté. Ceci nous indique un intérêt à mesurer les rétinoïdes dans différents organes ou tissus, comme les gonades, afin d'optimiser l'interprétation des conséquences relatives à une forte diminution.

De plus, le lien entre les différents biomarqueurs à l'étude et l'indice de condition de Fulton a été investigué par l'analyse non paramétrique de Spearman (tableau C.6), et ce, en considérant l'ensemble des échantillons. Selon nos résultats, seulement les niveaux plasmatiques en DROH étaient significativement corrélés avec l'indice de condition. Cette relation est en accord avec nos attentes selon l'étude de Defo *et al.*, (2012) et celle de Spear *et al.* (2009), où en milieu contaminé la croissance est moindre, et ce, couplé à un amoindrissement des rétinoïdes. Ainsi, selon nos résultats, la condition physiologique affaiblie chez les individus ayant de faibles niveaux de DROH, témoignent d'un possible déséquilibre métabolique.

Globalement, cette seconde campagne d'échantillonnage permet de confirmer le lien entre le gradient de perturbation anthropique et les réponses physiologiques et biochimiques observées en 2013, où la condition des perchaudes du LSP semble "affaiblie". De plus, les constats apportés pour l'état des rétinoïdes chez les juvéniles et les adultes en 2013 tendent à se confirmer en 2014 avec des diminutions hépatiques en α -tocophérol, lycopène, DROH et DPAL, ainsi qu'en DROH plasmatique.

CONCLUSION

Bien que plusieurs facteurs soient mis en cause dans l'effondrement de la population de perchaude du LSP (e.g. exploitation de la ressource, qualité des masses d'eaux, espèces exotiques, hydrologie, etc.) (Magnan *et al.*, 2008), les apports importants en contaminants semblent bel et bien avoir été sous-estimés. Le LSP reçoit des décharges importantes en contaminants agricoles comparativement au LSL et au LSF, en plus de la pollution résiduelle de la ville de Montréal, des effluents des municipalités et des industries riveraines (La Violette, 2004). Plusieurs de ces contaminants sont connus pour perturber le système rédox (Livingstone, 2001) et le métabolisme des rétinoïdes (Boily *et al.*, 2009 ; Novak *et al.*, 2008), incluant plusieurs pesticides.

La présente étude visait donc à établir un lien entre l'état de santé de la perchaude et le gradient de contamination et de pression anthropique le long du fleuve Saint-Laurent, où le LSP correspond au site le plus perturbé, et ce, sur deux années d'échantillonnage consécutives. En se basant sur les paramètres morphométriques et sur des biomarqueurs impliqués dans le système rédox (TBARS, α -tocophérol et caroténoïdes) et des composés rétinoïdes comme outils diagnostiques, cette étude a permis d'apporter des éléments complémentaires aux études réalisées jusqu'à maintenant sur l'intégrité écosystémique et sur l'état populationnel des perchaudes du fleuve Saint-Laurent.

Bien que les paramètres morphométriques mesurés soient plus élevés au LSP qu'au LSF et LSL, les perchaudes adultes provenant de ce site sont caractérisées par des coefficients de Fulton moindre qu'aux sites en amont, témoignant d'une condition

physiologique affaiblie, comme en font foi les résultats d'analyse des biomarqueurs. Dans cette étude nous avons considéré les niveaux de TBARS comme biomarqueurs du stress oxydant (peroxydation des lipides) avec l' α -tocophérol et les caroténoïdes comme antioxydants non-enzymatiques impliqués dans la protection des lipides. Les concentrations en α -tocophérol se sont révélées moindres aux sites les plus impactés chez les larves et les adultes de 2013, ainsi que chez les adultes du LSP de 2014. Notre étude a également révélé que chez les perchaudes juvéniles et adultes, le lycopène pourrait jouer un rôle majeur comme antioxydant, et ce, tant en 2013 qu'en 2014. De façon analogue à l' α -tocophérol, les perchaudes juvéniles et adultes du LSP ont présenté de plus faibles valeurs en lycopène. Ces résultats suggèrent une mobilisation de l' α -tocophérol et du lycopène pouvant témoigner d'une augmentation du potentiel pro-oxydant chez les perchaudes du LSP. Toutefois, hormis chez les adultes capturés en 2013, les analyses de TBARS vont à l'encontre du gradient de pression anthropique, où la peroxydation des lipides s'avérait plus faible au LSP. Ces résultats nous indiquent en premier lieu, qu'il faut normaliser des valeurs de TBARS avec la mesure des triglycérides (Jentzsch *et al.*, 1996). Dans le futur, l'analyse complémentaire des antioxydants enzymatiques permettra une meilleure évaluation de l'état du système rédox. De plus, nous avons noté de faibles concentrations de caroténoïdes dans le foie des perchaudes, et ce, pour tous les sites. Ce stock « amoindri » par rapport à d'autres espèces (comme la barbotte par exemple) peut être dû i) à un stockage extra-hépatique plus important dans d'autres organes (e.g. rein, tissu adipeux, etc.) et ii) à une diète plus pauvre en caroténoïdes. Les rétinoïdes se sont avérés des biomarqueurs de prédilection dans cette étude. En 2013, pour les trois stades de développement (larves, juvéniles et adultes), non seulement avons-nous observé un amoindrissement des esters hépatiques suggérant une mobilisation de la réserve, mais également chez les adultes de 2014, dont ce constat s'accompagne d'une diminution du déshydrorétinol circulant et hépatique, suggérant alors une augmentation du catabolisme des rétinoïdes chez les perchaudes du LSP. Afin de pouvoir statuer sur les mécanismes impliqués, des analyses complémentaires devront

être effectuées sur les enzymes impliqués dans la conversion « esters ↔ ROH/DROH » (LRAT et HER) ainsi que sur la protéine de transport RBP.

Dans les études environnementales, beaucoup de facteurs peuvent moduler les réponses physiologiques, tels que les caractéristiques physicochimiques, la structure et la dynamique écosystémique du milieu. Bien que notre design expérimental mette de l'avant certains facteurs, comme la contamination de l'eau, il reste que des études *in vivo* en milieu contrôlé et *in vitro* spécifique à certaines conditions observées au LSP, permettraient de compléter les résultats obtenus *in situ*. Par exemple, par l'étude des effets d'extraits d'eau provenant du LSP, de certains contaminants ciblés ou de carences alimentaires, en microsomes, en cultures cellulaires ou chez des poissons captifs, il serait possible de spécifier les mécanismes impliqués dans les perturbations observées dans celle-ci. De plus, l'étude des larves et des juvéniles apporte son lot d'imprécisions. En effet, la croissance rapide de ces jeunes individus fait en sorte que les composantes physiologiques sont moins stables et que les contaminants présents dans l'organisme se diluent en fonction de l'accroissement des tissus, modulant ainsi les effets.

Dans une perspective de recherches futures, l'utilisation d'analyses statistiques multivariées permettant une intégration de plusieurs facteurs permettrait d'établir des relations plus étroites entre les paramètres physiologiques et biochimiques mesurés. En effet, certaines méthodes analytiques utilisés dans d'autres domaines de la biologie (e.g. écologie) optimisent l'interrelation des variables tout en minimisant l'erreur de type 1 susceptible de générer des modèles faussement significatifs (Motulsky, 2013). Par exemple, les équations structurelles (SEM, *structural equation modeling*) permettraient, par le biais de réseaux conceptuels, d'établir les relations directes et indirectes existant entre les paramètres et les biomarqueurs, et ce même pour des données issues d'études de terrain (McGarigal *et al.*, 2000).

Malgré les éléments considérés « limitants », cette étude a permis d'établir un lien entre un gradient de perturbation anthropique et les « réponses » physiologiques et biochimiques pour les deux années d'échantillonnage consécutives. Ces réponses ont été plus marquantes au LSP dont l'intégrité est fortement compromise par la contamination chimique et l'activité humaine. Les perchaudes de ce site se distinguent, entre autres, par un coefficient de condition affaibli, un potentiel pro-oxydant, et une altération des rétinoïdes. L'ensemble des résultats fait la démonstration de la vulnérabilité de la perchaude au LSP et l'intérêt de poursuivre l'étude de cette espèce avec les biomarqueurs du stress oxydant et des rétinoïdes. De plus, il serait plus que pertinent, considérant le caractère lipidique des biomarqueurs à l'étude, d'évaluer le métabolisme des lipides et explorer des composantes faisant partie du métabolisme énergétique de la perchaude.

ANNEXE A

TRANSFERT DE MÉTHODES: QUANTIFICATION DES CAROTÉNOÏDES, DES RÉTINOÏDES ET DE L'α-TOCOPHÉROL PAR CHROMATOGRAPHIE À ULTRAHAUTE PERFORMANCE (CLUHP)

A.1 Introduction

Dans le cadre du projet de recherche « Développement d'outils diagnostiques (biomarqueurs) pour les poissons exposés aux pesticides » en lien avec la problématique de la perchaude au lac Saint-Pierre, il était attendu que la méthode permettant de quantifier les caroténoïdes, les rétinoïdes et la vitamine E (α-tocophérol) dans le foie par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) soit adaptée à une méthode CLUHP, un système reconnu pour sa rapidité, sa sensibilité et sa haute résolution (Granado-Lorencio *et al.*, 2010). Les méthodes antérieurement basées sur Spear et Moon (1986) pour les rétinoïdes hépatiques, et sur Hedrei Helmer *et al.* (2014) pour les caroténoïdes hépatiques ont été revues. De même, pour les rétinoïdes plasmatiques, nous avons adapté la méthode de Bérubé *et al.* (2005) en se basant sur celle de Gauthier *et al.* (en rédaction).

Les détails concernant le système CLUHP utilisé sont présentés à la section 2.4.1, ainsi que pour les méthodes de quantification des caroténoïdes, des rétinoïdes et de l'α-tocophérol hépatique et plasmatique. Pour chacune des matrices biologiques à l'étude, la caractérisation des analytes et la stabilité des extraits dans le temps ont été vérifiées chez la barbotte (*Ameiurus nebulosus*) et la perchaude (*Perca flavescens*). En effet, ayant une grande disponibilité de tissus et de plasma de barbottes au

laboratoire, récupéré de précédents projets, le transfert de méthode a été effectué avec la barbotte afin d'établir les conditions initiales des analyses au CLUHP, puis elles ont été confirmées avec le surplus d'échantillons (limité) de perchaude de 2013.

A.2 Caractérisation : temps de rétention et courbes standard

Pour chaque analyte, les temps de rétention (min) ont été identifiés. Des chromatogrammes typiquement retrouvés pour le plasma de perchaude et pour le foie de barbotte sont présentés à la figure A.1 et à la figure A.2 respectivement. Les courbes standard ont été générées (aires sous la courbe, mAUC, milli area under the curve) par rapport à une quantité (ng) extraite du foie et du plasma (tableau A.1).

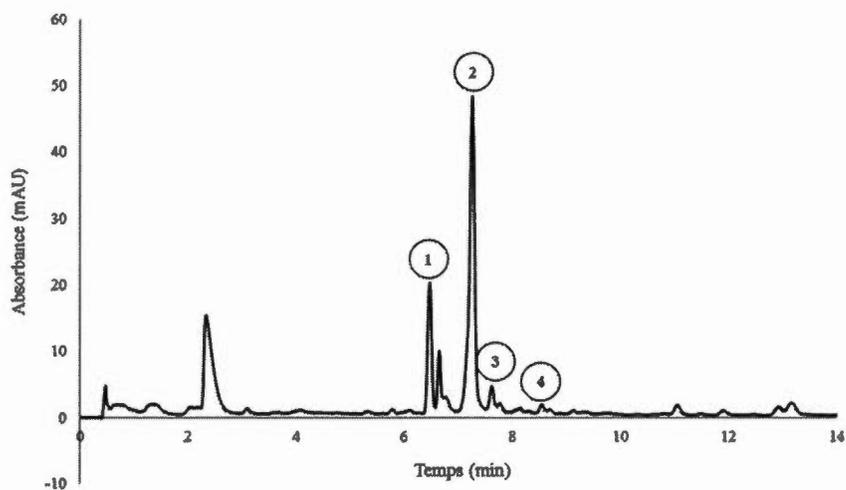


Figure A.1: Chromatogrammes réalisés par CLUHP à partir de plasma de perchaudes. Rétinoïdes : 1- déhydrorétinol; 2- 13-*cis* et 9-*cis* acides rétinoïques; 3- tout-*trans* acide rétinoïque et rétinol, 4- rétinaldéhyde.

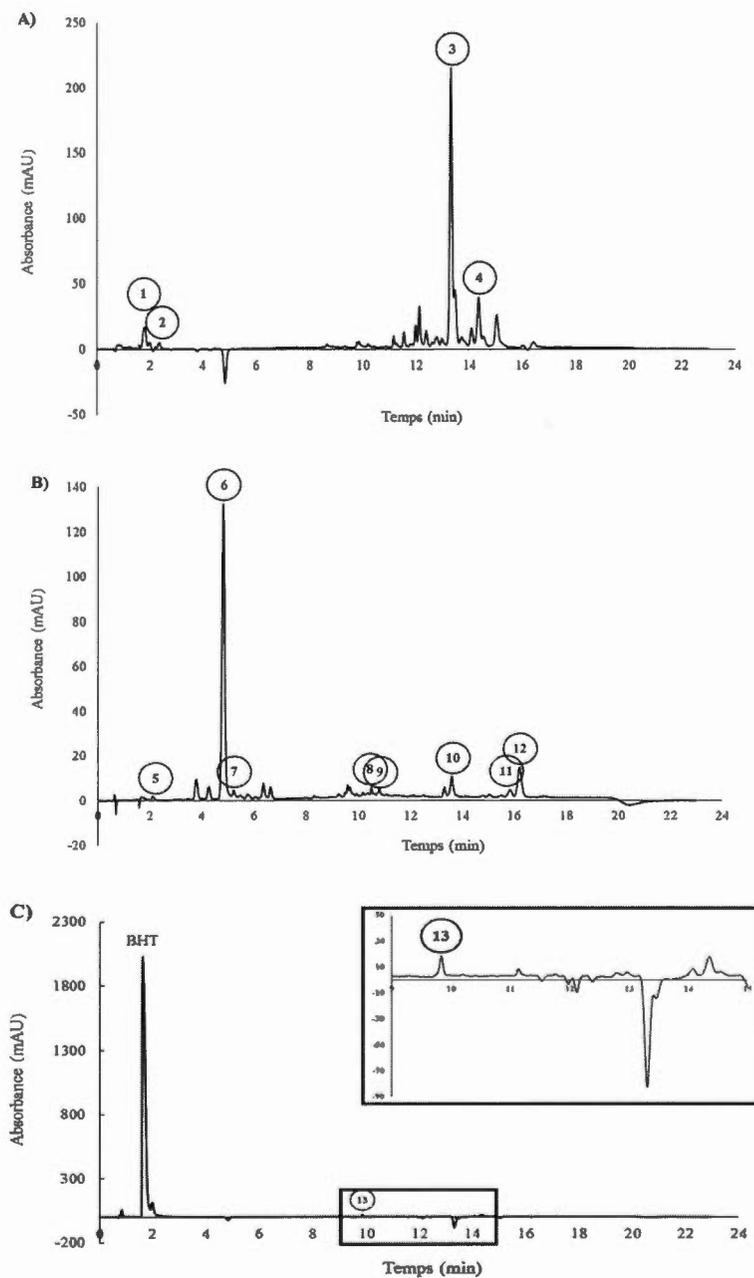


Figure A.2: Chromatogrammes réalisés sur le CLUHP à partir du foie de barbotte. (A) Rétinoïdes: 1-déhydrorétinol, 2-rétinol, 3-déhydropalmitate de rétinol, 4-palmitate de rétinol). (B) Caroténoïdes: 5-fucoxanthine, 6-diatoxanthine, 7-zéaxanthine et lutéine, 8- α -cryptoxanthine, 9- β -cryptoxanthine, 10-lycopène, 11- α -carotène, 12- β -carotène. (C) Alpha-tocophérol: 13- α -tocophérol).

Tableau A.1: Paramètres d'identification et de caractérisation des caroténoïdes, rétinoides et α -tocophérol mesurés dans le foie et le plasma de perchaude par CLUHP.

Tissu	Analytes	TR	Détection	Courbe Standard	R ²
Foie	déhydrorétinol	1,8	350/390	(voir rétinol)	—
	rétinol	2,3	325/390	aire(mAUC) = $(9,17 \times \text{Qté(ng)}) + 5,38$	0,9920
	déhydropalmitate	13,3	350/390	(voir palmitate)	—
	palmitate	14,4	325/390	aire(mAU) = $(12,70 \times \text{Qté(ng)}) + 8,21$	0,9993
	fucoxanthine	2,1	445/550	aire(mAU) = $(22,16 \times \text{Qté(ng)}) + 1,07$	0,9986
	diatoxanthine	4,8	445/550	aire(mAU) = $(30,15 \times \text{Qté(ng)}) - 4,90$	0,9993
	zéaxanthine	5,2	445/550	aire(mAU) = $(26,01 \times \text{Qté(ng)}) - 0,92$	0,9993
	lutéine	5,3	445/550	aire(mAU) = $(28,29 \times \text{Qté(ng)}) - 0,26$	0,9995
	α -cryptoxanthine	10,4	445/550	aire(mAU) = $(27,25 \times \text{Qté(ng)}) - 0,29$	0,9995
	β -cryptoxanthine	10,6	445/550	aire(mAU) = $(29,33 \times \text{Qté(ng)}) - 0,07$	0,9998
	lycopène	13,7	445/550	aire(mAU) = $(16,19 \times \text{Qté(ng)}) - 3,24$	0,9993
	α -carotène	15,3	445/550	aire(mAU) = $(30,96 \times \text{Qté(ng)}) - 1,85$	0,9996
	β -carotène	15,8	445/550	aire(mAU) = $(34,54 \times \text{Qté(ng)}) - 0,36$	0,9997
	α -tocophérol	9,9	292/390	aire(mAU) = $(34,44 \times \text{Qté(ng)}) - 27,89$	0,9996
	Plasma	déhydrorétinol	6,8	350/-	aire(mAU) = $(12,46 \times \text{Qté(ng)}) - 1,66$
13-cis acide rétinolique		7,2	350/-	aire(mAU) = $(13,23 \times \text{Qté(ng)}) + 1,54$	0,9997
9-cis acide rétinolique		7,4	350/-	(voir 13-cis acide rétinolique)	—
<i>all-trans</i> acide rétinolique		7,6	350/-	aire(mAU) = $(14,59 \times \text{Qté(ng)}) + 9,56$	0,9949
rétinol		7,6	325/-	(voir <i>all-trans</i> acide rétinolique)	—
rétinaldéhyde		8,6	380/-	aire(mAU) = $(16,30 \times \text{Qté(ng)}) + 1,67$	0,9893

— Indique qu'aucune mesure n'a été rapporté.

Détection (λ), Détection (nm)/Ref (nm).

TR indique le temps de rétention en minutes.

L'identification des analytes dans le foie de poisson s'est avérée relativement adéquate, sauf pour les isoformes (α et β) de la cryptoxanthine et du carotène. En effet, chez la perchaude, l'identification spécifique des isoformes n'est pas clairement définie. Pour cette raison, il était plus adéquat de regrouper les deux isomères (α et β) pour rapporter une valeur totale pour les cryptoxanthines et les carotènes. De plus, la co-élution de la zéaxanthine avec la lutéine nous a obligés à former le groupe « autres xanthophylles ». Pour le plasma de poisson, les mAUC des formes 9-*cis*-AR et 13-*cis*-AR ont été groupés, car pour certains échantillons, il était difficile de les intégrer de manière individuelle et bien distincte. De plus, l'AR tout-*trans* et le rétinol (ROH) co-éluent, obligeant alors à former un groupe « autres rétinoïdes ». En fait, il ne s'agit pas d'une réelle co-élution au même sens que celle observée pour la zéaxanthine et lutéine pour les caroténoïdes hépatiques, où les 2 standards sortent en même temps. Dans le cas du AR tout-*trans* et ROH, lorsque les 2 standards sont injectés en concentration équivalente, on obtient un pic à 2 têtes ou avec épaulement. Le problème se situe au niveau de la matrice biologique, où lorsque l'on injecte l'extrait, nous obtenons seulement 1 pic qui devient très laborieux d'identifier précisément s'il s'agit du AR tout-*trans* ou du ROH tout-*trans*. Ultérieurement, il sera pertinent de raffiner la méthode de détection afin d'optimiser la séparation des formes *cis*-AR, ainsi que de séparer la forme tout-*trans* AR du tout-*trans* ROH.

A.3 Stabilité des analytes dans le temps

En 2013, les analyses ont toujours été effectuées pour des extraits fraîchement préparés et injectés immédiatement dans le système CLHP, alors qu'avec le système CLUHP, muni d'un injecteur automatique (« auto-sampler »), plusieurs échantillons peuvent être préparés à l'avance. Il fallait toutefois vérifier la stabilité des analytes en fonction du temps. Pour ce faire nous avons procédé à 4 à 6 injections consécutives d'un même extrait (foie ou de plasma de barbotte) et nous avons comparé les mAUC en relation avec le temps. Les résultats obtenus sont présentés au tableau A.2.

Tableau A.2: Moyenne \pm écart-type des aires sous la courbe (mAUC) mesurées dans le temps pour 1 à 3 extractions de foie de barbotte pour des séquences de 4 à 6 injections consécutives.

Matrice biologique	Analytes	Barbottes						
		#1		#2		#3		
		Moyenne \pm SD (mAUC)	CV (%)	Moyenne \pm SD (mAUC)	CV (%)	Moyenne \pm SD (mAUC)	CV (%)	
Foie	Déhydrorétinol	366,20 \pm 7,90	2,16	667,35 \pm 5,92	0,89	361,67 \pm 4,86	1,34	
	Rétinol	19,38 \pm 0,40	2,08	79,10 \pm 5,22	6,60	23,00 \pm 0,30	1,29	
	Déhydroplimitate	2311,28 \pm 24,87	1,08	3701,77 \pm 43,60	1,18	3797,35 \pm 5,82	0,15	
	Palmitate	319,53 \pm 6,76	2,12	327,98 \pm 5,24	1,60	409,33 \pm 2,90	0,71	
	Fucoanthine	11,00 \pm 0,39	3,35	12,05 \pm 0,32	2,66	4,02 \pm 0,10	2,45	
	Diatoxanthine	12,30 \pm 1,94	15,75	68,32 \pm 13,97	20,45	11,35 \pm 0,15	1,34	
	Zéaxanthine	-	-	-	-	-	-	
	Lutéine	12,60 \pm 3,90	30,96	69,90 \pm 35,86	51,30	6,42 \pm 0,30	4,67	
	α -cryptoxanthine	-	-	-	-	-	-	
	β -cryptoxanthine	-	-	-	-	-	-	
	Lycopène	-	-	-	-	-	-	
	α -carotène	-	-	-	-	-	-	
	β -carotène	8,50 \pm 2,01	23,61	4,05 \pm 1,36	33,67	6,20 \pm 0,43	6,99	
	α -tocophérol	31,70 \pm 0,59	1,86	112,42 \pm 8,02	7,13	40,65 \pm 0,48	0,97	
	Plasma	Déhydrorétinol	484,34 \pm 3,46	0,72	-	-	-	-
		13- <i>cis</i> acide rétinolique	-	-	-	-	-	-
9- <i>cis</i> acide rétinolique		-	-	-	-	-	-	
all- <i>trans</i> acide rétinolique		-	-	-	-	-	-	
Rétinol		-	-	-	-	-	-	
Rétinaldéhyde		-	-	-	-	-	-	

— Indique qu'aucune mesure n'a été rapporté.

CV indique le coefficient de variation en pourcentage (%).

Globalement, les composés ont démontré une stabilité adéquate dans le temps, mais pour limiter la dégradation des échantillons, nous avons limité les injections à 4 pour les analyses de foie et à 2 pour celles du plasma.

A.4 Conclusion et perspectives

L'adaptation au CLUHP comporte de nombreux avantages. Dans un premier temps, pour un seul système les caroténoïdes, rétinoïdes et l' α -tocphérol peuvent être simultanément détectés et quantifiés. De plus, le temps d'analyse pour une injection a diminué de 12 minutes pour la méthode du foie passant de 35 min à 23 min, alors que pour celle du plasma on est resté au même temps, soit 25 min l'analyse, mais l'adaptation pourrait ultérieurement facilement être diminuée à 18 min. L'auto-injecteur permet d'optimiser le temps consacré aux analyses optimisant ainsi le rendement. Le détecteur DAD (diode array detection) permet une quantification optimisée par l'utilisation de plusieurs longueurs d'onde (λ) pour une même injection, ce que nous n'avions pas dans le système de chromatographie utilisé en 2013. Cela nous permet ainsi de cibler des longueurs d'onde spécifiques aux analytes d'intérêt, tel qu'utilisé dans la méthode pour les rétinoïdes plasmatiques, où 3 longueurs d'onde ont pu être utilisées en parallèle, soit 325 nm pour le rétinol, 350 nm pour le déhydrorétinol et les acides rétinoïques, ainsi qu'à 380 nm pour le rétinaldéhyde. En conclusion, les objectifs fixés pour adapter les méthodes d'extraction, de détection et de quantification des caroténoïdes, rétinoïdes et de l' α -tocphérol ont été atteints. Toutefois, plusieurs éléments restent à confirmer, dont les co-élutions pour certains composés. Plusieurs possibilités peuvent permettre une meilleure séparation, telle que l'utilisation d'une colonne analytique de type Poroshell 120 EC-C18 (Agilent Technologies, Toronto, ON, Canada) dont cette nouvelle technologie de colonne au « cœur plein » permet d'optimiser la séparation des composés sans augmenter la pression (Agilent Technologies, 2011). Néanmoins, il reste encore beaucoup de mise au point à faire au niveau des phases mobiles utilisées et de l'efficacité des méthodes d'extractions.

ANNEXE B

ADAPTATION DE MÉTHODE: DOSAGE DES SUBSTANCES RÉAGISSANTS À L'ACIDE THIOBARBITURIQUE (TBARS) EN MICROPLAQUE

B.1 Introduction

Dans le cadre du projet de recherche « Développement d'outils diagnostiques (biomarqueurs) pour les poissons exposés aux pesticides » en lien avec la problématique de la perchaude (*Perca flavescens*) au LSP la méthode d'évaluation de la peroxydation des lipides (TBARS) a été adaptée en microplaque. La méthode décrite par Hedrei Helmer *et al.* (2014) mise au point dans notre laboratoire a largement été utilisée pour divers organismes, notamment l'abeille domestique (*Apis mellifera*), le ouaouaron (*Lithobates catesbeianus*), la barbotte (*Ameiurus nebulosus*), la perchaude (*Percas flavescens*), et, depuis peu, pour les larves de perchaudes. À partir de cette méthode et avec la méthode de Camejo *et al.* (1998), une autre méthode a été mise au point permettant de minimiser le volume d'homogénat à utiliser et conséquemment optimiser le tissu prélevé.

Les détails relatifs à la méthode d'évaluation de la peroxydation des lipides mise au point pour des homogénats de tissu (muscle ou foie) de poisson sont présentés à la section 2.4.2. La caractérisation de la méthode de dosage des TBARS en microplaque, le pourcentage de récupération, ainsi que la comparaison des résultats obtenus avec la méthode adaptée versus ceux obtenus avec la méthode antérieure ont été vérifiées pour la barbotte et la perchaude.

B.2 Caractérisation de la méthode de dosage des TBARS en microplaque

La caractérisation de la relation entre l'absorbance (D.O) et la quantité de TBARS par puits s'est avérée particulièrement stable d'une analyse à l'autre avec une forte linéarité ($R^2 \geq 0.99$) (tableau B.1). La relation est toutefois assujettie à des facteurs d'influences, tels qu'une légère variation du temps d'incubation ou d'une variation de la température lors de l'incubation considérant l'incertitude relative à la plaque chauffante utilisée. Le coefficient de variation de 24,1% pour la constante (ordonnée à l'origine) et de 12,3% pour la pente témoignent de ces influences (tableau B.1). Ultérieurement, il sera possible d'utiliser un four à convection, tel que suggéré par Camejo *et al.* (1998) pour stabiliser la température. Il restera toutefois indispensable d'effectuer une courbe standard pour chacune des plaques.

Tableau B.1: Paramètres de régression spécifiques à la courbe standard de TTMP pour la méthode de dosage TBARS en microplaque.

	Constante (b)	Pente (m)	R ²
Courbe #1	0,0125	0,379	0,99976
Courbe #2	0,0204	0,468	0,99995
Courbe #3	0,0122	0,347	0,99985
Courbe #4	0,0126	0,371	0,99900
Courbe #5	0,0140	0,363	0,99942
Moyenne	0,0143 ± 0,003	0,386 ± 0,048	0,9996 ± 0,0004

Y Mesure de l'absorbance à 530 nm corrigée par celle obtenue à 650 nm (D.O corrigée).

X Quantité de TTMP (tétraméthoxypropane) en nmole par puits.

B.3 Pourcentage de récupération

La figure B.1 présente les pourcentages de récupération associés aux différentes étapes de la méthode. Nous avons donc effectué différentes versions du protocole suggéré dans la section méthodologie (section 2.4.2). Le dosage des TBARS a été parallèlement effectué selon la méthode brute décrite par Camejo *et al.* (1998), suivi de celle supplémentée d'une étape de pré-centrifugation à $4\ 000 \times g$, et en incluant l'étape de purification décrite par Peterson (1977). Le pourcentage de récupération (100,05%), ainsi que la linéarité ($R^2 = 0,9998$) de la méthode hybride mise au point se sont avérés excellents pour l'analyse des TBARS dans le muscle de perchaude (figure

B.1). La méthode brute proposée par Camejo *et al.* (1998) a donné de moins bons résultats à ce niveau (figure B.1). La linéarité s'est avérée passable ($R^2 = 0,9767$) et le pourcentage de récupération était relativement faible (75,0%). Seulement avec l'ajout d'une pré-centrifugation à $4000 \times g$, il y a une petite amélioration de la linéarité ($R^2 = 0,9799$), mais un meilleur pourcentage de récupération (97,1%) (figure B.1). Il est toutefois probable que ces améliorations soient attribuables à la diminution de la turbidité. Il semble que la turbidité interfère lors de la lecture d'absorbance.

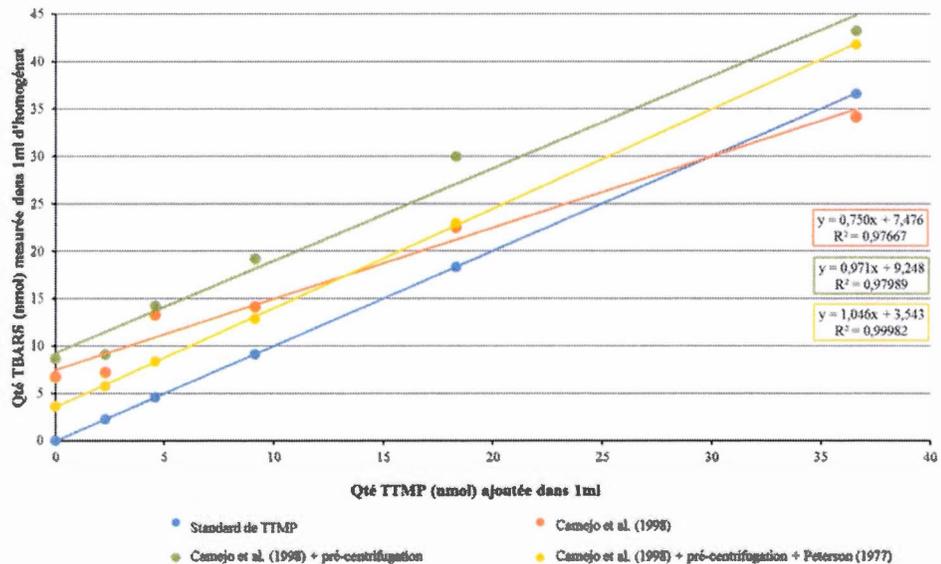


Figure B.1: Représentation graphique du pourcentage de récupération associé aux différentes étapes de la méthode de dosage des TBARS en microplaque dans le muscle de perchaude. Dosage des TBARS effectué (orange) avec la méthode décrite dans Camejo *et al.* (1998); (vert) additionnée d'une pré-centrifugation de $4000 \times g$ de l'homogénat; (jaune) additionnée d'une pré-centrifugation de $4000 \times g$ et d'une purification basée sur Peterson (1977). La courbe étalon de TTMP est représentée en bleu.

Lorsque l'homogénat est directement utilisé pour doser les TBARS, tel que proposé par Camejo et al. (1998), la turbidité de l'échantillon est particulièrement élevée par rapport au standard de TTMP (figure B.2-A). Avec la pré-centrifugation, permettant de précipiter les débris tissulaires, on observe une diminution de la turbidité, et parallèlement une atténuation de son effet sur la mesure de la réaction TBARS-2TBA. Avec une étape de purification telle que décrite par Peterson (1977), la turbidité obtenue est semblable à celle retrouvée pour la courbe standard de TTMP (figure B.2-B). De plus, l'utilisation de tels éléments méthodologiques devient d'autant plus pertinente lorsque l'évaluation des TBARS s'effectue pour les tissus hépatiques ayant déjà une coloration rougeâtre et donc une absorbance basale plus grande que le blanc et le standard à 530 nm.

B.4 Comparaison avec la méthode antérieure et avec la littérature

La figure B.3 présente les résultats de TBARS mesurés dans le muscle de perchaude, ainsi que dans le foie de barbotte selon différentes normalisations retrouvées dans la littérature, soit par g de tissu (figure B.3-A) et par mg de protéines (figure B.3-B), et ce, dépendamment de la méthode de dosage. Dans le muscle, on n'observe aucune différence significative entre la méthode adaptée et celle précédemment utilisée, et ce, tant avec la normalisation par g de tissu ($|t| = 0,377$; $p = 0,712$) que par mg de protéine ($|t| = 0,503$; $p = 0,623$). Alors que dans le cas du foie, pour un même homogénat on obtient une différence significative, et ce, tant avec la normalisation par g de tissu hépatique ($|t| = 13,42$; $p \leq 0,001$) que par mg de protéine ($|t| = -12,82$; $p \leq 0,001$).

On observe que la méthode en microplaque est comparable à ce qui est retrouvé dans la littérature en termes de TBARS par g de tissu, alors que celle d'Hedrei Helmer l'est davantage en termes de TBARS rapporté par mg de protéine (voir tableau B.2). Comme la plupart de nos paramètres sont rapportés par g de tissu, la méthode en microplaque s'avère appropriée.

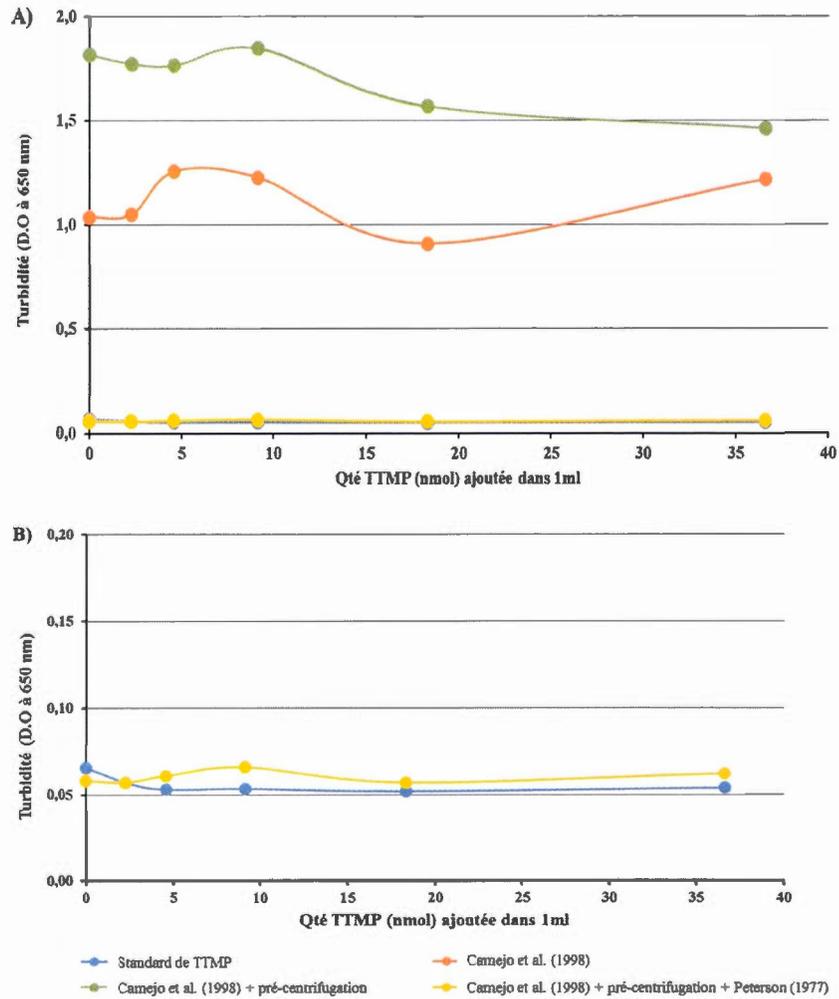


Figure B.2: Mesure de la turbidité associée aux différentes étapes de la méthode de dosage des TBARS en micropaque dans un échantillon de muscle de perchaude. Dosage des TBARS effectué (orange) selon la méthode décrite dans Camejo et al. (1998); (vert) additionnée d'une pré-centrifugation de $4000 \times g$ de l'homogénat; (jaune) additionnée d'une pré-centrifugation de $4000 \times g$ et d'une purification basée sur Peterson (1977). La courbe étalon de TTMP est représentée en bleu. Pour (A) l'ensemble des essais avec le standard et (B) entre l'adaptation finale et le standard uniquement.

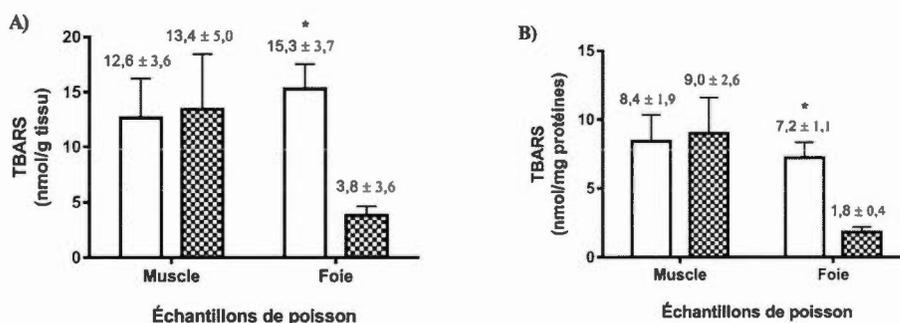


Figure B.3: Évaluation de la peroxydation des lipides par dosage des TBARS dans le muscle de perchaude et le foie de barbotte selon la méthode en microplaque adaptée de Camejo *et al.* (1998) (histogrammes clairs) versus celle d'écrite par Hedrei Helmer *et al.* (2015) (histogrammes hachurés). Mesure des TBARS rapporté par (A) g de tissu et par (B) mg de protéine. Les niveaux en TBARS ont été comparés entre les méthodes de dosage par test "t" de Student ($\alpha = 0,05$).

Tableau B.2: Peroxydation des lipides publiée pour différents tissus et différentes espèces de poissons.

Espèces	Tissu	Niveaux LPO	Références (sources)
Loquette d'Europe (<i>Zoarces viviparus</i>)	Foie	~ 20-100 nmol/g tissu	Almroth <i>et al.</i> (2005)
Meunier noir (<i>Catostomus commersoni</i>)	Foie	223-272 nmol/g tissu	Oakes et Van Der Kraak (2003)
	Gonade	~ 25 nmol/g tissu	
Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Foie	~ 0,21-0,35 mg/mg protéines	Tocher <i>et al.</i> (2002)
Flétan (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>)	Foie	~ 0,49-6,47 mg/mg protéines	Madeira <i>et al.</i> (2016)
Daurade royale (<i>Sparus aurata</i>)	Foie	~ 1,01-1,56 mg/mg protéines	
	Foie	~ 0,05-0,20 nmol/mg protéines	
	Branchie	~ 0,18-0,35 nmol/mg protéines	
	Muscle	~ 0,01-0,10 nmol/mg protéines	
	Intestin	~ 0,01-0,22 nmol/mg protéines	
	Cerveau	~ 0,01-0,05 nmol/mg protéines	

B.5 Conclusion et perspectives

À partir de la méthode de dosage des TBARS de Camejo *et al.* (1998) et de celle de Hedrei Helmer *et al.* (2014), il a été possible d'adapter une méthode de dosage des TBARS en microplaque de façon à optimiser le nombre d'échantillons (soit doublé) par analyse et la quantité d'homogénat nécessaire tout en minimisant l'influence de la turbidité sur les résultats. Cette adaptation était tout indiquée pour l'évaluation de la peroxydation des lipides des échantillons de tissu (muscle et foie) prélevés chez les perchaudes de 2014.

ANNEXE C

TABLEAUX DE CORRÉLATION DE LA CAMPAGNE DE 2014

Tableau C.1: Corrélations entre les valeurs de TBARS (muscle et foie) et d' α -tocophérol (foie) mesurées chez les perchaudées adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression croissant.

Biomarqueur X	Biomarqueur Y	Sites							
		LSF		LSL		LSP-N		LSP-S	
		rho	p-value	rho	p-value	rho	p-value	rho	p-value
TBARS(foie)	TBARS(muscle)	0,368	0,240	-0,268	0,281	-0,186	0,343	0,164	0,404
α -tocophérol	TBARS(muscle)	0,027	0,922	-0,320	0,079	-0,298	0,117	0,026	0,894
	TBARS(foie)	-0,762	0,004*	-0,090	0,723	0,317	0,100	0,120	0,535

Les corrélations ont été testées avec le test non paramétrique du rho (ρ) de Spearman ($\alpha_{\text{cor}} = 0,02$).

* Indique une corrélation significative.

Tableau C.2: Corrélations entre les valeurs en caroténoïdes hépatiques mesurées chez les perchaudes adultes capturées en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression croissant.

	Sites								
	LSF		LSL		LSP-N		LSP-S		
Caroténoïdes X	Caroténoïdes Y	rho	p-value	rho	p-value	rho	p-value	rho	p-value
Diatoxanthine	Fucoxanthine	0,139	0,700	0,053	0,809	-0,143	0,736	-0,393	0,383
Autres xantho.	Fucoxanthine	0,771	0,072	0,461	0,063	-0,050	0,872	0,083	0,750
	Diatoxanthine	0,200	0,800	0,028	0,923	0,127	0,726	0,903	≤ 0,001*
	Cryptoxanthines	-	-	-	-	-	-	-	-
Lycopène	Fucoxanthine	0,146	0,603	0,664	≤ 0,001*	0,716	≤ 0,001*	0,248	0,338
	Diatoxanthine	-0,254	0,450	0,058	0,781	-0,119	0,713	-0,391	0,235
	Autres xantho.	0,286	0,535	0,560	0,013	-0,014	0,955	0,218	0,284
	Cryptoxanthines	-	-	-	-	-	-	-	-
α et β Carotène	Fucoxanthine	-0,567	0,111	0,436	0,104	0,355	0,285	-	-
	Diatoxanthine	0,543	0,266	-0,033	0,915	0,321	0,482	-	-
	Autres xantho.	-0,600	0,285	0,467	0,174	0,679	0,094	-0,800	0,200
	Cryptoxanthines	-	-	-	-	-	-	-	-
	Lycopène	-0,667	0,050	0,512	0,043	0,148	0,629	0,300	0,624

- Indique qu'aucun résultat n'a pas été rapporté.

Les corrélations ont été testées avec le test non paramétrique du rho (ρ) de Spearman ($\alpha_{\text{corr}} = 0,005$).

* Indique une corrélation significative.

Tableau C.3: Corrélations entre les valeurs en caroténoïdes hépatiques et celles des biomarqueurs du systèmes rédox (TBARS et α -tocophérol) mesurés chez les perchaudes adultes capturés en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression croissant.

Biomarqueur X	Biomarqueur Y	Sites							
		LSF		LSL		LSP-N		LSP-S	
		rho	p-value	rho	p-value	rho	p-value	rho	p-value
Fucoxanthine	TBARS(muscle)	-0,114	0,685	0,001	0,996	0,177	0,483	-0,123	0,639
	TBARS(foie)	-0,064	0,853	0,395	0,235	0,153	0,545	-0,102	0,694
	α -tocophérol	-0,064	0,820	0,169	0,391	0,112	0,660	0,381	0,131
Diatoxanthine	TBARS(muscle)	-0,619	0,043	-0,060	0,776	-0,063	0,846	-0,050	0,117
	TBARS(foie)	-0,333	0,420	0,251	0,514	0,136	0,689	0,018	0,958
	α -tocophérol	-0,082	0,811	0,005	0,986	0,288	0,366	-0,027	0,936
Autres auxtho.	TBARS(muscle)	-0,180	0,699	0,074	0,764	-0,168	0,505	-0,002	0,993
	TBARS(foie)	-0,300	0,624	-0,182	0,593	0,172	0,510	0,092	0,661
	α -tocophérol	-0,342	0,452	0,082	0,737	-0,065	0,798	0,384	0,053
Lycopène	TBARS(muscle)	-0,316	0,232	-0,195	0,291	0,083	0,675	0,167	0,405
	TBARS(foie)	-0,252	0,430	0,034	0,893	0,111	0,582	0,082	0,685
	α -tocophérol	0,297	0,263	0,219	0,235	0,555	0,002*	0,645	$\leq 0,001^*$
Carotènes	TBARS(muscle)	-0,067	0,865	0,322	0,225	0,352	0,239	0,700	0,188
	TBARS(foie)	0,829	0,042	-0,300	0,624	-0,044	0,887	-0,400	0,504
	α -tocophérol	-0,234	0,544	-0,185	0,492	0,044	0,887	0,100	0,873

– Indique qu'aucun résultat n'a pas été rapporté.

Aucune valeur relative aux cryptoxanthines n'a été rapporté.

Les corrélations ont été testées avec le test non paramétrique du rho (ρ) de Spearman ($\alpha_{\text{corr}} = 0,003$).

* Indique une corrélation significative.

Tableau C.4: Corrélations entre les valeurs en caroténoïdes (foie) et en rétinolides (foie et plasma) mesurés chez les perchaudes adultes capturés en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression croissant.

Caroténoïdes X	Sites		LSF		LSL		LSP-N		LSP-S	
	Rétinoïdes Y		rho	p-value	rho	p-value	rho	p-value	rho	p-value
Fucoxanthine	DROH(plasma)		-0,210	0,513	-0,288	0,153	-0,173	0,571	0,343	0,211
	DROH(foie)		0,414	0,125	0,853	≤ 0,001*	0,599	0,009	0,002	0,993
	DPAL(foie)		0,021	0,940	0,581	≤ 0,001*	0,734	≤ 0,001*	0,150	0,567
	ROH(foie)		0,037	0,899	0,622	≤ 0,001*	0,408	0,117	0,121	0,656
	PAL(foie)		-0,071	0,800	0,667	≤ 0,001*	0,401	0,111	0,520	0,033
Diatoxanthine	DROH(plasma)		-0,533	0,139	-0,493	0,020	-0,217	0,576	-	-
	DROH(foie)		-0,327	0,326	0,048	0,821	-0,322	0,308	-0,227	0,502
	DPAL(foie)		-0,255	0,450	0,110	0,600	-0,098	0,762	-0,209	0,537
	ROH(foie)		-0,167	0,668	0,035	0,880	-0,064	0,852	-0,209	0,589
	PAL(foie)		0,191	0,574	0,005	0,983	-0,336	0,312	-0,200	0,580
Autres xantho.	DROH(plasma)		-0,700	0,188	0,035	0,897	-0,175	0,533	0,185	0,435
	DROH(foie)		0,429	0,337	0,265	0,280	-0,117	0,645	0,071	0,731
	DPAL(foie)		0,286	0,535	0,528	0,020	-0,034	0,893	0,081	0,694
	ROH(foie)		-0,600	0,285	0,294	0,252	0,173	0,537	0,221	0,310
	PAL(foie)		-0,357	0,432	0,419	0,074	0,165	0,542	0,135	0,521
Lycopène	DROH(plasma)		-0,379	0,201	-0,146	0,457	-0,029	0,902	-0,354	0,106
	DROH(foie)		0,468	0,068	-0,033	0,915	0,894	≤ 0,001*	0,885	≤ 0,001*
	DPAL(foie)		0,941	≤ 0,001*	0,804	≤ 0,001*	0,991	≤ 0,001*	0,951	≤ 0,001*
	ROH(foie)		0,297	0,303	0,970	≤ 0,001*	0,727	≤ 0,001*	0,444	0,030
	PAL(foie)		0,662	0,005	0,902	≤ 0,001*	0,787	≤ 0,001*	0,651	≤ 0,001*
Carotènes	DROH(plasma)		0,071	0,879	-0,112	0,703	-0,350	0,356	-	-
	DROH(foie)		-0,183	0,637	0,344	0,192	0,476	0,118	0,400	0,505
	DPAL(foie)		-0,667	0,050	0,603	0,013	0,099	0,747	0,300	0,624
	ROH(foie)		0,100	0,798	0,344	0,192	0,413	0,183	-	-
	PAL(foie)		0,017	0,966	0,593	0,015	0,279	0,379	0,800	0,200

- Indique qu'aucun résultat n'a pas été rapporté.

Aucune valeur relative aux cryptoxanthines n'a été rapporté.

DROH, déhydrorétinol; DPAL, palmitate de déhydrorétinol; ROH, rétinol; PAL, palmitate de rétinol.

Les corrélations ont été testées avec le test non paramétrique du rho (ρ) de Spearman ($\alpha_{\text{cor}} = 0,002$).

* Indique une corrélation significative.

Tableau C.5: Corrélations entre les valeurs en rétinoides et celles des biomarqueurs du système rédox (TBARS et α -tocophérol) mesurés chez les perchaudes adultes capturés en 2014 le long du fleuve Saint-Laurent suivant un gradient de pression croissant.

Biomarqueur X	Biomarqueur Y	Sites							
		LSF		LSL		LSP-N		LSP-S	
		rho	p-value	rho	p-value	rho	p-value	rho	p-value
TBARS(foie)	DROL(plasma)	0,100	0,798	-0,099	0,704	-0,112	0,627	0,038	0,861
α -tocophérol(foie)	DROL(plasma)	0,033	0,915	-0,124	0,529	-0,185	0,408	-0,188	0,379
DROL(foie)	TBARS(muscle)	-0,381	0,145	-0,202	0,275	-0,004	0,982	0,247	0,205
	TBARS(foie)	-0,175	0,587	0,383	0,117	0,050	0,804	0,188	0,337
	α -tocophérol	-0,097	0,720	0,180	0,332	0,429	0,023	0,650	$\leq 0,001^*$
DPAL(foie)	TBARS(muscle)	-0,419	0,106	0,218	0,238	0,013	0,947	0,222	0,256
	TBARS(foie)	-0,217	0,499	0,193	0,443	0,585	$\leq 0,001^*$	0,143	0,465
	α -tocophérol	-0,259	0,333	0,215	0,247	0,907	$\leq 0,001^*$	0,659	$\leq 0,001^*$
ROL(foie)	TBARS(muscle)	-0,240	0,409	-0,171	0,403	-0,226	0,312	0,156	0,479
	TBARS(foie)	-0,576	0,082	0,560	0,046	-0,170	0,463	-0,235	0,280
	α -tocophérol	0,376	0,185	0,307	0,128	0,075	0,740	0,586	0,002*
PAL(foie)	TBARS(muscle)	-0,433	0,094	-0,160	0,390	-0,072	0,744	0,018	0,930
	TBARS(foie)	-0,259	0,417	0,396	0,103	0,039	0,863	0,025	0,901
	α -tocophérol	0,268	0,316	0,197	0,289	0,213	0,328	0,766	$\leq 0,001^*$

– Indique qu'aucun résultat n'a pas été rapporté.

DROL, déhydrorétinol; DPAL, palmitate de déhydrorétinol; ROH, rétinol; PAL, palmitate de rétinol.

Les corrélations ont été testées avec le test non paramétrique du rho (ρ) de Spearman ($\alpha_{cor} = 0,004$).

* Indique une corrélation significative.

Tableau C.6: Corrélations entre l'indice de condition de Fulton (K) et les biomarqueurs chez les perchaudes adultes capturées en 2014 dans le fleuve Saint-Laurent.

Indice de condition	Biomarqueurs	rho	<i>p-value</i>
Fulton (K)	TBARS (muscle)	-0,029	0,768
	TBARS (foie)	0,058	0,599
	α -tocophérol	0,151	0,126
	Fucoxanthine	—	—
	Diatoxanthine	—	—
	Lutéine et zéaxanthine	—	—
	(α et β) Cryptoxanthines	—	—
	Lycopène	—	—
	(α et β) Carotènes	—	—
	DROH (foie)	-0,010	0,922
	DPAH	0,181	0,067
	ROH (foie)	-0,018	0,871
	PAH	0,014	0,889
	DROH (plasma)	0,449	$\leq 0,001$ *

DROH, déhydrorétinol; DPAL, palmitate de déhydrorétinol; ROH, rétinol; PAL, palmitate de rétinol.

– Indique qu'aucun résultat n'a pas été rapporté.

Les corrélations ont été testées pour l'ensemble de l'échantillonnage avec le test non paramétrique du rho (ρ) de Spearman ($\alpha_{\text{corr}} \leq 0,001$).

* Indique une corrélation significative.

RÉFÉRENCES

- Agilent Technologies (2011). Transfer of Methods between Poroshell 120 EC-C18 and ZORBAX- Technical Overview. 5990-6588EN, 14 p.
- Almroth, B.C., Sturve, J., Berglund, A et Forlin, L. (2005). Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 73, 171-180.
- Alsop, D., Hewitt, M., Kohli, M., Brown, S. et Van Der Kraak, G. (2003). Constituents within pulp mill effluent deplete retinoid stores in white sucker and bind to rainbow trout retinoic acid receptors and retinoid X receptors. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 22(12), 2969-2976.
- Alsop, D., Matsumoto, J., Brown, S. et Van Der Kraak, G. (2008). Retinoid requirements in the reproduction of zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 156(1), 51-62.
- Alsop, D., Van Der Kraak, G. J., Brown, S. B. et Eales, J. G. (2005). The biology and toxicology of retinoids in fish. Dans: Mommsen, T.P. et Moon, T.W. (Eds), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 6, Elsevier B.V., Ville inconnue, 413-428.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. et Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 7915-7922.
- Arcand-Hoy, L. D. et Metcalfe, C. D. (1999). Biomarkers of exposure of Brown Bullheads (*Ameiurus nebulosus*) to contaminants in the Lower Great Lakes, North America. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(4), 740-749.
- Baker, R. T. M., Handy, R. D., Davies, S. J. et Snooka, J. C. (1998). Chronic Dietary Exposure to Copper Affects Growth , Tissue Lipid Peroxidation , and Metal Composition of the Grey Mullet, *Chelon labrosus*. *Marine Environmental Research*, 45(4/5), 357-365.
- Barnham, C. et Baxter, A. (March 1998). Condition factor, for salmonid fish. *Fisheries Notes*, ISSN 1440-2254, 3p.

- Bendich, a et Olson, J. a. (1989). Biological actions of carotenoids. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 3(8), 1927-1932.
- Bernatchez, L. et Giroux, M., 2000. *Les poissons d'eau douce du Québec et leur répartition dans l'est du Canada*. Broquet (Éds), Ottawa, 350p. ISBN: 2-89000-493-7.
- Bertolo, A., Blanchet, F. G., Magnan, P., Brodeur, P., Mingelbier, M. et Legendre, P. (2012). Inferring processes from spatial patterns: the role of directional and non-directional forces in shaping fish larvae distribution in a freshwater lake system. *PLoS ONE*, 7(11), e50239.
- Bérubé, V. E., Boily, M. H., DeBlois, C., Dassylva, N. et Spear, P. A. (2005). Plasma retinoid profile in bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural intensity of sub-watersheds in the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada. *Aquatic Toxicology*, 71(2), 109-120.
- Boily, M., Bisson, M. et Spear, P.A. (2004) Rétinoïdes : Biomarqueurs et base moléculaire d'effets de substances toxiques. Dans Pelletier, E., Cambell, P.G.C. et Denizeau, F. (Éd). *Écotoxicologie Moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développements*. Presses de l'Université du Québec, Sainte-Foy, 197-256
- Boily, M., Thibodeau, J. et Bisson, M. (2009). Retinoid metabolism (LRAT, REH) in the liver and plasma retinoids of bullfrog, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural contamination. *Aquatic Toxicology*, 91(2), 118-125.
- Brigelius-Flohe, R. et Traber, M. G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(10), 1145-1155.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(15), 1551-1558.
- Brown, T.G., Runciman, B., Bradford, M.J., and Pollard, S. (2009). A biological synopsis of yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2883, v + 28 p.
- Burton, G. W. (1994). Vitamin E: molecular and biological function. *Proceedings of nutrition Society*, 53(1), 251-262.

- Camejo, G., Wallin, B. and Enojärvi, M. (1998) Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. Dans: Armstrong, D. (Ed.), *Free radical and antioxidant protocols. Methods in Molecular Biology*, 108, Humana Press Inc., Totawa, NJ, 377-386.
- Cillard, J. et Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides*, 13(1), 24-29.
- Combs, G.F., (2012a). Vitamin E. Dans: Combs, G.F. (Ed), *The vitamins*. Elsevier, Academic Press, London, 181-211.
- Combs, G.F., (2012b). Quasi-Vitamins. Dans: Combs, G.F. (Ed), *The vitamins*. Elsevier, Academic Press, London, 395-433.
- Combs, G.F., (2012c). Vitamin A. Dans: Combs, G.F. (Ed), *The vitamins*. Elsevier, Academic Press, London, 93-137.
- Comité de concertation Suivi de l'état du Saint-Laurent (2008). Portrait global de l'état du Saint-Laurent 2008 : Eau, Sédiments, Rives, Ressources Biologiques et Usages. *Plan Saint-Laurent. Environnement Canada, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec, Pêche et Océans Canada et Stratégies Saint-Laurent*, 28p.
- Compte-rendu de l'atelier d'échanges sur l'intégrité écosystémique du lac Saint-pierre (Septembre 2015) *Dans le cadre du Plan d'action Saint-Laurent, UQTR, 24 mars 2015*, Animé par Burton, J., et Organisé par Hébert, S., Hudon, C., Villeneuve, S. et Gascon, É., 18p.
- Couture, P. et Rajotte, J. W. (2003). Morphometric and metabolic indicators of metal stress in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from Sudbury, Ontario: a review. *Journal of Environmental Monitoring*, 5(2), 216-221.
- Cuvelier, C., Dotreppe, O. et Istasse, L. (2003). Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Annales de Médecine Veterinaire*, 147(5), 315-324.
- de la Chenelière, V., Brodeur, P. et Mingelbier, M. (2014). Restauration des habitats du lac Saint-Pierre: un prérequis au rétablissement de la perchaude. *Le naturaliste Canadien*, 128(2), 50-62.
- Defo, M. A., Pierron, F., Spear, P. A., Bernatchez, L., Campbell, P. G. C. et Couture, P. (2012). Ecotoxicology and Environmental Safety Evidence for metabolic imbalance of vitamin A2 in wild fish chronically exposed to metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 85, 88-95.

- Deschamps, D. (2013). Protocole d'échantillonnage du Réseau de suivi ichtyologique du fleuve Saint-Laurent: Lac Saint-Pierre 2013. *Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs*, 46p. + 38 annexes.
- Di Mascio, P., Murphy, M. E. et Sies, H. (1991). Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 194S-200S.
- Dix, T. a. et Aikens, J. (1993). Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chemical Research in Toxicology*, 6, 2-18.
- Doyon, C., Boileau, S., Fortin, R. et Spear, P. a. (1998). Rapid HPLC analysis of retinoids and dehydroretinoids stored in fish liver: comparison of two lake sturgeon populations. *Journal of Fish Biology*, 53(5), 973-986.
- Doyon, C., Fortin, R. et Spear, P. A. (1999). Retinoic acid hydroxylation and teratogenesis in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) from the St. Lawrence River and Abitibi region, Quebec. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56, 1428-1436.
- Draper, H.H., Squires, E.J., Mahmoodi, H., Wu, J. Agerwal, S. et Hadley, M. (1993) A comparative evaluation of thobarbutric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radical Biology & Medicine*, 15, 353-363.
- Edge, R., McGarvey, D. J. et Truscott, T. G. (1997). The carotenoids as anti-oxidants - A review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 41(3), 189-200.
- Esterbauer, H. et Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methodes in Enzymology*, 186,407-431.
- Fang, Y.Z., Yang, S. et Wu, G. (2002) Free radicals, antioxydants, and nutrition. *Nutrition*, 18, p.872-679.
- Fang, Y.-Z., Yang, S. et Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
- Frenette, J. J., Arts, M. T. et Morin, J. (2003). Spectral gradients of downwelling light in a fluvial lake (Lake Saint-Pierre, St-Lawrence River). *Aquatic Ecology*, 37(1), 77-85.

- Frenette, J.J. et Vincent, W.F. (2003). Bio-optical variability in the littoral zone : local heterogeneity and implications for water quality monitoring. Dans : Kumagai, M. Vincent, W.F. (Eds) *Freshwater Management-Global versus local perspectives*. Springer-Valeg, Tokyo, 41-59
- Frolik, C.A. (1984) Métabolisme of retinoids. Dans Sporn, M.B., Roberts, A.B. et Goodman, D.S. : *The Retinoids* (volume 2), Academic Press Inc, Orlando, 177-203
- Gardès-albert, M., Bonnefont-rousselot, D., Abedinzadeh, Z. et Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*, 91-96.
- Gauthier, M., Aras, P., Paquin, J. et Boily, M. (en rédaction). Chronic exposures to imidacloprid or thiamethoxam alters redox state and carotenoid-retinoid levels in caged honeybee (*Apis mellifera*). [Manuscrit non publié] Revue visée : *Environmental Pollution*.
- Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A. et Wang, J. (2015). Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(6), 1856-1862.
- Gesto, M., Castro, L. F. C., Reis-Henriques, M. A. et Santos, M. M. (2012). Tissue-specific distribution patterns of retinoids and didehydroretinoids in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 161(1), 69-78.
- Girotti, A. W. (1998). Action in Biological Systems. *Journal Of Lipid Research*, 39, 1529-1542.
- Giroux, I. (2015). Présence de pesticides dans l'eau au Québec : Portrait et tendances dans les zones de maïs et de soya – 2011 à 2014. *Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction du suivi de l'état de l'environnement*, ISBN-978-2-550-73603-5, 47p. + 5 ann.
- Granado-Lorencio, F., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I. et Perez-Sacristan, B. (2010). Suitability of ultra-high performance liquid chromatography for the détermination of fat-soluble nutritional status (vitamine A, E, D and individual carotenoids). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 1389-1393.

- Gueguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J.M.A., Balt, A.M., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P. et Souidi, M. (2006). Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. *Annales de Biologie Clinique*, 64(6), 535-548.
- Guénette, S., Mailhot, Y., Mcquinn, I., Lamoureux, P. et Fortin, R. (1994). Paramètre biologiques, exploitation commerciale et modélisation de la population de Perchaudes (*Perca flavescens*) du lac Saint-Pierre. Québec, Ministère de l'Environnement et de la Faune, et Université du Québec à Montréal, IBSN-2-550-28833-5, 110p.
- Hedrei Helmer, S., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C. et Boily, M. (2014). Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11), 8010-8021.
- Holt, M.S. (2000). Sources of chemical contaminants and routes into freshwater environment. *Food and chemical toxicology*, 38, 21-27.
- Hontela, A. et Dorval, J.J. (2004). Défaillance de la synthèse des hormones corticostéroïdes: Exposition de poissons et amphibiens aux métaux et aux pesticides. Dans Pelletier, E., Cambell, P.G.C. et Denizeau F. (Éd) *Écotoxicologie Moléculaire: Principes fondamentaux et perspectives de développements*, Presses de l'Université du Québec, Sainte-Foy, 163-195.
- Houde, M., Giraud, M., Douville, M., Bougas, B., Couture, P., De Silva, A. O., Spencer, C., Lair, S., Verreault, J., Bernatchez, L. et Gagnon, C. (2014). A multi-level biological approach to evaluate impacts of a major municipal effluent in wild St. Lawrence River yellow perch (*Perca flavescens*). *Science of the Total Environment*, 497-498(May), 307-318.
- Hudon, C. et Carignan, R. (2008). Cumulative impacts of hydrology and human activities on water quality in the St. Lawrence River (Lake Saint-Pierre, Quebec, Canada). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65(6), 1165-1180.
- Hudon, C., Cattaneo, A., Tourville Poirier, A.-M., Brodeur, P., Dumont, P., Mailhot, Y., Amyot, J.-P., Despatie, S.-P. et Lafontaine, Y. (2011). Oligotrophication from wetland eputation alters the riverine trophic network and carrying capacity for fish. *Aquatic Sciences*, 74(3), 495-511.

- Janero, D.R. (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine*, 9, 515-540.
- Jentsch, A.M., Bachmann, H., Furst, P. et Biesalski, H.K. (1996). Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(2), 251-256.
- Kaisuyama, M. et Matsuno, T. (1988). Carotenoid and vitamin A, and metabolism of carotenoids, β -carotene, canthaxanthin, astaxanthin, zeaxanthin, lutein and tunaxanthin in tilapia tilapia nilotica. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part B*, 90(1), 131-139.
- Kiokias, S. et Gordon, M. H. (2004). Antioxidant properties of carotenoids in vitro and in vivo. *Food Reviews International*, 20(2), 99-121.
- La Violette, N. (2004). Lcs lacs fluviaux du Saint-Laurent: Hydrologie et modifications humaines. *Le Naturaliste canadien*, 128, 98-104.
- Lall, S. P. et Lewis-McCrea, L. M. (2007). Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish - An overview. *Aquaculture*, 267(1-4), 3-19.
- Lemaire, G., Balaguer, P., Michel, S., Rahmani, R. (2005). Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by organochlorine pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202, 38-49.
- Liebler, D. C., Burr, J. A., Philips, L. et Ham, A. J. L. (1996). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of vitamin E and its oxidation products. *Analytical Biochemistry*, 236(1), 27-34.
- Livingstone. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8), 656-666.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Scott, M.P., Zipursky, S.L. et Darnell, J. (2005). *Biologie moléculaire de la cellule*. De Boeck (Eds), Bruxelles, 973p.
- Machlin, L. J., Keating, J., Nelson, J., Brin, M., Filipkowski, R. et Miller, R. (1979). Availability of adipose tissue tocopherol in the Guinea Pig. *Journal of Nutrition*, 109, 105-109.

- Madeira, D., Vinagre, C. et Diniz, M.S. (2016). Are fish in hot water? Effects of warming on oxidative stress metabolism in commercial species *Sparus aurata*. *Ecological Indicators*, 63, 324-331.
- Magnan, P. (2002) Avis scientifique sur l'état du stock de perchaudes au lac Saint-pierre, les indicateurs biologiques utilisés pour effectuer son suivi et la pertinence de protéger la période de fraye de façon partielle ou totale. *Chaire de recherche du Canada en écologie des eaux douces, Université du Québec à Trois-Rivières*, 52p.
- Magnan, P., Brodeur, P., Vachon, N., Mailhot, Y., Dumont, P. et Paradis, Y. (sous presse). État du stock de perchaude du lac Saint-Pierre en 2011 et bilan du plan de gestion de 2008. *Comité aviseur scientifique sur la gestion de la perchaude du lac Saint-Pierre, Université du Québec à Trois-Rivières et ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec*.
- Magnan, P., Mailhot, Y. et Dumont, P. (2008) État du stock de perchaude du lac Saint-pierre en 2007 et efficacité du plan de gestion de 2005. *Comité aviseur scientifique sur la gestion de la perchaude du lac Saint-Pierre, Université du Québec à Trois-Rivière, et Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec*, iv + 28p. + annexes.
- Mailhot, Y., Dumont, P., Paradis, Y., Brodeur, P., Vachon, N., Mingelbier, M., Lecomte, F. and Magnan, P., (2015). Yellow Perch (*Perca flavescens*) in the St. Lawrence River (Québec, Canada): population dynamics and management in a river with contrasting pressures. Dans : Couture, P. and G.G. Pyle (eds.). *Biology of perch*. CRC Press, Boca Raton, FL, 101-147.
- Marcogliese, D. J., Blaise, C., Cyr, D., de Lafontaine, Y., Fournier, M., Gagné, F., Gagnon, C. et Hudon, C. (2015). Effects of a major municipal effluent on the St. Lawrence River: A case study. *Ambio*, 44(4), 257-274.
- Marcogliese, D. J., King, K. C., Salo, H. M., Fournier, M., Brousseau, P., Spear, P., Champoux, L., McLaughlin, J. D. et Boily, M. (2009). Combined effects of agricultural activity and parasites on biomarkers in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Aquatic Toxicology*, 91(2), 126-134.
- Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation research*, 424(1-2), 83-95.
- Massicotte, P., Bertolo, A., Brodeur, P., Hudon, C., Mingelbier, M. et Magnan, P. (2015). Influence of the aquatic vegetation landscape on larval fish abundance. *Journal of Great Lakes Research*, 41(3), 873-880.

- Masson, S., de Lafontaine, Y., Pelletier, A.-M., Verreault, G., Brodeur, P., Vachon, N. et Massé, H. (2013). Dispersion récente de la tanche au Québec. *Le Naturaliste canadien*, 137(2), 55-61.
- Matos, H. R., Di Mascio, P. et Medeiros, M. H. (2000). Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. *Archives of biochemistry and biophysics*, 383(1), 56-59.
- Matsuno, T. (1991). Xanthophylls as precursors of retinoids. *Pure and Applied Chemistry*, 63(1), 81-88.
- McGarigal, K., Cushman, S.A., Stafford, S. (2000) *Multivariate Statistics for Wildlife and Ecology Research*. Springer Science+Business Media, New York, 283p. ISBN: 978-0-387-98642-5.
- MDDEFP (Ministère du Développement durable, de l'environnement, de la Faune et des Parcs) (2013). Pêche : Extension de l'arrêt de la pêche à la perchaude à une portion plus vaste du fleuve dès le 3 mai 2013. Document consulté le 25 mars 2014 de <http://www.mddefp.gouv.qc.ca/faune/peche/extension-moratoire-perchaude.htm>
- Moise, A. R., Isken, A., Dominguez, M., De Lera, A. R., Von Lintig, J. et Palczewski, K. (2007). Specificity of zebrafish retinol saturase: Formation of all-trans-13,14-dihydroretinol and all-trans-7,8- dihydroretinol. *Biochemistry*, 46(7), 1811-1820.
- Moren, M., Naess, T. et Hamre, K. (2002). Conversion of B-carotene, canthaxanthin and astaxanthin to vitamin A in Atlantic halibut (*hippoglossus hippoglossus L.*) juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry*, 27, 71-80.
- Morrow, J.D. et Roberts II, L.J. (1996). The Isopropanes. *Biochemical Pharmacology*, 51, 1-9.
- Mourente, G., Diaz-Salvago, E., Tocher, D. R. et Bell, J. G. (2000). Effects of dietary polyunsaturated fatty acid / vitamin E (PUFA / tocopherol ratio on antioxidant defence mechanisms of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*, Osteichthyes , Sparidae). *Fish Physiology and Biochemistry*, 23, 337-351.
- Motulsky, H. (2013) Chapitre 16 : Signification statistique et test d'hypothèse. Dans : Motulsky, H. (Ed.), *Biostatistique : Une approche intuitive*. Trad. de l'anglais par Michèle Dramaix-Wilmet. De Boeck (2^e Eds), Bruxelles, 122-129. ISBN:978-2-8041-6376-1.

- MNRF (Ministère des Ressources Naturelles et de la faune) (2012a) Gobie à tâches noires (*Neogobius melanostomus*). *Fiche de renseignements*, Imprimeur de la Reine pour l'Ontario, 2p.
- MNRF (Ministère des Ressources Naturelles et de la faune) (2012b). La pêche à la perchaude interdite au lac Saint-Pierre : Nouvelle réglementation. *Fiche technique*.
- MNRF (Ministère des Ressources naturelles et de la Faune) (2013). Restauration du stock de perchaudes du lac Saint-Pierre : Bilan des essais de contrôle par abattage du cormoran à aigrettes réalisé au Lac Saint-Pierre en 2012. *Direction général de la Mauricie et du Centre-du Québec, Ministère des Ressources Naturelles*, 3p.
- Novak, J., Benisek, M. et Hilscherova, K. (2008). Disruption of retinoid transport, metabolism and signaling by environmental pollutants. *Environment International*, 34(6), 898-913.
- Nwani, C. D., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, P. et Lakra, W. S. (2010). Lethal concentration and toxicity stress of carbosulfan , glyphosate and atrazine to freshwater air breathing fish *Channa punctatus* (Bloch). *International Aquatic Research*, 2, 105-111.
- Oakes, K.D. et Van Der Kraak, G.J. (2003). Utility of TBARS assays in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 63, 447-463.
- Ohkawa, H. Ohishi, N. et Yagi, K. (1979). Assay for lipid perodes in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358.
- Oliveira, E., Casado, M., Raldúa, D., Soares, A., Barata, C. et Piña, B. (2013). Retinoic acid receptors' expression and function during zebrafish early development. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 138, 143-51.
- Padros, J., Pelletier, É. et O.Ribeiro, C.A. (2004). Les interactions multiples en écotoxicologie : le cas du benzo(a)pyrène et du tributylétain chez l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*). Dans Pelletier, E., Cambell, P.G.C. et Denizcau F. (Éd) *Écotoxicologie Moléculaire: Principes fondamentaux et perspectives de développements*, Presses de l'Université du Québec, Sainte-Foy, 257-300.

- Pandey, S., Ahmad, I., Parvez, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R. et Raisuddin, S. (2001). Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* bloch: 1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper preexposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(3), 345-352.
- Parker, R. S. (1996). Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(5), 542-551.
- Payne, J. F., Malins, D. C., Gunselman, S., Rahimtula, A. et Yeats, P. A. (1998). DNA oxidative damage and vitamin A reduction in fish from a large lake system in Labrador, Newfoundland, contaminated with iron-ore mine tailings. *Marine Environmental Research*, 46(1-5), 289-294.
- Peakall, D.B. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (1) : Introduction. Chapman &Hall : *Ecotoxicology* (volume 3), 157-160.
- Peakall, D.B. et Walker, C.H. (1994). The rôle of biomarkers in environmental assessment (3) : Vertebrates. Chapman &Hall : *Ecotoxicology* (volume 3), 173-179.
- Perterson, G. L. (1977). A Simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 3, 346-356.
- Pilacik, B., Nofer, T.W. et Wasowicz, W. (2002) F2-Isopropanes biomarkers of lipid peroxidation: their utility in évaluation of oxidative stress induced by toxic agents. *International Journal of Occupational Medecine and Environmental Health*, 15(1), 19-27.
- Pinel-Alloul, B., Perceval, O., Giguère, A., Couillard, Y., Campbell, P.G.C. et Hare, L. (2004) La métallothioncine : un biomarqueur d'exposition au cadmium pour les invertébrés d'eau douce. Dans Pelletier, E., Cambell, P.G.C. et Denizeau, F (Éd). *Écotoxicologie Moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développements*, Presses de l'Université du Québec, Sainte-Foy, 63-108.
- Purchase, C. F., Collins, N. C., Morgan, G. E. et Shuter, B. J. (2005). Sex-specific covariation among life-history traits of yellow perch (*Perca flavescens*). *Evolutionary Ecology Research*, 7(4), 549-566.
- Rao, A. V. et Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55(3), 207-216.

- Richard, G., Côté D., Mingelbier M., Jobin B., Morin J. et Brodeur P. (2011). Utilisation du sol dans la plaine inondable du lac Saint-Pierre (fleuve Saint-Laurent) durant les périodes 1950, 1964 et 1997 : interprétation de photos aériennes, numérisation et préparation d'une base de données géoréférencées. *Québec, Gouvernement du Québec, 42 p. Rapport technique préparé pour le ministère des Ressources naturelles et de la Faune et Environnement Canada.* ISBN-978-2-550-62891-0.
- Sayed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R. et Raisuddin, S. (2003). Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(2), 295-301.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82, 291-295.
- Shirakami, Y., Lee, S. A., Clugston, R. D. et Blaner, W. S. (2012). Hepatic metabolism of retinoids and disease associations. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(1), 124-136.
- Sinhorin, V. D. G., Sinhorin, A. P., Teixeira, J. M. dos S., Miléski, K. M. L., Hansen, P. C., Moreira, P. S. A., Kawashita, N. H., Baviera, A. M. et Loro, V. L. (2014). Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma sp.*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 106, 181-187.
- Spear, P. A., Boily, M., Giroux, I., DeBlois, C., Leclair, M. H., Levasseur, M. et Leclair, R. (2009). Study design, water quality, morphometrics and age of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in sub-watersheds of the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada. *Aquatic Toxicology*, 91(2), 110-117.
- Spear, P.A. et Moon, T.W. (1986). Thyroid-vitamin A interactions in chicks exposed to 3,4,3,4-tetrachlorobiphenyl: Influence of low dietary vitamin A and Iodine. *Environmental Research*, 40, 188-198.
- Sporn, M.B., Roberts, A.B., Goodman, D. (1984). *The retinoids (volume 1)*. Academic Press, Orlando, Floride, USA, 424p.
- Stahl, W. et Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345-351.

- Taveekisakarn, P., Myazaki, T., Matsumoto, M. et Arai, S. (1994). Vitamin A deficiency in cherry salmon. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6, 251-259.
- Thibault, A. (2008) Bilan et recommandations : Priorité à la perchaude. *Comité consultatif conjoint pour la gestion des stocks de poissons du lac Saint-Pierre (CCCGP)*, Février, 46p.
- Tocher, D., Mourente, G., Eecken, Van Der Eecken, A., Evjemo, J., Diaz, E., Bell, J. G., Geurden, I., Lavens, P. et Olsen, Y. (2002). Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*), halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*) and sea bream (*Sparus aurata L.*). *Aquaculture Nutrition*, 8, 195-207.
- Tortora, G.J. et Derrickson, B. (2007) *Principes d'anatomie et de physiologie*. 2e Éd. Édition du Nouveau Pédagogique Inc (ERPI), Saint-Laurent, Québec, Canada, 1246p.
- Traber, M. G. et Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), 4-15.
- UNESCO (Organisation des nations unies pour l'éducation, la science et la culture) (2012). Réserve mondiale de la biosphère du Lac-Saint-Pierre. Document consulté le 3 octobre 2013 de <http://www.biospherelac-st-pierre.qc.ca/content/index.html>.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. et Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178-189.
- Van Collis, R. et Parent, L. (2011) *Écotoxicologie générale et appliquée*. Télé-Université, Québec, 427p.
- Wu, J. H. et Croft, K. D. (2007). Vitamin E metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 28(5-6), 437-452.
- Yahia, E. et Ornelas-paz, J.J. (2010) Chemistry, stability, and biological actions of carotenoids. *Fruit and vegetable phytochemical*, Wiley-Blackwell, Singapore, 177-222.
- Yonar, M. E. et Sakin, F. (2011). Ameliorative effect of lycopene on antioxidant status in *Cyprinus carpio* during pyrethroid deltamethrin exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(3), 226-231.

- Zhang, J., Xu, Y., Li, W., Schramm, K. W. et Kettrup, A. (2002). Alterations in retinoids, tocopherol, and microsomal enzyme activities in the liver of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) from Ya-Er lake, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 68(5), 660-667.