

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE COMME EXIGENCE PARTIELLE DU DOCTORAT

EN SCIENCES DE L'EAU

Par

Yves Couillard

*La métallothionéine dans le bivalve d'eau douce *Anodonta grandis*:*

études in situ du rôle de cette protéine dans la détoxification des

métaux traces et son évaluation comme indicateur biochimique

Novembre 1993

*à Louise, Sophie
et Philippe*

*A ma mère, Marguerite Lévesque, décédée le 8 mars 1991,
tu auras laissé une marque indélébile sur nous,
l'éducation que tu nous a donné en héritage*

REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur de thèse Peter Campbell et mon co-directeur André Tessier pour qui la "formation de chercheurs" n'est pas une expression vide de sens. Vous m'avez inculqué la rigueur, l'originalité et la patience ("cent fois remets ton travail sur l'établi"...), qualités toutes trois précieuses en science. Votre grande disponibilité vous fait honneur. Je ne vous oublierai pas et j'espère bien que nous nous croiserons de nouveau sur le chemin des sciences!

Je remercie également les Drs. Jocelyne Pellerin-Massicotte et Gerald Mackie pour leur précieux apport à ce projet (comité d'encadrement), ainsi que Landis Hare et Jean-Christian Auclair pour les discussions instructives.

Je rends hommage à Louise St-Cyr, ma compagne de vie, pour avoir supporté mes tics, et m'avoir soutenu dans mes angoisses existentielles de fin de doctorat. Merci pour ton gros coup de main pour la rédaction de cette thèse.

Du côté technique j'aimerais souligner l'apport appréciable des personnes suivantes; sur l'eau et sous l'eau: René Rodrigue, François Fournier, Patrick Goupil, Carl Mathieu, André Vachon et Suzie Bélanger; au laboratoire: Michelle G. Bordeleau, Céline St-Pierre (UQAR), Bernard Veilleux, Bertrand Dubreuil et Stéphane Prémont.

Les personnes suivantes m'ont aimablement ouvert les portes de leurs laboratoires lors de stages: le Dr M. George Cherian (U. of Western Ontario); le Dr Jack F. Klaverkamp et Mike Dutton (Freshwater Institute, Dept. of Fisheries and Oceans, Winnipeg); François Girard, Nicole Blanchette et M. Lachapelle (MLCP, Rouyn-Noranda).

Un gros merci à Sylvie St-Pierre pour m'avoir fourni le gîte lors du sprint final. Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont collaboré de près ou de loin à ce projet.

Cette étude fut rendue possible grâce à une aide financière du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG: bourse doctorale et subvention stratégique), du Fonds mondial pour la nature (CRSNG/Environnement Canada), et du Fonds de développement académique du réseau de l'Université du Québec (FODAR).

RÉSUMÉ

Les mollusques marins et d'eau douce sont reconnus pour leur capacité de bioconcentrer les métaux traces de leur environnement. Leur tolérance à des charges internes élevées de métaux a été attribuée à l'existence d'un mécanisme de détoxification impliquant la capture des espèces métalliques diffusant dans le cytosol par des ligands dédiés à cette fonction. Une candidate possible à cette fonction s'avère être la métallothionéine (MT). Il s'agit d'une protéine de faible poids moléculaire, riche en cystéine, complexant fortement les ions des métaux appartenant aux groupes IB et IIB. Bien que les métallothionéines aient été abondamment étudiées en laboratoire, depuis plus de trente ans, et d'autre part, considérant l'ampleur du problème de contamination des milieux aquatiques par les substances toxiques, il est surprenant de constater le peu de connaissances que nous avons sur le comportement de ces protéines chez les organismes aquatiques dans leur milieu naturel. Ce projet s'est voulu une contribution à l'étude des MT en environnement naturel. Les objectifs généraux ont été d'élucider le mécanisme de détoxification impliquant la métallothionéine qui prévaut chez le bivalve d'eau douce *Anodonta grandis* vivant en milieu contaminé, et d'évaluer le potentiel qu'offre cette protéine comme indicateur biochimique précoce d'exposition et de stress *in situ* causé par les métaux traces.

La première partie de ce projet comportait une étude multi-lacustre. Des sédiments superficiels oxygènes, les eaux sus-jacentes à ces sédiments et des spécimens d'*A. grandis* ont été prélevés à onze sites lacustres littoraux localisés au long d'un gradient géochimique de pH, de [Cd], de [Cu] et de [Zn]. La région d'étude de Rouyn-Noranda (nord-ouest québécois) est influencée par des activités minières et de fonte de métaux. Les concentrations de MT dans les branchies, les restes et l'organisme entier étaient significativement corrélées ($P < 0.01$) avec les concentrations tissulaires de Cd. En contraste, les corrélations entre les [MT] et les niveaux de Cu ou de Zn restaient faibles ou nulles. Les variations inter-sites des concentrations de MT étaient le mieux reliées avec les concentrations de l'ion libre Cd^{2+} à l'interface eau-sédiment, telles qu'estimées à partir des équilibres de sorption eau-sédiment. Les relations entre les niveaux de métallothionéine et les concentrations totales de métaux dissous au moment de leurs prélèvements, et entre les concentrations sédimentaires de métaux extraits par $NH_2OH.HCl$, étaient inexistantes. Ces résultats appuient l'hypothèse initiale de cette étude, à savoir que les concentrations tissulaires de métallothionéine répondent de façon dépendante à une disponibilité accrue de métal (dans ce cas le Cd) dans l'environnement, telle que définie par la concentration de l'ion libre Cd^{2+} .

La seconde partie de ce projet a consisté en une transplantation de spécimens d'*A. grandis* d'un lac relativement peu contaminé vers un lac très contaminé en Cd et en Zn. Ces lacs affichaient vraisemblablement des conditions écologiques semblables. Cette expérience s'est déroulée de nouveau dans la région de Rouyn-Noranda et s'est étendue sur 400 jours. Nous en avons tiré une évaluation préliminaire de la métallothionéine du bivalve *A. grandis* comme indicateur biochimique, en nous guidant sur des critères bien établis pour ce genre d'indicateur.

Les bivalves transplantés vers le lac le plus contaminé montrèrent un accroissement lent de métallothionéine dans le temps; cet accroissement était corrélé avec une augmentation tout aussi lente des concentrations tissulaires de cadmium. Rappelons que cette relation concentration-réponse pour le Cd a été également observée lors de l'étude inter-lacustre.

Les variations saisonnières des concentrations de MT dans les bivalves témoins (laissés dans leurs lacs d'origine) étaient modestes, en comparaison avec la hausse régulières en [MT] observée avec les bivalves transplantés. Le tout suggère que les caractéristiques inhérentes à la biologie et à la physiologie d'*A. grandis* (ex: croissance et développement, reproduction, nutrition) sont moins importantes que les changements en biodisponibilité des métaux traces comme sources de variations des [MT].

Après 400 jours, l'apparition de symptômes de toxicité cellulaire dans les branchies des mollusques transplantés (dégradation oxydative des membranes, homéostasie cellulaire du Ca perturbée, détérioration des indices de condition) coïncida avec l'association du Cd avec des ligands de faible poids moléculaire dans le cytosol branchial. Le déclenchement de ces événements cellulaires suggère un rôle central pour la MT dans la détoxification des métaux et dans le maintien en santé des bivalves dans leur environnement naturel.

Des effets toxiques au niveau de l'organisme et de la population furent également décelés. Les stades larvaires en développement dans les marsupiums branchiaux des bivalves du lac le plus pollué étaient apparemment affectés par un stress induit par le Cd alors que les adultes du même lac ne semblaient pas être accablés par quelque effet toxique.

Les connaissances acquises lors de ce projet ont permis de mieux apprécier le potentiel qu'offre la métallothionéine comme indicateur biochimique d'exposition et de toxicité provoquée par les métaux traces toxiques en milieu naturel. Les résultats sont encourageants à cet égard mais conservent un caractère préliminaire; à notre connaissance, peu d'évaluations systématiques *in situ* de ce genre ont été rapportées dans la littérature. Afin d'exploiter la métallothionéine comme indicateur prédicteur d'exposition et de toxicité, il sera nécessaire d'obtenir une compréhension plus profonde de ses fonctions physiologiques normales et du mécanisme de détoxification dont elle fait partie, dans l'environnement naturel. Ces études devront être effectuées sur l'organisme biomonitor proposé.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	iii
Résumé.....	iv
Table des matières	vi
Liste des tableaux	x
Liste des figures.....	xiii
1. Introduction	1
1.1 APPROCHES DÉVELOPPÉES EN MATIÈRE DE PROTECTION DES ÉCOSYSTÈMES AQUATIQUES	2
1.2 INDICATEURS BIOCHIMIQUES DE SANTÉ ENVIRONNEMENTALE	4
1.3 MÉTALLOTHIONÉINE (MT).....	5
1.3.1 Biochimie	5
1.3.2 Synthèse et dégradation	6
1.3.3 Fonctions.....	9
Détoxification des métaux traces non essentiels, et homéostasie des métaux essentiels	9
Rôle dans l'activation de métalloprotéines.....	10
Protection contre le stress oxydant au niveau cellulaire.....	10
Autres fonctions.....	11
1.3.4 Objectifs et hypothèses	12
2. Réponse des concentrations de métallothionéine chez le bivalve <i>Anodonta grandis</i> à un gradient environnemental de cadmium	15
2.1 INTRODUCTION.....	16
2.2 RÉGION D'ÉTUDE.....	17
2.3 MÉTHODOLOGIE	19
2.3.1 Échantillonnage et analyse des sédiments	19
2.3.2 Échantillonnage et analyse de l'eau.....	20
2.3.3 Récolte et analyse des bivalves.....	21
Essai de saturation au mercure pour mesurer les métallothionéines	22
Analyse des tissus en métaux.....	24
Analyses statistiques.....	25
2.4 RÉSULTATS ET DISCUSSION	26
2.4.1 Gradient de contamination.....	26
2.4.2 Relations entre les niveaux tissulaires de métallothionéine et de métaux.....	30
2.4.3 Relations entre les concentrations de métallothionéine et le gradient de contamination.....	33
2.4.4 Effets de l'accumulation des métaux.....	40
2.4.5 La métallothionéine et le concept d'indicateur biochimique.....	43
3. Evaluation du potentiel de la métallothionéine en tant qu'indicateur précoce d'exposition et de stress causé par les métaux traces chez le bivalve <i>Anodonta grandis</i> dans son environnement naturel: une expérience de transplantation d'un lac peu vers un lac très contaminé.....	45
3.1 INTRODUCTION.....	46
3.2 SITES DE TRANSPLANTATION	49

3.3	PLAN EXPÉRIMENTAL.....	49
3.4	MÉTHODOLOGIE.....	51
3.4.1	Procédure de détermination de l'âge.....	51
3.4.2	Analyse des bivalves.....	52
	Essai de saturation au mercure pour mesurer les métallothionéines.....	53
	Analyse des tissus en métaux.....	54
	Déterminations de malondialdéhyde dans les branchies.....	54
	Concentrations métalliques dans les préparations de cytosol branchial.....	54
	Répartition des métaux dans les préparations de cytosol branchial.....	54
	Analyses statistiques.....	56
3.5	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	57
3.5.1	Justifications du choix des sites.....	57
3.5.2	Evaluation de l'effet de marquage et de confinement sur les bivalves utilisés dans l'expérience de transplantation.....	60
3.5.3	Suivis temporels des concentrations de métallothionéine et de métaux au cours de l'expérience de transplantation.....	63
	Métallothionéine.....	66
	Cadmium.....	67
	Cuivre.....	67
	Zinc.....	68
3.5.4	Relations entre les concentrations de métallothionéine et de métaux.....	68
	Bivalves transplantés.....	68
	Bivalves témoins.....	72
3.5.5	Répartition des métaux dans les cytosols branchiaux des bivalves transplantés.....	75
3.5.6	Cytotoxicité des métaux traces.....	77
	Modèle hypothétique.....	77
	Modèle hypothétique - évaluation.....	79
	Analyses discriminatoires.....	81
3.5.7	Relations entre la réponse en métallothionéine et les effets aux niveaux supérieurs d'organisation biologique.....	88
	Réponses au niveau de l'organisme.....	88
	Réponses au niveau de la population.....	89
3.6	CONCLUSION.....	95
4.	Conclusion générale	99
4.1	PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....	100
4.1.1	La métallothionéine dans le bivalve <i>Anodonta grandis</i> en tant qu'indicateur biochimique d'exposition à des métaux traces et de stress causé par ceux-ci dans l'environnement naturel.....	100
4.1.2	Etudes complémentaires.....	102
5.	Bibliographie	105
6.	Glossaire	121
A.1	Informations complémentaires au chapitre 2	125
A.1.1	CALCUL DE LA CONCENTRATION DE L'ION CD^{2+} EN MILIEU NATUREL.....	126
A.1.2	DONNÉES BIOLOGIQUES DE L'ÉTUDE MULTI-LACUSTRE.....	130
A.1.3	ANALYSES EN RÉGRESSION MULTIPLE.....	131

A.2 Informations complémentaires au chapitre 3	133
A.2.1 ANALYSES EFFECTUÉES SUR LES ÉCHANTILLONS DE BIVALVES DE L'EXPÉRIENCE DE TRANSPLANTATION.....	134
A.2.2 EFFET DU MARQUAGE ET DU CONFINEMENT SUR LA CROISSANCE EN LONGUEUR DES COQUILLES DANS L'EXPÉRIENCE DE TRANSPLANTATION - TRAVAUX DURANT L'ÉTÉ 1992...	135
A.3 Méthode de dosage des métallothionéines par saturation au mercure-203. Application au bivalve <i>Anodonta grandis</i>	139
A.3.1 INTRODUCTION.....	140
A.3.1.1 Principe des méthodes de dosage par saturation métallique	140
Dosage des métallothionéines par saturation par le ²⁰³ Hg.....	142
A.3.1.2. Considérations méthodologiques importantes.....	143
Homogénéisation des tissus.....	143
Emploi d'un antioxydant non recommandable	143
Protéine accessoire.....	145
Inactivation des protéases.....	146
Interférences	146
A.3.2 PROTOCOLE.....	147
A.3.2.1 Matériel et réactifs.....	147
Matériel spécifique.....	147
Réactifs.....	148
Préparation de 10 mL de solution de travail de ²⁰³ Hg.....	148
Préparation de sang de rat hémolysé.....	149
A.3.2.2 Les étapes de la méthode.....	150
Homogénéisation	150
Saturation au ²⁰³ Hg.....	151
A.4 Expériences:	
1. Spécificité de notre méthode de dosage des métallothionéines du bivalve <i>Anodonta grandis</i>	
2. Effet du temps d'entreposage (-40°C, atm. d'azote) sur les concentrations de métallothionéine mesurées sur des tissus de mollusques	
3. Effets de conditions d'extraction sur les concentrations cytosoliques de métaux	157
A.4.1 SÉRIE D'EXPÉRIENCES VISANT À DÉMONTRER LA SPÉCIFICITÉ DE LA MÉTHODE DE DOSAGE DES MÉTALLOTHIONÉINES DU BIVALVE <i>A. GRANDIS</i> PAR SATURATION PAR LE MERCURE- 203.	158
A.4.1.1 Expérience de "contamination" d'un étalon métallothionéine par la glutathione ou la cystéine.....	158
Hypothèse.....	158
Matériel et méthodes.....	159
Résultats	160
Interprétation	160

A.4.1.2 Comparaison de chromatogrammes (obtenus par chromatographie liquide haute performance) de cytosols de spécimens entiers d' <i>Anodonta grandis</i> avant et après l'application de la méthode de dosage de la MT par saturation par le ^{203}Hg	161
Hypothèse.....	161
Méthodologie.....	162
Résultats.....	163
Interprétation.....	164
A.4.1.3 Conclusion.....	164
A.4.2 EFFET DU TEMPS D'ENTREPOSAGE (-40°C, ATM. D'AZOTE) SUR LES CONCENTRATIONS DE MÉTALLOTHIONÉINE MESURÉES SUR DES TISSUS DE MOLLUSQUES.....	166
A.4.3 EFFETS DES CONDITIONS D'EXTRACTION SUR LES CONCENTRATIONS DE CD, DE CU, DE ZN ET DE CA DANS LE CYTOSOL DES BRANCHIES DU BIVALVE <i>ANODONTA GRANDIS</i>	167
A.4.3.1 Introduction.....	167
A.4.3.2 Matériel et méthodes.....	168
A.4.3.3 Résultats.....	169
A.4.3.4 Discussion et conclusion.....	171
A.5 Travaux préliminaires avec la larve de l'éphémère <i>Hexagenia limbata</i>	173
A.5.1 INTRODUCTION.....	174
A.5.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	175
A.5.3 RÉSULTATS.....	176
Description des homogénats et de leurs surnageants 30,000 × g.....	176
Quantité de tissu obtenue pour les analyses.....	176
Concentrations de métallothionéine dans les tissus.....	177
Concentrations de métallothionéine et de métaux dans les restes.....	179
A.5.4 DISCUSSION ET CONCLUSION.....	180
Homogénéisation tissulaire.....	180
Occurrence de métallothionéine chez la larve d' <i>H. limbata</i>	181
Relation entre les concentrations tissulaires de métallothionéine et de métaux.....	181
A.6 Relation entre le cuivre dans le bivalve <i>Anodonta grandis</i> et le cuivre dissous dans les lacs de la région de Rouyn-Noranda.	185
A.6.1 INTRODUCTION.....	186
A.6.2 LES AÉROSOLS ÉMIS PAR LES USINES D'EXTRACTION DE CUIVRE.....	186
A.6.3 BIODISPONIBILITÉ DU CU DISSOUS POUR LE BIVALVE FILTREUR <i>A. GRANDIS</i>	190
A.7 Notre étude et la théorie du contrôle de la pollution	193
A.7.1 ÉLÉMENTS DE LA THÉORIE DU CONTRÔLE DE LA POLLUTION.....	194
A.7.1.1 Contexte du contrôle de la pollution dans le secteur minier.....	196
A.7.1.2 Le marché minier mondial.....	198
A.7.2 LA COMPAGNIE MINÉRAUX NORANDA INC.....	200
A.7.2.1 Resquilleur réformé ou chef de file en matière de protection de l'environnement? ..	201
A.7.3 L'ÉCOTOXICOLOGIE ET LE CONTRÔLE DE LA POLLUTION.....	205
A.7.3.1 Rationalité de chacun des intervenants dans un problème de pollution donné.....	205
A.7.3.2 Inefficacité des instruments de contrôle de la pollution à restaurer et maintenir l'intégrité des écosystèmes.....	206

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Exemples d'approches proposées pour évaluer le risque environnemental associé aux substances toxiques pour l'écosystème aquatique.....	3
Tableau 1.2	Espèces de mollusques aquatiques pour lesquelles de la métallothionéine ou une protéine similaire est reportée.....	7
Tableau 1.3	Facteurs physiologiques et expérimentaux résultant en l'induction de métallothionéine chez les mammifères.....	7
Tableau 2.1	Etude multi-lacustre. Superficie des lacs étudiés et caractéristiques géochimiques de l'eau près de l'interface eau-sédiment à chaque site d'échantillonnage.....	27
Tableau 2.2	Caractéristiques géochimiques des sédiments de surface des lacs étudiés.....	28
Tableau 2.3	Concentrations moyennes de métallothionéine (MT: nmol sites de liaison de métal g ⁻¹ p. sec) et de métal (nmol M g ⁻¹ p. sec) dans les tissus du bivalve d'eau douce <i>Anodonta grandis</i> récolté dans 11 lacs de la région minière de Rouyn-Noranda.....	29
Tableau 2.4	Corrélations (r de Pearson) entre les concentrations moyennes de métallothionéine et de métaux tissulaires dans des spécimens du bivalve <i>Anodonta grandis</i> récoltés dans des lacs de la région minière de Rouyn-Noranda. ..	33
Tableau 2.5	Corrélations (r de Pearson) entre les concentrations moyennes de métallothionéine (MT) dans le bivalve <i>Anodonta grandis</i> et les concentrations environnementales de Cd dans les lacs à l'étude de la région minière de Rouyn-Noranda.....	38
Tableau 3.1	Superficies lacustres, et caractéristiques géochimiques et biologiques des sites retenus pour l'expérience de transplantation.....	50
Tableau 3.2	Comparaisons entre les bivalves marqués et confinés en enclos composant les groupes C-OP-400 j et C-VA-400 j et leurs congénères respectifs prélevés en dehors des enclos en fin d'expérience (OP IND et VA IND).	61
Tableau 3.3	Individus manquants dans chacun des groupes, observés aux jours de récolte.	62
Tableau 3.4	Jours de récolte pour lesquels les concentrations de métallothionéine ou de métaux dans les individus transplantés (T-VA) étaient significativement différentes des concentrations dans les témoins C-OP récoltés à la même occasion et dans les individus T-VA à t = 0 j.	65
Tableau 3.5	Corrélations (r de Pearson) entre les concentrations de métallothionéine (nmol de sites de liaison de métal g ⁻¹ p. sec) et de métaux (nmol g ⁻¹ p. sec) dans les replicata tissulaires d' <i>A. grandis</i> , pour les différents traitements de la transplantation.....	71
Tableau 3.6	Concentrations de Cd et de Cu dans les fractions HPLC, obtenues par exclusion stérique, de cytosols branchiaux.	76
Tableau 3.7	Caractéristiques des populations de bivalves (<i>A. grandis</i>) des lacs Opasatica et Vaudray. La réponse de la population du lac Vaudray à son environnement contaminé est comparée à celle de la population témoin du lac Opasatica.....	91
Tableau 3.8	Concentrations de métallothionéine et de métaux, rapports [Cd] _{T(tissu)} /[MT], et poids secs des larves des groupes T-VA, C-OP, et C-VA à 60 et 90 j	92

Tableau 3.9	La concentration de métallothionéine dans le bivalve d'eau douce <i>Anodonta grandis</i> en tant qu'indicateur potentiel d'exposition aux métaux traces et de stress induit par ceux-ci. Sommaire des résultats de l'expérience de transplantation et leurs relations avec les critères pour un indicateur biochimique.....	96
Tableau 4.1	Changements des concentrations de sulfates dans certains lacs de la région de Rouyn-Noranda pour la période 1982-1991.....	104
Tableau A.1.1	Concentrations moyennes de métallothionéine (MT: nmol sites de liaison de métal g ⁻¹ p. sec) et de métal (nmol M g ⁻¹ p. sec) dans les tissus du bivalve d'eau douce <i>Anodonta grandis</i> récolté dans 11 lacs de la région minière de Rouyn-Noranda.....	130
Tableau A.2.1	Analyses effectuées sur les échantillons de bivalves de l'expérience de transplantation.....	134
Tableau A.2.2	Effet du marquage et du confinement sur la croissance des bivalves marqués et mis en enclos dans leur lac d'origine Vaudray durant l'été 1992.....	136
Tableau A.2.3	Effet du marquage et du confinement sur la croissance des bivalves marqués et mis en enclos dans leur lac d'origine Opasatica durant l'été 1992.....	137
Tableau A.3.1	Comparaisons des performances de quatre méthodes de dosage de la métallothionéine par saturation métallique: Ag-Hb fraîche, ²⁰³ Hg-blanc d'oeuf frais, ²⁰³ Hg-Hb fraîche, ²⁰³ Hg-ovalbumine.....	144
Tableau A.4.1	Plan de l'expérience de dopage d'un étalon MT avec de la glutathione ou de la cystéine.....	159
Tableau A.4.2	Intervalles de confiance des moyennes des [Hg(réplikat)] (nmoles Hg mL ⁻¹ sln.) des différents traitements tels que décrits en méthodologie.....	160
Tableau A.4.3	Détection du ²⁰³ Hg (CPM) dans les fractions chromatographiques recueillies après l'élution de 100 µL de la préparation résultant de la méthode de dosage.....	163
Tableau A.4.4	Récupération d'un étalon interne ("internal standard") de métallothionéine de foie de lapin commercialement disponible (Sigma Co.) ajouté avant l'incorporation du ²⁰³ Hg dans des surnageants 30,000 × g d'homogénats de branchies, de glande digestive ou de restes de spécimens d' <i>A. grandis</i> provenant du lac St-Joseph (Co. Portneuf).....	165
Tableau A.4.5	Pourcentages de récupération d'étalons MT utilisés plus ou moins longtemps après la fabrication de leur lot, pour le dosage de la métallothionéine de tissus de bivalves.....	166
Tableau A.4.6	Concentrations en Cd (µg mL ⁻¹ cytosol) d'échantillons d'un homogénat composite de branchies du bivalve <i>A. grandis</i> provenant du lac Vaudray (Rouyn-Noranda) dont des aliquots ont été soumis à différents traitements avant leurs centrifugations.....	169
Tableau A.4.7	Concentrations en Cu (µg mL ⁻¹ cytosol) d'échantillons d'un homogénat composite de branchies du bivalve <i>A. grandis</i> provenant du lac Vaudray (Rouyn-Noranda) dont des aliquots ont été soumis à différents traitements avant leurs centrifugations.....	169
Tableau A.4.8	Concentrations en Zn (µg mL ⁻¹ cytosol) d'échantillons d'un homogénat composite de branchies du bivalve <i>A. grandis</i> provenant du lac Vaudray (Rouyn-Noranda) dont des aliquots ont été soumis à différents traitements avant leurs centrifugations.....	170

Tableau A.4.9 Concentrations en Ca ($\mu\text{g mL}^{-1}$ cytosol) d'échantillons d'un homogénat composite de branchies du bivalve <i>A. grandis</i> provenant du lac Vaudray (Rouyn-Noranda) dont des aliquots ont été soumis à différents traitements avant leurs centrifugations.	170
Tableau A.5.1 Poids des tissus de larves d' <i>H. limbata</i> obtenus par lac et détection de métallothionéine dans ceux-ci.	178
Tableau A.5.2 Concentrations de métallothionéine (nmol sites de liaison de métal g^{-1} de tissu p. hum.) dans différentes parties corporelles de la larve de l'éphémère <i>Hexagenia limbata</i> dans les lacs à l'étude.	179
Tableau A.5.3 Concentrations de métallothionéine (nmol sites de liaison de métal g^{-1} p. sec) et de Cd, de Cu et de Zn dans les restes ($\mu\text{g g}^{-1}$ p. sec) de la larve de l'éphémère <i>Hexagenia limbata</i> dans les lacs à l'étude.	179
Tableau A.5.4 Concentrations de métallothionéine (nmol sites de liaison de métal g^{-1} p. sec) dans les restes de la larve d' <i>H. limbata</i> et du bivalve <i>A. grandis</i> , concentrations de Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$ p. sec) dans les branchies, le tract digestif et les restes de la larve benthique, et concentrations de Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$ p. sec) dans les restes d' <i>A. grandis</i> , pour les lacs à l'étude.	183
Tableau A.6.1 Répartition en taille des aérosols de cuivre émis d'une fonderie au Missouri.	188
Tableau A.6.2 Position des lacs à l'étude par rapport à la raffinerie de cuivre de Rouyn-Noranda, leur concentration en Cd et en Cu dissous, les concentrations internes moyennes de Cu dans le bivalve <i>A. grandis</i> et les corrélations (r de Pearson) entre $[\text{Cu}]_d$ et $[\text{Cu} (A. grandis)]$	189
Tableau A.7.1 Principales caractéristiques de la fonderie de cuivre Horne et les avantages qu'elles confèrent aux niveaux économique et environnemental.	204

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Modèle de synthèse et de dégradation de la métallothionéine à l'échelle cellulaire.....	8
Figure 2.1	Localisation des sites d'échantillonnage pour l'étude multi-lacustre.....	18
Figure 2.2	Diagramme des étapes de l'essai de saturation au ^{203}Hg pour mesurer les métallothionéines.....	23
Figure 2.3	Diagrammes de dispersion bidimensionnels des concentrations de métallothionéine <i>versus</i> les concentrations de Cd, de Cu et de Zn dans le bivalve <i>A. grandis</i>	32
Figure 2.4	Diagrammes de dispersion bidimensionnels des concentrations de métallothionéine dans <i>A. grandis</i> <i>versus</i> les formes géochimiques de Cd déterminées dans cette étude.....	36
Figure 2.5	Diagramme de dispersion bidimensionnel des indices de condition en fonction des concentrations de Cd dans le bivalve <i>A. grandis</i>	42
Figure 3.1	Modèle hypothétique des variations en concentrations de métallothionéine dans des spécimens du bivalve <i>A. grandis</i> pour l'expérience de transplantation.....	48
Figure 3.2	(a) Diagrammes de Walford des longueurs inter-annulaires pour le bivalve <i>A. grandis</i> provenant des lacs Opasatica (N=21) et Vaudray (N=29). (b) Courbes de croissance de Von Bertalanffy pour des populations d' <i>A. grandis</i> de certains lacs canadiens.....	59
Figure 3.3	Variations temporelles des concentrations de MT, de Cd, de Cu et de Zn dans les bivalves entiers témoins et transplantés.....	64
Figure 3.4	(a) et (b) Diagrammes de dispersion des concentrations de métallothionéine (X_2) <i>versus</i> respectivement les concentrations de Cd (X_1) et le poids sec de l'organisme (X_3) des bivalves transplantés. (c) Diagramme de dispersion de la corrélation partielle entre les concentrations de métallothionéine (X_2) et celles de Cd (X_1) des bivalves transplantés, le poids sec de l'organisme étant tenu constant (X_3).....	70
Figure 3.5	(a) et (b) Diagrammes de dispersion des concentrations de métallothionéine <i>versus</i> celles de Cd des bivalves témoins respectivement des lacs Opasatica (C-OP) et Vaudray (C-VA). (c) Diagramme de dispersion des concentrations de métallothionéine <i>versus</i> les poids secs des replicata des témoins du lac Vaudray.....	73
Figure 3.6	Modèle hypothétique de cytotoxicité causée par les métaux. Séquence des événements résultant en la mort de la cellule après la peroxydation lipidique.....	79
Figure 3.7	Aspects des branchies des populations à l'étude. Les branchies des bivalves de la population du lac Vaudray étaient souvent déformées, alors que celles des spécimens du lac Opasatica arboraient une morphologie plus régulière (photo prise à 400 j).....	80
Figure 3.8	Variations temporelles des indices de condition, des concentrations de malondialdéhyde et de calcium, et des ratios [métal]/[MT] des cytosols branchiaux des bivalves témoins et transplantés.....	82

Figure 3.9	(a) Diagramme de dispersion de la fonction discriminatoire intégrant les variables indice de condition, [MDA(branchies)], [Ca(branchies)] _{cyt} et le ratio [Cd(branchies)] _{cyt} /[MT(branchies)] pour les bivalves témoins et transplantés à 400 j. (b) Diagramme de dispersion des fonctions discriminatoires K ₁ et K ₂ intégrant les variables décrites ci-dessus ainsi que le ratio [Cu(branchies)] _{cyt} /[MT(branchies)].....	84
Figure A.3.1	Étapes des méthodes de saturation métallique pour doser les métallothionéines. ...	141
Figure A.4.1	Schéma expérimental du fractionnement d'un cytosol par HPLC, d'un spécimen entier d' <i>A. grandis</i> , avant et après l'application de la méthode de dosage de la MT par saturation au ²⁰³ Hg.	162
Figure A.6.1	Diagramme de dispersion des concentrations de Cu dans des spécimens entiers d' <i>A. grandis</i> en fonction des concentrations de Cu dissous dans des lacs de la région de Rouyn-Noranda (12), de l'Estrie (2) et de la région de Muskoka, Ont. (2).....	187
Figure A.6.2	Diagramme de dispersion des concentrations de Cu dans des spécimens entiers d' <i>E. complanata</i> en fonction des concentrations de Cu dissous dans des lacs de la région de Rouyn-Noranda (3), de l'Estrie (4) et de la région de Muskoka, Ont. (3).....	191
Figure A.7.1	Niveau de risque perçu par les décisionnaires de l'agence de contrôle et par les propriétaires et gérants d'exploitation en regard du niveau de production de la qualité d'environnement, faisant l'hypothèse de l'application du principe du pollueur-payeur.....	197
Figure A.7.2	Principales étapes du procédé de traitement en continu Noranda.....	203

C H A P I T R E 1

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

1.1 Approches développées en matière de protection des écosystèmes aquatiques

Au début des années 1970, la protection des écosystèmes aquatiques s'appuie sur des épreuves de toxicité aigüe en laboratoire. A cause du faible réalisme environnemental de ces tests, les prédictions des concentrations de polluants sans effet pour l'écosystème sont entachées d'une incertitude dont l'importance est difficile à apprécier. Il faut en effet extrapoler de conditions de laboratoire vers des conditions *in situ*; d'effets sur des espèces substitués vers des effets sur les espèces indigènes au milieu; et d'un niveau d'organisation biologique inférieur (organisme) vers un niveau supérieur (communauté et écosystème). Afin de réduire ces incertitudes, les concentrations sans effet observable en laboratoire ("no-observable-effects concentrations: NOEC") sont multipliées par un nombre fractionnaire défini ("application factor"). Les valeurs obtenues, plus conservatrices, servent de critères pour les prescriptions des charges toxiques industrielles aux cours d'eau récepteurs (Cairns et Mount, 1990). L'émergence de l'écotoxicologie a contribué au développement d'une vision holistique au problème de la pollution des écosystèmes aquatiques. Les stratégies de contrôle des polluants s'appuieraient maintenant sur trois catégories de mesures. La mesure de substances toxiques spécifiques dans les effluents rejetés au milieu récepteur aiderait à l'identification d'agents causals de leurs nocivités. L'évaluation de la toxicité de ces effluents avant rejet revêtait un caractère préventif (ex: Blaise, 1991). La caractérisation *in situ* des communautés et écosystèmes concernés, indiquerait les effets non pris en compte par les tests en laboratoire (Berryman, 1990); comme par exemple la persistance et la toxicité à long terme des contaminants en conditions naturelles (U.S. EPA, 1991).

Le tableau 1.1 fournit quelques exemples d'approches, intégrant les trois catégories de mesure ci-haut mentionnées, pour l'analyse du danger que présentent les substances toxiques anthropiques pour les écosystèmes aquatiques. Les sédiments auraient un impact majeur sur les biocoenoses. En effet, la contamination de poissons, d'oiseaux piscivores et de mammifères a pu être liée à plusieurs occasions à la présence de produits toxiques dans les sédiments (Adams *et al.*, 1992). Pour cette raison, l'U.S. EPA est mandaté de la tâche d'établir des critères de qualité des sédiments (U.S. EPA, 1991). Ces critères seraient développés à partir de modèles présumément mécanistiques, prédisant les concentrations sédimentaires biodisponibles de contaminants (p. ex.: concentration d'un métal sous

Tableau 1.1

Exemples d'approches proposées pour évaluer le risque environnemental associé aux substances toxiques pour l'écosystème aquatique.

SOURCE	MESURES		
	CHIMIQUES	TOXICOLOGIQUES	BIOLOGIQUES <i>in situ</i>
"Water-quality-based approach to toxics control" U.S. EPA (1991)	Charge maximum autorisée jour ⁻¹ d'un effluent basée sur les Critères de Qualité de l'Eau fédéraux.	Evaluation toxicologique de l'effluent entier avec minimum de 3 espèces standards: poisson, invertébré, plante.	Evaluation de l'intégrité biologique du milieu récepteur par comparaison avec un milieu de référence ("biocriteria").
Plan d'Action Saint-Laurent ^a (PASL)	Indice CHIMIOTOX ^b	Barème d'Effets Ecotoxiques Potentiels (BEEP: Costan, 1992) ^c	Biocritère? A venir.
Approche séquentielle			
"Site-specific Sediment Quality Criteria" (Adams <i>et al.</i> , 1992)	Biodisponibilité des substances toxiques dans les sédiments évaluée: - subs. organiques non-ioniques: "equilibrium partitioning approach" - métaux toxiques: normalisation pour le contenu en sulfures extraits en milieu acide ("AVS") - subs. organiques ioniques, surfactants: normalisation pour la capacité d'échange cationique ("CEC") et concentration critique micellaire.	Epreuves de toxicité chronique et aigüe en présence des sédiments.	Evaluation de l'intégrité de la communauté benthique.

^a Séminaire donné à l'INRS-Eau en 1993 par G. Duchesneau d'Environnement Canada. L'objectif du PASL est de réduire de 90% les émissions de 50 industries prioritaires le long du fleuve Saint-Laurent.

^b L'indice CHIMIOTOX pour un effluent donné = $\sum_{i=1}^{n_{\text{substances}}} \text{unités CHIMIOTOX}_i$. Pour une substance donnée, le nombre d'unités CHIMIOTOX = charge × Facteur toxicité, où Facteur toxicité = 1/critère de qualité de l'eau le plus sévère et charge = [substance (effluent)]_{initiale} × débit.

^c
$$\text{BEEP} = \log_{10} \left[1 + \frac{n \left(\sum_{i=1}^k A_v + A_p \right) D}{N} \right]$$
 où n = nombre de bioessais démontrant une toxicité, N = nombre total de

bioessais entrepris, A_v et A_p = seuil de toxicité exprimée en unités toxiques avant et après dégradation de la substance (100 / CL_{50} , etc...), et D = débit de l'effluent ($m^3 h^{-1}$). Le BEEP peut varier de 0 à 10. Source: Costan (1992).

forme biodisponible dans l'eau interstitielle, voir tableau 1.1). Dans l'éventualité où des sédiments d'un site donné ne se conformeraient pas à ces critères, une approche séquentielle d'évaluation des impacts serait requise; elle ferait appel à des épreuves de toxicité en présence de ces sédiments et à une évaluation écotoxicologique *in situ*.

Le tableau 1.1 laisse entrevoir que l'information écotoxicologique sera intégrée aux programmes de protection de l'environnement aquatique dans l'avenir. Cette information peut servir entre autre (U.S. EPA, 1991):

- comme indiqué précédemment, à l'évaluation des impacts de sources ponctuelles, et également de sources diffuses de pollution;
- à la classification des plans et cours d'eau nationaux de première importance. Dans ce cas, la recherche des causes de dégradation pourrait être rétrospective en raison d'un environnement déjà affecté et d'anomalies observées (MENVIQ, 1992);
- à statuer sur l'efficacité de critères de qualité de l'eau ou de sédiments à protéger un plan d'eau donné;
- à évaluer et documenter les bénéfices biologiques obtenus de contrôles de la pollution.

1.2 Indicateurs biochimiques de santé environnementale

Une catégorie de sondes écotoxicologiques qui s'offre en matière de protection des écosystèmes aquatiques contre l'agression de contaminants toxiques est celle des "indicateurs biochimiques de santé environnementale". Le principe en est que tout effet toxique débute par une réaction entre l'élément toxique et un récepteur biochimique dans un organisme vivant. La concentration de polluant requise pour déclencher cette réaction est souvent bien inférieure à celle provoquant une crise dans l'organisme ou une dégradation visible d'un écosystème donné. Ainsi, la détection et la mesure de ces réactions chimiques pourraient fournir un outil sensible, spécifique et indicateur de stress dans l'environnement (CNRC, 1985). Harris *et al.* (1990) prouvent l'utilisation de mesures d'intégrité écosystémique, qui arborent la capacité de fournir un diagnostic précoce d'un problème de

dégradation. Ils ajoutent que ces bioindicateurs doivent refléter la complexité du niveau d'organisation écosystémique.

Le présent projet s'oriente vers l'étude en milieu naturel d'une protéine séquestrant les métaux traces toxiques, la métallothionéine, dans un mollusque bivalve d'eau douce *Anodonta grandis*, et qui est suggérée comme indicateur biochimique précoce d'exposition et de stress *in situ* causé par les métaux traces (CNRC, 1985). Les raisons de ces choix sont discutées en section 1.3.4.

1.3 Métallothionéine (MT)

L'excellent article de Roesijadi (1992) décrit de façon extensive ce qui est connu présentement des métallothionéines (MT) dans le monde vivant, en particulier chez les animaux marins. Beaucoup des informations qui suivent sont tirées de cette publication.

1.3.1 Biochimie

La métallothionéine mammalienne, la mieux connue et décrite des protéines de ce type, possède les caractéristiques suivantes (Roesijadi, 1992):

- un faible poids moléculaire de 10 KD (estimé à partir de chromatographie d'exclusion stérique); chez certaines espèces animales, la protéine se retrouve comme dimère;
- un fort contenu en métal;
- l'absence d'acides aminés aromatiques et un fort contenu de cystéine ($\approx 30\%$);
- un spectre d'absorption dans l'ultraviolet caractéristique, avec une absence d'absorbance à 280 nm, à cause de l'absence de résidus aromatiques, et un pic d'absorbance à 250 nm, à cause du lien métal-thiol;
- une division caractéristique en 2 domaines, chacun possédant des capacités différentes ou non (pas chez les mammifères) de séquestrer les ions métalliques.

Chaque ion métallique est lié simultanément à plusieurs groupements thiol fournis par la cystéine; ensemble ils forment une trappe chélatrice. De fait, la constante de dissociation du Cd avec la MT du

cheval à pH \approx 8.0 est de 5×10^{-20} M. Par contraste, cette constante chez le crabe *Cancer pagurus* à pH 8.0 et à 20°C n'est que de 3.6×10^{-7} M. L'affinité de la MT mammalienne pour les métaux, estimée par des expériences de substitution *in vitro*, diminue dans l'ordre: Hg(II) > Cu(I) > Cd(II) > Zn(II) > Ni(II), Co(II).

La métallothionéine semble ubiquiste dans le règne animal. Cependant, la protéine n'a été suffisamment purifiée pour en permettre l'analyse structurale que chez quelques espèces seulement. On rapporte la présence de métallothionéine ou d'une protéine similaire chez les mammifères terrestres supérieurs et marins, chez les amphibiens, chez les reptiles (alligator), chez les oiseaux, chez les poissons marins et d'eau douce. De même, cette protéine est détectée chez les groupes d'invertébrés suivants: échinodermes, pogonophores, insectes, crustacés, mollusques (tableau 1.2) et annélides.

Les métallothionéines sont regroupées en trois classes, sur la base de la localisation de la cystéine dans la chaîne d'acides aminés et du mode de synthèse (Fowler *et al.*, 1987):

- Classe I: polypeptides dont la localisation de la cystéine est similaire à celle de la métallothionéine du rein de cheval; on peut également inclure les protéines ressemblant à la MT de cheval dans plusieurs de leurs caractéristiques;
- Classe II: polypeptides dont la localisation de la cystéine est apparentée de loin à celle de la métallothionéine du rein de cheval;
- Classe III: polypeptides, non-synthétisés par transcription d'un gène, mais formant des chélates avec les métaux; p. ex.: cadystine, phytométallothionéine, phytochélatine et γ -glutamyl-cystéine-glycine. Ces polypeptides ont été identifiés chez des plantes et des champignons.

1.3.2 Synthèse et dégradation

Le tableau 1.3 (Cousins, 1985) liste les facteurs expérimentaux et intrinsèques (liés à l'organisme), qui induisent la synthèse de métallothionéines chez les mammifères. Ces facteurs, mis à part les métaux traces, n'ont pas encore retenu l'attention voulue chez les mollusques. Cependant, les métaux traces sont généralement les plus forts inducteurs de MT (Klaassen, 1981).

Tableau 1.2

Espèces de mollusques aquatiques pour lesquelles de la métallothionéine ou une protéine similaire est reportée. Adapté de Roesijadi (1992).

CLASSE	ESPÈCE	NOM COMMUN
PELECYPODE	<i>Crassostrea virginica</i> <i>Crassostrea gigas</i> <i>Ostrea edulis</i> <i>Ostrea lutaria</i> <i>Mytilus edulis</i> <i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Macoma balthica</i> <i>Protothaca straminea</i> <i>Mercenaria mercenaria</i> <i>Calyptogena magnifica</i> <i>Placopecten magellanicus</i> <i>Anodonta cygnea</i> <i>Anodonta grandis</i> ^a <i>Unio elongatus</i>	Huître américaine Huître japonaise Huître européenne Huître de Nouvelle-Zélande Moule bleue Moule méditerranéenne bivalve marin bivalve marin bivalve marin bivalve marin pétoncle anodonte Anodonte commune bivalve d'eau douce
GASTROPODE	<i>Crepidula fornicata</i> <i>Patella vulgata</i> <i>Patella intermedia</i> <i>Littorina littorea</i>	patelle patelle patelle bigorneau
POLYPLACOPHORE	<i>Cryptochiton stelleri</i>	chiton

^a Cette étude.

Tableau 1.3

Facteurs physiologiques et expérimentaux résultant en l'induction de métallothionéine chez les mammifères (Adapté de Cousins, 1985).

FACTEURS PHYSIOLOGIQUES	FACTEURS EXPERIMENTAUX		
Développement Zinc dans la diète Infection Jeûne Stress	Ag Cd Cu Hg Zn	Adjuvant contre l'arthrite Agents alkylants Diabète Endotoxine Epinéphrine Glucocorticoïdes	Glucagon Interleukine 1 Isopropanol Acide rétinolique Térébenthine CCl ₄

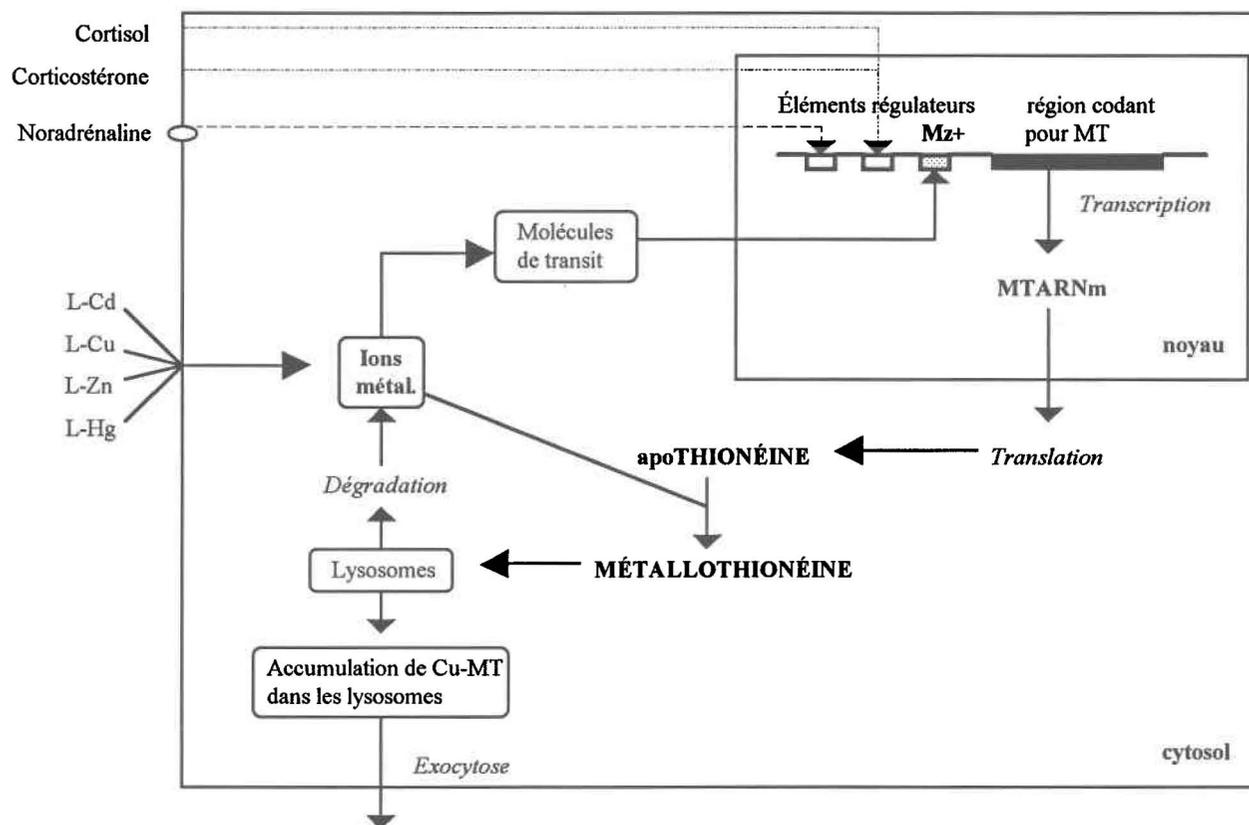


Figure 1.1: Modèle de synthèse et de dégradation de la métallothionéine à l'échelle cellulaire. On suppose le métal extracellulaire associé à un ligand pour son transport à l'intérieur de l'organisme. La synthèse de la MT est induite par des hormones et des métaux traces; l'induction par ces derniers implique la liaison des ions à des molécules de transit. Ces complexes se lient alors aux éléments régulateurs du gène MT correspondants; la transcription s'ensuit. La métallothionéine, nouvellement produite, posséderait une affinité pour les métaux inducteurs supérieure aux autres ligands intracellulaires. La Cu-thionéine excédentaire s'accumulerait dans les lysosomes sous une forme polymérisée pour ensuite être éventuellement excrétée par exocytose. (Adapté de Roesijadi, 1992; et Hogstrand, 1991).

L'induction de la métallothionéine par les métaux traces, à l'échelle de la cellule (figure 1.1), impliquerait la liaison des ions à des molécules de transit ("trans-acting factor, MRF": Roesijadi, 1992). Cela résulterait en un changement de conformation qui permettrait à ces molécules de se lier à des éléments régulateurs de transcription sur le gène MT ("metal regulatory element, MRE": Roesijadi, 1992). Les éléments régulateurs seraient de plusieurs types, étant spécifiques aux métaux ou à des hormones et composés particuliers (Roesijadi, 1992). La production de l'ARN messager correspondant s'ensuivrait. La métallothionéine, nouvellement synthétisée, posséderait une affinité

pour les métaux inducteurs supérieure aux autres ligands intracellulaires. Chez la cellule mammalienne, la métallothionéine est majoritairement retrouvée dans la fraction cytosolique (Cousins, 1985). Viarengo (1989) a pu démontrer, chez un mollusque marin *Mytilus sp.*, que la Cu-thionéine excédentaire était accumulée dans les lysosomes sous la forme d'un polymère insoluble pour ensuite être excrétée hors de la cellule. Ce mécanisme semblait inefficace à éliminer le cadmium cellulaire. Le Cd associé aux lysosomes tertiaires dans le rein de la moule bleue *Mytilus edulis* ne se trouve apparemment pas sous la forme d'un polymère de MT (George, 1983). Notons que contrairement au Cd, le Cu reste fermement lié à la métallothionéine à pH 1, prévalant dans la vacuole lysosomique. Ces observations sont en accord avec les demi-vies biologiques différentes de ces deux métaux dans les tissus de *Mytilus sp.*, courte pour le Cu (9 jours) et plus longue pour le Cd (7 mois). La demi-vie biologique du Cd chez le bivalve d'eau douce *Anodonta grandis* est estimée supérieure à 0.9 année (Tessier *et al.*, résultats inédits).

1.3.3 Fonctions

Détoxification des métaux traces non essentiels, et homéostasie des métaux essentiels

Etant donné sa grande affinité et son induction par les métaux mous, on a généralement accordé à la métallothionéine un rôle dans leur détoxification. De plus, au moins deux catégories d'expériences suggèrent cette fonction pour les métaux traces, essentiels ou non. L'exposition préliminaire d'organismes en laboratoire à des doses ou concentrations suffisantes de Cd, Cu ou Zn pour induire la synthèse de MT, leur confère une tolérance accrue à des expositions subséquentes à ces métaux (Hogstrand, 1991; Klaverkamp et Duncan, 1987; Roesijadi et Fellingham, 1987; CNRC, 1985). Le second type d'expériences implique l'utilisation de lignées cellulaires déficientes ou surcapacitaires à produire de la MT. Certaines lignées rendues incapables de biosynthétiser de la MT, à cause de l'hyperméthylation de son gène, sont spécialement sensibles aux métaux. En contrepartie, les cultures cellulaires à surcapacité de biosynthèse causée par l'amplification du gène MT, se montrent beaucoup plus résistantes à ceux-ci (discuté dans Hogstrand, 1991).

Paradoxalement, la métallothionéine retrouvée dans certains mollusques favoriserait la bioaccumulation du Cd. En séquestrant le Cd intracellulaire, celle-ci maintiendrait le gradient

nécessaire à la diffusion passive du métal. Langston et Spence (1994) ont comparé l'influx net du Cd chez quatre bivalves marins. Ils ont effectivement constaté, chez des populations de *Scrobicularia plana* ne possédant pas l'habileté de synthétiser la MT, que la concentration tissulaire de Cd était bien moindre que celles des trois autres espèces productrices de MT.

Rôle dans l'activation de métalloprotéines

Certaines études récentes suggèrent que la Zn,Cu-thionéine pourrait pourvoir le Zn nécessaire à l'activation de certaines enzymes telles l'anhydrase carbonique, la phosphatase alcaline, la thermolysine et l'aldolase (Viarengo, 1989). Il convient de citer les travaux éloquents de Engel et Brouwer (1987) sur le homard *Homarus americanus*. Ces chercheurs ont préparé de l'apohémocyanine de homard, par décomplexation du Cu au site actif de la protéine fixatrice d'oxygène; ils l'ont alors réactivée avec de la Cu-thionéine extraite de l'hépatopancréas de l'animal. Fait intéressant, le cuivre est retrouvé sous la même forme, Cu(I), dans les deux protéines. Engel et Brouwer (1987) ont, de plus, trouvé une relation entre les concentrations de métalloprotéines requérant du Cu et du Zn, et les concentrations tissulaires respectives de Cu- et de Zn-thionéines. L'abondance de ces biomolécules est modulée par le cycle de mue du homard.

Protection contre le stress oxydant au niveau cellulaire

De nombreux travaux suggèrent que la métallothionéine est impliquée dans la protection des cellules contre le stress oxydant. Cela s'effectuerait par l'inactivation directe par la MT des radicaux hydroxyl, OH \cdot , et superoxyde O $_2\cdot^-$. Indirectement, la métallothionéine fournirait le Zn supplémentaire requis à la stabilisation des membranes endommagées (Bremner et Beattie, 1990; Viarengo, 1989). Ce phénomène, d'occurrence générale dans le règne animal, serait provoqué par des stress de multiples natures: métaux et composés promoteurs de dégradation oxydative des membranes, privation de nourriture (Bremner et Beattie, 1990) et stress de la capture (Baer et Thomas, 1990). Chez le mulot *Mugil cephalus*, la concentration de Zn associée à la MT a augmenté significativement de 100 à ≈ 1200 nmol. Zn g $^{-1}$ p. hum. (augmentation de MT probable), dans les sept jours suivant la capture des poissons, leur manipulation, leur transport au laboratoire et leur transfert dans des réservoirs (Baer et Thomas, 1990).

Autres fonctions

On a également suggéré que la métallothionéine répondait au stress cellulaire imposé par la chaleur et par les infections bactériennes (Bremner et Beattie, 1990) et qu'elle constituait un réservoir de cystéine pour la cellule (chez le rat: Hidalgo *et al.*, 1991).

On attribue donc à la métallothionéine une multiplicité de rôles reliés aux processus physiologiques normaux de la cellule. Cette constatation et le fait que la MT favoriserait la bioaccumulation d'un métal toxique comme le Cd (voir Langston et Spence, 1994) sème un doute sur la prétendue faculté de cette dernière de détoxifier les métaux traces. Beeby (1991) suggère plutôt, à l'aide d'exemples sur les invertébrés terrestres, que les mécanismes régulateurs en place pour les métaux essentiels peuvent s'être à la longue "adaptés" à la détoxification et à l'excrétion de métaux traces toxiques (Cd, Hg). Cette adaptation ne serait pas parfaite. La métallothionéine apparaît comme une protéine très ancienne, nécessaire très tôt pour l'évolution et la radiation des espèces animales et végétales sur terre. D'autre part, l'accroissement des flux géochimiques de certains métaux, mineurs dans l'écorce terrestre, vers l'écosystème aquatique remonte tout au plus à 250 ans, le début de l'Ere Industrielle. A cet égard, il convient d'évoquer les idées de Gould et Lewontin (1979) sur l'Evolution. Selon eux, les organismes vivants doivent être considérés dans leur totalité; leur "forme" est très affectée de contraintes au changement évolutif occasionnées par leur héritage phylogénique, leur embryogénèse et leur architecture générale. Ainsi, aucun insecte ne pourrait devenir aussi gros qu'un éléphant parce que l'exosquelette arthropode ne peut théoriquement supporter une telle charge; la physiologie de l'insecte (p. ex.: poïkilothermie) ne pourrait non plus assurer la respiration d'une telle masse tissulaire. Selon Gould et Lewontin (1979) il est dès lors plus intéressant et plus important de tenter de délimiter les trajectoires évolutives permises par ces contraintes. Si l'on transpose les idées de ces auteurs au présent cas, il apparaît que les fonctions physiologiques fondamentales pour lesquelles la MT joue un rôle seraient très intégrées et très affectées de contraintes à l'adaptation et cela restreindrait tout changement possible. Pourtant, les espèces animales développeraient une tolérance accrue aux métaux toxiques, *grâce à la métallothionéine*, entre autre par (trajectoires évolutives) la multiplication de copies du gène MT (amplification: discuté antérieurement et voir chapitre 3), et l'apparition d'isoformes de métallothionéine répondant spécifiquement à certains métaux (voir Brouwer *et al.*, 1992).

1.3.4 Objectifs et hypothèses

Considérant d'une part, les efforts considérables de recherche qui sont déployés dans l'étude des métallothionéines chez une diversité d'organismes vivants et, d'autre part, l'ampleur du problème de contamination des milieux aquatiques par les substances toxiques, il est surprenant de constater le peu de connaissances que nous avons du comportement de ces protéines dans l'environnement naturel. Le présent travail s'inscrit dans cette problématique. Les objectifs généraux sont d'élucider le mécanisme de détoxification impliquant la métallothionéine qui prévaut chez un invertébré benthique vivant en milieu contaminé et d'évaluer le potentiel qu'offre cette protéine comme indicateur biochimique précoce d'exposition et de stress *in situ* causé par les métaux traces. L'organisme retenu est le bivalve d'eau douce *Anodonta grandis* Say 1829. Nous l'avons sélectionné parce que:

- (i) les mollusques sont généralement reconnus comme des biomoniteurs de pollution métallique; les qualités requises d'un tel biomoniteur profiteraient bien à un indicateur biochimique comme la MT;
- (ii) ce bivalve possède la faculté de fortement bioconcentrer les métaux traces;
- (iii) nous avons mis en évidence la présence de métallothionéine dans ses tissus (discuté au chapitre 2);
- (iv) d'abondantes populations de cette espèce prospèrent dans la région de notre étude.

Une caractéristique importante d'un système de détoxification est que son activité s'accroît en fonction de la concentration ambiante de la substance toxique. L'étude multi-lacustre présentée au chapitre 2 a ainsi pour but d'éprouver les hypothèses suivantes:

H₁: la biosynthèse de métallothionéines peut effectivement être induite à des niveaux de contamination typiques de ceux rencontrés dans les sédiments pollués;

H₂: les concentrations de métallothionéine dans le bivalve *A. grandis* répondent de façon dépendante (ou, si l'on préfère, conformément à une relation concentration-réponse) à une biodisponibilité accrue de métal dans l'environnement.

L'expérience de transplantation décrite au chapitre 3 comporte le transfert de spécimens d'*A. grandis* d'un lac relativement peu pollué vers un lac très pollué en Cd, et Zn. Nous espérons de cela

tirer une évaluation assez juste du potentiel de la métallothionéine de ce bivalve comme indicateur biochimique. Nous nous guidons en cela sur des critères bien établis pour ce genre d'indicateur; ils sont présentés dans ledit chapitre. Un modèle de cytotoxicité, élaboré par d'autres chercheurs, est testé lors de cette expérience avec, comme élément hypothétique déclencheur, le métal toxique non lié à la MT dans le cytosol cellulaire.

Les chapitres 2 et 3 sont des chapitres indépendants comprenant chacun une introduction, une section traitant du matériel et des méthodes, une section résultats et discussion ainsi qu'une conclusion.

Le chapitre 4, la conclusion, fait état des perspectives de recherche, c'est-à-dire de ce qu'il faut entreprendre pour continuer à bien ce travail. L'ensemble des conclusions de notre projet tient dans le tableau synoptique no 3.9 à la fin du chapitre 3.

Rappelons qu'un chapitre traitant uniquement des méthodes expérimentales n'est pas prévu dans cet ouvrage. Plutôt, des annexes fournissent la méthodologie détaillée du dosage de la métallothionéine chez *A. grandis*, ainsi qu'une description des expériences effectuées pour établir les divers protocoles expérimentaux utilisés dans ce projet.

**Réponse des concentrations de métallothionéine chez le bivalve *Anodonta grandis*
à un gradient environnemental de cadmium ¹**

¹ Couillard, Y., P. G. C. Campbell et A. Tessier. 1993. *Limnol. Oceanogr.* 38: 299-313.

2.1 Introduction

Les mollusques marins et d'eau douce sont généralement reconnus pour leur capacité à bioconcentrer les métaux de leur environnement (Phillips, 1980). Leur tolérance à des contenus élevés en métaux traces a été attribuée à l'existence de mécanismes de détoxification, impliquant la capture des espèces métalliques diffusant dans la cellule par des ligands spécifiques présents dans le cytosol (Viarengo, 1989). Nous avons évoqué au chapitre 1 plusieurs éléments qui font qu'en principe la métallothionéine est bien placée pour exercer une telle fonction (voir aussi Stegeman *et al.*, 1992). A titre d'exemple, lorsque la moule marine *Mytilus edulis* est exposée au préalable à des concentrations suffisantes de Cd, Cu ou Zn pour induire la synthèse de métallothionéines, elle acquiert une tolérance accrue au mercure inorganique (Roesijadi et Fellingham, 1987).

Cependant, la plupart des résultats appuyant l'idée que les organismes aquatiques synthétisent de la métallothionéine en guise de défense contre les métaux toxiques proviennent d'essais en laboratoire pour lesquels les conditions d'exposition ont différé considérablement de celles retrouvées en nature (échelles de temps, voies d'exposition et gamme de concentrations d'exposition très différentes). Nous avons discuté au chapitre 1 de la diversité des rôles attribués à la MT. Ceci, doublé du manque de naturel des expériences de laboratoire, ont soulevé des doutes quant à l'implication fondamentale des métallothionéines dans la détoxification des métaux chez les animaux aquatiques vivant dans leur environnement naturel (Cosson *et al.*, 1991).

Un important critère à considérer pour proclamer un système de détoxification opérationnel est que l'activité de ce dernier s'accroît en fonction de la concentration du toxique (Simkiss *et al.*, 1982). Dès lors, nous avons vérifié dans la présente étude l'hypothèse que les concentrations de métallothionéine dans le bivalve d'eau douce *Anodonta grandis* augmentent en fonction (ou suivant une relation concentration-réponse) d'une biodisponibilité accrue du Cd dans l'environnement. L'étude complémentaire de Tessier *et al.* (1993) a examiné la répartition du Cd entre les sédiments de fond et les eaux sus-jacentes; elle explique de façon détaillée un modèle géochimique servant à estimer les concentrations environnementales de Cd²⁺, et elle explore les relations entre les valeurs de [Cd²⁺] et les concentrations tissulaires de Cd chez *A. grandis*.

2.2 Région d'étude

Un relevé préliminaire dans la région minière de Rouyn-Noranda dans le nord-ouest québécois nous a indiqué les présences requises d'un gradient spatial de contamination métallique et de populations de bivalves tout au long de ce gradient. D'importantes opérations minières et d'extraction par fusion se sont déroulées sur ce territoire depuis 1927. Les émissions atmosphériques annuelles du complexe de raffinage de cuivre de Rouyn-Noranda incluaient en 1977 485,000 tonnes métriques de SO₂, 75 tonnes de Cd, 34 tonnes de Cu, 1,540 tonnes de Pb, 610 tonnes de Zn et 16 tonnes de Hg. Des émissions plus modestes de Bi, Co, Fe, Ni, Sb, Se et Te étaient également rapportées (BEST, 1979a). Un relevé effectué en 1982 par Arafat (1985) indiquait que les sédiments de surface de lacs situés dans un rayon inférieur à 10 km du complexe étaient sévèrement pollués par du Cu, du Zn et du Pb. Les facteurs d'enrichissement ($[M]_{0-7 \text{ cm}}/[M]_{\text{bruit de fond}}$) s'établissaient respectivement à 118 et à 166 pour le Zn et le Cu. Des dispositifs de contrôle de la pollution de l'air et de l'eau ont récemment été installés, mais les sédiments superficiels des lacs environnants reflètent encore la contamination passée.

Onze lacs, de niveaux de contamination différents en Cd, Cu et Zn, ont été sélectionnés le long du gradient spatial identifié précédemment. Des sédiments, les eaux immédiatement au-dessus de ces sédiments (sus-jacentes) et des bivalves ont été récoltés du 12 au 25 juin 1989 à un seul site littoral dans chaque lac (figure 2.1). La source principale de pollution métallique pour ces lacs semble être les émissions atmosphériques du complexe de Rouyn-Noranda; en effet, aucune opération minière ni aucun déblai minier n'ont été vus dans les bassins versants immédiats autour des plans d'eau. D'après les conditions météorologiques normales prévalant sur la région, 9 des 11 sites choisis sont affectés par les vents dominants en provenance des activités de raffinage de Rouyn-Noranda.

Tous les lacs étudiés, ayant une altitude moindre que 300 m, reposent sur des dépôts glaciolacustres riches en argile et limon, laissés par le lac postglaciaire Barlow-Ojibway. Les terres plus élevées sont habituellement composées de roches précambriennes ignées et métamorphiques (carte de la géologie des formations de surface no 1639A; Commission géologique du Canada; Ministère de l'Énergie, des Mines et des Ressources du Canada, 1987).

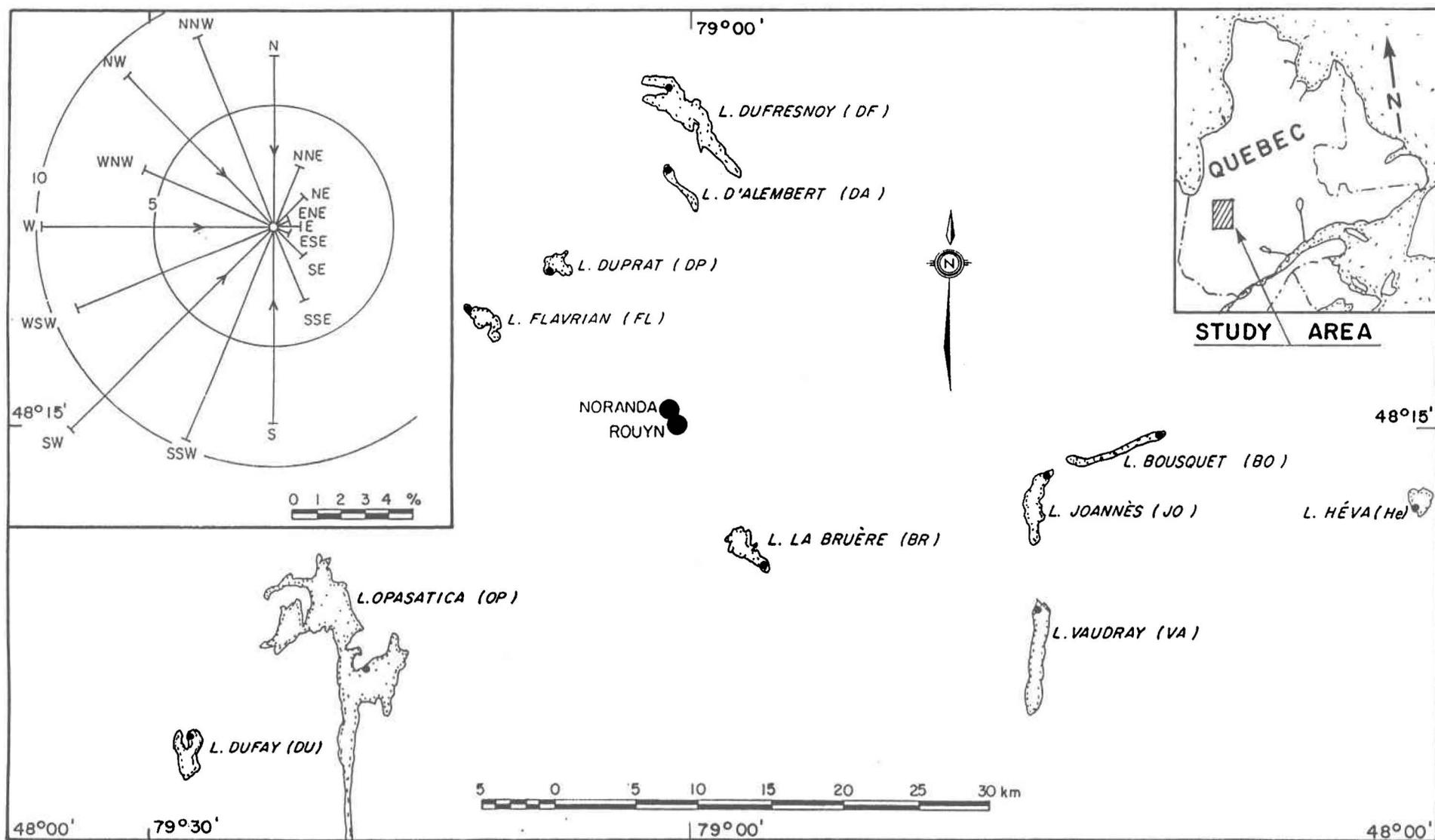


Figure 2.1: Localisation des sites d'échantillonnage pour l'étude multi-lacustre. La direction moyenne des vents au complexe minier de Rouyn-Noranda sont indiquées

2.3 Méthodologie

2.3.1 Echantillonnage et analyse des sédiments

A chaque station, des plongeurs autonomes ont récolté 3 ou 4 carottes de sédiment, à l'intérieur des limites de la surface de collecte des bivalves. Les carottes étaient extrudées sur la rive et les couches oxygènes, c.-à.-d. le 0.5 cm superficiel, étaient recueillies et mélangées pour former un échantillon composite. Celui-ci était alors mis dans une bouteille à centrifugation en polypropylène préalablement lavée à l'acide; ensuite, il était recouvert d'eau du lac, acheminé au laboratoire de l'INRS-Eau à une température de $\approx 4^{\circ}\text{C}$, et entreposé à -20°C jusqu'aux analyses (à l'intérieur d'un mois). Au moment des analyses, les échantillons étaient décongelés, centrifugés à $13,700 \times g$ pour 30 min et les surnageants étaient jetés. Les gros fragments sédimentaires étaient retirés avec des pinces en polypropylène (p.ex.: cailloux, fragments de coquille, racines), puis une quantité de sédiment correspondant à ≈ 1 g en poids sec était soumise à une extraction avec une solution de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 0.04 M dans 25% (vol/vol) d'acide acétique, à 96°C , pour 6 h. Cette extraction devait libérer en solution les métaux non-détritiques associés aux carbonates, aux oxyhydroxydes de Fe et de Mn amorphes, ou adsorbés sur la matière organique particulaire (CNRC, 1988). Un second ensemble de sédiments a été prélevé de façon similaire aux mêmes stations dans le cadre d'une étude complémentaire (Tessier *et al.*, 1993). Ce second ensemble fut utilisé pour mesurer les variables géochimiques nécessaires à l'estimation de la répartition du Cd dans les sédiments de surface et à l'estimation de $[\text{Cd}^{2+}]$ à l'interface eau-sédiment. Ces variables sont: le carbone organique, la {Fe-ox} amorphe et le Cd total, {Cd}_T. Notons que les symboles { } et [] réfèrent tout au long du texte respectivement aux concentrations d'espèces solides et dissoutes.

Les concentrations de Fe, Cd, Cu et Zn dans les extraits de sédiment ont été mesurées par spectrophotométrie d'absorption atomique à la flamme (Varian Spectra AA-20). Le contenu en Hg des sédiments fut déterminé par spectrophotométrie d'absorption atomique par vapeur froide (Varian AA VGA 76), à la suite d'étapes de digestion acide (HNO_3) et de réduction du Hg (SnCl_2). Les concentrations de carbone organique sédimentaire, {C-org}, furent mesurées par combustion (analyseur Carlo-Elba CNS, modèle NA 1500) après avoir éliminé le carbone inorganique par acidification avec une solution d' H_2SO_4 0.05 M (15 min, 100 mL par g sec de sédiment).

2.3.2 Echantillonnage et analyse de l'eau

Des échantillons d'eau, destinés à la détermination des métaux dissous totaux ($[Cd]_d$, $[Cu]_d$ et $[Zn]_d$), ont été récoltés à une seule occasion à chaque site littoral. Pour tous les lacs, à l'exception des lacs Joannès et La Bruère, les échantillons furent pris par des plongeurs à ≈ 10 cm au-dessus des sédiments à l'aide de bouteilles de téflon propres. Chaque prélèvement était, peu de temps après, filtré à travers une membrane de polycarbonate pré-lavée ($0.4 \mu m$, Nuclepore). Les premiers 4 mL du filtrat étaient jetés; le volume subséquent de 2 mL était transféré dans une bouteille de téflon propre et acidifié avec 200 μL d'acide nitrique ultrapur (J.T. Baker Chemical Co., grade Ultrex, 0.1N). Pour les lacs Joannès et La Bruère, les métaux dissous totaux furent prélevés par dialyse *in situ* respectivement au cours des étés 1987 et 1988 (Tessier *et al.*, 1993). Les métaux ont été dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme (Varian Spectra AA-30 équipé d'un four au graphite modèle GTA-96).

Les valeurs obtenues par AA sans flamme d'un échantillon d'eau de référence (SLRS-1, Riverine Water Reference Material, Conseil national de Recherches du Canada) étaient à l'intérieur de 7% des valeurs certifiées pour le Cu et Zn; la concentration de Cd de l'échantillon de référence était trop proche de la limite de détection de notre appareil pour permettre une comparaison adéquate. Des témoins, faits d'eau désionisée, ayant subi les mêmes étapes de filtration et de préservation que les échantillons, ont affiché une contamination basse mais non négligeable (Cd: 0.2 nM; Cu: 4.6 nM; Zn: 10 nM). De plus, la filtration additionnelle d'un échantillon déjà filtré (du lac Héva) à travers un nouveau filtre de polycarbonate n'a pas eu d'effet sur les concentrations de métaux traces mesurées, suggérant ainsi que les pertes par adsorption durant l'étape de filtration n'étaient pas importantes.

De grandes précautions furent prises durant la préparation du matériel dans le but de minimiser sa contamination, spécialement par le Zn. Tout le matériel plastique fut trempé pendant 24 h dans une solution d' HNO_3 5%, ensuite dans une solution d' HCl 7% pour finalement être rincé soigneusement avec de l'eau désionisée. Les membranes filtrantes furent installées dans leurs porte-filtres sous une hotte à flux laminaire; ces assemblages furent alors mis dans des sacs de polyéthylène faible-densité et ne furent utilisés qu'une fois. Sur le terrain, le temps de contact de l'échantillon et de l'air ambiant était réduit au minimum.

Les échantillons d'eau destinés aux déterminations de pH, d'alcalinité, de Ca et de carbone organique dissous ont été récoltés à ≈ 10 cm au-dessus des sédiments dans des bouteilles de polyéthylène lavées à l'acide et rincées avec de l'eau du lac au moment du prélèvement. Des prélèvements, obtenus de la même façon, ont été pris à plusieurs autres occasions durant l'été pour l'obtention de moyennes saisonnières de pH; le pH moyen = $-\log_{10} (\Sigma [H^+]/N)$. Le Ca fut mesuré par spectrophotométrie d'absorption atomique à la flamme avec l'addition d'un agent de suppression ionique La-Cs (2000 mg L^{-1}). Le carbone organique dissous fut mesuré par une oxydation au persulfate en présence d'irradiation aux rayons ultraviolets, suivie d'une détermination par conductivité du CO_2 relargué. L'alcalinité a été déterminée par une titration Gran.

2.3.3 Récolte et analyse des bivalves

Les plongeurs recueillirent, à chaque site d'étude, 20 spécimens du bivalve *A. grandis* filtrant activement et de taille uniforme (taille recherchée ≈ 8 cm; les moyennes par site fluctuèrent en réalité entre 7.3 et 8.5 cm). L'échantillonnage fut réalisé en juin afin de pallier de possibles complications causées par le cycle de reproduction; ainsi, aucun des organismes ne fut trouvé gravide. La surface de cueillette à chaque site couvrait de 300 à $1,500 \text{ m}^2$ (rayon approximatif: 10 - 22 m). Les animaux étaient disséqués dans les 12 h suivant la récolte en trois groupes de tissus: les branchies, la glande digestive et les restes (manteau, pied, masse viscérale, palpes labiaux, reins, coeur, muscles... auxquels nous référerons comme étant le "corps"). Afin de minimiser l'influence de la matière particulaire ingérée sur le contenu en contaminants du corps (Hare *et al.*, 1989), les contenus des tracts digestifs étaient évacués par un jet d'eau désionisée appliqué aux ouvertures. Les parties de cinq spécimens étaient réunies pour constituer un échantillon composite; quatre replicata par tissu était ainsi obtenu par site. Chaque replicat tissulaire était placé dans deux sacs de polyéthylène: l'intérieur scellé sous vide, et l'extérieur rempli d'azote. Le tout était ensuite congelé à -40°C jusqu'au moment de l'homogénéisation effectuée 2 semaines à 5 mois plus tard.

Les tissus partiellement décongelés étaient homogénéisés à l'aide d'un broyeur électrique (Brinkman "Kinematica" CH-6010) dans un poids égal d'une solution NaCl 0.9% maintenue à près de 0°C (pour la glande digestive, un poids de solution équivalent à $4 \times$ le poids des tissus fut utilisé). L'homogénéisation se déroulait dans un sac à gants gonflé d'azote ("Atmosbag", Aldrich Chemical

Co.), afin de minimiser l'oxydation de MT durant cette opération, et les tissus homogénéisés étaient gardés sur la glace. Ensuite, un sous-échantillon de 3 mL était centrifugé à $30,000 \times g$ pour 30 min, à 4°C , et le surnageant résultant était analysé le même jour pour la métallothionéine par la méthode de saturation au Hg décrite ci-dessous. Des sous-échantillons additionnels de l'homogénat étaient réservés à l'évaluation des concentrations de Cd, Cu et Zn et à la mesure du ratio {poids sec/poids humide}. L'indice de condition suivant a été calculé pour chaque réplicat (Davenport et Chen, 1987):

$$\frac{\text{poids sec total de chair des spécimens (g)}}{\text{volume total intervalvaire (mL)}} \times 1,000 \quad (2.1)$$

Cet indice est couramment employé et implique des mesures facilement effectuées.

Essai de saturation au mercure pour mesurer les métallothionéines

Les concentrations de métallothionéine dans les parties corporelles furent mesurées par l'entremise d'un essai de saturation au Hg, dans lequel le surnageant d'homogénat était incubé dans un excès de ^{203}Hg en présence de 10% d'acide trichloroacétique (figure 2.2). Dutton *et al.* (1993) ont démontré que cette méthode était simple, spécifique et rapide. Une substitution réussie du Cu (96% de relâchement), du Cd et du Zn par le Hg fut obtenue par ces auteurs dans des tentatives avec de la MT hépatique de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*); cette MT est connue pour renfermer un fort contenu en Cu. La surestimation caractéristique de MT dont souffrait la méthode originale de Piotrowski *et al.* (1973) fut surmontée par Dutton et ses collègues, en ajoutant dans leur procédure une protéine accessoire ("exogenous": albumine d'oeuf) ayant pour tâche de récupérer le Hg lié à des ligands cytosoliques autres que MT.

L'essai de saturation au Hg décrit par Dutton *et al.* (1993) fut adapté avec de légères modifications à notre étude. Nous avons substitué de l'hémoglobine fraîche de rat à l'albumine d'oeuf en tant que protéine accessoire; la première formait un culot plus ferme après centrifugation, et cela facilitait l'aspiration par pipette du surnageant pour le comptage γ . Les dilutions en série recommandées par Dutton *et al.* (1993) pour évaluer l'importance de la liaison non spécifique du Hg (en fin d'essai) furent employées dans des expériences préliminaires avec différents tissus de

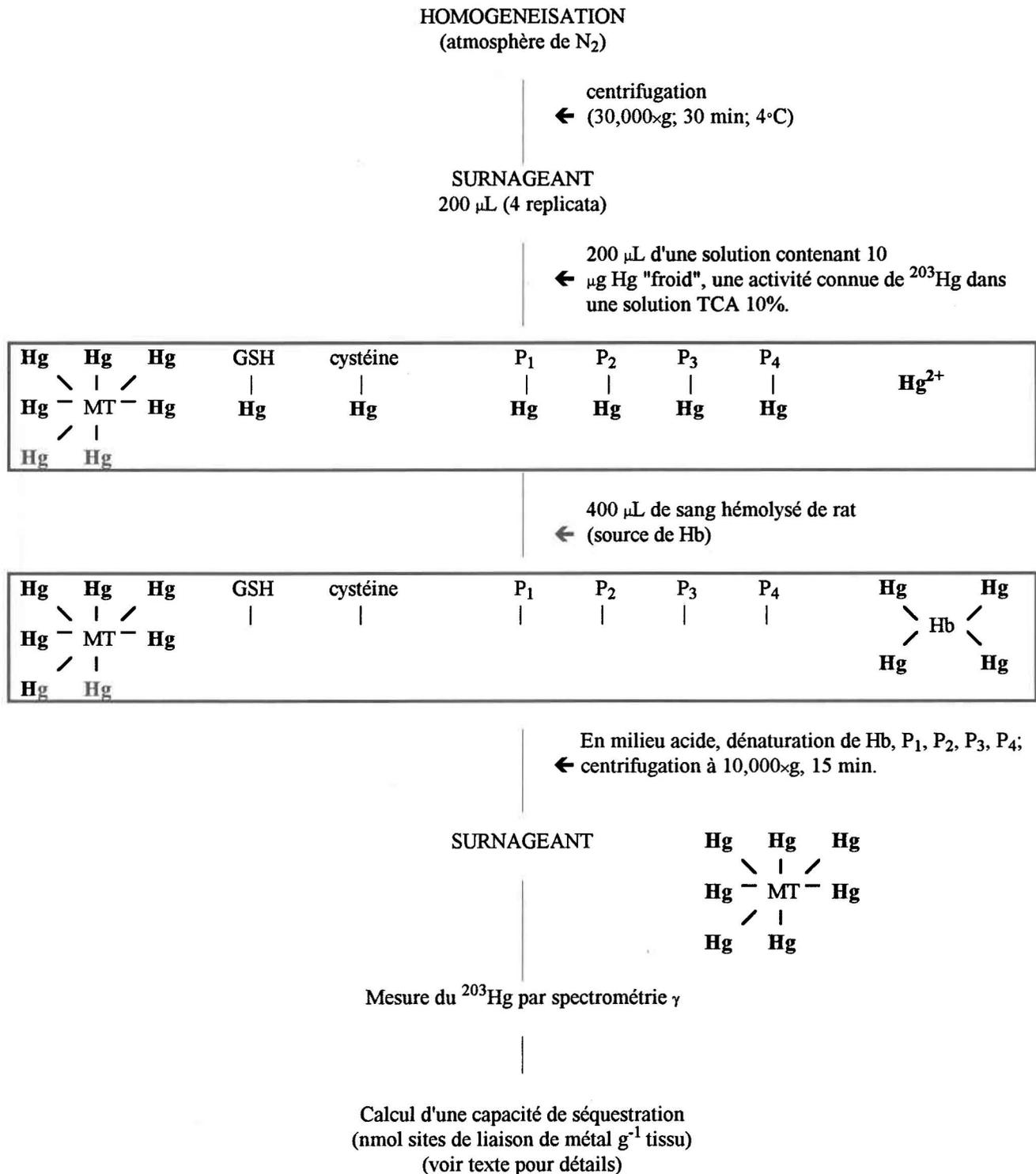


Figure 2.2: Diagramme des étapes de l'essai de saturation au ²⁰³Hg pour mesurer les métallothionéines. Le lecteur pourra consulter l'annexe 3 pour la description détaillée de l'essai, et l'annexe 4 pour les expériences réalisées pour adapter cet essai à des tissus de mollusques. Abréviations: GSH: glutathione; P₁, P₂, P₃, P₄: enzymes et protéines labiles dans le surnageant; Hb: hémoglobine; TCA: acide trichloroacétique.

mollusques. Comme il fut constaté que la liaison non-spécifique du mercure n'était pas importante, les dilutions en série furent abandonnées lors de l'usage routinier de cette méthode. Lors d'un essai modifié, nous avons ajouté un étalon interne ("internal standard") de MT de foie de lapin commercialement disponible (Sigma Co.) à un homogénat de tissu de bivalve avant l'ajout de ^{203}Hg ; la récupération de l'étalon a atteint $96 \pm 1\%$ ($N=4$: annexe 4). De plus, nous avons dosé la MT dans des tissus qui avaient été entreposés pour 15 ou 60 j à -40°C , sous atmosphère d'azote; ces concentrations se sont avérées non significativement différentes de celles déterminées à $t = 0$ j sur des échantillons frais des mêmes tissus (annexe 4). Nous concluons que notre procédure de conservation des tissus était appropriée.

Les concentrations de métallothionéine dans cet ouvrage sont exprimées en nmoles de sites de liaison de métal par gramme de tissu sec (c'est en quelque sorte les concentrations de Hg en fin d'essai). Les concentrations totales dans l'organisme, $[\text{MT}(\text{org.})]$, ont été calculées comme suit:

$$[\text{MT}(\text{org.})] = \frac{\sum [\text{MT}(\text{tissu})]_i W_i}{\sum W_i} \quad (2.2)$$

où $[\text{MT}(\text{tissu})]_i$ et W_i sont respectivement la concentration de métallothionéine et le poids sec du i -ème tissu. La récupération d'un étalon MT de foie de lapin (Sigma Co.) variait entre 85 et 121% pour les branchies, entre 77 et 102% pour la glande digestive et entre 91 et 101% pour le corps. La précision de la moyenne ($S_{\bar{X}}/\bar{X}$) pour les concentrations de MT, telle qu'estimée à partir des 4 replicata à chaque site, variait de 4 à 20% (moy. 13%), de 2 à 39% (moy. 17%), de 3 à 23% (moy. 11%) et de 3 à 16% (moy. 9%) respectivement pour les branchies, la glande digestive, le corps et l'organisme entier.

Analyse des tissus en métaux

Aux fins de ces analyses, une quantité d'homogénat tissulaire équivalant à 100 mg en poids sec était pipetée dans un réacteur de téflon de 30 mL (Parr Instrument Co.) et gardée 2 h dans une étuve chauffée à 70°C . De l'acide nitrique concentré ultrapur (3 mL; BDH Chemicals; grade Aristar) était alors ajouté et la digestion s'effectuait dans un four à micro-ondes (700 watts, ≤ 2 min) pendant un

temps suffisant pour atteindre une pression $\approx 6,900$ kPa. On ajoutait alors aux échantillons digérés et refroidis de l'eau désionisée pour un volume total de 25 mL et les concentrations de Cd, Cu et Zn étaient déterminées par spectrométrie d'émission atomique à plasma (Thermo Jarrell Ash, Atom Scan 25; lecture séquentielle). Un échantillon de référence d'un poids avoisinant 100 mg (U.S. Nat. Inst. Std. Technol.; Oyster tissue, SRM no 1566) était digéré à toutes les deux sessions de travail. Les concentrations de métaux traces obtenues variaient peu dans le temps (C.V. 1 - 12%, N = 6) et se trouvaient à l'intérieur des limites de variation certifiées pour cet échantillon de référence (Cd: 3.5 ± 0.4 [intervalle de confiance à 95%] $\mu\text{g g}^{-1}$ p. sec; Cu: 63.0 ± 3.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ p. sec; Zn: 852 ± 14 $\mu\text{g g}^{-1}$ p. sec). Des témoins de digestion furent également faits et une contamination faible à négligeable fut détectée (Cd: 1.8 nmol g^{-1} p. sec; Cu: 4 nmol g^{-1} p. sec; Zn: 11 nmol g^{-1} p. sec; N = 6).

Les concentrations métalliques dans l'organisme entier, $[M(\text{org})]$, ont été calculées de la même manière que $[MT(\text{org})]$ (éq. 2.2). La précision de la moyenne ($S_{\bar{x}}/\bar{X}$), telle qu'estimée à partir des 4 replicata à chaque site, est similaire pour tous les tissus pour un métal donné: $\approx 16\%$ pour le Cd, $\approx 12\%$ pour le Cu et $\approx 8\%$ pour le Zn.

Dans le but de minimiser la contamination par les éléments traces, tout le matériel de laboratoire était laissé à tremper dans une solution d'acide nitrique 15% pendant 24 h pour ensuite être rincé répétitivement dans l'eau désionisée avant usage. De l'eau hautement purifiée pour l'usage analytique (désionisée: > 17 Mohms cm^{-1}) était générée à partir d'un système commercial pourvu de résines échangeuses d'ions, de colonnes d'adsorption au charbon et de membranes filtrantes (0.2 μm).

Analyses statistiques

Les relations entre les concentrations tissulaires (MT; métaux) et les différentes variables environnementales furent initialement examinées à l'aide de diagrammes de dispersion bidimensionnels; ces relations étaient alors évaluées par le coefficient de corrélation de Pearson (r) et sa probabilité associée. La supposition de normalité requise par la corrélation de Pearson a été généralement respectée avec les données brutes (non-transformées).

2.4 Résultats et discussion

2.4.1 Gradient de contamination

La région d'échantillonnage présente un gradient de contamination assez étendu, comme le lecteur peut en juger à partir des tableaux 2.1 et 2.2. Les variations de concentrations les plus considérables sont pour le Cd, le Cu et le Zn extraits des sédiments de surface oxygènes avec une solution réductrice, $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}/\text{HOAc}$ (les ratios des valeurs maximum/minimum ≈ 25). Les activités de l'ion H^+ , les valeurs d'alcalinité Gran et les concentrations de Zn dissous ($[\text{Zn}]_d$) montrent également une variabilité inter-lacustre appréciable, alors que les variables restantes (Ca, carbone organique dissous, $[\text{Cd}]_d$, $[\text{Cu}]_d$) fluctuent moins. Tel que prévu, les concentrations sédimentaires les plus élevées sont retrouvées dans les lacs affectés par les vents dominants en provenance de la raffinerie de cuivre de Rouyn-Noranda; il s'agit des lacs D'Alembert, Duprat, Flavrian, Joannès, La Bruère et Vaudray (voir la figure 2.1). Les lacs choisis ne paraissent pas pollués par le mercure, également un inducteur potentiel de biosynthèse de MT. Les concentrations de Hg des sédiments superficiels sont comprises dans la variation géochimique normale de ce territoire: de 0.10 à 0.45 nmol Hg g^{-1} en poids sec (tel que déterminé dans les strates antérieures à 1900 dans des carottes de sédiments lacustres, [BEST, 1979b]-tableau 2.2).

Les concentrations tissulaires d' *A. grandis* varient aussi tout au long du gradient de contamination (tableau 2.3), mais à un degré moindre toutefois que les concentrations sédimentaires. La variabilité inter-lacustre dans les concentrations tissulaires des métaux est plus forte pour le Cd que pour le Cu et le Zn; pour un métal donné, l'étendue est plus grande pour les branchies que pour les autres tissus. Les niveaux de Zn dans les parties corporelles d' *A. grandis* restent relativement constants en dépit de la présence d'un gradient environnemental appréciable de Zn (tableaux 2.1 et 2.2). Ceci peut refléter le fait que le Zn est un élément essentiel et qu'il existe une forme de contrôle homéostatique sur les teneurs de Zn tissulaires. Langston et Zhou (1986) ont en effet observé que les concentrations totales de Cu et de Zn dans le gastéropode *Littorina littorea* ne répondaient pas aux fluctuations spatiales de contamination en Cu et en Zn au long des côtes de la Grande Bretagne.

Tableau 2.1

Superficie des lacs étudiés et caractéristiques géochimiques de l'eau près de l'interface eau-sédiment à chaque site d'échantillonnage. Le pH moyen a été estimé à partir de séries temporelles (juin à octobre) alors que les autres variables n'ont été déterminées qu'une fois (juin 1989, sauf indication contraire).

Lac (code; aire en ha).	Ca (10^{-4} M)	alcalinité Gran ($\mu\text{eq L}^{-1}$)	C org. diss. COD (mg C L^{-1})	pH moyen	Cd (nM)	M dissous Cu (nM)	Zn (nM)
Bousquet (BO; 176)	1.05	147	9.7	6.34	2.8	63	205
D'Alembert (DA; 109)	1.19	173	6.5	7.14	2.1	101	108
Dufay (DU; 435)	0.85	529	7.2	6.51	2.1	56	53
Dufresnoy (DF; 1158)	1.66	328	10.9	7.17	1.0	75	49
Duprat (DP; 218)	1.88	326	7.7	7.10	1.2	145	162
Flavrian (FL; 308)	1.58	108	6.4	7.39	2.7	74	245
Héva (HE; 228)	0.59	47	7.1	6.18	2.2	38	142
Joannès (JO; 430)	1.70	287	---	7.22	1.1 ^a	51 ^a	42 ^a
La Bruère (BR; 388)	3.44	298	---	7.33	0.8 ^a	113 ^a	15 ^a
Opasatica (OP; 5128)	1.65	292	6.5	7.39	0.8	56	40
Vaudray (VA; 746)	0.90	93	6.5	6.56	1.2	53	174
max./min.	5.8	11	1.7	16 ^b	3.5	3.8	16

^a Déterminations avec des dialyseurs.

^b Ratio calculé à partir de $[\text{H}^+]$ plutôt que pH.

Tableau 2.2

Caractéristiques géochimiques des sédiments de surface des lacs étudiés. L'estimation de la concentration de Cd^{2+} à partir des équilibres de sorption eau-sédiment est décrite dans le texte et en détail en annexe 1.

Lac	M extraits avec $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (nmol g^{-1})		Métal total (nmol g^{-1})		Phases de sorption ($\mu\text{mol g}^{-1}$)		[Cd^{2+}] calculées (nmol L^{-1})
	{Cu}	{Zn}	{Hg}T	{Cd}T	{Fe-ox} ^a	{OM} ^b	
Bousquet (BO)	28	1,300	0.32	33	207	3,415	1.77
D'Alembert (DA)	102	2,700	0.26	93	119	6,530	0.47
Dufay (DU)	25	430	0.12	9.1	88	1,175	0.88
Dufresnoy (DF)	67	800	0.31	18	126	3,250	0.17
Duprat (DP)	114	4,280	0.15	66	86	5,120	0.46
Flavrian (FL)	70	2,100	0.15	28	123	4,200	0.12
Héva (HE)	25	750	0.16	10	122	1,840	1.43
Joannès (JO)	112	2,260	---	62	120	4,675	0.32
La Bruère (BR)	547	1,600	---	36	73	1,095	0.68
Opasatica (OP)	54	150	0.10	4.4	41	260	0.28
Vaudray (VA)	88	1,200	0.10	38	129	1,885	2.22
max./min.	22	28	3.3	21	5	25	18

^a Fe-ox = oxyhydroxydes de fer amorphes, extraits du sédiment avec une solution de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$.

^b Matière organique (concentration exprimée en $\mu\text{mol C organique g}^{-1}$).

Tableau 2.3

Concentrations moyennes de métallothionéine (MT: nmol sites de liaison de métal g⁻¹ p. sec) et de métal (nmol M g⁻¹ p. sec) dans les tissus du bivalve d'eau douce *Anodonta grandis* récolté dans 11 lacs de la région minière de Rouyn-Noranda. Les variations de la moyenne sont fournies dans la section 2.3.3 (N = 4).

Lac	Branchies				Glande digestive				Corps				Organisme entier			
	MT	Cd	Cu	Zn	MT	Cd	Cu	Zn	MT	Cd	Cu	Zn	MT	Cd	Cu	Zn
BO	195	1,390	1,470	9,060	358	430	445	1,630	365	610	260	2,380	287	710	630	3,980
DA	238	2,130	3,540	9,070	319	365	590	1,460	269	420	300	1,820	270	710	900	3,020
DU	220	770	710	4,460	232	420	330	1,480	244	340	150	1,500	237	450	300	2,180
DF	154	340	870	4,100	242	180	320	1,330	173	90	130	1,270	183	140	280	1,710
DP	217	720	6,180	11,890	258	70	990	1,730	253	90	300	1,580	249	160	1,070	2,830
FL	129	490	1,070	5,110	232	200	470	1,380	198	140	270	1,260	192	200	410	1,830
HE	262	1,170	820	4,040	310	580	390	1,710	359	420	130	1,490	330	620	330	2,130
JO	199	2,050	2,500	6,400	387	380	370	1,430	421	660	390	2,170	339	1,150	1,160	3,650
BR	156	740	5,370	12,320	307	240	630	1,340	259	240	390	1,600	240	350	1,520	3,970
OP	100	260	860	5,520	212	170	370	1,390	178	130	230	1,790	163	170	400	2,670
VA	408	2,400	2,540	5,860	292	540	370	1,460	436	480	150	1,450	414	840	610	2,260
<u>max.</u> <u>min.</u>	4.1	9.1	8.7	3.1	1.8	7.9	3.1	1.3	2.5	7.3	3.0	1.9	2.5	8.0	5.5	2.3

Les concentrations de Cu et de Zn rapportées au tableau 2.3 ne sont pas exceptionnelles pour les mollusques lamellibranches d'eau douce (*cf.* Manly et George, 1977: 340 - 1,630 nmol Cu g⁻¹, 6,170 - 27,800 nmol Zn g⁻¹), mais les niveaux de Cd sont considérablement plus élevés que ceux remarqués chez les populations indigènes d'écosystèmes non perturbés. Par exemple, dans leur étude Manly et George mentionnent des valeurs s'échelonnant de 4 à 52 nmol Cd g⁻¹, bien en-deçà de notre gradient allant de 140 à 1,150 nmol g⁻¹. Dans notre étude complémentaire, des teneurs aussi faibles que 25 à 70 nmol Cd g⁻¹ furent obtenues pour des mollusques de lacs non affectés par des activités minières (Tessier *et al.*, 1993). Malley *et al.* (1989) ont trouvé une concentration totale de Cd de ≈ 36 nmoles g⁻¹ en poids sec pour des spécimens d' *A. grandis* vivant dans un lac non perturbé du Bouclier Canadien dans l'ouest ontarien (0.01 ± 0.001 nM Cd dissous). De même, Segar *et al.* (1971) rapportent des concentrations de 11, 47 et 1,835 nmol g⁻¹ en poids sec respectivement pour le Cd, le Cu et le Zn dans des bivalves du genre *Anodonta* cueillis dans un lac très peu contaminé en Irlande.

2.4.2 Relations entre les niveaux tissulaires de métallothionéine et de métaux

Un travail précédent dans notre laboratoire (Legrand *et al.*, 1987) mit en évidence la présence d'une protéine semblable à la métallothionéine ("metallothionein-like protein") dans les branchies et la glande digestive de spécimens d'*A. grandis*; ils avaient été préalablement exposés à des concentrations artificiellement élevées de Cd en laboratoire. Cette protéine se liant au Cd, au Cu et au Zn fut subséquemment isolée de spécimens récoltés dans des lacs de la région minière de Rouyn-Noranda. Cette protéine peut être désignée métallothionéine (métallothionéine de Classe I de Fowler *et al.*, 1987) en vertu de ses caractéristiques suivantes: un poids moléculaire de ≈ 10 kDaltons, son comportement chromatographique sur gel d'exclusion (Sephadex), son spectre d'absorption dans l'UV, sa stabilité à la suite d'un traitement acide ou à la chaleur, son comportement polarographique et son contenu en groupements sulfhydryl (un ratio de 0.3 groupe ⁻SH par résidu d'acide aminé).

A l'instar des niveaux métalliques des tissus, les variations dans les concentrations de métallothionéine au long du gradient de contamination s'avèrent plus grandes pour les branchies que pour la glande digestive ou le corps (tableau 2.3). Pour les branchies ou le corps pris séparément, ou pour l'organisme entier reconstitué, les niveaux de MT étaient significativement corrélés avec les concentrations de Cd dans les parties considérées (figure 2.3a, tableau 2.4). Par contraste, de telles

corrélations ne furent pas observées entre [MT] et les niveaux de Cu ou de Zn dans les tissus individuels ou dans l'organisme reconstitué (figure 2.3b et c). Des analyses en régression multiple ont été menées avec la [MT] comme variable prédite et les [Cd], [Cu] et [Zn] comme variables prédictives, respectivement pour les branchies, le corps ou l'organisme entier. Celles-ci nous confirmèrent que seul [Cd] est un prédicteur significatif de [MT] à l'intérieur de notre aire d'étude ($P < 0.05$; annexe 1). Ces observations n'éliminent cependant pas la possibilité d'associations de métaux autres que le Cd (p. ex.: Cu et Zn) à la MT chez les mollusques d'eau douce. En effet, les concentrations de MT dans le corps et la glande digestive des spécimens des lacs Opasatica, Flavrian, Dufresnoy et Duprat étaient plus que suffisantes pour séquestrer tout le Cd tissulaire (tableau 2.3); cela suggère que des complexes autres que Cd-MT étaient présents (nous supposons des rapports stoechiométriques similaires pour le Cd et le Hg réagissant avec MT).

Les corrélations entre les [MT] et les concentrations tissulaires en Cd concordent avec les potentiels différents du Cd, du Cu et du Zn, indiqués dans la littérature, d'induire la biosynthèse de MT dans des expériences en laboratoire. Par exemple, Roesijadi *et al.* (1988) ont exposé des moules bleues *Mytilus edulis* à du Cd, du Cu ou du Zn pendant 28 j et ont mesuré des concentrations de MT de $20 \mu\text{g g}^{-1}$ pour l'exposition à 89 nM Cd, $3.7 \mu\text{g MT g}^{-1}$ pour 79 nM Cu et $1.3 \mu\text{g MT g}^{-1}$ pour 153 nM Zn. Ils ont considéré le Zn un inducteur non effectif de ces protéines puisque l'accroissement de MT au-dessus du seuil de base de $0.5 \mu\text{g MT g}^{-1}$ était minime. L'induction de la MT chez de seconds stades larvaires de la drosophile *Drosophila melanogaster* par du Cd, du Cu ou du Zn a conduit rigoureusement aux mêmes conclusions quant au potentiel de ces métaux à induire la biosynthèse de la MT (Maroni et Watson, 1985). Dans leur revue de la littérature d'expériences avec des souris et des rats, Jones *et al.* (1988) ont montré que l'habileté relative des métaux à induire la synthèse de métallothionéine était inversement corrélée avec leur coefficient σ_p ("softness parameter"); ce coefficient indique la position relative d'un élément dans la classification d'atomes "durs" et "mous" (Ahrland, 1968). Un accepteur d'électrons "mou" est caractérisé par son enveloppe électronique extérieure hautement polarisable et par sa tendance à former des liaisons stables avec des ligands "mous", par exemple ceux contenant des groupements thiol libres, RS^- . Des valeurs plus faibles de σ_p correspondent à des ions plus mous; les valeurs de σ_p pour Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} sont respectivement 0.081, 0.104 et 0.115 (Ahrland, 1968). En milieu naturel, Elliott *et al.* (1992) ont

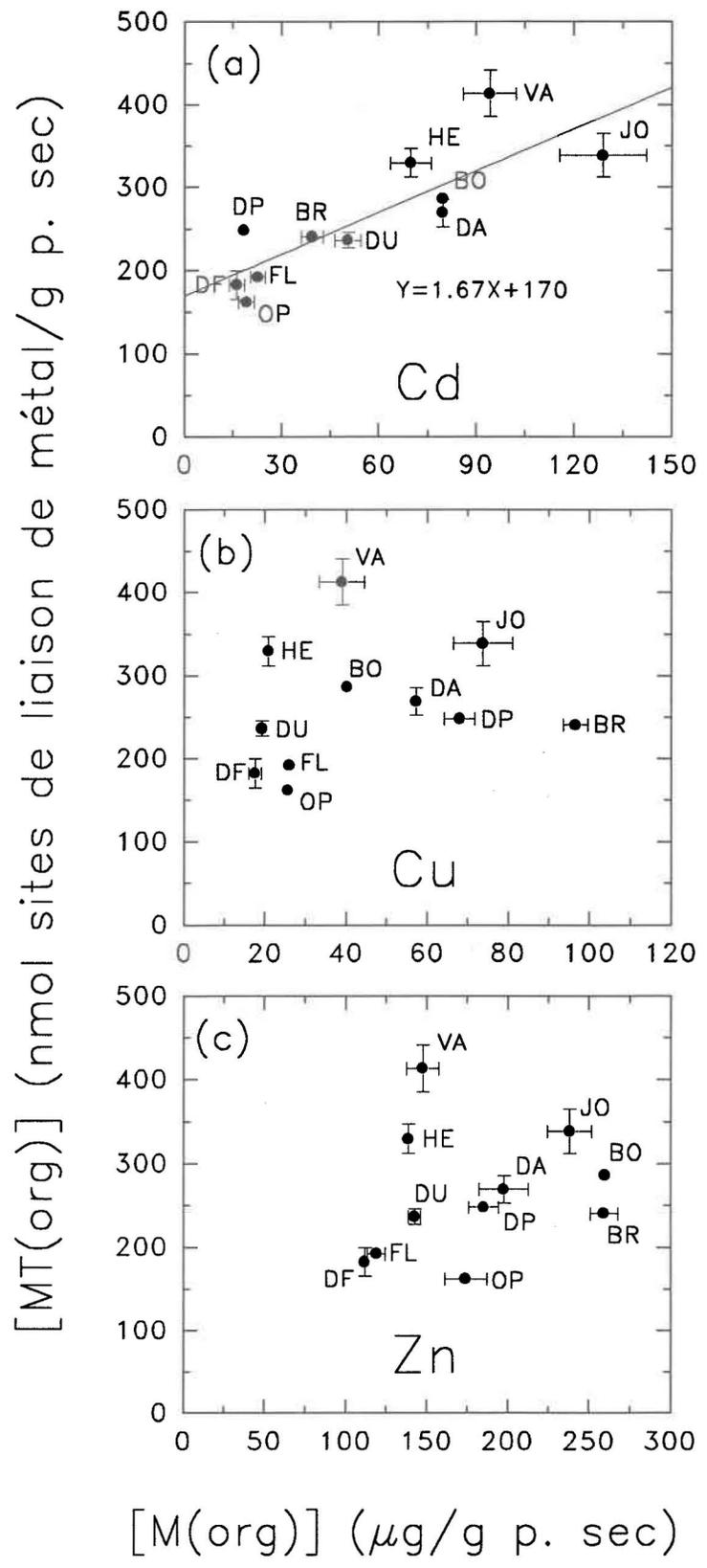


Tableau 2.4

Corrélations (r de Pearson) entre les concentrations moyennes de métallothionéine et de métaux tissulaires dans des spécimens du bivalve *Anodonta grandis* récoltés dans des lacs de la région minière de Rouyn-Noranda. (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; $N = 11$).

	Corrélation entre [MT] et [M], pour chaque tissu		
	[Cd]	[Cu]	[Zn]
Branchies	0.77 **	0.12	-0.06
Glande digestive	0.51	-0.01	0.24
Corps	0.87 ***	0.08	0.47
Organisme entier reconstitué	0.83 **	0.22	0.21

prélevé des oiseaux marins de colonies de la côte Atlantique du Canada durant la saison de nidification 1988. Les concentrations rénales de Cd et de MT étaient significativement corrélées entre elles chez le pétrel *Oceanodroma leucorhoa*, le macareux *Fratercula arctica* et le goéland *Larus argentatus*. Par contre, les niveaux des métaux essentiels Cu et Zn paraissaient étroitement contrôlés chez ces espèces.

2.4.3 Relations entre les concentrations de métallothionéine et le gradient de contamination

Nous avons montré que les variations dans les concentrations de métallothionéine chez *A. grandis* étaient corrélées avec les changements dans le Cd bioaccumulé (mais non avec ceux dans le Cu et le Zn bioaccumulés). Nous éprouvons maintenant le corollaire manifeste que les concentrations

Figure 2.3: Diagrammes de dispersion bidimensionnels des concentrations de métallothionéine *versus* les concentrations de Cd, de Cu et de Zn dans le bivalve *A. grandis* ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; $N = 4$). Les coefficients de corrélation de Pearson entre la [MT] et les [Cd], [Cu] et [Zn] dans l'organisme entier sont respectivement 0.83 ($N = 11$; $P < 0.01$), 0.22 ($N = 11$; $P > 0.05$) et 0.21 ($N = 11$; $P > 0.05$). Pour connaître la correspondance entre les symboles et les lacs individuels, voir la figure 2.1.

de métallothionéine devraient varier de façon prévisible en réponse aux changements de biodisponibilité du Cd le long du gradient de contamination. Notons qu'aucune relation ne fut détectée entre [MT] et le Zn ou le Cu (dissous ou extrait du sédiment); les valeurs en sont fournies aux tableaux 2.1 et 2.2.

Dans une étude parallèle sur le terrain, effectuée sur un territoire beaucoup plus vaste de 350,000 km² (Tessier *et al.*, 1993; N = 19 sites, dont 10 sont communs à la présente étude), nous avons trouvé que les variations dans les niveaux de Cd dans les tissus mous d'*A. grandis* étaient expliquées par les concentrations de l'ion Cd²⁺ dissous, à l'interface eau-sédiment. Les [Cd²⁺] furent déterminées à partir des équilibres de sorption sédiment/eau et du pH de l'eau du lac. Par exemple, les corrélations (r de Pearson) entre [Cd²⁺] et les concentrations de Cd dans les branchies, la glande digestive et l'organisme entier atteignaient respectivement 0.79, 0.88 et 0.91 (N = 19; P < 0.001). Par contraste, aucune des variables "Cd total sédimentaire" ou "Cd extractible sédimentaire" ne put prédire avec succès la [Cd(tissu)]. En partant de ces observations, nous avons exploré les relations potentielles entre la [MT(tissu)] et la [Cd] aqueux. ²

Les invertébrés benthiques sont exposés à la fois aux métaux traces dissous et particulaires, et peuvent en principe accumuler les métaux directement de l'eau ambiante ou des particules ingérées (Luoma, 1983; CNRC, 1988). Pour *A. grandis* (et pour un autre bivalve filtreur, *Elliptio complanata*), plusieurs éléments appuient l'hypothèse que l'eau est le principal vecteur de prise en charge du Cd dans notre région d'étude. Chez ces espèces, les branchies et le manteau sont irrigués par de l'eau constamment renouvelée et lui présentent de grandes surfaces d'interaction. Tessier *et al.* (données inédites) ont suggéré que la contribution potentielle de l'eau ambiante à la prise en charge du Cd était plus importante que celle du sédiment ingéré. Dans leur évaluation ils ont pris en compte les taux journaliers estimés de filtration d'eau et les taux journaliers d'ingestion de sédiment. L'observation que de grandes quantités de Cd sont associées avec les branchies et le manteau des deux bivalves est cohérente avec la suggestion ci-haut: en dépit de leur contribution relativement faible au poids total de l'organisme (35 - 40%), ces organes comptent pour près de 75% du contenu

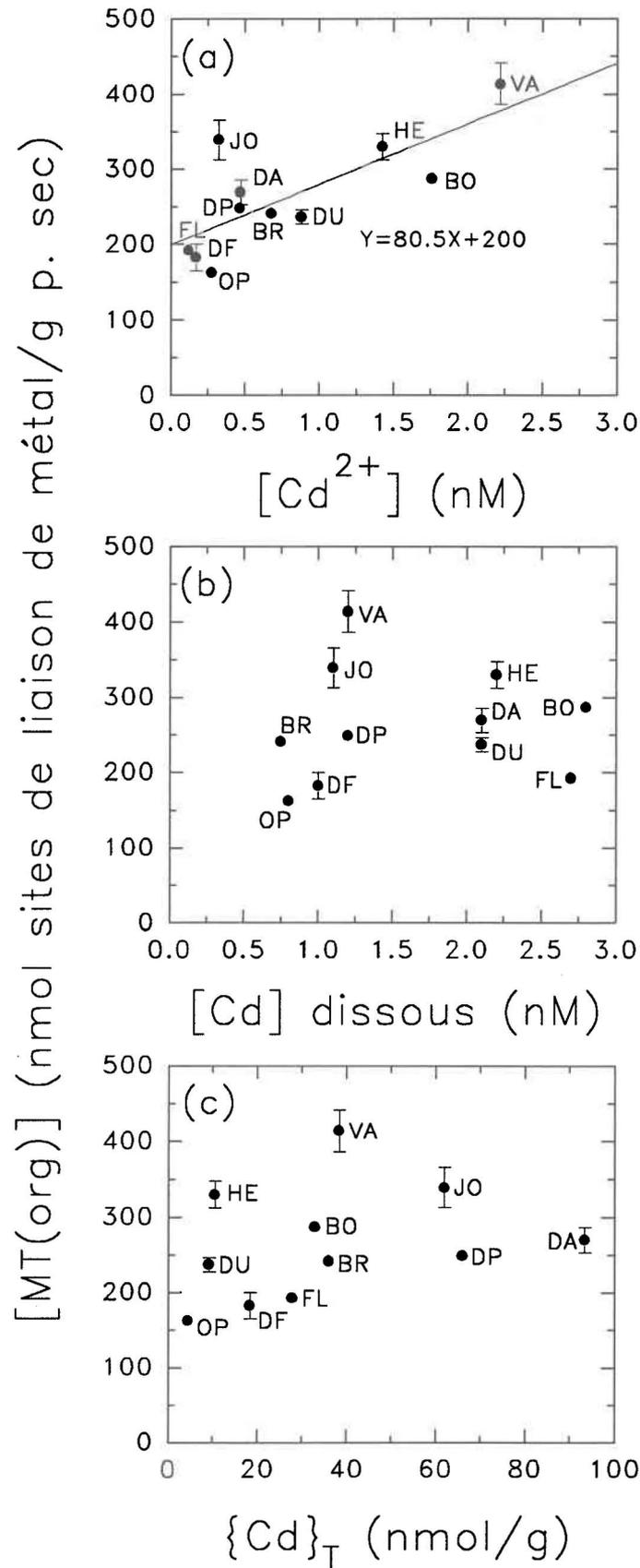
² Noter que dans le présent cas, avec les données dont nous disposons, il n'est pas possible de discriminer les influences des vecteurs eau et des particules en équilibre avec le Cd dissous (phytoplancton, voir p. 39) dans l'accumulation du Cd par *A. grandis*.

en Cd d'*A. grandis* dans les lacs les plus contaminés de notre étude. De plus faibles contributions de ces tissus au contenu corporel en Cd (35 - 50%) furent notées pour des lacs du sud du Québec, non influencés par des activités minières (Tessier *et al.*, 1993).

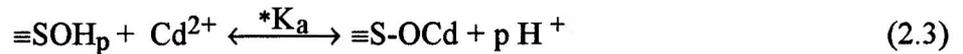
Nous avons souligné la corrélation qui existait entre les [Cd] tissulaires et les [Cd²⁺] dissous calculées à l'interface eau-sédiment (Tessier *et al.*, 1993). Nous avons également présenté la corrélation significative entre les [Cd] et [MT] tissulaires (ce travail). On peut donc s'attendre à ce que les niveaux de métallothionéine varient en fonction des [Cd²⁺] dans l'eau au-dessus du sédiment (Jenkins et Sanders, 1986). Ou, s'il est présumé que la complexation du Cd dans ces eaux douces diluées est négligeable (c.-à-d. que [Cd²⁺] ≈ [Cd]_d: voir Tessier *et al.*, 1993), la [Cd]_d devrait théoriquement être un bon prédicteur de la [MT]. Tel n'est pas le cas. Les concentrations de Cd dissous, déterminées à une seule occasion sur l'eau prélevée au même moment que les mollusques, ne prédisent pas les niveaux de MT dans les bivalves (figure 2.4b, tableau 2.5).

Des expériences de transplantation avec *A. grandis* indiquent que les niveaux tissulaires de métaux changent très lentement dans le temps, et donc qu'ils reflètent les changements à long-terme des concentrations ambiantes de polluants ($t_{1/2}$ pour Cd > 0.9 année: Tessier *et al.*, résultats inédits). Les mêmes expériences révèlent également que l'accumulation de métal ne se produit que pendant la belle saison. Le Cd dissous peut varier appréciablement durant ladite saison dans les lacs du Bouclier Canadien, à cause des changements physico-chimiques de l'eau (notamment le pH) et de la biomasse phytoplanctonique (voir Yan *et al.*, 1990). Ainsi, l'apparente indépendance des [MT] et des [Cd]_d dans notre étude peut simplement refléter le faible effectif de valeurs de Cd_d et leur inhabileté à représenter la variabilité temporelle du Cd dissous. La contamination par inadvertance des échantillons d'eau peut également avoir contribué à l'indépendance apparente entre les [MT] et les [Cd]_d.

Découlant des résultats ci-dessus, il est vraisemblablement nécessaire d'obtenir une estimation intégrante des valeurs d'exposition au Cd. Il paraît également pertinent de circonvier la difficulté de mesurer les concentrations d'ions métalliques libres au long du gradient de contamination. Nous avons donc dérivé mathématiquement un estimé de [Cd²⁺] basé sur la répartition, par sorption, du Cd entre l'eau et les sédiments superficiels.



Dans une étude parallèle à celle-ci, la répartition du Cd dans les sédiments oxyques littoraux de 35 lacs (incluant 10 des 11 lacs choisis dans la présente étude) a été analysée. Il a été démontré que les variations inter-lacustres dans la répartition du Cd pouvaient être expliquées de manière satisfaisante par la sorption du Cd sur deux composantes sédimentaires: les oxyhydroxydes de fer amorphes et la matière organique (Tessier *et al.*, 1993). Les concepts liés aux réactions de complexation de surface ont été utilisés pour décrire cette sorption (éq. 2.3):



où les charges ne sont pas indiquées sur les espèces solides par souci de simplicité; $\equiv\text{S}$ = sites de sorption (Fe-ox amorphes ou matière organique sédimentaire, OM); $*K_a$ est une constante d'équilibre globale apparente; p = le nombre moyen apparent de protons libérés par ion Cd sorbé.

Conformément à ce modèle de répartition géochimique, le développement duquel est discuté en détail dans Tessier *et al.* (1993) (voir aussi annexe 1), $[\text{Cd}^{2+}]$ peut être calculé à partir de l'expression suivante:

$$[\text{Cd}^{2+}] = \frac{\{\text{Cd}\}_T [\text{H}^+]^{x+y}}{N_{\text{Fe}} \times *K_{\text{Fe-Cd}} \{\text{Fe-ox}\} [\text{H}^+]^y + N_{\text{OM}} \times *K_{\text{OM-Cd}} \{\text{OM}\} [\text{H}^+]^x} \quad (2.4)$$

où $\{\text{Fe-ox}\}$ = concentration d'oxyhydroxydes de fer amorphes ($\mu\text{mol g}^{-1}$); $\{\text{OM}\}$ = concentration de carbone organique dans les sédiments de surface ($\mu\text{mol C g}^{-1}$); $\{\text{Cd}\}_T$ = concentration de Cd total dans les sédiments (nmol g^{-1}); x et y = nombres moyens apparents de protons libérés par ion Cd^{2+}

Figure 2.4: Diagrammes de dispersion bidimensionnels des concentrations de métallothionéine dans *A. grandis* versus les formes géochimiques de Cd déterminées dans cette étude ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$; $N = 4$). (a) [MT] dans l'organisme entier vs $[\text{Cd}^{2+}]$, telle que calculée avec l'équation 2.4 ($r = 0.75$, $N = 11$; $P < 0.01$); (b) [MT] dans l'organisme entier vs les concentrations de Cd dissous, $[\text{Cd}]_d$ ($r = 0.05$, $N = 11$; $P > 0.05$); (c) [MT] dans l'organisme entier vs le Cd total sédimentaire, $\{\text{Cd}\}_T$ ($r = 0.24$, $N = 11$; $P > 0.05$). Pour connaître la correspondance entre les symboles et les lacs individuels, voir la figure 2.1.

Tableau 2.5

Corrélations (r de Pearson) entre les concentrations moyennes de métallothionéine (MT) dans le bivalve *Anodonta grandis* et les concentrations environnementales de Cd dans les lacs à l'étude de la région minière de Rouyn-Noranda. (**, P < 0.01; *, P < 0.05; N = 11).^a

Concentrations environnementales	Concentrations de MT			
	Branchies	Glande digestive	Corps	Organisme entier reconstitué
[Cd ²⁺] ^a	0.79 **	0.34	0.72 *	0.75 **
[Cd] _d	0.05	0.14	0.10	0.06
{Cd} _T	0.24	0.51	0.27	0.31

^a [Cd²⁺] calculées avec l'équation 2.4.

adsorbé respectivement sur les oxyhydroxydes de fer et sur la matière organique; N_{Fe} = nombre de moles de sites de sorption sur les oxyhydroxydes de fer, par mole de Fe-ox; N_{OM} = nombre de moles de sites de sorption sur la matière organique sédimentaire, par mole de carbone organique; $*K_{Fe-Cd}$ et $*K_{OM-Cd}$ = constantes d'équilibre globales apparentes pour la sorption du Cd respectivement sur les oxyhydroxydes de fer et la matière organique. Les valeurs des constantes x (0.82), y (0.97), $N_{Fe} \times *K_{Fe-Cd}$ ($10^{-1.30}$) et $N_{OM} \times *K_{OM-Cd}$ ($10^{-2.45}$) ont été déterminées expérimentalement à partir de données géochimiques obtenues de l'environnement naturel (Tessier *et al.*, 1993). Etant donné la lente dynamique d'échange du Cd entre *A. grandis* et son milieu ambiant, les estimations de Cd²⁺ sont basées sur les pH moyens des eaux au-dessus des sédiments. Ces moyennes ont été estimées à partir de séries estivales (juin à octobre) à chaque lac, et se montrent hautement préférables aux valeurs "instantanées" de pH mesurées au moment de la récolte des animaux. Les valeurs de [Cd²⁺] calculées pour chaque lac sont fournies au tableau 2.2.

Le ratio valeur maximum/valeur minimum pour les concentrations estimées de Cd²⁺ à l'interface eau-sédiment atteignaient 18 le long du gradient de contamination et ces activités s'avérèrent de bons prédicteurs des concentrations tissulaires de métallothionéine. Des relations positives hautement significatives furent obtenues entre les concentrations de MT (dans les branchies, le corps ou l'organisme entier) et les concentrations de Cd²⁺ (figure 2.4a, tableau 2.5). Ces résultats appuient

notre hypothèse initiale, soit: que la biosynthèse de MT peut être induite à des niveaux de contamination typiques de ceux rencontrés dans les sédiments pollués; et que les concentrations de cette protéine dans le bivalve *A. grandis* répondent de façon dépendante à la biodisponibilité du métal dans l'environnement naturel (relation concentration-réponse: dans ce cas le Cd).

Relativement peu de travaux ont abordé les relations entre les concentrations de métallothionéine chez des organismes indigènes et la contamination environnementale en métal (Klaverkamp *et al.*, 1991; Deniseger *et al.*, 1990; Hogstrand et Haux, 1990; Roch *et al.*, 1982). Toutes ces études traitent d'espèces de poissons. Dans celles-ci, le degré de contamination a généralement été évalué en mesurant soit les concentrations de métaux dissous (Deniseger *et al.*, 1990; Roch *et al.*, 1982: faible effectif de sites-4), soit en considérant la distance de la source polluante (Klaverkamp *et al.*, 1991); aucune de ces mesures n'est nécessairement une bonne estimation de la biodisponibilité des métaux. A notre connaissance, la présente étude est la première démonstration que les niveaux de métallothionéine chez des populations naturelles d'invertébrés d'eau douce varient au long d'un gradient de contamination métallique de manière consistante, c.-à-d. en fonction de l'exposition au métal tel que définie par la concentration de l'ion libre, $[Cd^{2+}]$.

En principe, l'estimateur de la $[Cd^{2+}]$, tel que défini par l'équation 2.4 (ou encore par les termes de droite des Eq. 21a et 21b dans Tessier *et al.*, 1993), pourrait prédire avec succès les concentrations de MT dans des organismes autres que *A. grandis* qui obtiennent le Cd en grande partie de la phase dissoute des eaux superficielles et pour lesquels on a mis en évidence une relation positive entre les concentrations de MT et de Cd tissulaires. La prédiction tiendrait même si la prise en charge de Cd par *A. grandis* (ou par un autre organisme) se faisait principalement par l'ingestion de nourriture (ex.: phytoplancton), à condition que la concentration de Cd dans cette nourriture soit fonction de la $[Cd^{2+}]$. Les producteurs de MT, acquérant le Cd en majeure partie de ces vecteurs, pourraient appartenir aux groupes suivants: les mollusques unionidés et sphaeridés filtreurs, les mollusques fouisseurs se nourrissant de matière organique sédimentaire (Winsor *et al.*, 1990), certaines larves fouisseuses d'insectes (chironomidés et éphémères: Matisoff *et al.*, 1985) et des poissons vivant en régions contaminées (l'étude de Jackson *et al.*, 1993 permet de le supposer). En contrepartie, l'estimateur de Cd^{2+} peut ne pas être valide pour prédire les concentrations de MT dans les juvéniles endobenthiques (observé par Y. Couillard lors d'études sur le terrain) d'*A. grandis*. En admettant que

le comportement de ces derniers est similaire à celui du bivalve *Elliptio complanata* (Amyot et Downing, 1991), ils passeraient les premières années de leur cycle vital enfouis dans les sédiments anoxyques (p. ex.: de 0.5 à 3 m). Dès lors, leur vecteur de prise en charge de Cd serait possiblement les eaux interstitielles en équilibre avec ces sédiments (cf. Pennak, 1989; Sphaeridés fouisseurs). Enfin, dans certains environnements très sujets à la resuspension des sédiments, le mécanisme de transfert du Cd à des bivalves filtreurs peut ne pas impliquer l'ion Cd^{2+} (p. ex.: l'huître perlière *Pinctada carchararium* dans une baie de l'Australie: McConchie et Lawrance, 1991). Il existe donc un vaste domaine d'investigations concernant la relation $[\text{MT}] - [\text{Cd}^{2+}]$. Cette relation devrait être vérifiée sur une vaste gamme d'eaux de surface de conditions physico-chimiques variées, avec d'autres organismes benthiques et pour d'autres métaux traces.

En guise d'avertissement, nous devons souligner qu'en dépit de l'accord des présents résultats avec le modèle de toxicité basé sur l'activité de l'ion libre, M^{Z+} (Morel, 1983), ils ne constituent pas une validation sans ambiguïté du modèle, en milieu naturel. Des calculs d'équilibre indiquent qu'au long de notre gradient de contamination, virtuellement tout le cadmium inorganique dissous devrait être présent sous la forme d'ion libre Cd^{2+} (comme mentionné précédemment). Si la complexation du Cd par la matière organique dissoute s'avère également négligeable, ou reste constante de lac en lac - voir Tessier *et al.* (1993) pour la discussion de ce point - la relation observée entre la MT tissulaire et la $[\text{Cd}^{2+}]$ est mathématiquement indistincte d'une relation entre la $[\text{MT}]$ et la $[\text{Cd}]_d$.

2.4.4 Effets de l'accumulation des métaux

Nous avons examiné les relations entre l'accumulation du Cd, du Cu et du Zn par les bivalves et leur santé générale. Les indices de condition moyens des échantillons d'*A. grandis* (I.C.) ont oscillé entre $\approx 25 \text{ g mL}^{-1}$ (lac Joannès) et 75 g mL^{-1} (lac Flavrian). Les indices de condition étaient négativement corrélés avec les concentrations de Cd dans l'organisme entier reconstitué (figure 2.5: $r = -0.70$); par contraste, les corrélations entre les I.C. et les $[\text{Cu}]$ ($r = 0.13$) ou les $[\text{Zn}]$ ($r = -0.28$) dans l'organisme entier n'étaient pas significatives.

Un indice de condition devrait reproduire les variations dans l'intensité de l'activité anabolique, et en particulier la croissance des tissus mous; une faible valeur d'un indice donné est indicatrice d'une

période de stress (Lucas et Beninger, 1985). L'indice de condition des mollusques d'eau douce est sensé être influencé par une variété de facteurs, notamment l'état trophique des lacs étudiés, et la concentration et la qualité nutritionnelle des particules de nourriture en suspension. Les cycles saisonniers de l'indice de condition peuvent différer entre les populations de bivalves étudiées. On peut également suspecter une variation en tolérance aux agents toxiques entre différentes populations d'une même espèce, sur une base soit phénotypique, soit génotypique (Klerks et Weis, 1987). Etant donné ce manque inhérent de spécificité, la relation négative entre l'I.C. et le Cd dans l'organisme entier (figure 2.5) est notable; elle implique que la variation inter-lacustre dans les indices de condition des mollusques est au moins partiellement expliquée par leurs contenus tissulaires en Cd.

Brown et Parsons (1978) suggérèrent que si le taux d'influx métallique excède le taux net de biosynthèse de métallothionéine, le métal excédentaire faisant intrusion dans le cytosol tendrait à se lier non spécifiquement à d'autres ligands que MT (notamment l'ensemble des enzymes). Ils postulèrent que ce phénomène correspondrait au seuil d'effets adverses détectables. Cette hypothèse ne pouvait pas être formellement testée dans notre étude. Néanmoins, nous avons tenté de détecter indirectement "un débordement cytosolique" de métal ("spillover") en comparant les indices de condition d'*A. grandis* avec une variable reflétant la saturation potentielle de la métallothionéine tissulaire, c.-à-d. le ratio de la concentration de Cd tissulaire sur la concentration cytosolique de MT. La supposition implicite en est que de plus hauts ratios indiquent une "détoxification" moindre du Cd. De faibles indices de condition étaient en effet associés à des ratios élevés de $[Cd(\text{organisme})] / [MT(\text{organisme})]$. Par exemple, les spécimens avec de "piètres" indices de condition provenant des lacs Joannès, Bousquet et Héva (I.C. < 40 dans la figure 2.5) affichaient respectivement des ratios moyens $[Cd]/[MT]$ de 3.30, 2.47 et 1.88. La corrélation entre l'I.C. et le ratio $[Cd(\text{org.})]/[MT(\text{org.})]$ était significative ($r = -0.69$, $P < 0.05$), mais elle ne représentait pas une amélioration de prédiction par rapport à la corrélation simple entre I.C. et $[Cd(\text{org.})]$ ($r = -0.70$, $P < 0.05$).

Cette absence d'amélioration de prédiction n'est peut être pas surprenante étant donné la distribution sub-cellulaire du Cd et de la MT dans les parties corporelles des mollusques. Tel qu'expliqué ci-dessus, nous nous sommes servis du ratio de la concentration du Cd dans le tissu entier sur celle de la MT dans le cytosol. La comparaison de la $[Cd(\text{cytosol})]$ et de la $[MT(\text{cytosol})]$ aurait

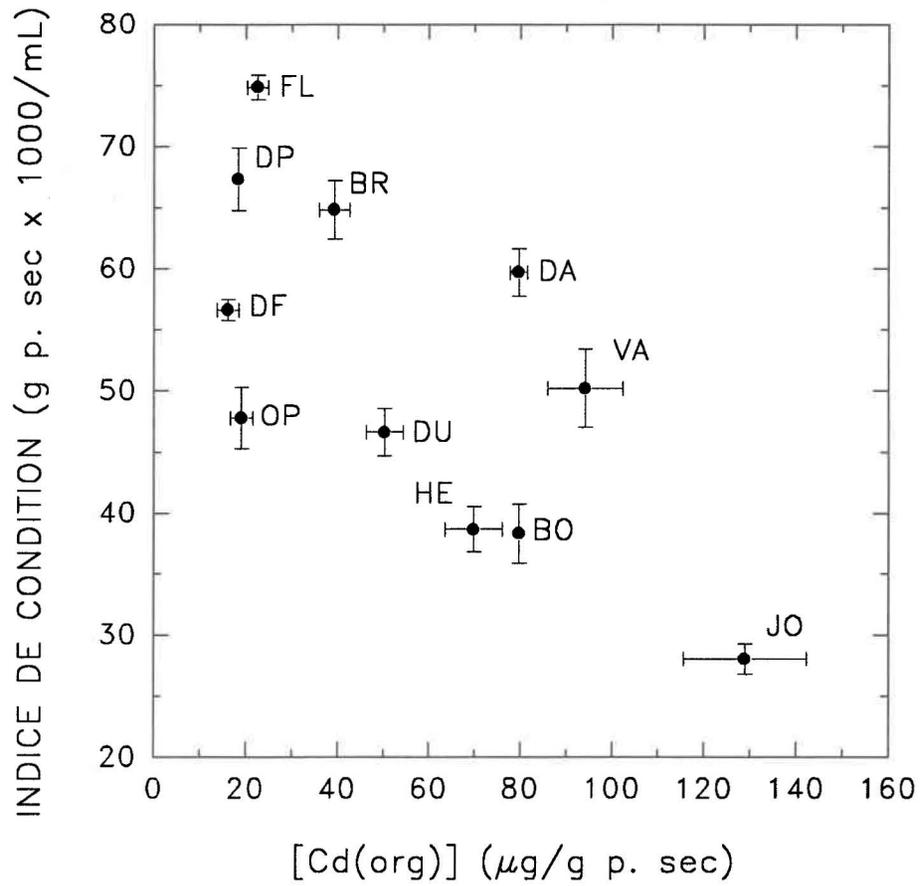


Figure 2.5: Diagramme de dispersion bidimensionnel des indices de condition en fonction des concentrations de Cd dans le bivalve *A. grandis* (organisme entier; $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$; N = 4). Pour connaître la correspondance entre les symboles et les lacs individuels, voir la figure 2.1.

pu fournir une meilleure indication de l'efficacité avec laquelle le Cd est détoxifié (p. ex.: Hamilton *et al.*, 1987; dans le chapitre 3, nous examinons plus en détail cette relation). Le métal cytosolique représente un important réservoir bio-réactif qui devrait répondre rapidement à l'exposition métallique. En contrepartie, les concentrations totales dans les organes incluent de dépôts importants de métaux immobilisés (ex.: granules, concrétions, lysosomes), qui sont minimalement concernés avec leur métabolisme (Johansson *et al.*, 1986). Ainsi, dans les branchies des spécimens d'*A. grandis* des lacs aux deux extrémités du gradient de contamination (Opasatica et Vaudray), le Cd dans le cytosol ne comptait respectivement que pour 5 - 8% et 2 - 4% du Cd total de la branchie.

La différence entre les niveaux de métallothionéine dans le cytosol et les concentrations tissulaires totales de Cd était particulièrement marquée pour les branchies (tableau 2.3); cela indique que la métallothionéine n'était pas le seul ligand engagé dans la séquestration du Cd et sa détoxification. Par exemple, les mollusques habitant le lac Flavrian apparaissaient les mieux portants considérant leur indice de condition. Pourtant, dans leurs branchies, ils avaient 4 fois plus de Cd que de sites disponibles sur MT pour le chélater ($[Cd(\text{branchies})]/[MT] = 0.26$). Clairement, le Cd branchial doit être lié à des formes autres que Cd-MT. Cette observation n'est pas sans précédent - fréquemment chez les invertébrés marins, en contraste avec les mammifères ou les poissons, la MT ne constitue pas le réservoir intracellulaire majeur des métaux dans les organes vitaux (Stegeman *et al.*, 1992). La métallothionéine pourrait quand même jouer un rôle important dans la détoxification du Cd dans les branchies. Par exemple, elle peut être le ligand cytosolique qui complexe initialement le métal "intrus" pour ensuite contribuer à le transférer à d'autres sites d'entreposage (lysosomes / granules ou concrétions). Un tel mécanisme, déjà présenté au chapitre 1, a été suggéré par Viarengo (1989) pour les invertébrés marins.

2.4.5 La métallothionéine et le concept d'indicateur biochimique

Le concept d'indicateur biochimique a été défini en section 1.2. Pour les métaux, la plupart des efforts de recherche dans ce domaine se sont attardés sur les protéines les liant ("metal-binding proteins": Stegeman *et al.*, 1992; Engel et Roesijadi, 1987; CNRC, 1985; Roesijadi, 1981). En particulier, le contenu en métallothionéine d'un organisme ou d'un tissu a été proposé comme indicateur précoce d'exposition à un métal.

La relation concentration-réponse observée avec la MT au long du gradient de contamination de notre étude supporte cette assertion. Plusieurs questions doivent cependant être résolues avant que les variations des niveaux de MT de populations indigènes ne soient interprétées sans ambiguïté. Par exemple, les dynamiques de synthèse et de dégradation de métallothionéines d'invertébrés d'eau douce sont virtuellement inconnues, comme le sont les effets de facteurs saisonniers (p. ex.: cycle de reproduction) sur les niveaux de MT. Ces variables doivent être évaluées dans l'environnement naturel, avec des conditions d'exposition réalistes. Ces questions ainsi que plusieurs autres sont abordées au chapitre 3. Nous avons visé, par l'entremise d'une expérience de transplantation, à apprécier le plus justement possible le potentiel qu'offre la métallothionéine d'*A. grandis* en tant qu'indicateur précoce d'exposition et de stress causé par les métaux traces dans l'environnement naturel.

Evaluation du potentiel de la métallothionéine en tant qu'indicateur précoce d'exposition et de stress causé par les métaux traces chez le bivalve *Anodonta grandis* dans son environnement naturel: une expérience de transplantation d'un lac peu vers un lac très contaminé.³

³ Couillard, Y., P.G.C. Campbell, A. Tessier, J. Pellerin-Massicotte et J.C. Auclair. Sous la forme de deux articles soumis à Can. J. Fish. Aquat. Sci..

3.1 Introduction

Nous avons défini, au chapitre 1 (section 1.2), le concept d'indicateur biochimique de santé environnementale. Nous avons montré par la même occasion que l'information écotoxicologique devenait souhaitable, tant aux yeux des scientifiques qu'à ceux des gestionnaires, pour la protection de l'environnement aquatique. On a récemment proposé les critères suivants auxquels un indicateur biochimique devrait obéir pour être interprétable sans ambiguïté (Stegeman *et al.*, 1992; Haux et Förlin, 1989):

1. l'indicateur devrait revêtir un caractère précoce, c.-à-d. que sa réponse devrait être prédictive d'effets aux niveaux supérieurs d'organisation biologique et qu'elle devrait les précéder;
2. l'indicateur devrait s'avérer spécifique à un contaminant particulier ou à une catégorie de contaminants;
3. l'indicateur devrait répondre de façon dépendante (relation concentration-réponse) à un changement de biodisponibilité du contaminant;
4. les variables exogènes (relatives au milieu externe) ou endogènes (relatives à la physiologie de l'organisme) affectant l'indicateur devraient être identifiées afin de minimiser les sources de variation non souhaitées;
5. l'indicateur devrait refléter la santé ou l'ajustement général de l'organisme à son milieu ("fitness").

La conformité de l'indicateur à ces critères devrait bien sûr être évaluée en milieu naturel.

Plusieurs éco-toxicologues accordent un potentiel considérable à la métallothionéine en tant qu'indicateur biochimique spécifique d'exposition et/ou de stress provoqué par des métaux traces (Roesijadi, 1992; Stegeman *et al.*, 1992). Deux approches sont envisageables sur le terrain:

- (i) la simple détermination de la concentration de métallothionéine, [MT], en tant qu'indicateur d'exposition antérieure à des métaux toxiques. Dans cette optique, on présume que les niveaux de MT minimalement requis par un organisme sont faibles. Tout accroissement de MT au-delà de ces

niveaux de base est attribuable à son induction par un influx de métaux toxiques. En principe, une telle approche permettrait la mesure de la fraction intracellulaire de métal ayant un sens au point de vue toxicologique (Roesijadi, 1981);

(ii) l'examen de la répartition des métaux toxiques entre les ligands cytosoliques, comme moyen d'évaluer le stress à l'échelle biochimique causé par les métaux intracellulaires. Il a été suggéré que lorsque l'influx cellulaire du métal dépasse la vitesse de biosynthèse de métallothionéine, le métal excédentaire peut interagir avec d'autres ligands cytosoliques et ainsi exprimer sa toxicité. Ce phénomène de débordement ("spillover": Brown et Parsons, 1978) serait symptomatique (donc détectable) d'un stress provoqué par les métaux.

Les études *in situ* en rapport avec ces deux approches affluent lentement dans la documentation écotoxicologique ([approche (i): Couillard *et al.*, 1993, chapitre 1; Elliott *et al.*, 1992; Klaverkamp *et al.*, 1991; Hogstrand et Haux, 1990; Roch et McCarter, 1984)]; [approche (ii): Klaverkamp *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1987; Johannson *et al.*, 1986]).

Dans la présente étude, nous avons transplanté des spécimens du bivalve d'eau douce *Anodonta grandis* d'un lac peu contaminé vers un lac très contaminé en Cd et en Zn. Nous voulions en cela vérifier les hypothèses suivantes:

(i) les concentrations de métallothionéine dans *A. grandis* augmenteront suite à un changement brusque d'exposition en métaux traces. Ces augmentations seront persistentes et obéiront à une relation concentration-réponse;

(ii) les variabilités saisonnières des concentrations de métallothionéine dans les populations témoins resteront modestes en regard de l'augmentation de ces concentrations chez les individus transplantés;

(iii) un modèle de cytotoxicité, élaboré par d'autres chercheurs, a été testé lors de cette expérience avec, comme élément hypothétique déclencheur, le métal toxique non lié à la métallothionéine dans le cytosol cellulaire. Ce modèle est expliqué dans la section Résultats et Discussion.

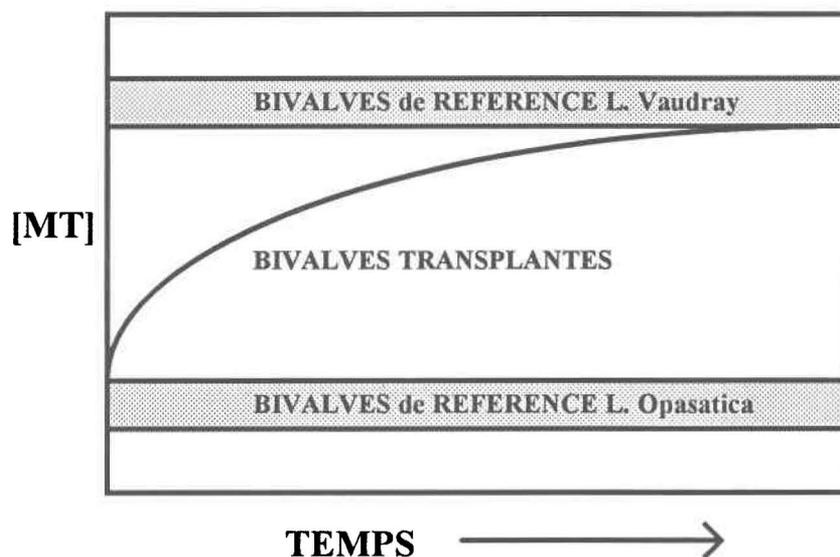


Figure 3.1: Modèle hypothétique des variations en concentrations de métallothionéine dans des spécimens du bivalve *A. grandis* pour l'expérience de transplantation. Les zones grises représentent les variations saisonnières des [MT] dans les bivalves de référence. Les allures de la courbe et des bandes de variation ne reflètent pas nécessairement une situation réelle. Nous voulons plutôt illustrer ici le concept de cette expérience.

Nous nous attendions à ce que les concentrations de métaux et de MT chez les mollusques transplantés rejoignent éventuellement celles des mollusques du lac contaminé. La condition *sine qua non* en était que des conditions relativement stables prévalent dans le temps aux sites de transplantation (figure 3.1).

Les relations entre les réponses en métallothionéine et les effets aux paliers supérieurs d'organisation biologique ont également été évaluées. Les indices de condition et les taux de croissance en longueur des coquilles (réponses au niveau de l'organisme), ainsi que certaines caractéristiques des populations de bivalves (p.ex.: reproduction) impliquées ici, furent établies.

De ces résultats, nous avons tiré une évaluation du potentiel de la métallothionéine en tant qu'indicateur biochimique d'exposition et de stress causé par les métaux traces chez le bivalve *A. grandis*. Nous nous sommes guidés en cela sur les critères énumérés plus haut pour ce genre d'indicateur.

3.2 Sites de transplantation

Nous avons établi nos sites de transplantation dans la région de Rouyn-Noranda. Le lecteur se référera à la figure 2.1 pour la localisation de la région, et à la section 2.2 pour un aperçu des sources ponctuelles de métaux traces et de la contamination de la région.

Dans l'étude présentée au chapitre 2, nous avons obtenu des corrélations positives hautement significatives entre les concentrations de métallothionéine de populations indigènes d'*A. grandis* et les concentrations d'ions libres Cd^{2+} dans les eaux sus-jacentes aux sédiments. Dès lors, la présente expérience a été conçue pour mettre en évidence les changements temporels associés à une exposition accrue de métaux (notamment $\Delta[\text{MT}]$). Deux lacs d'état trophique similaire, mais très différents quant à leur contamination et aux concentrations de MT de leurs bivalves, furent sélectionnés à partir des onze lacs de l'étude précédente (lacs Opatatica et Vaudray: figure 2.1, tableau 3.1). Les raisons qui nous ont amené à choisir ces lacs sont exposées en section 3.5.1.

3.3 Plan expérimental

Des spécimens du bivalve *A. grandis* d'une longueur nominale ≈ 8 cm furent transplantés du lac Opatatica (faiblement contaminé) au lac Vaudray (fortement contaminé) ($N = 112$; longueur moyenne = 80.1 mm, écart-type = 4.3 mm; nous référons à ces individus par le code T-VA). Des individus des populations indigènes servirent de témoins (Opatatica: $N = 64$; longueur moyenne = 81.3 mm, écart-type = 4.5 mm; on réfère à ceux-ci par le code C-OP; Vaudray: $N = 112$; longueur moyenne = 82.6 mm, écart-type = 3.9 mm; on réfère à ceux-ci par le code C-VA). Aucun des animaux prélevés dans ces deux lacs n'était gravide lors d'un échantillonnage préliminaire effectué deux semaines avant le début de l'expérience. Tous les groupes, y compris les témoins, furent déposés dans des enclos (bordures plastiques d'une hauteur de 10 cm, arrangées en cercles d'un diamètre de 60 cm) enfoncés dans les sédiments littoraux. Les enclos, disposés par paires le long d'une corde courant au fond, contenaient chacun huit mollusques. Une densité comparable à celle des populations indigènes était ainsi respectée pour les enclos. Deux enclos étaient sacrifiés à chaque prélèvement de bivalves transplantés et témoins du lac Vaudray suivant la séquence 0, 5, 14, 30, 60, 90 et 400 j ($t = 0$: 20 juin

Tableau 3.1

Superficies lacustres, et caractéristiques géochimiques et biologiques des sites retenus pour l'expérience de transplantation. Les données géochimiques proviennent de Couillard *et al.* (1993) ou du chapitre 2. Les données biologiques ont été obtenues de spécimens récoltés en dehors des enclos en fin d'expérience (OP IND et VA IND: N=3 replicata; chaque réplikat est composé de 4 individus; $\bar{X} \pm S\bar{X}$).

Caractéristiques géochimiques	Lacs		Caractéristiques biologiques	Lacs	
	Opasatica	Vaudray		Opasatica	Vaudray
Aire (ha)	5128	746	[MT] (nmol de sites g ⁻¹ p. sec)	154 ± 10	596 ± 16
Ca (10 ⁻⁴ M)	1.65	0.9	[Cd] (nmol g ⁻¹ p. sec)	178 ± 6	1,560 ± 60
alcalinité Gran (meq L ⁻¹)	292	93	[Cu] (nmol g ⁻¹ p. sec)	680 ± 43	1,260 ± 60
C org. dissous (mg C L ⁻¹)	6.5	6.5	[Zn] (nmol g ⁻¹ p. sec)	3,130 ± 150	4,880 ± 280
pH moyen ^a	7.39	6.56			
	[M] dissous			Branchies	
[Cd] (nM) ^b	0.8	1.2	[MT] (nmol de sites g ⁻¹ p. sec)	109 ± 14	411 ± 20
[Cu] (nM) ^b	56	53	[Cd] (nmol g ⁻¹ p. sec)	279 ± 19	2,560 ± 150
[Zn] (nM) ^b	40	174	[Cu] (nmol g ⁻¹ p. sec)	1,435 ± 155	3,060 ± 200
[Cd ²⁺] calc. (nmol L ⁻¹) ^c	0.28	2.22	[Zn] (µg g ⁻¹ p. sec)	6,660 ± 260	10,140 ± 830
	[M] dans séd. oxyques.			Caractéristiques de l'organisme	
[Cu] extract. (nmol g ⁻¹) ^d	54	88	Indice de condition ^e	0.110 ± 0.003	0.103 ± 0.009
[Zn] extract. (nmol g ⁻¹) ^d	150	1200	Taux de croissance	similaire ^f	
[Cd] total (nmol g ⁻¹)	4.4	38			
[Hg] total (nmol g ⁻¹)	0.10	0.10			

^a pH moyen estimé à partir de séries temporelles (juin à octobre 1989, 1990); le pH moyen = $-\log_{10} (\Sigma [H^+]/N)$.

^b Mesure unique à 10 cm au-dessus des sédiments (juin 1989).

^c [Cd²⁺] estimées à partir des équilibres de sorption sédiment/eau; voir Tessier *et al.* (1993) pour les détails.

^d M extraits pendant 6h à 96°C avec une solution 0.04 M NH₂OH.HCl dans 25% (vol/vol) d'acide acétique.

^e Des valeurs similaires ont été obtenues pour les deux lacs avec un indice de condition calculé en normalisant le poids de chair par le volume intervalval. Voir la figure 2.5.

^f Voir la figure 3.2a.

1990). Les groupes témoins C-OP furent échantillonnés suivant la séquence 0, 5, 90 et 400 j. Chaque spécimen destiné à être récolté à 400 j fut mesuré avec soin et identifié en gravant un nombre à l'aide d'un clou pointu près du sommet ("umbo") de la coquille (ces spécimens devaient servir au suivi de la croissance des bivalves). Afin de déterminer si le marquage et le maintien des bivalves à l'intérieur d'enclos avaient une influence sur les concentrations de métallothionéine et de métaux, et sur les indices de condition, nous avons comparé les membres des groupes C-OP-400 j et C-VA-400 j à leurs congénères respectifs cueillis en dehors des enclos à 400 j (auxquels nous référons par les codes OP IND et VA IND). Nous avons également évalué l'effet du marquage et du confinement sur la croissance en longueur des coquilles des groupes C-OP-400 j et C-VA-400 j, 90 j après la transplantation; cette évaluation est commentée en section 3.5.2.

3.4 Méthodologie

Le lecteur se référera au tableau A.2.1 pour les analyses effectuées sur les échantillons de bivalves de cette expérience. Les procédures détaillées sont fournies dans les sections ci-dessous.

3.4.1 **Procédure de détermination de l'âge**

Comme base de comparaison des caractéristiques écologiques des sites de transplantation, nous avons calculé les taux de croissance en longueur de la coquille pour les populations indigènes de bivalves dans les deux lacs. Deux semaines avant le commencement de l'expérience, nous avons sélectionné 21 et 29 spécimens respectivement des lacs Opasatica et Vaudray, couvrant la gamme des tailles retrouvées à chaque site. Les anneaux annuels de croissance visibles sur le dessus de la coquille ont été comptés indépendamment par deux personnes. Les différences entre ces estimations étaient peu fréquentes (5 divergences sur 50 mesures). Les longueurs totales et inter-annulaires (utilisées pour générer des diagrammes de Walford; discuté ultérieurement) ont été mesurées au 0.1 mm près à l'aide d'un pied à coulisse digital. L'âge de chacun des spécimens composant les groupes C-OP-400 j et C-VA-400 j fut également déterminé. Les comparaisons sont discutées dans la section Résultats et Discussion.

Les comparaisons indiquées ci-haut étaient assujetties à l'exactitude des lectures d'âge et des mesures inter-annulaires. Dans seulement quelques cas, l'érosion des coquilles a rendu difficile la distinction du premier annulus. Dans l'établissement des relations âge-croissance pour les bivalves indigènes libres décrits ci-haut, nous avons évité d'avoir à discriminer les annuli très serrés à la bordure des coquilles des individus les plus vieux. Ces embûches possibles dans l'emploi des anneaux externes de croissance des unionidés ont été soulignées par Metcalfe-Smith et Green (1992). L'apparition une fois l'an d'un nouvel anneau externe est généralement admis pour les populations de bivalves vivant sous un climat tempéré nordique (basé sur des opérations de marquage-recapture; rapporté par Metcalfe-Smith et Green, 1992; *A. grandis*: Ghent *et al.*, 1978). Cependant Downing *et al.* (1992) ont observé lors d'une expérience de marquage-recapture, que les annuli externes de plusieurs coquilles d'*A. grandis* se formaient moins fréquemment qu'annuellement dans un lac du Minnesota. En dépit du caractère ponctuel de leur observation, nous convenons avec Downing et ses collaborateurs que l'occurrence annuelle de nouveaux annuli externes devrait être fermement établie pour les populations des lacs Opasatica et Vaudray sur la foi d'expériences de marquage-recapture.

3.4.2 Analyse des bivalves

Les bivalves étaient disséqués dans les 4 h suivant leur retrait des enclos, en quatre groupes de tissus: les branchies, le manteau, la glande digestive et les restes (pied, masse viscérale, palpes labiaux, reins, coeur, muscles). Afin de minimiser l'influence de la matière particulaire ingérée sur le contenu en contaminants des restes (Hare *et al.*, 1989), les contenus des tracts digestifs étaient évacués par un jet d'eau désionisée appliqué aux ouvertures. Les parties de quatre animaux étaient réunies, fournissant ainsi quatre replicata par traitement et par date lorsqu'aucune mortalité n'était enregistrée. Chaque réplikat tissulaire était mis dans deux sacs de polyéthylène: l'intérieur scellé sous vide, et l'extérieur rempli d'azote. Le tout était ensuite congelé à -40°C jusqu'au moment de l'homogénéisation effectuée 1 à 5 mois plus tard.

L'homogénéisation et la constitution des sous-échantillons d'homogénats étaient en tout point identiques aux manipulations décrites en section 2.3.3, à l'exception des points suivants. Le tampon d'homogénéisation était une solution 25 mM Tris ajustée à pH 7.2 (pour être isotonique avec ces tissus). Les poids de solution ajoutée par tissu variaient pour chacun: la glande digestive (4 poids), le

manteau (3 poids), les branchies (2 poids) et les restes (1 poids). La MT, le Ca, le Cd, le Cu et le Zn furent mesurés dans tous les homogénats. L'indice de condition suivant a été calculé pour chaque réplicat:

$$I.C. = \frac{\text{poids sec total de chair (g)}}{\text{poids total des coquilles (g)}} \quad (3.1)$$

Quatre paires de lames branchiales de chaque réplicat étaient mises de côté au moment de la dissection pour la détermination des concentrations cytosoliques de Cd, de Cu, de Zn et de Ca ($[M]_{\text{cyt}}$). Nous y avons dosé également le malondialdéhyde ([MDA]: traduisant l'intensité de la peroxydation lipidique; Sunderman *et al.*, 1985), et nous avons déterminé la répartition du Cd, du Cu et du Zn entre les ligands du cytosol branchial (bivalves transplantés seulement: à 14, 90 et 400 j). Les tissus étaient conservés tel que mentionné ci-haut jusqu'à l'étape d'homogénéisation. Un demi-gramme par réplicat de ces tissus partiellement décongelés était homogénéisé à l'aide d'une éprouvette et d'un piston de verre dans 5 mL d'une solution 154 mM KCl maintenue à près de 0°C; cet extrait était analysé la journée même pour le MDA. Les tissus restants étaient homogénéisés dans 3 ou 9 poids d'une solution 25 mM Tris, pH 7.2, $\approx 0^\circ\text{C}$ à l'aide d'une éprouvette de verre et d'un piston de téflon mû par un moteur à 80 rpm; ces homogénats étaient immédiatement congelés à -80°C pour l'analyse éventuelle des métaux cytosoliques.

Essai de saturation au mercure pour mesurer les métallothionéines

L'essai de saturation au Hg est exposé en détail à la section 2.3.3 et en annexe 3. Les concentrations de MT sont exprimées en nmoles de sites de liaison de métal par gramme de tissu sec. La récupération d'un étalon MT de foie de lapin (Sigma Co.) variait entre 87 et 114% pour les branchies, entre 85 et 110% pour le manteau, entre 85 et 114% pour la glande digestive, et entre 87 et 113% pour les restes (N = 75).

Analyse des tissus en métaux

La procédure suivie est détaillée à la section 2.3.3. Les concentrations de métaux traces mesurées dans un échantillon de référence (U.S. Nat. Inst. Std. Technol.; Oyster tissue, SRM no 1566) variaient peu dans le temps (C.V. 3 - 17%, N = 14) et se trouvaient à l'intérieur des limites de variation certifiées pour cet échantillon. Nous avons détecté une contamination faible à négligeable dans des témoins de digestion (Cd: 0.03 nmol g⁻¹ p. sec; Cu: 5 nmol g⁻¹ p. sec; Zn: 7 nmol g⁻¹ p. sec; Ca: 90 nmol g⁻¹ p. sec; N = 13).

Déterminations de malondialdéhyde dans les branchies

Les concentrations de MDA dans les branchies ont été mesurées sur les homogénats tissulaires entiers par la méthode colorimétrique de Sunderman *et al.* (1985), basée sur la réaction de l'acide thiobarbiturique avec le malondialdéhyde et les composés chromogènes apparentés. Deux déterminations analytiques de [MDA] étaient exécutées sur chaque homogénat. Le coefficient de variation moyen par homogénat se chiffrait à 6 %. Les replicata ont été corrigés pour le bruit de fond (équivalent à 0.01 mmol MDA g⁻¹ poids hum.).

Concentrations métalliques dans les préparations de cytosol branchial

Les homogénats tissulaires de branchies, mis de côté pour ces analyses, ont été décongelés et centrifugés à 170,000 × g pendant 1 h à 2°C. Des sous-échantillons (2 mL) des surnageants obtenus étaient ensuite acidifiés avec une solution ultra-pure d'HNO₃ (Aristar; concentration finale 0.5 % vol/vol). Les concentrations de Cd, de Cu, de Zn et de Ca étaient déterminées par spectrométrie d'émission atomique au plasma. Une contamination négligeable fut détectée dans des témoins méthodologiques (Cd: N.D.; Cu: 5 ng mL⁻¹; Zn: N.D.).

Répartition des métaux dans les préparations de cytosol branchial

Pour les mollusques transplantés (T-VA), une préparation de cytosol branchial, c.-à-d. 1 réplicat sur les quatre obtenus respectivement pour t = 14, 90 et 400 j, a été analysée. Un sous-échantillon de 100 µL de chacun des surnageants 170,000 × g a été fractionné par chromatographie liquide haute performance (chromatographe Waters 600) à l'aide d'une colonne d'exclusion stérique (TSK gel SW

2000, 30 × 0.75 cm) précédée d'une pré-colonne (Biorad 7.5 × 0.75 cm). La colonne était éluée avec une solution ajustée à pH 7 et contenant 10 mM Tris, 100 mM NaCl et 0.03% NaN₃; le débit était de 0.5 mL min⁻¹ (Micallef *et al.*, 1992). L'éluant a été désoxygéné par de l'hélium avant usage et était dégazé périodiquement durant l'opération du chromatographe.

Les standards protéiques suivants (Sigma Co.) ont été utilisés pour étalonner la colonne: dextran (2,000 kD, V₀ = 5.7 - 5.8 mL), albumine bovine (67 kD), albumine d'oeuf (45 kD), anhydrase carbonique (29 kD), ribonucléase-a (13.7 kD), cytochrome-c (12.4 kD), aprotinine (6.5 kD), vitamine B-12 (1,355 D) et tryptophane (204 D). Des fractions de 2 mL étaient recueillies automatiquement (LKB 2211 SuperRac) jusqu'à l'obtention d'un volume de 22 mL pour ensuite être dosées pour le Cd et le Cu par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) sans flamme (Varian Techtron, modèle Spectra AA-30 équipé d'un four au graphite GTA-96). En guise de contrôle analytique, un échantillon de référence aqueux (NIST, Trace elements in Water, SRM no 1643b; 20% de SRM 1643b dans l'éluant) a été analysé par SAA sans flamme. Les concentrations mesurées ne s'éloignaient pas plus de ± 9% des valeurs certifiées pour le Cd et le Cu. Les concentrations de métaux dans les fractions chromatographiques furent corrigées pour les concentrations résiduelles détectées dans l'éluant. Le Zn n'a pu être quantifié à cause d'un fort bruit de fond dans l'éluant. Les fractions chromatographiques ont été classifiées en trois groupements de ligands sur la base de leur poids moléculaire: un groupement de haut poids moléculaire ("high molecular weight": HMW), du volume mort de la colonne à 15 kD; un groupement métallothionéine (MT), de 15 à 3 kD; et un groupement de faible poids moléculaire ("low molecular weight": LMW), < 3 kD.

Les distributions sub-cellulaires de métaux dans les branchies présentées dans ce chapitre sont définies opérationnellement. En effet, toute procédure d'homogénéisation et de fractionnement cytosolique causera normalement la rupture d'organites et pourrait mener à une redistribution de métaux entre les constituants cellulaires. Les méthodes d'homogénéisation retenues ici, c.-à-d. l'emploi de deux surfaces de cisaillement en verre, ou d'une surface en verre et une autre en téflon, devraient nous procurer un faible bris d'organites (Julshamn et Andersen, 1981). D'autre part, les homogénéisations devraient être réalisées idéalement sur du tissu frais et dans le respect de l'état d'oxydo-réduction de la cellule. Nous avons mentionné antérieurement que nos homogénéisations furent faites sur des tissus décongelés, et à l'air libre. Les homogénats furent congelés à -80°C. Les

cytosols furent extraits des homogénats laissés à dégeler pendant 12 h à 4°C. La concentration moyenne de Zn de cytosols obtenus par cette méthode équivalait *grosso modo* à la moitié de la $[Zn]_{\text{cyt}}$ de branchies encore fraîches homogénéisées sous atmosphère d'azote, et dont les homogénats avaient été ultra-centrifugés le même jour pour l'extraction des cytosols. Une telle perte de métal ne se manifesta pas pour le Cu et apparut négligeable pour le Cd cytosolique (consulter l'annexe 4). Cette observation n'est pas sans précédent. Des cellules algales de l'espèce *Tetraselmis suecica* ont vu leur concentration en Cu rester stable mais leur concentration en Ag diminuer à la suite de leur conservation à -20°C (Amiard-Triquet *et al.*, 1992).

Par ailleurs, on peut considérer que les quantités de complexes Cd-MT obtenues après chromatographie liquide sont similaires aux quantités présentes dans les préparations de cytosol branchial. Des expériences de compétition pour le ^{109}Cd furent entreprises avec de la métallothionéine commerciale marquée au ^{109}Cd et un extrait frais de cytosol de bivalve. Aucun échange appréciable de Cd ne se produisit pendant 20 min de contact et la séparation chromatographique qui s'ensuivit (Micallef *et al.*, 1992).

Analyses statistiques

L'analyse de variance à un critère de classification a été employée pour statuer sur les différences dans les séries temporelles de métallothionéine, de métaux et d'autres variables mesurées pour chacun des traitements examinés individuellement: T-VA, C-OP et C-VA. Les différences entre les moyennes de groupes (T-VA-i j, T-VA-j j, etc...) ont été examinées à l'aide des contrastes de Scheffé *a posteriori*. Les contrastes orthogonaux *a priori* ont été écartés parce que les groupes de chaque traitement n'avaient pas tous le même effectif. Les accroissements de concentrations de métallothionéine ou de métaux dans les individus transplantés étaient considérés significatifs lorsque les replicata T-VA étaient significativement différents des replicata C-OP récoltés à la même occasion (test de t de Student pour deux moyennes), et étaient significativement différents des replicata T-VA obtenus à $t = 0$ j.

Les relations entre les concentrations tissulaires de MT et de métaux furent initialement examinées à l'aide de diagrammes de dispersion bidimensionnels, pour être ensuite évaluées par le

coefficient de corrélation de Pearson (r). Nous avons recouru à des corrélations partielles pour mettre en évidence de fausses corrélations entre les concentrations de MT et de métaux, notamment celles causées par les changements en poids sec des organismes. L'analyse discriminatoire (Jolicoeur, 1959) a été utilisée pour détecter la toxicité cellulaire chez les bivalves transplantés, à $t = 400$ j. Quatre variables ou plus furent considérées conjointement pour la discrimination des groupes T-VA-400 j, C-OP-400 j et VA IND.

Les taux de croissance en longueur de la coquille pour les populations d'*A. grandis* des deux sites étudiés ont été déterminés par l'emploi de diagrammes de dispersion bidimensionnels avec, en ordonnée, la longueur délimitée par l'annulus "n+1", et en abscisse, la longueur délimitée par l'annulus "n" (McCuaig et Green, 1983). La similarité des deux régressions linéaires (obtenues des variables ci-dessus) a été testée par une analyse de covariance (ANCOVA). Les conditions requises par l'usage de ces méthodes paramétriques ont été généralement respectées avec les données brutes (non transformées).

3.5 Résultats et discussion

3.5.1 Justifications du choix des sites

Les lacs Opasatica et Vaudray reposent tous les deux, à des altitudes moindres que 300 m, sur des dépôts glacio-lacustres laissés par le lac post-glaciaire Barlow-Ojibway (carte de la géologie des formations de surface no 1639A; Commission géologique du Canada; Ministère de l'Énergie, des Mines et des Ressources du Canada, 1987). A cette similarité géologique, se superposent les différences désirées dans les niveaux de contamination des composantes biotiques et abiotiques des sites choisis, tel qu'il peut en être jugé au tableau 3.1. Les différences de concentrations les plus appréciables sont observées pour le Cd et le Zn des sédiments de surface oxygènes, et pour l'ion Cd^{2+} dissous (conc. différentes de 8 à 8.6 fois entre les deux sites). Rappelons que le lac Vaudray est affecté par les vents dominants en provenance du complexe de raffinage de Rouyn-Noranda alors que le lac Opasatica ne l'est pas (figure 2.1). Les activités de l'ion H^+ , les valeurs d'alcalinité Gran et les concentrations de Zn dissous montrent également une variabilité appréciable entre les deux sites, alors que les variables restantes (Ca, carbone organique dissous, [Cd] dissous, [Cu] dissous, [Cu]

sédimentaire) sont plus semblables. Les sites choisis ne paraissent pas pollués par le mercure, également un inducteur potentiel de biosynthèse de MT. Les concentrations de Hg des sédiments superficiels sont comprises dans la variation géochimique normale de la région (voir tableau 2.2).

Les concentrations de métallothionéine et de Cd dans les tissus d'*A. grandis* diffèrent aussi beaucoup entre les deux sites d'étude, alors que les niveaux tissulaires de Cu et de Zn divergent moins. Alors que les concentrations de ces derniers ne sont pas exceptionnelles pour les mollusques pélicypodes d'eau douce (cf. Manly et George, 1977: 340-1,630 nmol Cu g⁻¹ p. sec, 6,170-27,800 nmol Zn g⁻¹ p. sec), les niveaux de MT et de Cd sont considérablement plus élevés que ceux notés chez les populations indigènes d'écosystèmes non perturbés. Par exemple, Malley *et al.* (1989) ont rapporté une concentration moyenne totale de ≈ 36 nmoles Cd g⁻¹ p. sec et une concentration moyenne branchiale de MT de ≈ 9 nmol sites de liaison de métal g⁻¹ p. hum. ([MT] calculée à partir des données de Malley *et al.*, 1993; nous supposons un poids mol. de 10 kD pour la MT et un rapport stoechiométrique de 7 atm-g Hg/mole MT) pour des spécimens d'*A. grandis* vivant dans un lac non pollué du Bouclier Canadien dans l'ouest de l'Ontario (0.01 ± 0.001 nM Cd dissous). Sur une base de poids humide, la concentration moyenne de MT dans les branchies indiquée au tableau 3.1 pour la population de bivalves du lac Opasatica était de 16 ± 2.6 nmol sites de liaison de métal g⁻¹ p. hum.

Afin de minimiser l'influence de facteurs autres que la contamination métallique sur les réponses biochimiques et physiologiques suivies dans cette étude, nous avons sélectionné des sites arborant vraisemblablement des caractéristiques écologiques semblables. Il est relativement bien établi que les conditions environnementales, en particulier la qualité et la disponibilité de la nourriture, sont bien intégrées dans l'indice de condition (Lucas et Beninger, 1985) et le taux de croissance de la coquille (McCuaig et Green, 1983) des populations de bivalves. La comparaison de ces caractéristiques entre les populations indigènes de mollusques étudiées suggère que les deux sites étaient en effet d'un même état trophique (tableau 3.1 et figure 3.2a). Par exemple, la longueur inter-annulaire à l'an "n+1" fut estimée à partir de la longueur inter-annulaire à l'an "n" pour des échantillons de bivalves récoltés (hors des enclos) aux sites des lacs Opasatica et Vaudray, deux semaines avant le démarrage des expériences (figure 3.2a). Les pentes et les ordonnées à l'origine des deux droites d'estimation ne sont pas significativement différentes entre elles (ANCOVA, $P > 0.05$). Les régressions de la figure 3.2a furent utilisées pour dériver les courbes de croissance en longueur des coquilles basées sur le modèle

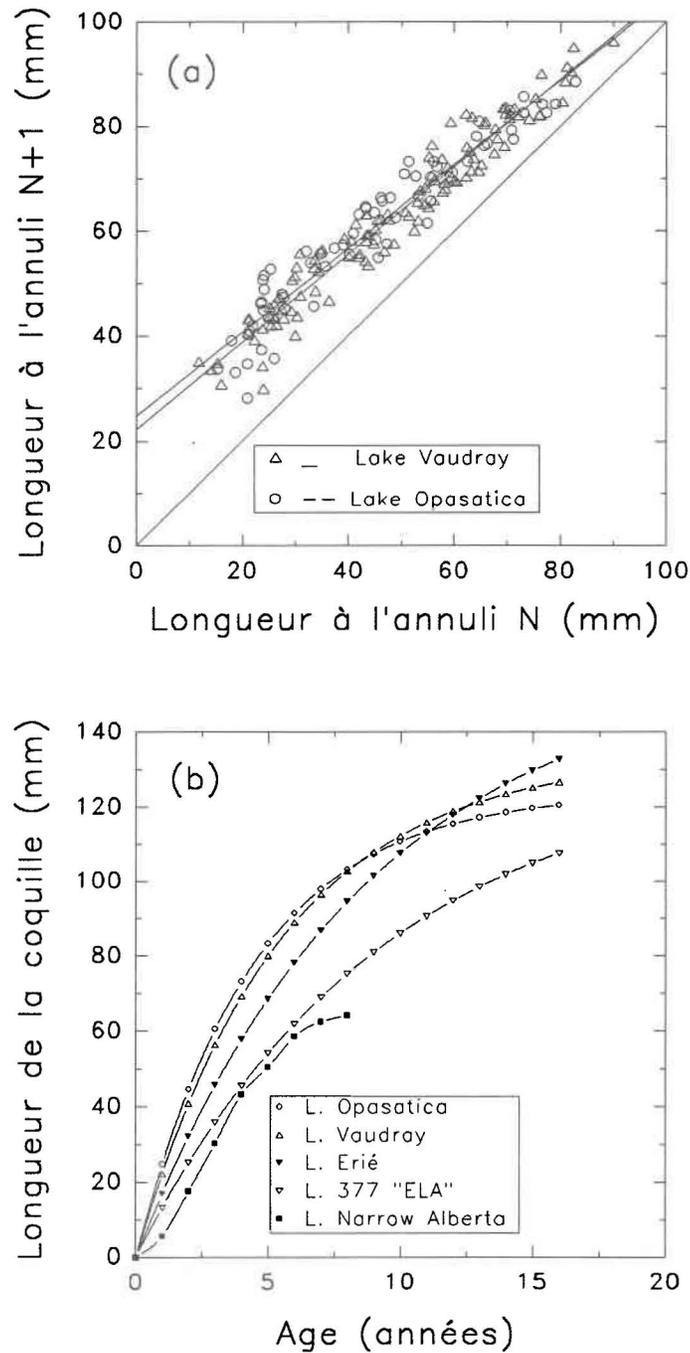


Figure 3.2: (a) Diagrammes de Walford des longueurs inter-annulaires pour le bivalve *A. grandis* provenant des lacs Opasatica (N=21) et Vaudray (N=29). Les spécimens furent récoltés 2 semaines avant l'expérience de transplantation. La ligne pleine originant de 0,0 indique l'absence de croissance. (b) Courbes de croissance de Von Bertalanffy pour des populations d'*A. grandis* de certains lacs canadiens. Sources: lacs Opasatica et Vaudray: cette étude; lac Erié: McCuaig et Green (1983); lac 377 "ELA": Malley *et al.*, (1989); lac Narrow: Hanson *et al.*, (1988).

de Von Bertalanffy (McCuaig et Green, 1983; figure 3.2b). La comparaison visuelle de ces courbes suggère de nouveau les croissances semblables des bivalves des lacs Opasatica et Vaudray. Par ailleurs, ces animaux croissent apparemment plus vite et atteignent de plus grandes tailles que certaines populations vivant à des latitudes analogues au Canada, par exemple la population du lac 377, "Experimental Lakes Area", Ontario (Malley *et al.*, 1989), et celle du lac Narrow, Alberta (à une profondeur de 1 m; Hanson *et al.*, 1988). Néanmoins, les populations abitibiennes sont apparemment surpassées en longueur asymptotique par une population du lac Erié (McCuaig et Green, 1983). Compte tenu de leur profondeur et de leur proximité de rivages offrant peu d'emprise aux vents dominants, on peut admettre que les sites choisis étaient affectés de façon similaire par la turbulence des eaux (voir figure 2.1). Comme nous voulions étudier les taux de croissance en longueur des coquilles pour les fins de cette étude, nous devons tenir compte de la turbulence des eaux en raison de son effet sur la croissance allométrique de la coquille (Green *et al.*, 1989). Nous concluons que les deux sites de transplantation retenus sont similaires quant à leur écologie.

3.5.2 Evaluation de l'effet de marquage et de confinement sur les bivalves utilisés dans l'expérience de transplantation

Avant de débiter la discussion des effets de la transplantation sur les concentrations de métallothionéine et de métaux, nous devons nous demander si ces variables étaient affectées par le plan expérimental (c.-à-d. la claustration des mollusques et la restriction de leurs mouvements). Pour des spécimens mis en cage dans le lac Opasatica (traitement C-OP), la comparaison entre les anodontes marquées et en enclos du groupe C-OP-400 j et les anodontes indigènes recueillies en dehors des enclos (OP IND) n'a révélé aucun effet de marquage et de confinement sur les indices de condition (figure 3.8), ou sur les concentrations tissulaires de MT et de métaux (tableau 3.2). Il est à noter que la question de l'effet du marquage ne concerne que les spécimens confinés et récoltés à 400 j; ceux assignés aux prélèvements antérieurs ne furent pas marqués car on ne prévoyait pas déterminer leur croissance individuelle. Par ailleurs, la situation dans le lac Vaudray diffère de celle ci-haut. Six concentrations sur les 11 concentrations tissulaires de MT et de métaux déterminées sur le groupe

Tableau 3.2

Comparaisons entre les bivalves marqués et confinés en enclos composant les groupes C-OP-400 j^a et C-VA-400 j^a et leurs congénères respectifs prélevés en dehors des enclos en fin d'expérience (OP IND et VA IND)^a, pour les variables suivantes.

Identification du groupe	Effet du marquage et du confinement sur:			
	MT	Cd	Cu	Zn
	BRANCHIES			
C-OP-400 j	NON	NON	NON	NON
C-VA-400 j	NON	----	----	----
	MANTEAU			
C-OP-400 j	OUI (P≈0.02)	NON	NON	NON
C-VA-400 j	NON	OUI (P<0.05)	OUI (P<0.05)	NON
	HEPATOPANCREAS			
C-OP-400 j	NON	NON	NON	OUI (P≈0.04)
C-VA-400 j	OUI (P<0.05)	----	----	----
	RESTES			
C-OP-400 j	NON	NON	NON	NON
C-VA-400 j	OUI (P<0.05)	NON	OUI (P<0.05)	NON
	ORGANISME ENTIER			
C-OP-400 j	NON	NON	NON	NON
C-VA-400 j	OUI (P<0.05)	----	----	----

^a Tailles des échantillons: Groupes C-OP-400 j, OP IND et VA IND: N = 3; Groupe C-VA-400 j: N = 1.

C-VA-400 j⁴ étaient significativement différentes de celles du groupe VA IND (tableau 3.2; pas de comparaison d'indices de condition). Nous suspectons un effet du marquage dans le cas du groupe C-VA-400 j parce que nous avons transpercé, par inadvertance, plusieurs des coquilles plutôt minces de ces individus durant l'étape de la gravure. Puisque les comparaisons entre les groupes C-VA et VA IND ne furent effectuées qu'à 400 j, et comme tous les bivalves du groupe C-VA-400 j furent marqués, nous ne pouvons tirer de conclusions claires sur la question d'effet d'enclos sur les

⁴ Pour ce groupe, la mortalité se montrait beaucoup plus élevée que celles enregistrées dans les autres enclos. Le nombre de bivalves vivants s'élevait, après 90 et 400 j, respectivement à 7 et à seulement 1 individu sur 16. Par comparaison, nous récupérâmes, en fin d'expérience, 14 individus vivants sur les 16 placés originellement dans les enclos pour le groupe T-VA-400 j (ind. transplantés), et 9 vivants sur les 16 témoins du groupe C-OP-400 j (tableau 3.3). Nous soupçonnons l'étape de gravure comme responsable de cet état de fait.

Tableau 3.3

Individus manquants dans chacun des groupes, observés aux jours de récolte. C-OP et C-VA: spécimens gardés en enclos respectivement dans leur lac de provenance OP et VA; T-VA: bivalves transplantés.

Jours de récolte	Traitement		
	C-OP	T-VA	C-VA
0	0	0	0
5	1	0	0
14	--- ^a	0	0
30	--- ^a	0	0
60	--- ^a	3	0
90	6 ^b	5 ^b	2 ^b
400	6 ^c	2 ^c	15 ^c

^a Aucun échantillon n'était prévu à ces occasions.

^b A cette occasion (17 septembre 1990), la température de l'eau $\approx 10^{\circ}\text{C}$. Il est possible que certains individus se soient enfouis dans les sédiments pour l'hiver.

^c Spécimens manquants déjà après seulement 90 j: C-OP: 4 dont 2 trouvés à l'extérieur de leurs enclos; T-VA: 0; C-VA: 9 morts, puisque leurs coquilles vides furent retrouvées.

spécimens **non marqués** du traitement C-VA.

Nous avons également évalué l'effet du marquage et du confinement sur la croissance en longueur des coquilles. Les anodontes des groupes C-OP-400 j et C-VA-400 j ont été récoltées par des plongeurs à 90 j, mesurées et retournées à leur enclos. Nous avons comparé les incréments de croissance (de 0 à 90 j) de spécimens marqués avec les incréments de croissance attendus pour les mêmes individus, s'ils s'étaient trouvés hors des enclos, non marqués, et pour la même période de croissance de 90 j. Les incréments de croissance attendus ont été déterminés par l'équation de la courbe de Von Bertalanffy de chacune des populations de bivalves des lacs Opasatica et Vaudray (Figure 3.2b). Nous avons supposé que la période de croissance effective est en moyenne de 120 j par année dans la région de Rouyn-Noranda (François Girard, Ministère du Loisir, de la Chasse et de la Pêche du Québec; comm. pers.); ainsi, pour la présente période estivale de 90 j, les spécimens atteindraient 75% de leur croissance annuelle. Les mollusques du groupe C-OP-400 j ont crû en moyenne de 1.74 ± 0.26 mm (écart-type de la moyenne; $S_{\bar{x}}$) en comparaison avec l'incrément attendu de 5.30 ± 0.20 mm calculé pour ceux-ci s'ils n'avaient pas été dérangé dans leur milieu naturel. De même, les spécimens du groupe C-VA-400 j ont crû en moyenne de 0.99 ± 0.46 mm en comparaison

avec l'incrément attendu de 4.38 ± 0.14 mm. Ainsi, un fort effet de marquage et d'enclos sur la croissance a été mis en évidence pour chacun des deux groupes ($P < 0.001$). Signalons que nous en sommes venus aux mêmes conclusions pour une manipulation subséquente entreprise durant l'été 1992 dans laquelle les anodontes étaient marquées plus délicatement en collant, avec de la colle sous-marine, des étiquettes de plastique sur la marge postérieure des valves (voir annexe 2).

Hanson *et al.* (1988) contraignèrent, par l'emploi d'enclos, des bivalves de l'espèce *A. grandis* à une zone de profondeur, dans le lac Narrow, Alberta, de juin 1985 à août 1986. Les moules d'eau douce contraintes à 7 ou à 5 m crûrent plus lentement que celles contraintes à 1 et 3 m. Les différences de croissance étaient fortement corrélées avec la température de l'eau mesurée aux différentes profondeurs. Etant donné les résultats de Hanson *et al.* (1988), une explication plausible à l'effet de marquage et de confinement sur la croissance de la coquille observé avec notre plan expérimental serait celle-ci: les bivalves dans leur environnement naturel grandissent plus rapidement que les bivalves marqués et mis en enclos parce que les premiers peuvent migrer en des micro-environnements plus favorables à la croissance (préférence pour un type de substrat particulier, pour des eaux plus chaudes, etc...). Aux deux sites de notre étude, les bivalves n'ont qu'à se déplacer de 100 m, pour passer de 4 m, la profondeur d'immersion des enclos, à 1 m. Les carences en nourriture en enclos ne semblent pas une explication à retenir pour l'effet de marquage et d'enclos sur la croissance puisque les indices de condition des spécimens confinés et indigènes libres étaient similaires (figure 3.8).

3.5.3 Suivis temporels des concentrations de métallothionéine et de métaux au cours de l'expérience de transplantation

La figure 3.3 présente les séries temporelles des concentrations de métallothionéine et de métaux dans les organismes entiers simultanément pour les trois traitements, c.-à-d. les bivalves transplantés et les bivalves témoins aux deux sites. Les principales caractéristiques des séries temporelles de MT et de métaux pour les parties corporelles sont exposées dans les tableaux 3.4 et 3.5.

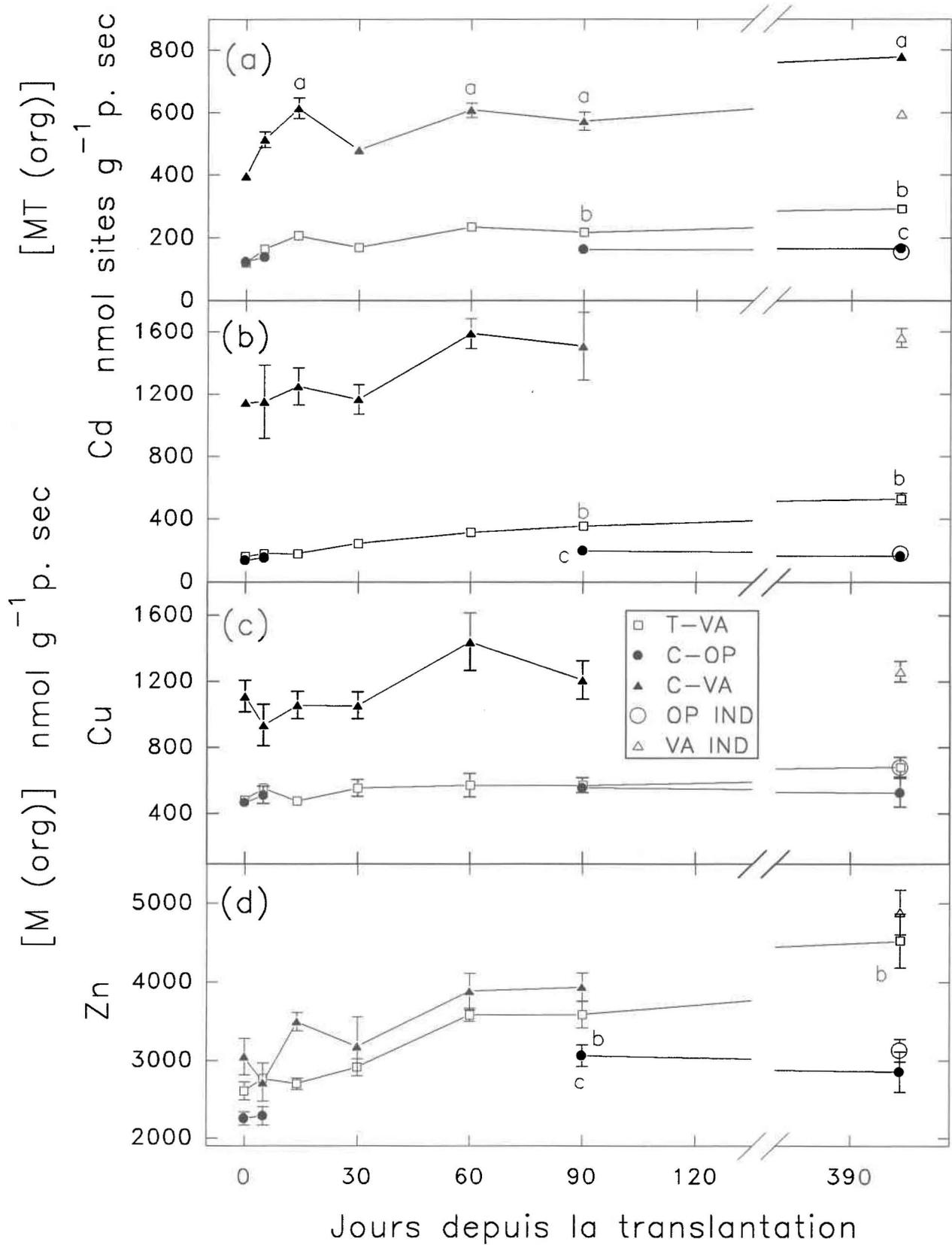


Tableau 3.4

Jours de récolte pour lesquels les concentrations de métallothionéine ou de métaux dans les individus transplantés (T-VA) étaient significativement différentes des concentrations dans les témoins C-OP récoltés à la même occasion et dans les individus T-VA à $t = 0$ j. T-VA: bivalves transplantés du lac Opasatica (peu contaminé) au lac Vaudray (très contaminé); C-OP et C-VA: bivalves gardés en enclos dans leurs lacs d'origine respectifs OP et VA. (*, < 0.05 ; **, $P < 0.01$).

Parties corporelles	MT (jour no)	Cd (jour no)	Zn (jour no)
Branchies	90 *, 400 ** a	90 *, 400 **	N.S. c
Manteau	400 **	90 **, 400 **	400 * c
Glande digestive	90 *, 400 ** a	90 **, 400 **	90 *, 400 ** a,c
Restes	400 **	90 **, 400 ** b	90 *, 400 ** d
Organisme reconstitué	90 *, 400 ** a	90 **, 400 ** b	90 *, 400 * a,c

a Le groupe T-VA-60 j est significativement différent du groupe T-VA-0 j, $P < 0.01$

b Les groupes T-VA-60 j et T-VA-30 j sont significativement différents du groupe T-VA-0 j, $P < 0.01$.

c Les groupes T-VA-60 j, T-VA-90 j et T-VA-400 j ne sont pas significativement différents respectivement des groupes C-VA-60 j, C-VA-90 j et VA IND.

d Les groupes T-VA-90 j et T-VA-400 j ne sont pas significativement différents respectivement des groupes C-VA-90 j et VA IND.

Figure 3.3: Variations temporelles des concentrations de MT, de Cd, de Cu et de Zn dans les bivalves entiers témoins et transplantés. Chaque point figuratif est la moyenne \pm l'écart-type de la moyenne d'un échantillon de replicata. Les lettres minuscules désignent les moyennes significativement différentes de celle à $t = 0$ j. Pour les anodonte transplantés (T-VA), ces lettres indiquent les moyennes qui sont significativement différentes de celles des témoins C-OP récoltés à la même occasion et de celle de l'échantillon T-VA à 0 j. La concentration élevée de MT dénotée pour le groupe C-VA-400 j doit être écartée puisqu'elle fut obtenue d'un seul individu affichant des concentrations anormalement fortes de Cu et de Cd dans le manteau et les restes. Il a été mentionné précédemment que les individus marqués du groupe C-VA-400 j moururent massivement et ce seul animal survécut jusqu'en fin d'expérience.

C-OP et C-VA: bivalves gardés en enclos dans leurs lacs d'origine respectifs OP et VA. OP IND et VA IND: spécimens récoltés en dehors des enclos respectivement des lacs OP et VA.

Métallothionéine

La variabilité saisonnière intra-traitement de la métallothionéine apparut modeste relativement aux différences marquées entre les concentrations de MT des deux sites (C-VA *versus* C-OP; VA IND *versus* OP IND). De fait, des variations saisonnières modérées des [MT(org)] étaient observées pour les mollusques témoins des lacs Vaudray et Opasatica (C-VA et C-OP; figure 3.3a). Pour le lac Vaudray, le ratio de la plus forte valeur moyenne obtenue (14 j) ⁵ sur la plus faible valeur moyenne (0 j) était 1.55, alors que pour le lac Opasatica, ce ratio était de 1.34. Les différences entre les concentrations moyennes de MT des traitements C-OP et C-VA aux jours 0, 5, 90 et 400 étaient toujours très hautement significatives ($P < 0.001$). Des conclusions statistiques semblables sont obtenues pour les parties corporelles.

Les anodotes transplantées du lac Opasatica au lac Vaudray (T-VA) montrèrent un accroissement lent mais régulier de métallothionéine dans le temps. Le ratio du niveau moyen de MT le plus élevé (400 j) sur le niveau moyen de MT le plus bas (0 j) atteignait 2.45 (figure 3.3a). Si l'on ignore quelque effet possible d'enclos sur la dynamique de biosynthèse de la MT, et si l'on admet un accroissement linéaire des concentrations de MT dans le temps tout au long de l'année, nous estimons qu'il en aurait pris deux années de plus pour que les bivalves transplantés atteignent les niveaux de MT retrouvés dans les bivalves indigènes du lac Vaudray. Par ailleurs, puisque les bivalves marqués et gardés en enclos croissaient plus lentement que leurs congénères dans le milieu naturel adjacent, nous devons admettre la possibilité que le plan expérimental ait également influencé les dynamiques d'accumulation de métaux et possiblement de biosynthèse de métallothionéine.

Des augmentations significatives en [MT] dans les branchies, la glande digestive et dans les organismes entiers transplantés furent initialement remarquées à 90 j et persistèrent ensuite jusqu'à la conclusion de l'expérience (figure 3.3a; tableau 3.4); ces hausses auraient probablement pu être détectées aussi tôt qu'à 60 jours si les témoins nécessaires avaient été disponibles. Les accroissements en [MT] dans le manteau et dans les restes n'étaient, au contraire, pas discernables avant 400 j

⁵ La concentration élevée de MT dénotée à 400 j doit être écartée puisqu'elle fut obtenue d'un seul individu affichant des concentrations anormalement fortes de Cu et de Cd dans le manteau et les restes. Il a été mentionné précédemment que les individus marqués du groupe C-VA-400 j moururent massivement et ce seul animal survécut jusqu'en fin d'expérience.

(tableau 3.4). Malley *et al.* (1993) analysèrent des représentants de l'espèce *A. grandis* tirés d'un lac pour lequel les concentrations moyennes de Cd dissous dans l'épilimnion furent augmentées artificiellement de 0.01 nM à 0.66 nM. Il fut observé que les parties corporelles suivantes produisaient de la MT en réponse à l'exposition au métal: branchies, manteau, masse viscérale, pied et reins. Nos résultats concordent avec ces recherches.

Cadmium

Les [Cd(org)] moyennes des bivalves témoins du lac Vaudray (C-VA) ne varièrent pas significativement pendant l'expérience de transplantation, alors que les [Cd(org)] des témoins C-OP le firent (figure 3.3b). Les ratios de la concentration moyenne la plus élevée de Cd sur la concentration moyenne la moins élevée, pour les groupes C-VA et C-OP, étaient tous deux égaux à 1.4. En contrepartie, les concentrations moyennes de Cd dans les spécimens transplantés (T-VA) augmentaient 3.3 fois entre 0 et 400 j. Après 400 j de transplantation, la concentration moyenne de Cd dans l'échantillon T-VA, 528 nmoles g⁻¹ p. sec, n'était encore que le tiers des niveaux de Cd dans les organismes entiers, indigènes du lac Vaudray. Tessier *et al.* (résultats inédits) estimèrent que la demi-vie du Cd dans *A. grandis* était supérieure à 0.9 année. Des augmentations significatives des concentrations de Cd furent notées pour toutes les parties corporelles à 90 j, et celles-ci persistent jusqu'à la fin de l'expérience (figure 3.3b; tableau 3.4). Ces accroissements auraient probablement pu être détectés à 30 j si les témoins requis avaient été disponibles.

Cuivre

Comme il en est déduit de la similarité des contaminations ambiantes en Cu aux deux sites (tableau 3.1), les niveaux de Cu des anodontes transplantées (T-VA) ne crûrent pas significativement par rapport aux témoins du lac Opasatica (figure 3.3c). Cependant, les concentrations en cuivre des bivalves témoins ou indigènes (libres) du lac Vaudray (C-VA ou VA IND) dépassaient presque du double celles des individus témoins ou indigènes du lac Opasatica (C-OP ou OP IND). Cette différence entre les concentrations dans les organismes entiers était attribuable aux fortes concentrations branchiales en Cu des spécimens du lac Vaudray (moyennes générales des séries

temporelles: C-VA: $\approx 3,540 \text{ nmol g}^{-1} \text{ p. sec}$; C-OP: $\approx 1,260 \text{ nmol g}^{-1} \text{ p. sec}$); les niveaux de cuivre des autres parties du corps des bivalves C-VA étaient semblables à ceux des bivalves C-OP.

Zinc

En dépit des écarts respectables entre les [Zn] dissous et particulaire des deux sites (tableau 3.1), les concentrations en zinc des bivalves témoins des deux lacs ne différaient que légèrement. Les moyennes globales des [Zn(org)] pour l'expérience de transplantation se chiffraient à 3,600 et $\approx 2,600 \text{ nmol g}^{-1} \text{ p. sec}$ respectivement pour les traitements C-VA et C-OP. Il n'y avait pas de différence entre les groupes C-VA et C-OP à $t = 0, 14$ ou 90 j , mais une différence significative fut notée entre les concentrations de zinc dans les groupes OP IND et VA IND à 400 j (figure 3.3d).

Ces observations sont conséquentes avec le statut du zinc en tant qu'élément trace essentiel et l'existence d'une forme de régulation de la disponibilité du Zn pour les fonctions qui en dépendent. Par exemple, Langston et Zhou (1986) ont observé que les concentrations de Zn dans le gastropode *Littorina littorea* ne répondaient pas aux fluctuations de contamination environnementale en Zn au long des côtes de la Grande Bretagne.

Dans les bivalves transplantés (T-VA), les concentrations en Zn de toutes les parties corporelles atteignirent relativement rapidement les concentrations tissulaires des indigènes du lac Vaudray (tableau 3.4).

3.5.4 Relations entre les concentrations de métallothionéine et de métaux

Bivalves transplantés

Les relations entre les concentrations en métallothionéine, et celles en Cd, en Cu et en Zn ont été examinées chez les bivalves transplantés du lac Opasatica au lac Vaudray (T-VA: figure 3.4, tableau 3.5). Les concentrations de MT étaient significativement corrélées avec les concentrations de Cd dans les parties corporelles, ou dans l'organisme entier reconstitué (*cf.* points identifiés 0, 5, 30, 60, 90 et 400 en figure 3.4a). Alors que les [MT] et les [Cd] haussaient, les poids secs des organismes décroissaient durant le cours de l'expérience (figure 3.4b). Nous avons au départ pensé que la relation entre les [MT] et les [Cd] pourrait être fautive, à cause des diminutions de poids sec des individus.

Cependant, la corrélation partielle entre les [MT(org)] et les [Cd(org)], tenant le poids sec des organismes constant, indique que cette relation est bien réelle pour les anodontes transplantées (figure 3.4c).

Nous avons également obtenu des corrélations significatives entre les [MT] et les [Zn], tenant constants les poids secs, pour tous les tissus à l'exception des branchies, et pour l'organisme entier reconstitué (tableau 3.5: T-VA). Ces résultats entrent en contradiction apparente avec notre étude multi-lacustre exposée au chapitre 2 et dans Couillard *et al.* (1993). Lors de ces travaux, nous avons examiné les niveaux de MT, de Cd, de Cu et de Zn dans des spécimens d'*A. grandis* provenant de 11 lacs de la région de Rouyn-Noranda (incluant les deux lacs de la présente étude). Les concentrations de MT dans les branchies, les restes (org. entier moins les branchies et la glande digestive) et l'organisme entier étaient significativement corrélées ($P < 0.01$) avec les [Cd] tissulaires. En contraste, les corrélations entre les [MT] et les niveaux tissulaires de Zn étaient faibles ou nulles. De plus, Roesijadi *et al.* (1988) trouvèrent le zinc un inducteur inefficace de MT (contrairement au Cd) lors d'expositions en laboratoire de moules *Mytilus edulis* à ce métal durant 28 j. Nous concluons provisoirement que la relation présente entre les [MT] et les [Zn] est un artéfact. Nous suggérons que si cette expérience était prolongée, les [Cd] et les [MT] totales continueraient d'augmenter tandis que celles de Zn plafonneraient, puisque ces concentrations sont parvenues déjà aux niveaux de Zn affichés par les bivalves du lac Vaudray. Il s'ensuit que la relation entre les [MT] et les [Zn] dans l'organisme s'affaiblirait dans le cadre d'une expérience plus longue.

Les présents résultats suggèrent que les concentrations de MT dans les bivalves transplantés (T-VA) ont augmenté en cours d'expérience par suite des pertes de poids des organismes mais, en grande partie, à cause de l'induction déclenchée par l'accumulation du Cd (figure 3.4). Le temps de réponse des niveaux de MT dans *A. grandis* à un changement d'exposition *in situ* aux métaux était moindre que 90 j et les accroissements de MT persistaient ensuite jusqu'en fin d'expérience. Cette relation concentration-réponse avec le Cd fut également observée spatialement. Dans notre étude précédente (chapitre 2 ou Couillard *et al.*, 1993), nous obtenions une forte corrélation entre les concentrations de MT dans *A. grandis* et les concentrations de Cd²⁺ à l'interface sédiment-eau (aucune corrélation de ce type ne fut constatée avec le Cd, le Cu ou le Zn dans d'autres compartiments abiotiques). En définitive, les résultats de ces deux études suggèrent que la

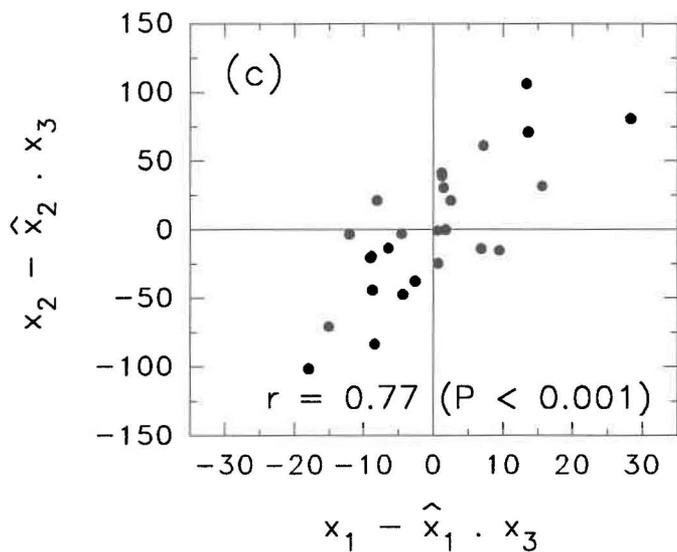
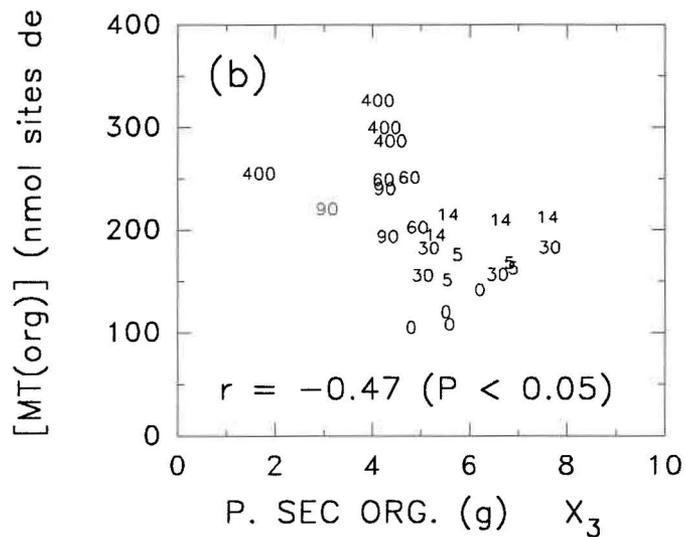
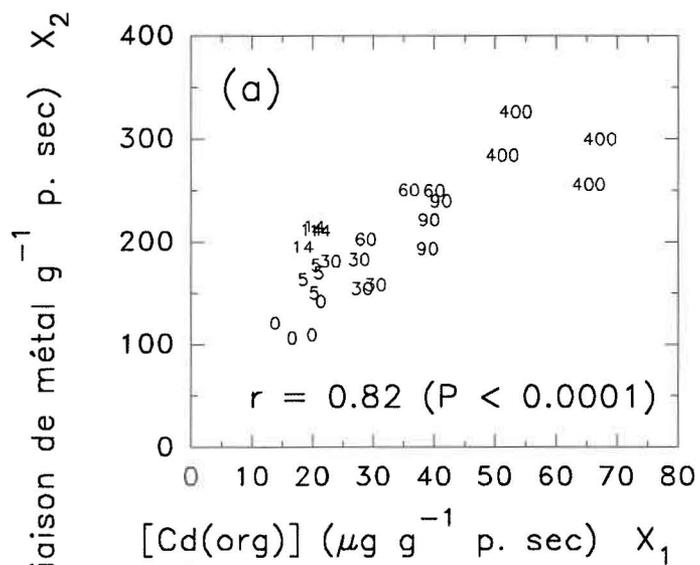


Tableau 3.5

Corrélations (r de Pearson) entre les concentrations de métallothionéine (nmol de sites de liaison de métal g^{-1} p. sec) et de métaux (nmol g^{-1} p. sec) dans les replicata tissulaires d'*A. grandis*, pour les différents traitements de la transplantation. Les corrélations partielles entre les concentrations de MT et de M, le poids sec tissulaire tenu constant, sont indiquées en *italique souligné*. Nous n'avons retenu que celles pour lesquelles des relations significatives existaient simultanément entre les poids secs tissulaires et les [MT] et les [M]. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

TRAITEMENT	MÉTAL		
	Cd	Cu	Zn
		MT BRANCHIES	
T-VA	0.76 ***	-0.04	0.66 ***
C-OP	-0.44	-0.51	0.04
C-VA	0.27	0.21	0.31
		MT MANTEAU	
T-VA	0.70 ***	0.41 *	0.64 ***
	<u>0.64 ***</u>	<u>0.36 *</u>	<u>0.58 **</u>
C-OP	0.59 *	0.19	0.50
C-VA	0.49 *	0.19	0.22
		MT HEPATOPANCREAS	
T-VA	0.56 **	-0.24	0.57 **
	<u>0.48 **</u>		<u>0.42 *</u>
C-OP	0.57 *	-0.18	0.20
	<u>0.40</u>		
C-VA	0.15	-0.45 *	0.30
		MT RESTES	
T-VA	0.75 ***	0.12	0.78 ***
	<u>0.75 ***</u>		<u>0.78 ***</u>
C-OP	0.73 **	0.36	0.72 **
C-VA	0.71 ***	0.59 **	0.70 ***
	<u>0.53 **</u>	<u>0.32</u>	<u>0.44 *</u>
		MT ORGANISME RECONSTITUE	
T-VA	0.82 ***	0.58 **	0.86 ***
	<u>0.77 ***</u>		<u>0.82 ***</u>
C-OP	0.59 *	0.16	0.60 *
C-VA	0.61 **	0.39	0.46 *
			<u>0.37</u>

Figure 3.4: (a) et (b) Diagrammes de dispersion des concentrations de métallothionéine (X_2) versus respectivement les concentrations de Cd (X_1) et le poids sec de l'organisme (X_3) des bivalves transplantés. Chaque nombre correspond au jour (après la transplantation) de prélèvement d'un réplikat individuel d'organisme donné. (c) Diagramme de dispersion de la corrélation partielle entre les concentrations de métallothionéine (X_2) et celles de Cd (X_1) des bivalves transplantés, le poids sec de l'organisme étant tenu constant (X_3). Les points représentent les replicata individuels d'organismes. Les lignes dénotent l'absence d'écart entre une observation et son estimation par la variable X_3 .

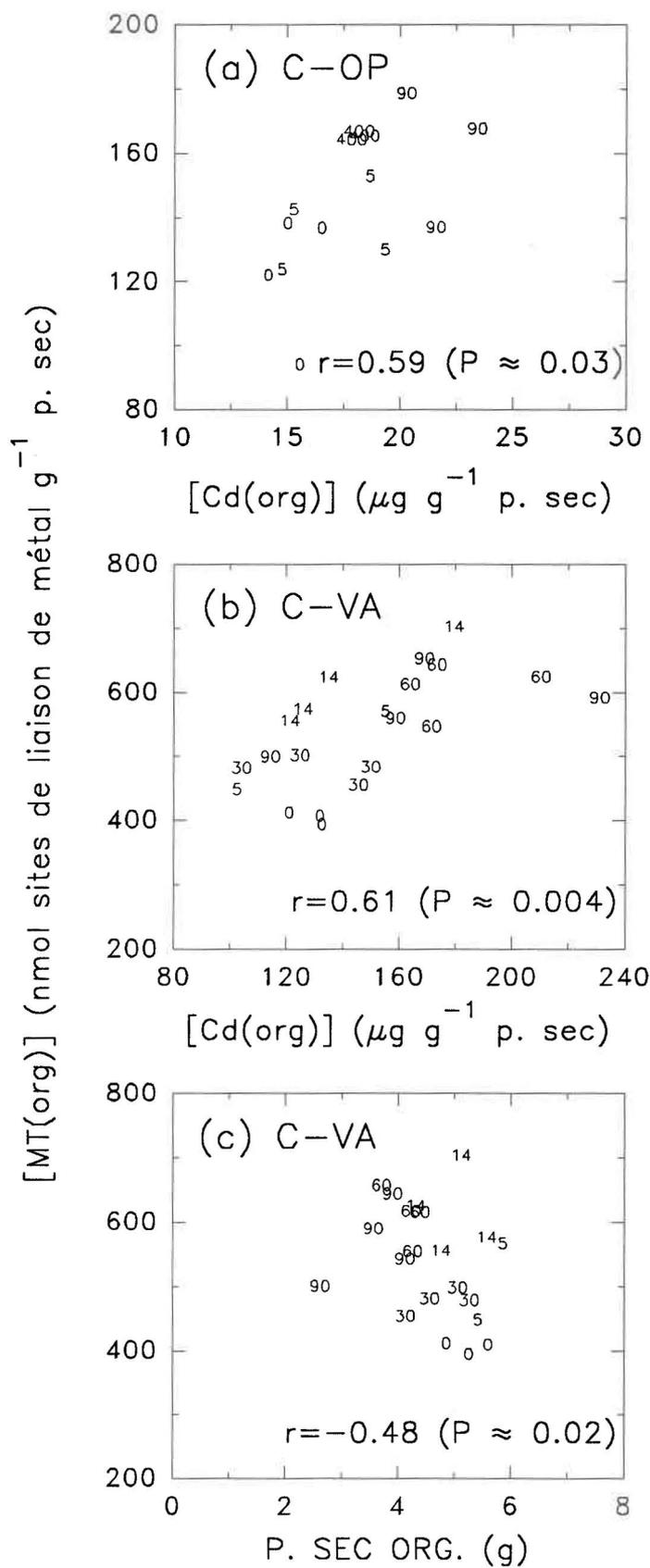
métallothionéine satisfait au critère 3 énoncé en introduction (existence d'une relation concentration-réponse).

La lente élévation des niveaux de métallothionéine dans les anodontes transplantées ne signifie pas nécessairement que la synthèse de la MT est un mécanisme lent. La dynamique de la MT dans le bivalve *A. grandis* intègre des processus de biosynthèse et de dégradation. L'induction de la métallothionéine résultant d'un changement de biodisponibilité de métal aurait pu être rapide dans les replicata T-VA, mais en raison de la variation biologique des témoins, ce phénomène ne fut pas détecté. Afin de mieux distinguer les processus de biosynthèse et de dégradation de la MT dans une telle expérience *in situ*, nous aurions à les étudier au niveau moléculaire.

Bivalves témoins

Concernant les groupes de mollusques témoins, C-OP et C-VA, les variations saisonnières [MT] étaient associées aux changements dans les concentrations tissulaires de Cd et de Zn. Toutefois, ces relations ne s'avérèrent pas aussi intenses que dans le cas des individus transplantés (T-VA), et ne furent pas systématiquement observées avec les branchies, le manteau et la glande digestive (tableau 3.5). Les changements en poids sec exercent un effet significatif sur les variations saisonnières des concentrations de MT, de Cd et de Zn dans les restes et l'organisme entier pour les témoins C-VA (tableau 3.5; figure 3.5c); ainsi, à cause des covariations avec les poids secs, la corrélation entre les [MT] et les [Cu] dans les restes, et celle entre les [MT] et les [Zn] dans l'organisme entier sont fausses (groupe C-VA: tableau 3.5). De tels effets ne sont pas apparus avec les bivalves témoins du lac Opasatica.

Figure 3.5: (a) et (b) Diagrammes de dispersion des concentrations de métallothionéine *versus* celles de Cd des bivalves témoins respectivement des lacs Opasatica (C-OP) et Vaudray (C-VA). (c) Diagramme de dispersion des concentrations de métallothionéine *versus* les poids secs des replicata des témoins du lac Vaudray. Chaque nombre correspond au jour de récolte d'un réplikat individuel d'organismes donné.



D'importantes variations saisonnières dans les concentrations métalliques ont été rapportées pour des bivalves marins (Cain et Luoma, 1990; Boyden et Phillips, 1981). Ces fluctuations étaient fortement reliées aux changements dans la masse des tissus mous, lesquels dépendaient (Boyden et Phillips, 1981) ou étaient indépendants (Cain et Luoma, 1990) du cycle de gamétogénèse et de frai. La production d'une protéine liant le Cd (homologuée à présent avec les MT) dans l'huître *Crassostrea virginica*, habitant la côte est des Etats-Unis, semblait assujettie à la température de l'eau et au cycle de reproduction (Fowler *et al.*, 1986). La production de la protéine atteignait un minimum en hiver pour ensuite se relever et arriver à un maximum pendant le développement des gonades et le frai, s'étendant de juin à août. De plus, au cours du frai et des derniers jours le précédant, le Cd était déplacé par le Cu aux sites de liaison de la protéine. Nous avons observé, de manière analogue aux travaux de Fowler *et al.* (1986), que les [MT(org)] des bivalves témoins C-OP et C-VA tendaient à être élevées dans les spécimens pour lesquels des oeufs ou des glochidias non matures étaient trouvés dans les marsupia branchiaux. L'occurrence de gravidité fut notée à 60 j (20 août 1990), 90 j (17 septembre 1990) et 400 j (24 juillet 1991) après la transplantation (voir la figure 3.5). Clairement, un suivi ininterrompu des populations indigènes d'anodontes sur plusieurs saisons consécutives s'impose si l'on espère apprécier l'importance de l'influence des cycles annuels de croissance, de gamétogénèse et de frai sur les concentrations de MT et de métaux, ainsi que sur la composition de la MT en métaux chez *A. grandis*.

Si la métallothionéine est appelée un jour à devenir une biosonde précoce d'exposition et de stress induit par les métaux traces, les variations saisonnières intra-site de ses concentrations devraient s'avérer moins importantes que les variations inter-site. Les changements saisonniers relativement modestes des niveaux de MT dans les bivalves témoins par rapport aux mêmes variations dans les bivalves transplantés apparaissent à ce titre rassurants. Les fluctuations temporelles des [MT] peuvent toutefois être plus appréciables dans les populations de moules d'eau douce habitant des environnements montrant une plus grande complexité dans leur régime hydrologique et leur géochimie. Entre autre, des suivis continus et étendus dans le temps sont requis si nous voulons tenir compte de manière adéquate des effets des facteurs endogènes et exogènes sur les concentrations de MT dans les populations indigènes de mollusques (critère 4).

Une diminution constante du poids sec des organismes fut remarquée pour tous les traitements, C-OP, C-VA et T-VA, et cela affecte évidemment le suivi temporel des indices de condition (figure 3.8). Il ne s'agit probablement pas d'un effet d'enclos puisque les indices de condition moyens des populations indigènes déclinerent aussi - il a été indiqué antérieurement que les indices de condition moyens des mollusques témoins (C-OP-400 j) et indigènes (OP IND) du lac Opasatica à 400 j n'étaient pas significativement différents entre eux (figure 3.8). Cain et Luoma (1990) observèrent également une baisse constante, sur deux années consécutives, de poids des tissus mous de spécimens du bivalve marin *Macoma balthica* endémiques à la baie de San Francisco. Un suivi annuel (avec une bonne fréquence d'échantillonnage) sur plusieurs saisons consécutives serait souhaitable pour évaluer les variations inter-annuelles de l'I.C. et relier celles-ci aux variations d'année en année qui peuvent survenir dans l'abondance et la qualité nutritive de la matière particulaire en suspension.

3.5.5 Répartition des métaux dans les cytosols branchiaux des bivalves transplantés

La distribution sub-cellulaire du Cd dans le cytosol branchial d'*A. grandis* fut déterminée à trois occasions durant le déroulement de l'expérience de transplantation. Les répartitions, établies par chromatographie, du Cd dans le cytosol branchial des bivalves transplantés, T-VA, sont disponibles pour un échantillon composite (de 4 individus) unique à 14, 90 et 400 j (Cu: 90 j seulement; tableau 3.6). Les concentrations de Cd dans plusieurs des fractions HPLC ($0.2 - 0.3 \text{ ng mL}^{-1}$) étaient proches de la limite de détection analytique de $0.08 \text{ ng Cd mL}^{-1}$. Cette imprécision analytique contribua sans doute aux récupérations variables de Cd après le fractionnement HPLC (76 - 155% de la $[\text{Cd}]_{\text{cyt}}$ totale; tel que constaté par des calculs de bilan massique). Malgré cette variabilité, les répartitions cytosoliques présentent des différences qualitatives importantes en cours d'expérience.

Quatorze jours après le déploiement des bivalves dans les enclos, le Cd se trouvait exclusivement associé à des ligands de haut poids moléculaire (HMW: P.M. > 15 kD) dans les cytosols branchiaux des spécimens transplantés. Après 90 j, tout le Cd était apparemment passé dans les fractions de poids moléculaire modéré (15 kD - 3 kD) contenant présumément la MT. Ces résultats concordent avec le temps estimé de réponse de la métallothionéine branchiale au changement dans le niveau de Cd ambiant lors de notre expérience (90 j; tableau 3.4). En contraste avec le Cd, et en accord avec sa dénomination d'élément essentiel, le Cu cytosolique parut essentiellement lié au groupement HMW,

Tableau 3.6

Concentrations de Cd et de Cu dans les fractions HPLC, obtenues par exclusion stérique, de cytosols branchiaux. Les cytosols analysés par chromatographie à trois occasions durant l'expérience, provenaient de spécimens transplantés du lac Opasatica (peu contaminé) au lac Vaudray (très contaminé) - (T-VA).

FRACTIONS POIDS MOLEC.	VOLUME D'ELUTION (mL)	[M] DANS LES FRACTIONS POUR CHAQUE TRAITEMENT			
		T-VA-14 j [Cd]	T-VA-90 j [Cd]	T-VA-90 j [Cu]	T-VA-400 j [Cd]
		($\mu\text{g g}^{-1}$ p. sec)			
HAUT	4-6	0.74	0	1.32	0
POIDS	6-8	0.42	0	5.62	0
MOLEC.	8-10	0.59	0	1.41	1.09
MT ^b	10-12	0	0	0	0
	12-14	0	6.62	1.49	0.96
FAIBLE POIDS MOLEC.	14-16	0	0	0	5.73
	16-18	0	0	0	0
	18-20	0	0	0	0
	20-22	0	0	0	0
RECUPERA- TION de la [M] TOTALE dans le CYTOSOL ^a (%)	Σ FRACT. ($\mu\text{g g}^{-1}$ p. sec)	1.74	6.62	9.83	7.79
		<i>versus</i>	<i>versus</i>	<i>versus</i>	<i>versus</i>
		2.28	4.26	10.87	6.33
		76%	155%	90%	123%

^a Les concentrations totales de M dans les cytosols branchiaux furent estimées, par spectrométrie d'émission atomique au plasma, sur des sous-échantillons de ces cytosols..

^b 10 kD correspond au volume d'élution de 12.6 mL.

contenant des métalloprotéines, à 90 j (85% du Cu cytosolique; tableau 3.6). Après 400 j, le Cd apparut pour la première fois dans les fractions de faible poids moléculaire (74% du Cd cytosolique, tableau 3.6); l'interprétation toxicologique que nous faisons de cette distribution est fournie plus loin.

Roesijadi et Klerks (1989) exposèrent des huîtres *Crassostrea virginica* à des concentrations de Cd^{2+} fluctuant entre 35 et 40 nM, pour 24 j. Ils étudièrent les cinétiques de liaison du Cd à la MT et à d'autres ligands intracellulaires dans des branchies excisées à différents moments en cours d'exposition. Ils conclurent que la complexation du Cd branchial est contrôlée par une compétition entre divers ligands montrant des affinités différentes pour ce métal, la MT possédant la plus forte affinité. Avant l'induction de la MT, estimée s'étant produite au jour 4, le Cd se lia principalement à la fraction particulière et au réservoir basal de MT (la taille de ce réservoir n'est pas fournie). Après

l'induction, la MT devint le ligand majeur pour le Cd et le métal initialement lié à d'autres fractions (particulaire, HMW, LMW) fut récupéré par la métallothionéine.

Les concentrations ambiantes de Cd^{2+} et la durée d'exposition associées à la présente expérience de terrain sont considérablement différentes des conditions de laboratoire fixées par Roesijadi et Klerks (1989). Il est tout de même intéressant de constater que le comportement du Cd dans les branchies des bivalves transplantés comporte certaines caractéristiques communes avec la complexation compétitive du Cd décrite par ces chercheurs.

3.5.6 Cytotoxicité des métaux traces

Modèle hypothétique

Tel qu'il a été mentionné en introduction, nous avons évalué le rôle de la MT dans la détoxification des métaux traces et dans le maintien en santé des organismes (critère 5) dans le cadre d'un modèle hypothétique de cytotoxicité causée par les métaux (Viarengo, 1989; Younes et Siegers, 1984; figure 3.6). Dans ce modèle, le rapport [métal cytosolique]/[MT] (Cd, Cu) refléterait la quantité de métal disponible pour exprimer de la toxicité cellulaire (étape 1 de la figure 3.6). Le processus de peroxydation lipidique (étape 2 de la figure 3.6) est défini au sens large comme étant une détérioration oxydative des lipides polyinsaturés composant les membranes cellulaires, initiée par des espèces réactives d'oxygène (O_2^- , $\text{OH}\cdot$, O_2^* ; Bus et Gibson, 1979). Les métaux non essentiels non complexés à la MT, ainsi que les métaux essentiels non liés à la MT et présents en excès (étape 1), intensifieraient le processus de peroxydation lipidique (étape 2) donnant lieu à des accroissements des niveaux de malondialdéhyde, un produit secondaire de cette peroxydation (Sunderman *et al.*, 1985). Il est bien établi du reste que le Cd et le Cu, en particulier, possèdent la capacité de stimuler ce processus (Hendry *et al.*, 1992; Gill *et al.*, 1990; Viarengo *et al.*, 1990). Avec une agression soutenue, plusieurs systèmes de défense contre ces dommages seraient affaiblis; une diminution de la glutathione (GSH), le principal antioxydant cellulaire, pourrait être observée (étape 3). Les espèces réactives d'oxygène ainsi que les métaux faisant intrusion dans la cellule altéreraient les systèmes d'extrusion du Ca logés dans la membrane cytoplasmique en réagissant, par exemple, avec les groupements -SH de la CaMg-ATPase (Viarengo, 1989; ex. avec Cd: Verboost *et al.*, 1988). A ce stade (étape 4), une accumulation

de Ca dans le cytoplasme se produirait; les fonctions cellulaires dépendant du Ca comme médiateur chimique seraient altérées et le tout aboutirait à la mort cellulaire (étape 5).

La signification du rapport [métal cytosolique]/[MT], utilisé implicitement dans ce modèle comme indicateur de la biodisponibilité du métal intracellulaire, mérite réflexion. Initialement, il fut proposé que la toxicité cellulaire se manifeste en présence de métal excédentaire non lié à la MT. Ainsi, un ratio [métal cytosolique]/[MT] plus élevé que 1 était associé avec des manifestations de cytotoxicité (Hogstrand, 1991). Les travaux de laboratoire à la base de ces idées impliquaient l'exposition d'organismes à un seul métal (Brown et Parsons, 1978). Cependant, dans l'environnement aquatique naturel, les animaux sont exposés plutôt à des mélanges de métaux et les rapports [métal cytosolique]/[MT] deviennent difficilement interprétables. Des études *in vitro* suggèrent que l'affinité de la MT pour différents métaux décroît dans l'ordre Hg > Cu > Cd > Zn (Roesijadi, 1992). Si cette même séquence tient *in vivo*, alors on peut anticiper que le Cd ne serait lié à la MT que si la quantité de sites de chélation offerte par la protéine se montre en excès de la quantité requise pour lier la majorité du Cu cytosolique. *Ce ne semble pas être le cas.* Brown *et al.* (1987) examinèrent les distributions cytosoliques du Cd, du Cu et du Zn dans le foie de trois espèces de poissons capturés dans deux sites côtiers respectivement très et peu contaminés du sud de la Californie. En contraste avec les considérations ci-dessus, les auteurs constatèrent, pour les trois espèces aux deux stations, que 75 à 95% du Cd cytosolique se retrouvait dans le "réservoir" ("pool") incluant la MT; alors que de fortes proportions de Cu (7-50%) étaient associées avec des ligands cytosoliques autres que MT. Nous observâmes dans les cytosols branchiaux des bivalves transplantés (T-VA) que 100% du Cd et seulement 15% du Cu éluaient avec les fractions chromatographiques englobant la métallothionéine 90 j après le début de l'expérience de transplantation (voir section 3.5.5). Si nous tenons compte de nos résultats et de ceux de Brown *et al.* (1987), les rapports [Cd]/[MT], [Cu]/[MT] et [Cd+Cu]/[MT] pourraient arborer une signification toxicologique ou une signification en regard de la physiologie de la cellule. Nous avons statué sur la pertinence de ces rapports en tant qu'indicateurs de "disponibilité" de métal dans le cytosol à l'intérieur du modèle de cytotoxicité déclenchée par les métaux traces, présenté auparavant. Les ratios [Zn]/[MT] et [Cd + Cu + Zn]/[MT] furent ignorés dans le traitement statistique de ces données. Nous avons supposé que le Zn est aisément déplacé par le Cu ou le Cd sur



Figure 3.6: Modèle hypothétique de cytotoxicité causée par les métaux. Séquence des événements résultant en la mort de la cellule après la peroxydation lipidique. Consulter le texte pour explications. Adapté de Viarengo (1989) et de Younes et Siegers (1984).

la MT, et étant donné son statut de métal essentiel, l'association du Zn à des enzymes ou à d'autres biomolécules du cytosol ne constitue pas nécessairement une indication de toxicité.

Modèle hypothétique - évaluation

Afin d'évaluer le modèle hypothétique de cytotoxicité présenté en figure 3.6, les branchies représentaient à notre avis l'organe-cible le plus évident pour ce type proposé de réactions cellulaires en chaîne. Leur contribution au poids sec total d'*A. grandis* variait entre 20 et 21% pour les bivalves témoins de cette expérience. Ces organes comptaient pour 38 à 47% des teneurs corporelles en Cd, mais pour seulement 11 à 14 % des teneurs corporelles en MT. De plus, les branchies des individus appartenant à la population du lac Vaudray étaient souvent déformées, alors que celles des spécimens du lac Opasatica arboraient une morphologie plus régulière (figure 3.7).

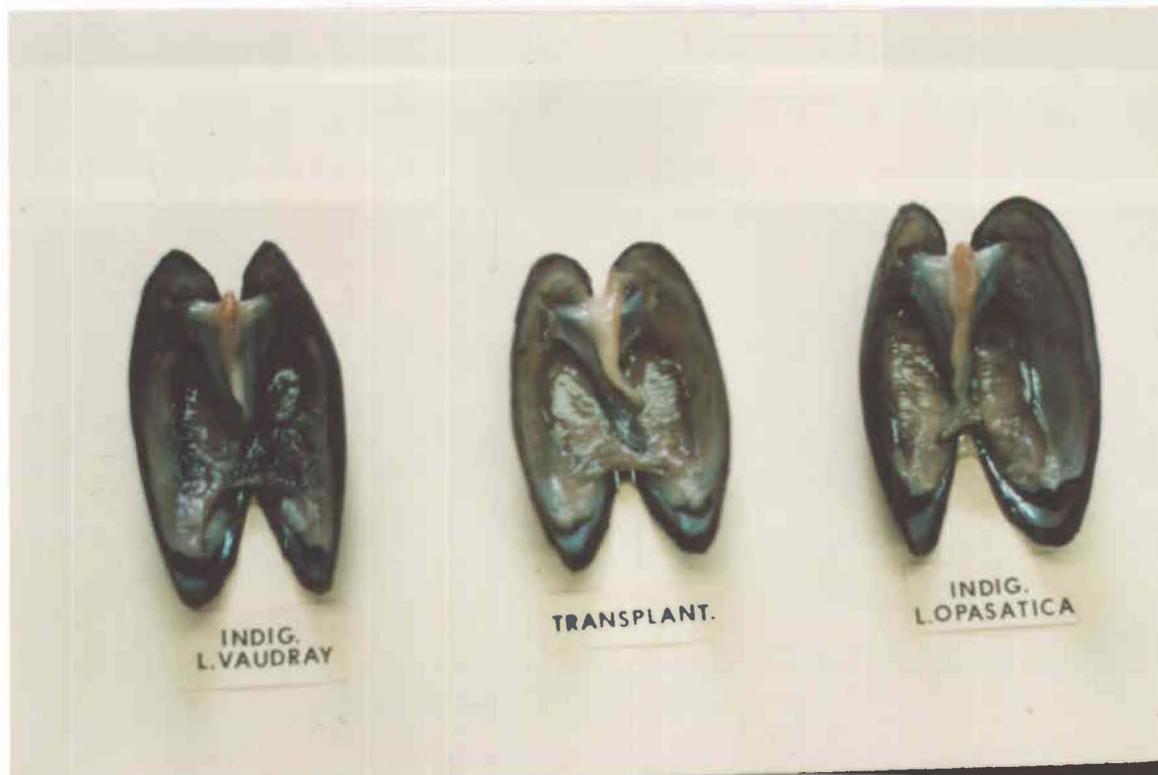


Figure 3.7: Aspects typiques des branchies des populations à l'étude. Les branchies des bivalves de la population du lac Vaudray étaient souvent déformées, alors que celles des spécimens du lac Opasatica arboraient une morphologie plus régulière (photo prise à 400 j après la transplantation).

La quantité de métal disponible pour exercer une toxicité cellulaire était représentée par le ratio [métal(cytosol)]/[MT] ($[M]_{\text{cyt}}/[MT]$); nous présumons, pour la MT, qu'une mole de sites de liaison de métal tel que mesurée par l'essai de saturation par le ^{203}Hg peut chélater 1 mole de Cd, ou 12/7 mole de Cu (Nielson *et al.*, 1985). La supposition implicite est également avancée qu'un ratio $[M]_{\text{cyt}}/[MT]$ élevé correspond à une "détoxification" moins efficace. La peroxydation lipidique a été évaluée sur la base des concentrations de malondialdéhyde ($[MDA]$). La perméabilité membranaire au Ca a été déterminée par la mesure de la $[Ca]_{\text{cyt}}$; des valeurs de $[Ca]_{\text{cyt}}$ élevées indiqueraient un accroissement de cette perméabilité. Les répercussions de la cytotoxicité sur l'organisme ont été jugées en terme de changements dans les valeurs des indices de condition (équation 3.1).

Les séries temporelles de chacune des variables ci-dessus pour les bivalves transplantés et témoins sont en figure 3.8. Pour les trois traitements, les $[MDA(\text{branchies})]$ moyennes et les $[Ca]_{\text{cyt}}$ moyennes ne varièrent pas significativement dans le temps (ANOVA, $P > 0.05$; figure 3.8b et 3.8c). Les $[Cu]$ moyennes dans les cytosols branchiaux des bivalves transplantés (T-VA) restèrent à peu près

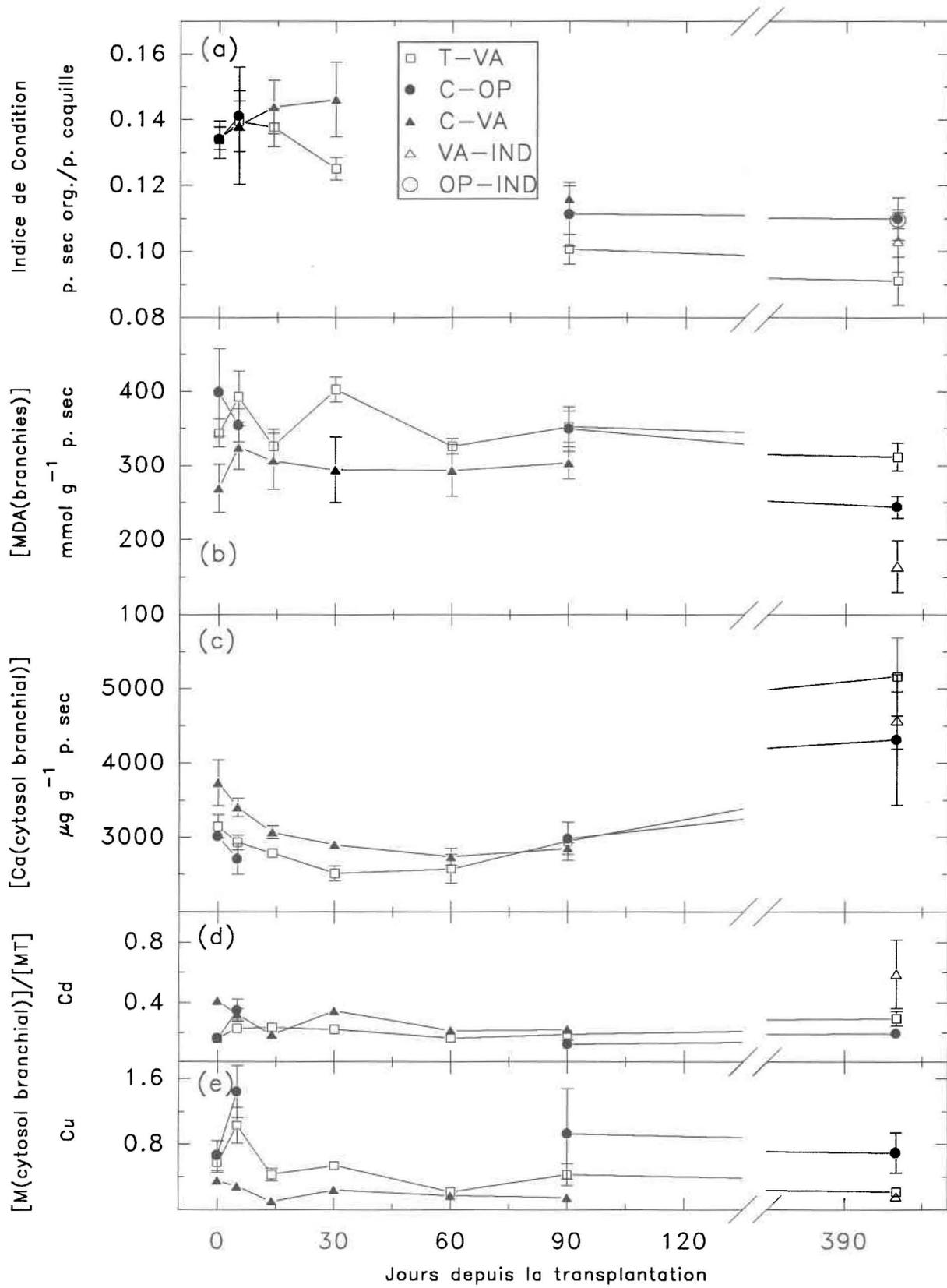
constantes dans le temps. De plus, les ratios moyens $[Cu]_{cyt}/[MT]$ pour les replicata T-VA étaient toujours inférieurs à 1, signifiant que les spécimens transplantés ont exclus efficacement ce métal du cytosol pour toute la durée de l'expérience (figure 3.8e). Pour ces raisons, nous avons écarté dans un premier temps le Cu cytosolique en tant que promoteur de toxicité dans les branchies d'*A. grandis*.

Les concentrations moyennes de cadmium dans le cytosol des bivalves transplantés sont significativement plus élevées à 90 et à 400 j que la valeur moyenne obtenue pour l'échantillon T-VA à 0 j (augmentations respectives de 230% et de 490%, $0.05 > P > 0.02$). Malgré cela, les rapports moyens $[Cd]_{cyt}/[MT]$ se rapportant aux groupes T-VA-400 j et C-OP-400 j ne sont pas significativement différents l'un de l'autre (figure 3.8d). Néanmoins, un examen attentif de la figure 3.8 révèle que les spécimens transplantés (T-VA) affichent, à 400 j, un ratio moyen $[Cd]_{cyt}/[MT]$ plus élevé que celui des bivalves témoins du lac Opasatica; les $[MDA]$ et $[Ca]_{cyt}$ moyennes du groupe T-VA-400 j sont les plus fortes concentrations des trois groupes; et l'indice de condition moyen des spécimens T-VA-400 j est le plus faible des trois indices. Il est intéressant de découvrir que ces tendances au dernier prélèvement concordent avec le modèle de cytotoxicité par les métaux traces décrit précédemment, quoique la nature séquentielle du modèle ne soit pas dévoilée par nos résultats.

Analyses discriminatoires

L'utilisation d'une analyse discriminatoire est apparue pertinente ici, car des groupes d'organismes peuvent être entièrement distincts quant à plusieurs caractères considérés conjointement, mais ils peuvent se chevaucher quant à chacun des caractères pris séparément (Jolicoeur, 1959) ⁶. Les groupes T-VA-400 j, C-OP-400 j et VA IND sont bien discriminés par une unique fonction discriminatoire ("discriminant function": DF) correspondant à une combinaison linéaire des variables $[Cd]_{cyt}/[MT]$, $[MDA]$, $[Ca]_{cyt}$ et indice de condition ($P \approx 0.04$; figure 3.9a). La signification du diagramme de dispersion discriminatoire est rendue explicite par la projection sur l'axe discriminant de chaque variable originale prise séparément; l'influence d'une variable sur la fonction discriminatoire est

⁶ Il est à noter que le groupe VA IND est un substitut des individus témoins du lac Vaudray à 400 j, puisqu'aucune valeur n'est disponible pour le groupe C-VA à ce moment.



indiquée par la longueur de son vecteur. En accord avec les tendances signalées plus haut, le groupe T-VA-400 j diffère des deux autres groupes, par des [MDA] et $[Ca]_{\text{cyt}}$ moyennes plus élevées, et par un indice de condition moyen plus faible. Le ratio $[Cd]_{\text{cyt}}/[MT]$ ne semble pas important pour la discrimination des groupes. L'inclusion du ratio $[Cu]_{\text{cyt}}/[MT]$ à l'ensemble des variables précédentes ($[Cd]_{\text{cyt}}/[MT]$, [MDA], $[Ca]_{\text{cyt}}$ et indice de condition) a un effet déterminant sur la discrimination des groupes T-VA-400 j, C-OP-400 j et VA IND. Leurs positions dans le diagramme de dispersion sont décrites par deux fonctions discriminatoires (K_1 , $P \approx 0.002$; K_2 , $P \approx 0.06$). L'influence plus marquée du rapport $[Cu]_{\text{cyt}}/[MT]$ que celle du rapport $[Cd]_{\text{cyt}}/[MT]$ dans la séparation des groupes est illustrée par le vecteur plus long du premier (figure 3.9b). Les corrélations entre les variables originales dans le plan discriminant K_1OK_2 sont évaluées par l'angle entre leurs vecteurs. Un angle de 90° entre deux vecteurs indique une corrélation nulle. Les accroissements dans les indices de condition des bivalves sont associés à des diminutions du rapport $[Cu]_{\text{cyt}}/[MT]$ et des [MDA] branchiales. Les ratios $[Cd]_{\text{cyt}}/[MT]$ sont positivement corrélés avec les [MDA] branchiales. L'interprétation de cette seconde analyse discriminatoire ne s'impose pas d'elle-même. Le cuivre et le cadmium sont reconnus pour promouvoir le processus de peroxydation lipidique dans les tissus des mollusques (Cu: Viarengo *et al.*, 1990), des mammifères (Cd: Gill *et al.*, 1990) et des végétaux (Cd: Hendry *et al.*, 1992). Le Cd peut inhiber sévèrement l'activité de l'enzyme Ca^{2+} -ATPase dans les membranes des poissons présumément à cause de la présence d'un groupement thiol au site actif de l'enzyme; la perturbation de la régulation cellulaire de l'ion Ca^{2+} s'ensuivrait (Verbost *et al.*, 1988). L'ion cuivrique semble également habilité à altérer l'homéostasie de l'espèce Ca^{2+} dans les branchies de la moule marine *Mytilus galloprovincialis* (Viarengo *et al.*, 1988). En regard des résultats des

Figure 3.8: Variations temporelles des indices de condition, des concentrations de malondialdéhyde et de calcium, et des ratios [métal]/[MT] des cytosols branchiaux des bivalves témoins et transplantés. Les autres caractéristiques de la figure sont expliquées dans la légende de la figure 3.3. Consulter le texte pour la discussion.

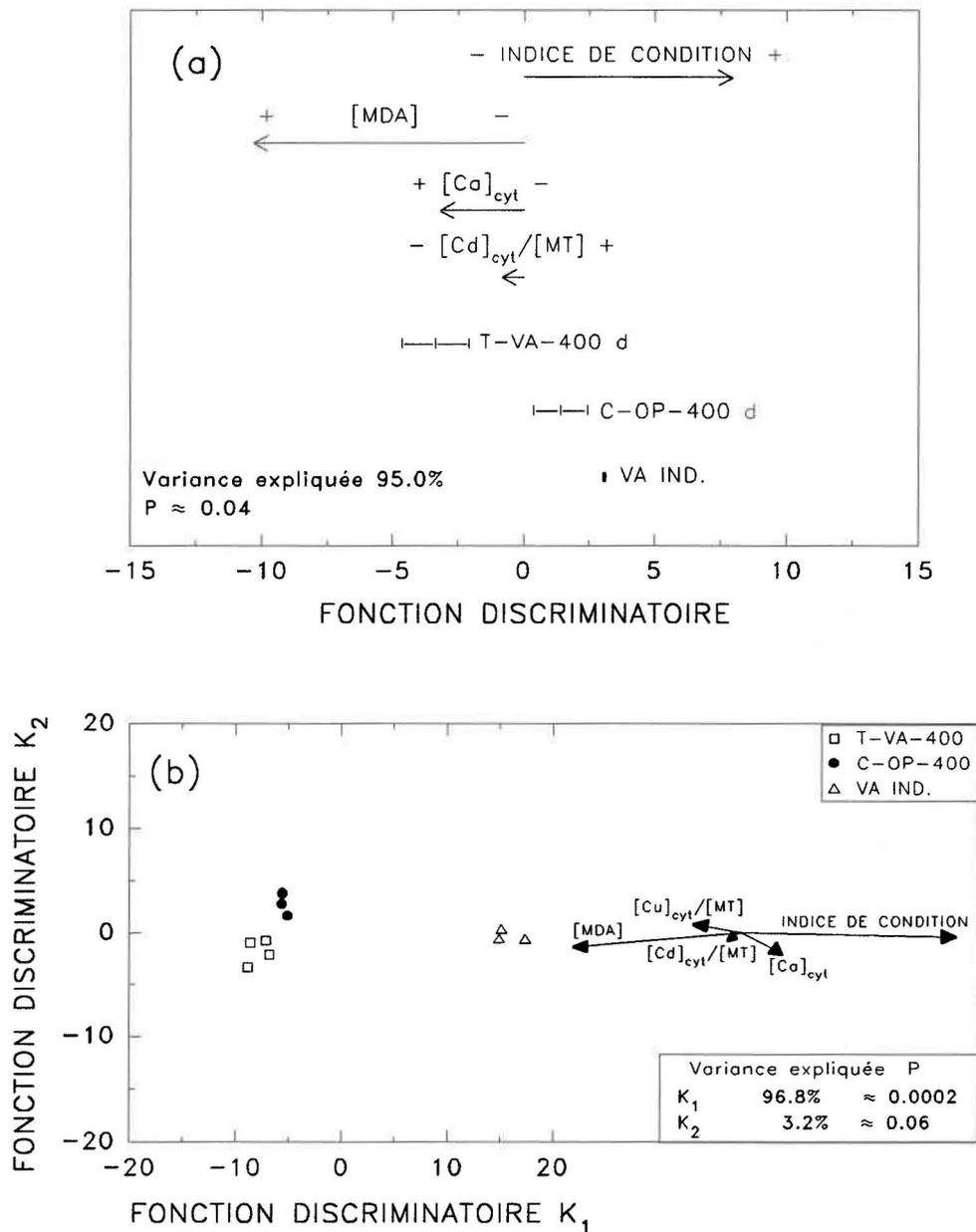


Figure 3.9: (a) Diagramme de dispersion de la fonction discriminatoire intégrant les variables indice de condition, [MDA(branchies)], [Ca(branchies)]_{cyt} et le ratio [Cd(branchies)]_{cyt}/[MT(branchies)] pour les bivalves témoins et transplantés à 400 j. La valeur moyenne ± un écart-type, prise par chacun des groupes dans la fonction DF, est indiquée. On y montre également l'effet de chaque variable originale prise séparément sur la valeur de la fonction DF; les valeurs d'entrée sont les moyennes générales des trois groupes. (b) Diagramme de dispersion des fonctions discriminatoires K₁ et K₂ intégrant les variables décrites ci-dessus ainsi que le ratio [Cu(branchies)]_{cyt}/[MT(branchies)]. La contribution de chaque variable originale sur les valeurs prises par les fonctions discriminatoires est illustrée par la projection de son vecteur sur les axes de DFK₁ et DFK₂. Les corrélations entre les variables originales dans le plan discriminant K₁0K₂ sont évaluées par l'angle entre leurs vecteurs. Un angle de 90° entre deux vecteurs indique une corrélation nulle.

deux études ci-dessus et du modèle théorique de cytotoxicité, on s'attend à ce que les variables $[Cu]_{cyt}/[MT]$ et $[Cd]_{cyt}/[MT]$ soient positivement corrélées avec la variable $[Ca]_{cyt}$; tel n'est pas le cas puisque le vecteur de la variable $[Ca]_{cyt}$ pointe dans la mauvaise direction en figure 3.9b. Cette observation peut être contrastée avec la figure 3.9a, dans laquelle le vecteur $[Ca]_{cyt}$ serait orienté dans la bonne direction. Cela suggère que les influences prédominantes de certaines variables sur les fonctions DFK_1 et DFK_2 (figure 3.9b) contraignent le vecteur de la variable $[Ca]_{cyt}$ d'adopter sa position contre-intuitive ⁷.

Pour une raison qui nous échappe, les concentrations moyennes en Cu des branchies des anodontes indigènes du lac Vaudray se montrent 2 fois plus élevées que celles de leurs congénères du lac Opasatica (VA IND: 3,060 nmol Cu g⁻¹ p. sec; OP IND: 1,435 nmol Cu g⁻¹ p. sec). Pourtant, les concentrations de cuivre restent semblables dans les autres parties corporelles des deux populations. De plus, les [Cu] dissous et sédimentaires, et les [COD] semblent similaires dans les deux lacs (voir le tableau 3.1). Pour contrer les effets toxiques du cuivre, les bivalves du lac Vaudray l'ont apparemment exclus du cytosol pour le stocker ailleurs dans le tissu branchial. Par exemple, les rapports globaux moyens $[Cu]_{cyt}/[Cu]_T$ (tissu) pour les échantillons C-VA et C-OP se chiffrent respectivement à 0.03 et 0.09. Les mollusques libres (VA IND) et confinés (C-VA) du lac Vaudray montrent également un plus fort potentiel dans la séquestration du Cu cytosolique (ratios $[Cu]_{cyt}/[MT]$ plus faibles) et ont de plus faibles niveaux branchiaux de MDA que les bivalves des autres traitements pour la durée entière de l'expérience (figure 3.8b et e). Rodríguez-Ariza *et al.* (1992) récoltèrent des représentants des bivalves marins *Chamalea gallina* et *Crassostrea gigas* sur les littoraux espagnols de l'Atlantique sud. Les animaux des régions les plus contaminées (Cd, Cu, Hg et Pb) possédaient des niveaux plus élevés d'enzymes anti-oxydantes et des niveaux plus bas de malondialdéhyde que ceux d'autres sites. Apparemment, les organismes les plus contaminés étaient mieux armés pour affronter le stress oxydant. Des tendances similaires furent observées pour des populations de poissons vivant dans des environnements pollués par des métaux toxiques (composés anti-oxydants: Klaverkamp *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1987).

⁷ Noter que la substitution des rapports $[Cu]_{cyt}/[MT]$ et $[Cd]_{cyt}/[MT]$ par le rapport $[Cd+Cu]_{cyt}/[MT]$ dans l'analyse discriminatoire correspondante ne résulte pas en une meilleure séparation des groupes (K_1 , $P \approx 0.008$; K_2 , $P \approx 0.31$)

Les membres du groupe C-OP-400 j au lac Opasatica ont apparemment un potentiel moindre de séquestrer le Cu cytosolique et ont des [MDA (branchies)] plus élevées que le groupe VA IND (figure 3.8b et e; on doit se rappeler que le groupe VA IND est le substitut du groupe C-VA-400 j). Par ailleurs, l'indice de condition moyen du groupe C-OP-400 j s'avère le plus élevé des trois groupes à 400 j; ceci est conséquent avec les basses concentrations métalliques mesurées chez les bivalves du lac Opasatica (voir le tableau 3.1 et la figure 3.3). Les épisodes de toxicité cellulaire devraient, certes, être peu fréquents.

Les bivalves transplantés du groupe T-VA-400 j présentent les plus hautes [MDA] et $[Ca]_{\text{cyt}}$ et le plus faible indice de condition des trois groupes à 400 j (figure 3.8a, b et c). La répartition du Cd dans le cytosol de ces anodontes révèle que l'apparition de ces symptômes de toxicité cellulaire dans les branchies (400 j) semble coïncider avec l'association du Cd avec les ligands de faible poids moléculaire (basé sur un seul échantillon composite, N = 1: tableau 3.6). Johansson *et al.* (1986) échantillonnèrent des bivalves de l'espèce marine *Macoma balthica* à intervalles mensuels dans la baie de San Francisco. Ils observèrent que les concentrations de Cu, d'Ag et de Zn augmentèrent de façon régulière dans des fractions chromatographiques de faible poids moléculaire (LMW) lorsque le "réservoir" de métallothionéine apparut saturé en présence de hautes concentrations cytosoliques de métaux. Malencontreusement, ils ne purent relier ces patrons de répartition à des indications de stress *in situ* causé par les métaux. A partir de travaux de laboratoire avec le polychète *Neanthes arenaceodentata*, Jenkins et Mason (1988) dénotèrent des perturbations dans la reproduction de cette espèce à 10 nM Cd^{2+} . Ceci coïncidait avec l'accumulation accrue du Cd dans un "réservoir" de ligands cytosoliques de très faible poids moléculaire. Ces études, à l'instar de celle-ci, se sont avérées impuissantes à établir la signification toxicologique de la complexation du cadmium à des ligands cytosoliques de faible poids moléculaire. Curieusement, le Cd semble avoir migré du groupement MT au groupement LMW à 400 j (tableau 3.6). Toutefois, étant donné le caractère fragmentaire de nos résultats, il est objectivement difficile de statuer sur la réalité de cette re-distribution du Cd cytosolique.

D'autres observations appuient notre interprétation de l'analyse discriminatoire ci-dessus. Aucun des groupes T-VA-i j, C-OP-i j et C-VA-i j à 0 j, 5 j ou à 90 j ne s'avèrent significativement distincts quant aux variables $[Cu]_{\text{cyt}}/[MT]$, $[Cd]_{\text{cyt}}/[MT]$, $[Ca]_{\text{cyt}}$, [MDA] et indice de condition considérées

conjointement. Les probabilités respectives sont $P \geq 0.05$, $P \approx 0.13$ et $P \approx 0.18$. Chacun des groupes de la série temporelle C-OP ne s'avèrent pas significativement différents quant aux mêmes variables incluses dans une fonction discriminatoire ($P \approx 0.055$). En contraste, les groupes de la série temporelle T-VA sont significativement discriminés (K_1 , $P < 0.00001$; K_2 , $P \approx 0.01$, K_3 , $P \approx 0.04$).

Les résultats précédents, éloquentes au point de vue biologique, ne constituent pourtant pas une validation *in situ* non ambiguë du modèle hypothétique de cytotoxicité présenté en figure 3.6. Les raisons sont énumérées ici bas.

(a) Les bivalves transplantés subissent apparemment un "débordement" ("spillover") de Cd dans les ligands de faible poids moléculaire du cytosol branchial (groupe T-VA-400 j; résultats du fractionnement HPLC). Ce débordement se produit même si le ratio $[Cd]_{\text{cyt}}/[MT]$ est inférieur à 1 pour tous les jours de récolte de groupes T-VA; ces rapports < 1 indiquent qu'il s'est trouvé constamment assez de MT dans le cytosol branchial pour complexer tout le Cd. De plus, le ratio $[Cd]_{\text{cyt}}/[MT]$ moyen du groupe VA IND est plus élevé que celui du groupe T-VA-400 j mais le premier groupe ne montre aucun symptôme évident de toxicité induite par le Cd ($[MDA(\text{branchies})]$ et $[Ca]_{\text{cyt}}$ faibles, indice de condition élevé). Pour clarifier éventuellement les relations entre les rapports $[M]_{\text{cyt}}/[MT]$, exprimant la complexation non spécifique (à la MT) ou encore la disponibilité des métaux dans le cytosol, et les réponses cellulaires et au niveau de l'organisme suivies lors de cette expérience de transplantation, une compréhension approfondie du mécanisme de détoxification est nécessaire. En particulier, les dynamiques du Cd, du Cu et du Zn dans les cytosols branchiaux et les branchies entières devraient être analysées en cours d'exposition pour les trois traitements. Comme il a été invoqué précédemment, la capacité de la MT à lier le Cd peut résulter d'une compétition pour les sites protéiques de chélation entre ledit métal et les métaux constitutifs Cu et Zn (Bebiano *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1987; Hamilton *et al.*, 1987).

(b) Les processus de peroxydation lipidique et de régulation cellulaire du Ca ont rarement été étudiés *in situ* chez les mollusques bivalves. La cinétique des phénomènes oxydants cellulaires et les effets de facteurs naturels sur ceux-ci sont mal compris (voir Ribera *et al.*, 1989). Entre autre, l'ion libre Ca^{2+} , plutôt que le Ca total cytosolique, est minutieusement régulé par la cellule en raison du rôle du premier comme messenger intracellulaire (Carafoli, 1987). Par conséquent, la concentration

cytosolique totale de Ca est moins indicatrice de régulation perturbée du macroélément que ne l'est la concentration de l'espèce Ca^{2+} . De plus, le modèle exposé en figure 3.6 peut s'avérer simpliste en ne tenant pas compte des dynamiques des espèces réactives d'oxygène dans la cellule comme, par exemple, la dégradation de substances dans les phagocytes (J. Pellerin-Massicotte, comm. pers.).

3.5.7 Relations entre la réponse en métallothionéine et les effets aux niveaux supérieurs d'organisation biologique

Réponses au niveau de l'organisme

En dépit du fait que nous n'avons pas réussi à démontrer sans ambiguïté le modèle hypothétique de toxicité cellulaire provoquée par les métaux traces (figure 3.6), d'intéressantes données concernant cette chaîne théorique d'événements cellulaires ont été obtenues. Ainsi, un fil conducteur semble exister entre l'apparition du Cd lié aux composés de faible poids moléculaire dans le cytosol branchial (tel que mesuré par chromatographie HPLC), la dégradation oxydative des membranes, l'homéostasie cellulaire perturbée du Ca et la détérioration des indices de condition des bivalves transplantés. La métallothionéine joue un rôle central dans le déclenchement de ces événements cellulaires lorsque le Cd "déborde" du compartiment MT. Au niveau de l'organisme entier, la croissance moyenne des anodonte marquées transplantées était significativement inférieure à celle des anodonte marquées témoins du lac Opasatica à 400 j ($[\text{longueur moyenne}_{400 \text{ j}} - \text{longueur moyenne } 0 \text{ j}] / \text{longueur moyenne } 0 \text{ j}] \times 100$: T-VA: 1.70%, N = 14, [incrément moyen en longueur: 1.7 mm]; C-OP: 3.9%, N = 9, [incrément moyen en longueur: 3.9 mm]; test de t pour 2 échantillons, P < 0.001). Comme les mollusques des traitements C-OP et T-VA originaient tous du lac Opasatica et étaient marqués et en enclos, nous présumons que l'effet de marquage et de confinement était semblable sur les deux échantillons.

Les résultats ci-dessus sont encourageants si nous désirons relier le degré de détoxification des métaux dans *A. grandis* à l'état de santé de l'organisme dans son environnement naturel (critère 5). Les jalons critiques restent l'isolation réussie du métal cytosolique non lié à la métallothionéine, et la détermination des dynamiques des métaux d'importance (Cd, Cu, Zn) au niveau de l'organe. Une

meilleure compréhension des relations entre le Cd non complexé à la métallothionéine et les réponses physiologiques de l'anodonte s'impose également.

Réponses au niveau de la population

La tolérance apparente des bivalves indigènes du lac Vaudray (VA IND), malgré leur exposition chronique au Cd, au Cu et à leur stress oxydant associé, contraste avec l'état de santé précaire des bivalves transplantés ([MDA(branchies)] et $[Ca]_{cyt}$ élevées, indice de condition faible). Il est tentant de raccorder cette tolérance à la présence de concentrations élevées de MT chez les individus appartenant à la population du lac Vaudray. De plus, depuis le démarrage d'opérations minières et de raffinage en 1927, les bivalves du lac Vaudray ont peut-être développé une tolérance aux métaux traces sur une base génotypique, compte tenu de la rapidité avec laquelle peut se dérouler l'évolution vers la tolérance aux métaux sous de fortes pressions sélectives (Bradshaw *et al.*, 1990). Dans des populations naturelles de drosophiles (insecte: *Drosophila* sp.), la multiplicité des copies du gène MT (amplification du gène MT) coïncidait avec des niveaux élevés d'ARN messager pour la protéine et une résistance accrue à la toxicité du cuivre (Maroni *et al.*, 1987). En raison de sa composante génétique, Luoma et Carter (1991) émettent l'avis que la tolérance élevée pour un métal à l'intérieur d'une population, relativement à d'autres populations de la même espèce, peut constituer une réponse spécifique à ce métal au palier d'organisation biologique de la population. Il s'ensuit que l'incidence de la tolérance aux métaux traces résultant d'une sélection génétique, chez les populations d'anodontes de la région de Rouyn-Noranda, s'avère une question importante. Celle-ci doit être résolue si nous souhaitons faire usage de la métallothionéine comme indicateur précoce d'exposition et de stress induit par les métaux traces chez l'espèce *A. grandis* ou chez quelque espèce animale en général (critère 1). En d'autres termes, les questions sont:

(i) Si nous présumons avoir correctement pris en compte les facteurs saisonniers influençant les niveaux de MT d'une espèce donnée à un site donné, pourrions-nous considérer qu'une haute concentration de MT est, dans ces conditions, un signal précoce d'exposition et de stress causé par un métal chez cette espèce ? Ou est-ce déjà une réponse au niveau de la population entière (une négation de la précocité de l'indicateur biochimique MT) ?

(ii) Soit deux populations de la même espèce se différenciant par leurs gènes MT; produiront-elles des concentrations différentes de MT dans les mêmes conditions d'exposition à un métal ? Si la réponse est oui, alors la [MT] d'une espèce donnée à un site donné ne peut être interprétée dans son sens absolu; les structures des gènes MT et les concentrations de métal biodisponible doivent être prises en considération pour interpréter correctement les résultats. Cette contrainte possible ne découragerait pas mais circonscrirait plutôt les usages possibles de la MT comme indicateur biochimique.

Les relations entre la réponse en métallothionéine et les réponses au niveau de la population peuvent être également évaluées sur la base de l'habileté de la population de bivalves du lac Vaudray à composer avec son habitat contaminé (concept de "fitness"). Pour faciliter cet examen, nous avons adapté à notre étude l'approche de Munkittrick et Dixon (1989) appliquée à l'élucidation *in situ* des impacts de substances toxiques sur des populations de poissons. Le principe de leur approche est qu'une population d'organismes croissant, se reproduisant et survivant de façon similaire à une population de référence sera considérée non affectée par quelque effet nocif accompagnant l'exposition aux contaminants. Les caractéristiques des populations de mollusques provenant de nos sites d'étude sont exposées au tableau 3.7. La population du lac Opasatica est notre population de référence suivant cette approche. Aucune différence détectable dans le taux moyen de croissance et l'indice de condition moyen n'est décelée entre les deux populations, suggérant ainsi une absence de toxicité pour les adultes. Toutefois, relativement au lac de référence, les bivalves du lac Vaudray montrent une plus faible incidence de femelles gravides par échantillon et un plus faible poids sec moyen de larves par individu (à 90 j), laissant présager l'existence d'effets toxiques au niveau des stades larvaires. La diminution résultante du recrutement de jeunes bivalves serait reflétée par l'âge moyen légèrement plus élevé (quoique non statistiquement significatif) des anodontes du lac Vaudray. Il faut souligner que l'âge moyen de nos populations de bivalves peut souffrir d'un biais méthodologique puisque les jeunes individus, endo-benthiques pour la plupart, ne seront pas prélevés efficacement par des plongeurs se bornant à une cueillette en surface des sédiments comme dans cette étude (voir Amyot et Downing, 1991). La population du lac Vaudray semblait plus importante que celle du lac Opasatica au départ de nos expériences, telles qu'en témoignent les valeurs de nombre de captures par unité de temps ("catch per unit effort": CPUE) aux deux sites. A la fin de la transplantation toutefois, une chute marquée de la variable CPUE fut observée au lac Vaudray. Malheureusement, les valeurs CPUE

Tableau 3.7

Caractéristiques des populations de bivalves (*A. grandis*) des lacs Opasatica et Vaudray. La réponse de la population du lac Vaudray à son environnement contaminé est comparée à celle de la population témoin du lac Opasatica. Une valeur plus élevée est dénotée par un plus, une diminution par un moins, et l'absence de changement par un zéro; deux symboles indiquent des tendances non significatives. Consulter le texte pour discussion.

Caractéristiques des populations	Sites		Changement observé
	VA (contaminé)	OP (témoin)	
Age moyen (années)	5.23 N = 57	4.88 N = 64	0,+
Taux de croissance	similaire ^a		0
Indice de condition	0.103 ± 0.009	0.110 ± 0.003	0
Fécondité			
% femelles gravides / échantillon	29 %	50 %	- ?
poids sec moyen larves / bivalve:	0.14 g	0.25 g	
CPUE ^b	1.78 A.g./min/ plongeur ^c	1.15 A.g./min/ plongeur	0,+ ?
Taille de la population	≈ similaire ^c		0,- ?

^a Voir la figure 3.2a.

^b Nombre de captures par unité de temps; voir le texte pour la discussion des facteurs soupçonnés d'avoir affectés la variable "CPUE".

^c Baisse sévère de la valeur CPUE en été 1992 pour la population du lac Vaudray à 0.21 A.g./min/plongeur.

de notre étude étaient influencées par l'habileté des plongeurs et la transparence de l'eau; différentes équipes récoltèrent les spécimens dans les deux lacs. La transparence de l'eau estimée par les plongeurs était respectivement ≤ 1 et ≥ 3 m pour les lacs Opasatica et Vaudray.

En conclusion, l'analyse précédente suggère un impact possible des métaux traces sur la reproduction des bivalves indigènes du lac Vaudray. Cependant, les données présentées au tableau 3.7 ne furent pas obtenues spécifiquement pour apprécier ces impacts et nous ne pouvons donc rigoureusement tester les effets anticipés d'un insuccès de reproduction sur la structure de la population (âge moyen, taille de la population, distribution des classes d'âge, etc...).

Un appui supplémentaire à l'existence d'effets adverses des métaux traces sur la reproduction d'*A. grandis* dans le lac Vaudray est offert par l'examen des concentrations de métallothionéine et de métaux dans les stades larvaires. Les larves furent extraites des demi-branchies de leurs parents à 60 j

Tableau 3.8

Concentrations de métallothionéine et de métaux, rapports $[Cd]_{T(\text{tissu})}/[MT]$, et poids secs des larves des groupes T-VA, C-OP, et C-VA à 60 et 90 j ($\bar{X} \pm S\bar{X}$). **a,b**

VARIABLES	TRAITEMENTS à 60 j			TRAITEMENTS à 90 j		
	T-VA	C-OP	C-VA	T-VA	C-OP	C-VA
MT (nmol sites de liaison g^{-1} p. sec)	61 ± 5.7 x *	-----	102 ± 9.8 y *	26 ± 8.5 x	23 ± 3.8 x	26 ± 2.6 x
Cd (nmol g^{-1} p. sec)	11 ± 4 x	-----	22 ± 4 x	11 ± 5 x	5 ± 3 x	65 ± 8 y **
Cu (nmol g^{-1} p. sec)	260 ± 20 x	-----	255 ± 60 x	620 ± 145 x	550 ± 170 x	1,380 ± 820 x
Zn (nmol g^{-1} p. sec)	520 ± 30 x	-----	535 ± 70 x	470 ± 8 x	470 ± 20 x	660 ± 30 y **
Ca ($\mu\text{mol } g^{-1}$ p. sec)	1,800 ± 140 x	-----	2,160 ± 130 x	5,400 ± 430 x	6,070 ± 200 x	5,200 ± 14 x
$\frac{[Cd]_{T(\text{tissu})}}{[MT]}$	0.20 ± 0.08 x	-----	0.22 ± 0.06 x	0.39 ± 0.16 x	0.21 ± 0.13 x	2.53 ± 0.56 y **
P. sec / bivalve (g)	0.06 ± 0.02 x	-----	0.04 ± 0.01 x	0.14 ± 0.03 x	0.25 ± 0.05 x	0.14 ± 0.02 x

a Tailles des échantillons de replicata: T-VA-60 j: 4; C-VA-60 j: 2; T-VA-90 j: 3; C-OP-90 j: 3; C-VA-90 j: 2.

b Pour chaque série à 60 ou à 90 j, les différences entre les moyennes sont indiquées par des lettres minuscules différentes, x, y, etc... (contrastes de Scheffé ou test de t pour deux échantillons: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

(août 1990; possiblement des stades embryonnaires) et à 90 j. Les hautes concentrations moyennes de Ca des échantillons à 90 j (tableau 3.8) suggèrent que les coquilles larvaires se développaient à cette époque (voir Mackie, 1984). A 90 j, pour des niveaux semblables de MT, les larves des témoins du lac Vaudray (C-VA) affichaient une concentration moyenne de Cd \approx 12 fois plus élevée ($P < 0.01$) que celles des larves des témoins du lac Opasatica (C-OP); les larves C-VA-90 j montraient également une capacité moindre, statistiquement hautement significative, de séquestrer le Cd par la MT (ratio $[Cd]_{T(\text{tissu})}/[MT]$: tableau 3.8). La situation est singulièrement différente à 60 j, auquel moment les

larves C-VA avaient respectivement une concentration de MT \approx 4 fois plus forte mais une concentration de Cd \approx 3 fois plus faible dans leurs tissus qu'à 90 j. Cette tendance temporelle s'avérait en gros similaire pour les larves des bivalves transplantés (T-VA). A 90 j, la reproduction des anodontes transplantées ne semblaient pas encore mise en péril: le groupe T-VA-90 j exhibait une incidence de femelles gravides (5 femelles gravides sur 11 spécimens) similaire au groupe C-OP-90 j. Pour des niveaux à peu près équivalents de MT, à 90 j, les larves des mollusques transplantés présentaient une concentration moyenne de cadmium plus élevée et un plus faible poids sec larvaire individu⁻¹ que les larves des témoins du lac Opasatica. Pour un prélèvement donné, les niveaux de Cu et de Zn étaient essentiellement constants pour tous les groupes.

Il semblerait, de l'analyse des tableaux 3.7 et 3.8, que les larves en développement présentes dans les marsupia branchiaux de leurs parents indigènes au lac Vaudray, paradoxalement une population tolérante aux métaux, font face à un stress provoqué par le Cd. Ce stress résulterait à son tour en un recrutement larvaire déficient au niveau de la population. Notre analyse s'appuie sur des stocks semblables de bivalves, vivant en des environnements similaires, et échantillonnés de même manière. Malgré cela, des différences insoupçonnées peuvent exister. L'hypothèse de reproduction déficiente devrait être éprouvée concurremment sur le terrain et au laboratoire en conditions plus contrôlées.

En principe, les coquilles larvaires et les tissus mous contribuèrent conjointement aux contenus en Cd des échantillons de larves obtenus après 90 j. Ces coquilles ne possédaient probablement pas encore une couche de périostracum (Pennak, 1989), reconnue pour détenir une capacité énorme à bioconcentrer les métaux traces chez les adultes (p. ex.: facteur de bioconcentration du Cd dans le périostracum de la moule zébrée [*Dreissena polymorpha*] \approx 70,000; Bias et Karbe, 1985). Lingard *et al.* (1992) ont mesuré les concentrations de Cd dans les couches coquillières de nacre (périostracum des coquilles enlevés) et les tissus mous de spécimens adultes du bivalve d'eau douce *Elliptio complanata*, dans un lac pauvre en calcium en Ontario. Ils ont obtenu les valeurs moyennes de 3.3 nmol Cd g⁻¹, 0.5 nmol Cd g⁻¹ et 169 nmol Cd g⁻¹ p. sec respectivement pour la "fraction protéique du nacre", la "fraction cristalline du nacre" et les tissus mous.

Peu d'études de terrain ou en laboratoire ont porté sur les effets des métaux traces sur la reproduction d'espèces animales. Au laboratoire, Ringwood (1993) soumit plusieurs stades vitaux du bivalve marin *Isomognon californicum* à des expositions de Cd en laboratoire. Les stades larvaires se révélèrent plus sensibles et affichèrent de plus forts taux d'accumulation que les adultes. Fait intéressant, la prise en charge du cadmium débuta seulement au moment de l'éclosion des oeufs c.-à-d. après que les membranes embryonnaires se dégradèrent (cf. tableau 3.8: données à 60 et 90 j). Les juvéniles des anodontes *A. grandis* et *A. imbecilis* âgés d'un ou deux jours se sont avérés autant affectés que le microcrustacé très sensible *Daphnia magna* à des expositions de métaux en laboratoire (Jacobson *et al.*, 1993; Keller et Zam, 1991). Par exemple, pour une dureté semblable de l'eau ($\approx 40 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$), les CL50-48 hres pour *A. imbecilis* et *D. magna* étaient respectivement de 507 et 578 nM Cd (Keller et Zam, 1991). Jenkins et Mason (1988) observèrent une totale absence d'accouplement pour des spécimens du polychète *Neanthes arenaceodentata* exposés en laboratoire à 10 nM Cd^{2+} . Cette concentration n'est que 4.5 fois plus élevée que la $[\text{Cd}^{2+}]$ estimée à 10 cm au-dessus des sédiments au lac Vaudray (voir le tableau 3.1).

En ce qui a trait aux études en milieu naturel, Johannson *et al.* (1986) rapportèrent qu'une population du bivalve marin *Macoma balthica* vivant près d'une source anthropique de Cu et d'Ag dans la baie de San Francisco apparaissait très tolérante au cuivre. Cette population s'éclipsa de l'aire d'échantillonnage à plusieurs reprises en 8 ans, et ces disparitions coïncidèrent avec de fortes concentrations tissulaires de Cu et d'Ag. Klaverkamp *et al.* (1991) étudièrent des populations de catostomes noirs (*Catostomus commersoni*) de la région de Flin Flon, Manitoba, qui est polluée par les émissions atmosphériques de Cu et de Zn d'une raffinerie locale de métaux. Des spécimens prélevés en 1981 dans un lac distant de 5.8 km de la raffinerie présentaient de plus fortes concentrations rénales et hépatiques de métallothionéine, et démontraient une plus grande résistance à la toxicité du Cd lors de bioessais en laboratoire que ceux d'un lac témoin à 20 km de la raffinerie. En dépit de cette résistance apparente au Cd, les catostomes ne purent être capturés dans le lac le plus pollué en 1986. Lors d'un échantillonnage en 1976, cette population avait affiché un piètre succès de frai, une survie réduite des oeufs et des larves, une taille des oeufs plus petite, et une longévité diminuée par rapport à la population témoin. Cependant, contrairement à la population de bivalves du lac Vaudray, les catostomes du lac le plus contaminé compensèrent leur insuccès de reproduction par

une fécondité accrue et une maturité sexuelle plus précoce (McFarlane et Franzin, 1978). Haukioja et Hakala (1978) étudièrent 13 populations du bivalve *Anodonta piscinalis* dans le sud-ouest de la Finlande. Fait intéressant pour notre étude, ils déterminèrent qu'un effort de reproduction est d'autant plus investi par les adultes que la survie des juvéniles devient prévisible. Dans des environnements instables, c.-à-d. dans des situations stressantes, les populations d'*A. piscinalis* se distinguaient par un faible effort de reproduction, par le faible effectif de leurs couvées et par une forte variabilité dans la survie des juvéniles (les auteurs soulignent que ces caractéristiques sont en désaccord avec les théories de sélection r et K).

En conclusion, cette étude et celles de Klaverkamp *et al.* (1991) et de Johannson *et al.* (1986) suggèrent qu'il existe des relations entre les dynamiques de la métallothionéine à l'intérieur des organismes et les réponses au niveau de la population (critère 1). De telles relations devraient également être recherchées dans des milieux contaminés de façon variée par les métaux traces. Les particularités des cycle vitaux ("life-cycle strategies") semblent un important facteur déterminant dans la façon qu'une population animale réagira au stress des métaux sur sa reproduction.

3.6 Conclusion

Le tableau 3.9 est une récapitulation des résultats de notre expérience de transplantation en relation avec les critères à être respectés par un indicateur biochimique "idéal", lesquels critères sont énumérés en Introduction (section 3.1). Des questions sont identifiées pour lesquelles de la recherche additionnelle est requise pour délimiter l'usage des niveaux de MT dans le bivalve *A. grandis* en tant qu'indicateur précoce d'exposition aux métaux traces et de stress induit par ceux-ci. Une des questions cruciales à être examinée est la relation entre les niveaux de MT et l'état présent ou futur d'une communauté aquatique. Les ajouts expérimentaux de Cd dans un lac du nord-ouest de l'Ontario ("Experimental Lakes Area": ELA) par Malley *et al.* (1991) peuvent contribuer à répondre à cette question.

La réussite de notre expérience de transplantation dépendait de la discrimination convenable de l'effet d'un changement dans l'exposition métallique sur les concentrations de MT dans *A. grandis*, toutes choses étant égales par ailleurs. Entre autres choses, les similarités dans la disponibilité des

Tableau 3.9

La concentration de métallothionéine dans le bivalve d'eau douce *Anodonta grandis* en tant qu'indicateur potentiel d'exposition aux métaux traces et de stress induit par ceux-ci. Sommaire des résultats de l'expérience de transplantation et leurs relations avec les critères pour un indicateur biochimique (consulter le texte pour explications).

CRITERE no	RESULTATS	REMARQUES
1. MT \rightarrow caractère précoce; réponse prédictive des effets aux niveaux supérieurs d'organisation biologique.	<p>Notre étude et 2 autres*:</p> <p>Il semble exister un lien entre (i) les dynamiques de la MT et des M cytosoliques et (ii) des perturbations dans la reproduction des populations affectées par les métaux . (Résultats préliminaires).</p> <p>* (Klaverkamp <i>et al.</i>, 1991 et Johannson <i>et al.</i>, 1986)</p>	<p>Une étude <i>in situ</i> de longue durée est requise.</p> <p>De telles relations devraient être également recherchées en des environnements contaminés par les métaux traces à des degrés divers. La question de la réponse en MT et la structure de son gène chez une population animale naturelle doit être résolue.</p> <p>L'étude des effets des métaux traces sur les larves d'<i>A. grandis</i> doit être entreprise.</p>
2. MT \rightarrow spécificité à un métal particulier ou à une catégorie de métaux traces.	<p>Notre étude:</p> <p>La MT dans <i>A. grandis</i> semble répondre particulièrement au Cd. (Voir aussi chapitre 2 ou Couillard <i>et al.</i>, 1993).</p>	<p>Plusieurs études en laboratoire suggèrent la spécificité de la MT à un groupe de métaux traces.</p>
3. La [MT] devrait répondre de façon dépendante à un changement de biodisponibilité de métal.	<p>Notre étude:</p> <p>Une relation de type "concentration-réponse" a été mise en évidence, <i>in situ</i>, aussi bien dans l'espace (chap. 2) que dans le temps (chap. 3).</p>	<p>Cette réponse devrait être également observée sur une vaste gamme d'eaux de surface de conditions physico-chimiques variées et avec d'autres métaux traces.</p>
4. MT \rightarrow connaissance des facteurs exogènes et endogènes affectant l'indicateur.	<p>Notre étude:</p> <p>Les niveaux de MT de nos populations indigènes montrèrent des variations saisonnières modestes (encourageant).</p>	<p>Une étude <i>in situ</i>, de longue durée de ce type est requise.</p> <p>Evaluer les fluctuations saisonnières en [MT] et des distributions cytosoliques des métaux en des environnements complexes dans leur régime hydrologique et leur géochimie.</p>
5. Le degré de détoxification des métaux internes devrait être relié à l'état de santé de l'organisme dans son environnement naturel.	<p>Notre étude:</p> <p>Dans les cytosols branchiaux des bivalves transplantés à 400 j, un lien semble exister entre:</p> <ul style="list-style-type: none"> - le Cd non complexé à la MT, - la dégradation oxydative des membranes, - l'homéostasie cellulaire perturbée du Ca, - la détérioration des indices de condition. <p>(Résultats fragmentaires).</p>	<p>Une meilleure compréhension du mécanisme de détoxification des métaux dans <i>A. grandis</i> est nécessaire;</p> <p>p. ex. études spatio-temporelles des dynamiques du Cd, du Cu et du Zn dans le cytosol.</p>

ressources pour notre espèce-test furent établies par la comparaison des indices de condition et des taux de croissance des populations de bivalves respectives. De telles approches furent employées par d'autres (McCuaig et Green, 1983; Haukioja et Hakala, 1978). En guise d'avertissement, la vérification rigoureuse de cette supposition requièrerait ultimement un échantillonnage intensif, simultanément aux deux sites, de variables-clés reflétant la disponibilité des ressources et la qualité de l'habitat: par exemple, le spectre de taille des particules nutritives en suspension, leurs valeurs calorifiques, le nombre de degrés-jours, la turbulence des eaux, l'exposition éolienne, etc...

Même si l'on n'en est pas encore à l'étape du développement et de l'application, le suivi environnemental de la métallothionéine dans le bivalve *Anodonta grandis* bénéficierait des qualités des mollusques comme bioindicateurs de pollution par les métaux. En particulier, l'espèce *A. grandis* se montre capable de tolérer de très forts contenus internes en contaminants et leur survivre sans effets adverses excessifs. En tant qu'organisme sédentaire, l'anodonte est représentative de l'aire d'échantillonnage. Elle fait preuve d'une bonne longévité, est de taille raisonnable et est largement disséminée sur le continent nord-américain (Clarke, 1981). Elle s'avère aisée à transplanter - la transplantation de spécimens affichant des antécédents communs de contamination et des génotypes semblables peut apporter des preuves solides d'impacts locaux de contamination ("site-specific impacts"; Clements, 1991). Le bivalve *A. grandis* peut être représentatif des organismes pour lesquels le vecteur principal de prise en charge des métaux est suspecté être le métal en phase dissoute dans les eaux superficielles (voir Tessier *et al.*, 1993, Couillard *et al.*, 1993 ou le chapitre 2 pour la discussion de ce point). Par conséquent, aux sites d'impacts où des augmentations significatives de [MT] sont enregistrées, les espèces biodisponibles de métal en solution pourraient être mesurées; cela fournirait une information utile aux déterminations des concentrations sans effet observable dans ce compartiment abiotique, en milieu naturel ("no-observable-effects concentrations: NOEC"). Les caractéristiques d'une telle biosonde hypothétique restent évidemment à définir: plan expérimental, mesure de la MT, du métal cytosolique non complexé à la MT, inclusion dans une batterie d'autres bioindicateurs, etc...

Un des principaux problèmes entravant l'usage en milieu naturel d'indicateurs biochimiques des effets des contaminants est que l'attention des chercheurs se concentre sur le développement de

nouvelles méthodes, plutôt que sur l'amélioration et la validation des réponses biochimiques connues pour l'usage sur le terrain (Veersteg *et al.*, 1988). Dans le développement de bioindicateurs, les déterminations des valeurs "NOEC" sont souvent assujetties à des considérations bureaucratiques et réglementaires (la question est de savoir si les métaux ont un effet biologique). L'utilisation de l'optique selon laquelle on cherche à comprendre comment les métaux affectent les réponses biologiques peut être plus profitable à cet égard (Luoma et Carter, 1991).

C H A P I T R E 4

CONCLUSION GENERALE

4. CONCLUSION GENERALE

Ce projet de doctorat a comporté deux parties principales: une étude multi-lacustre et une expérience de transplantation, toutes deux réalisées dans la région de Rouyn-Noranda avec le bivalve *Anodonta grandis*. Un objectif général sous-tendait ces deux études, soit l'évaluation *in situ* du potentiel de la métallothionéine dans *A. grandis* comme indicateur biochimique précoce d'exposition et de stress induit par les métaux traces toxiques. D'intéressants résultats ont été obtenus; le tableau synoptique 3.9 à la fin du chapitre 3 permet d'obtenir rapidement une vue d'ensemble des conclusions à tirer de ce projet. Nous reviendrons ici sur ces conclusions, en mettant l'accent sur les perspectives de recherche découlant de ce travail.

4.1 Perspectives de recherche

4.1.1 La métallothionéine dans le bivalve *Anodonta grandis* en tant qu'indicateur biochimique d'exposition à des métaux traces et de stress causé par ceux-ci dans l'environnement naturel.

L'étude multi-lacustre (chapitre 2) et l'expérience de transplantation (chapitre 3) mettent en lumière le caractère prometteur de la métallothionéine dans le bivalve *A. grandis* en tant qu'indicateur biochimique d'exposition et de stress causé par les métaux traces en milieu naturel. Toutefois, la nature exploratoire de certains résultats dénote la nécessité de recherche additionnelle pour statuer correctement sur la conformité de la MT aux critères attribués à un indicateur biochimique idéal (critères décrits en section 3.1). Trois études et leurs principales caractéristiques sont décrites ci-après.

(A) Variabilité spatiale et saisonnière des concentrations de métallothionéine, de métaux tissulaires, et de la répartition cytosolique du Cd, du Cu et du Zn:

Détermination des variabilités spatiales et saisonnières des concentrations de MT et de Cd, Cu, et Zn et de la répartition de ces métaux parmi les ligands cytosoliques (étude par chromatographie HPLC). Des spécimens d'*A. grandis* seraient examinés à divers sites présentant des conditions hydrologiques et géochimiques variées. L'étude se poursuivrait sur plusieurs cycles annuels avec une fréquence

d'échantillonnage relativement élevée; cette étude se ferait dans le cadre ou non d'une expérience de transplantation.

(B) Expérience de transplantation avec *A. grandis*:

Validation de l'approche par chromatographie liquide HPLC pour déterminer la répartition des métaux parmi différentes classes de ligands cytosoliques; vérification au laboratoire de la stabilité des complexes métal-ligand cytosolique, lors des étapes d'homogénéisation et de séparation (consulter nos travaux déjà effectués sur cette question: Micallef *et al.*, 1992 et l'annexe 4);

Chez les mollusques transplantés (site témoin → site contaminé; on devra aussi nécessairement prévoir des témoins), suivis de variables susceptibles de refléter une intoxication sous-létale par le Cd ou le Cu (parties du métal dans le cytosol présumément non liées à la MT); par exemple,

au niveau cellulaire: dynamiques du Cd, du Cu et du Zn dans le cytosol en cours d'exposition à ces métaux, peroxydation lipidique, intégrité membranaire, [glutathione] et [Ca] cytosoliques;

au niveau physiologique: taux de filtration (voir Patel et Anthony, 1991);

au niveau de l'organisme: indice de condition, croissance;

au niveau de la population: fécondité, survie des adultes et des juvéniles.

L'expérience devrait se poursuivre sur au moins deux cycles annuels complets avec une fréquence d'échantillonnage relativement élevée; les deux sites choisis devraient présenter des extrêmes de contamination, mais devraient se ressembler sur les autres plans (ex.: niveau trophique; voir section 3.6)⁸. Pour démontrer que les deux populations choisies pour cette expérience ont un taux de

⁸ Il serait particulièrement avantageux d'obtenir ces conditions dans un seul et même plan d'eau. Le lac Duparquet, situé à environ 50 km au nord-ouest de Rouyn-Noranda, pourrait se révéler un bon candidat. Un parc à résidus miniers (riche en As, Cu et Hg) situé sur sa rive nord, se prolonge pour 800 m dans le lac. Les concentrations totales sédimentaires atteignaient en 1985 à cet endroit 465 $\mu\text{g As g}^{-1}$ et 27 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$. L'eau filtrée près de cette rive contenait, en 1990, 148 $\mu\text{g As L}^{-1}$. Les concentrations de Hg dans les chairs du doré jaune, du doré noir et du grand brochet tournaient autour de 1 ppm en septembre 1990. Le lac Duparquet présenterait une transparence acceptable pour le travail en plongée (documentation fournie par D. Gagné, Conseil régional de la Santé et des Services sociaux de l'Abitibi-Témiscamingue, et R. Roy, MENVIQ à Rouyn-Noranda). Aucune information n'a malheureusement été obtenue sur la présence d'*A. grandis* et sur les concentrations biotiques et abiotiques de Cd, Cu et Zn dans ce lac.

croissance similaire, l'examen de leurs relations âge-longueur sera nécessaire. Si l'âge des bivalves est déterminé par le décompte des annuli externes sur la coquille, alors l'apparition une fois l'an d'un nouvel anneau externe doit être impérativement établi, à l'aide d'expériences de capture-recapture (discuté en section 3.4.1).

(C) Variabilité spatiale des concentrations de MT et de métaux biodisponibles dans l'eau:

Généralisation de la relation concentration-réponse $[MT]-[Cd^{2+}]_d$ (cf. modèle de l'ion libre défini dans le glossaire) observée avec le bivalve *A. grandis*. On chercherait à détecter cette relation dans des eaux de surface de conditions physico-chimiques variées (ex.: système Saint-Laurent) et même pour d'autres métaux traces (ex.: Hg). Rappelons qu'une relation concentration-réponse est un important attribut que doit arborer un indicateur biochimique en milieu naturel.

4.1.2 Etudes complémentaires

- Nous avons avancé, au chapitre 3, une hypothèse étayée par des résultats de nature préliminaire, obtenus lors de l'expérience de transplantation. Nous avons suggéré que les larves en développement dans les marsupia branchiaux de leurs parents indigènes au lac Vaudray font face à un stress provoqué par le cadmium; le métal non lié à la MT semblait responsable des effets toxiques. Cette hypothèse est importante parce qu'elle concerne la relation entre la $[MT]$ et les effets aux paliers supérieurs d'organisation biologique, dans ce cas-ci une réponse au niveau de la population (voir critère 1 dans le tableau 3.9). Cette hypothèse devrait être éprouvée concurremment sur le terrain (ex.: dans le cadre d'une nouvelle expérience de transplantation) et au laboratoire en conditions contrôlées. Dans cette dernière situation, une source fiable et constante de larves serait requise. Le mode de reproduction particulier d'*A. grandis* et des Unionidés (il comprend une larve parasitique: la glochidia) ne devrait pas décourager l'expérimentateur de cultiver le bivalve en laboratoire. Keller et Zam (1990) sont parvenus à maintenir en laboratoire une culture d'*A. imbecilis* sans l'emploi de poisson-hôte. Jacobson *et al.* (1993) ont obtenu des juvéniles d'*A. grandis* en grande quantité, en gardant et en nourrissant en aquariums de 80 L des spécimens du crapet *Lepomis macrochirus* expérimentalement infestés par des glochidias de ladite espèce.

- Des travaux préliminaires entrepris par l'auteur avec la larve de l'éphémère *Hexagenia limbata* (voir annexe 5) nous suggèrent fortement que celle-ci recèle une protéine de type métallothionéine. La concentration de la protéine serait significativement reliée à la concentration tissulaire de Cd, en milieu naturel. Ces résultats entrouvrent la porte à un domaine de recherche encore peu exploré soit les métallothionéines chez les insectes benthiques, en particulier chez la larve d'*H. limbata* (il existe peu de références à ce sujet).
- Pour le mollusque *A. grandis*, comme pour la larve benthique d'*H. limbata*, la métallothionéine devrait être homologuée hors de tout doute. Le tout passe par sa caractérisation en acides aminés, et par la détermination de sa séquence en acides aminés.
- L'auteur a trouvé à l'aide de données provenant de son étude et de travaux de Tessier et coll. (annexe 6) des relations positives hautement significatives entre les concentrations en Cu de deux espèces de bivalve et celles de Cu dissous, dans l'environnement naturel. Il est suggéré d'examiner les relations entre les concentrations en cuivre des organismes et les concentrations de Cu^{2+} dissous, en supposant qu'on puisse mesurer l'ion libre Cu^{2+} sans difficulté (cf. Tessier *et al.*, 1993).
- Effets des réductions aéroportées de métaux et de SO_2 sur les concentrations de métallothionéine et sur l'état de santé des bivalves.

La fonderie de Minéraux Noranda Inc. a entrepris depuis quelques années un programme de réduction de ses émissions de dioxyde de soufre (en collaboration avec le gouvernement du Québec). La manifestation la plus évidente de ce programme a été, en 1990, la mise en service d'une usine d'acide sulfurique, fabriqué à partir des émissions de SO_2 récupérées. La même année, les émissions annuelles de SO_2 n'étaient plus que de 133,000 t métriques, une diminution de 73% par rapport à 1980 (Dupont, 1992).

Consécutivement à cette action, des baisses significatives des niveaux de sulfates ont été observés par Dupont (1992) dans tous les plans d'eau visités jusqu'à une distance de 200 km de la raffinerie de Cu (voir le tableau 4.1 dans le cas de lacs à proximité de Rouyn-Noranda). Les pH de ces lacs sont restés stables; Dupont (1992) a attribué ceci au fait que le laps de temps écoulé entre la réduction effective des émissions de SO_2 et l'échantillonnage des lacs en 1991 s'est avéré trop court pour que

Tableau 4.1

Changements des concentrations de sulfates dans certains lacs de la région de Rouyn-Noranda pour la période 1982-1991 ^a

LAC	LONGITUDE	LATITUDE	[SO ₄] (mg L ⁻¹)	
			1982	1991
La Haie	78° 42' 05"	48° 28' 15"	6.5	5.3
Nora	79° 11' 30"	48° 21' 35"	10.0	8.7
D'Alembert	79° 00' 40"	48° 23' 00"	12.5	6.3
Savard	78° 52' 00"	48° 20' 00"	13.0	6.8
Marillac	78° 50' 35"	48° 15' 25"	16.0	10.3
Norman	78° 30' 00"	48° 13' 53"	15.5	10.7
Maron	79° 28' 20"	48° 12' 55"	7.5	5.5
Adéline	79° 10' 20"	48° 12' 20"	14.5	8.2

^a Adapté de Dupont (1992). Ce sont des lacs de tête dont le bassin versant n'était visiblement pas perturbé par les activités humaines; ils ont été échantillonnés à une seule occasion au début de mars 1982 et 1991. Les sulfates ont été analysés par colorimétrie automatisée et aucun préservatif n'a été ajouté lors du prélèvement.

des changements importants aient eu le temps de se produire (rémanence du bassin versant). Plusieurs lacs ont vu leurs pH augmenter et leurs concentrations en métaux traces diminuer depuis la fermeture de la fonderie de métaux non ferreux de Coniston en Ontario (Havas, 1989).

Cette situation s'avère particulièrement propice pour évaluer l'effet de réductions atmosphériques de métaux et de SO₂ sur les concentrations de MT et l'état de santé des populations d'*A. grandis* vivant autour de Rouyn-Noranda. Dans les prochaines années, on peut s'attendre à ce que la baisse des dépôts atmosphériques de métaux et de SO₂ fasse diminuer les concentrations de Cd²⁺_d des lacs environnants (voir la dépendance de la [Cd²⁺]_d envers la [H⁺]_d: chapitre 2 et annexe 1). Si, comme nous l'avons fortement suggéré au chapitre 2, la concentration de MT répond de façon dépendante à la concentration de l'ion Cd²⁺ eu égard au rôle de la protéine dans la détoxification des métaux, nous anticipons que les bivalves de l'espèce *A. grandis* de la région synthétisent moins de MT et fassent preuve d'un meilleur état de santé dans le futur. A cet effet, nous avons visité 11 lacs en 1989 (avant la mise en service de l'usine de H₂SO₄). Les visites de ces lacs de nouveau vers 1995 et l'an 2000 permettraient de vérifier ces hypothèses. Du même coup, ces visites rendraient compte de l'impact environnemental de la diminution des émissions de SO₂ dans les écosystèmes aquatiques entourant Rouyn-Noranda.

C H A P I T R E 5

BIBLIOGRAPHIE

5. BIBLIOGRAPHIE

- Adams, W.J., R.A. Kimerle et J.W. Barnett, Jr. 1992. Sediment quality and aquatic life assessment. *Environ. Sci. Technol.* 26: 1864-1875.
- Ahrland, S. 1968. Thermodynamics of complex formation between hard and soft acceptors and donors. *Struct. Bonding* 5: 118-149.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et J.D. Watson. 1983. Molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc, New York et London. 1145 p. + ann.
- Amiard-Triquet, C., R. Martoja et C. Marcaillou. 1992. Alternative methodologies for predicting metal transfer in marine food webs including filter-feeders. *Wat. Sci. Tech.* 25: 197-204.
- Amyot, J.P. et J.A. Downing. 1991. Endo- and epibenthic distribution of the unionid mollusc *Elliptio complanata*. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 10: 280-285.
- Arafat, N.M. 1985. The impact of mining and smelting on trace metal distribution in lake sediments around Rouyn-Noranda, Québec. *Water Pollut. Res. J. Canada* 20: 1-8.
- Baer, K.N. et P. Thomas. 1990. Influence of capture stress, salinity and reproductive status on zinc associated with metallothionein-like proteins in the livers of three marine teleost species. *Mar. Environ. Res.* 29: 277-287.
- BEST. 1978. Etude de la variabilité du pH des précipitations autour de Rouyn-Noranda. Gouvernement du Québec, Bureau d'étude sur les substances toxiques, rapport E-13. 74 p.
- BEST. 1979a. Détermination de la quantité des substances toxiques rejetées dans l'environnement de la région de Rouyn-Noranda. Gouvernement du Québec, Bureau d'étude sur les substances toxiques, rapport T-6. 253 p.
- BEST. 1979b. Etude écologique de la région de Rouyn-Noranda. Gouvernement du Québec, Bureau d'étude sur les substances toxiques, rapport E-17. 552 p.
- Bebianno, M.J., W.J. Langston et K. Simkiss. 1992. Metallothionein induction in *Littorina littorea* (Mollusca: Prosobranchia) on exposure to cadmium. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 72: 329-342.

- Bédard, M., M. Chapados et G. Kachaniwsky. 1991. Advances in technology for complex custom feed material treatment at Noranda. *Can. Inst. Mining Metal. Bull.* 84: 64-69.
- Bedford, J.J. 1973. Osmotic relationships in a freshwater mussel *Hyridella menziesi* Gray (Lamellibranchia: Unionidae). *Arch. Intern. Physiol. Biochem.* 81: 819-831.
- Beeby, A. 1991. Toxic metal uptake and essential metal regulation in terrestrial invertebrates: a review. Dans: Newman, M.C. et A.W. McIntosh [éds]. Metal ecotoxicology - concepts and applications. Lewis Publishers, Chelsea, MI. chap. 3: 65-89.
- Berryman, D. 1990. Sélection de nouveaux indicateurs de la qualité des cours d'eau du Québec. Ministère de l'Environnement du Québec, Direction de la qualité des eaux, rapport QE-90-05. 77 p.
- Bias, R. et L. Karbe. 1985. Bioaccumulation and partitioning of cadmium within the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* Pallas. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 70: 113-125.
- Blaise, C. 1991. Microbiotests in aquatic ecotoxicology: characteristics, utility, and prospects. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6: 145-155.
- Boyden, C.R. et D.J.H. Phillips. 1981. Seasonal variation and inherent variability of trace elements in oysters and their implications for indicator studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 5: 29-40.
- Bradshaw, A.D., T. McNeilly et P.D. Putwain. 1990. The essential qualities. Dans: Shaw, A.J. [éd]. Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. CRC Press, Boca Raton, FLA. chap. 21: 323-334.
- Bremner, I. et J.H. Beattie. 1990. Metallothionein and the trace minerals. *Ann. Rev. Nutr.* 10: 63-83.
- Brouwer, M., D. Schlenk, A.H. Ringwood et T. Brouwer-Hoexum. 1992. Metal-specific induction of metallothionein isoforms in the blue crab *Callinectes sapidus* in response to single- and mixed-metal exposure. *Arch. Biochem. Biophys.* 294: 461-468.
- Brown, D.A., S.M. Bay, D.J. Greenstein, P. Slazay, G.P. Hershelman, C.F. Ward, A.M. Westcott et J.N. Cross. 1987. Municipal wastewater contamination in the Southern California Bight. II. Cytosolic distribution of contaminants and biochemical effects in fish livers. *Mar. Environ. Res.* 21: 135-161.

- Brown, D.A. et T.R. Parsons. 1978. Relationship between cytoplasmic distribution of mercury and toxic effects to zooplankton and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) exposed to mercury in a controlled ecosystem. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 35: 880-884.
- Bus, J.S. et J.E. Gibson. 1979. Lipid peroxidation and its role in toxicology. Dans: Hodgson, Bend, et Philpot, [éds]. Reviews in biochemical toxicology. Elsevier North Holland. pp. 125-149.
- Cain, D.J. et S.N. Luoma. 1990. Influence of seasonal growth, age, and environmental exposure on Cu and Ag in a bivalve indicator, *Macoma balthica*, in San Francisco Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 60: 45-55.
- Cairns, J., Jr. et D.I. Mount. 1990. Aquatic toxicology. *Environ. Sci. Toxicol.* 24: 154-161.
- Campbell, P.G.C. 1994. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. Accepté dans: Tessier, A. et D. Turner [éds]. Trace Metal Speciation and Bioavailability. Lewis Publishers, Boca Raton, FLA.
- Carafoli, E. 1987. Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 395-433.
- Clarke, A.H. 1981. The freshwater molluscs of Canada. National Museum of Natural Sciences, National Museum of Canada, Ottawa, Canada. 446 p.
- Clements, W.H. 1991. Community responses of stream organisms to heavy metals: a review of observational and experimental approaches. Dans: Newman, M.C. et A.W. McIntosh [éds]. Metal ecotoxicology - concepts and applications. Lewis Publishers, Chelsea, MI. chap. 13: 363-391.
- CNRC. 1988. Biologically available metals in sediments. Conseil national de Recherche du Canada, Sous-Comité associé sur les critères scientifiques concernant l'état de l'environnement, rapport CNRC no 27694. 298 p.
- CNRC. 1985. The use of biochemical indicators in the assessment of ecosystem health - their development and validation. Conseil national de Recherche du Canada, Sous-Comité associé sur les critères scientifiques concernant l'état de l'environnement, rapport CNRC no 24371. 119 p.
- Cosson, R.P., C. Amiard-Triquet et J.C. Amiard. 1991. Metallothioneins and detoxication. Is the use of detoxication protein for MTs a language abuse? *Water Air Soil Pollut.* 57-58: 555-567.

- Costan, G. 1992. Diagnosis of effluent ecotoxicity with an innovative biological-chemical approach. Dans: Niimi, A.J. et M.C. Taylor [éds]. Comptes rendus du dix-huitième atelier annuel sur la toxicité aquatique: du 30 septembre au 3 octobre 1991, Ottawa, Ontario. Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat. 1863. p. 183.
- Couillard, Y., P.G.C. Campbell et A. Tessier. 1993. Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. *Limnol. Oceanogr.* **38**: 299-313.
- Cousins, R.J. 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* **65**: 238-309.
- Davenport, J. et X. Chen. 1987. A comparison of methods for the assessment of condition in the mussel (*Mytilus edulis* L.) *J. Moll. Stud.* **53**: 293-297.
- Davenport, W.G. 1980. Copper smelting to the year 2000. *Can. Inst. Mining Metal. Bull.* **73**: 152-158.
- De Robertis, E.D.P., F.A. Saez et E.M.F. De Robertis, Jr. 1975. Cell biology, 6^e éd. W.B. Saunders Co, Philadelphia, London, Toronto. 615 p.
- Deniseger, J.L., L.J. Erickson, A. Austin, M. Roch et M.J.R. Clark. 1990. The effects of decreasing heavy metal concentrations on the biota of Buttle Lake, Vancouver Island, British Columbia. *Water Res.* **24**: 403-416.
- Downing, W.L., J. Shostell et J.A. Downing. 1992. Non-annual external annuli in the freshwater mussels *Anodonta grandis grandis* and *Lampsilis radiata siliquoidea*. *Freshwater Biol.* **28**: 309-317.
- Dupont, J. 1992. Effets des réductions des émissions de SO₂ sur la qualité de l'eau des lacs de la région de Rouyn-Noranda. Ministère de l'Environnement du Québec, Direction de la qualité des cours d'eau, rapport no QEN/PA-43/1. 74 p.
- Dutton, M.D., M. Stephenson et J.F. Klaverkamp. 1993. A mercury saturation assay for measuring metallothionein in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**: 1193-1202.
- Eaton, D.L. et B.F. Toal. 1982. Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **66**: 134-142.

- Elliott, J.E., A.M. Scheuhammer, F.A. Leighton et P.A. Pearce. 1992. Heavy metal and metallothionein concentrations in Atlantic Canadian seabirds. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22: 63-73.
- Engel, D.W. et M. Brouwer. 1987. Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus*: metallothionein function in metal metabolism. *Biol. Bull.* 173: 239-251.
- Engel, D.W. et G. Roesijadi. 1987. Metallothioneins: a monitoring tool. Dans: Vernberg, W.B, A. Calabrese, F.P. Thurberg et F.J. Vernberg [éds]. *Pollution physiology of estuarine organisms*. Univ. South Carolina. pp. 421-438.
- Fowler, B.A., D.W. Engel et M. Brouwer. 1986. Purification and characterization studies of cadmium-binding proteins from the American oyster *Crassostrea virginica*. *Environ. Health Persp.* 65: 63-69.
- Fowler, B.A., C.E. Hildebrand, Y. Kojima et J. Webb. 1987. Nomenclature of metallothionein. Dans: Kägi, J.H.R. et Y. Kojima [éds]. *Metallothionein II*. Birkhäuser-Verlag. *Experientia Suppl.* 52: 19-22.
- George, S.G. 1983. Heavy metal detoxication in the mussel *Mytilus edulis*-composition of Cd-containing kidney granules (tertiary lysosomes). *Comp. Biochem. Physiol.* 76C: 53-57.
- Ghent, A.W., R. Singer et L. Johnson-Singer. 1978. Depth distributions determined with SCUBA, and associated studies of the freshwater clams *Elliptio complanata* and *Anodonta grandis* in Lake Bernard, Ontario. *Can. J. Zool.* 56: 1654-1663.
- Gill, K.D., R. Sandhir, G. Sharma, R. Pal et R. Nath. 1990. Perturbations in lipid peroxidation and antioxidant enzymes on cadmium exposure to growing rats. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 3: 79-89.
- Gould, S.J. et R.C. Lewontin. 1979. The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proc. R. Soc. London B* 205: 581-598.
- Gouvernement du Canada. 1991. *L'état de l'environnement au Canada*. Ministère de l'Environnement du Canada, Ottawa, no de cat. EN21-54/1991F.
- Green, R.H., R.C. Bailey, S.G. Hinch, J.L. Metcalfe et V.H. Young. 1989. Use of freshwater mussels (*Bivalvia*: Unionidae) to monitor the nearshore environment of lakes. *J. Great Lakes Res.* 15: 635-644.

- Hamilton, S.J., P.M. Mehrle et J.R. Jones. 1987. Evaluation of metallothionein measurement as a biological indicator of stress from cadmium in brook trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 116: 551-560.
- Hanson, J.M., W.C. Mackay et E.E. Prepas. 1988. The effects of water depth and density on the growth of a unionid clam. *Freshwater Biol.* 19: 345-355.
- Hare, L. et P.G.C. Campbell. 1992. Temporal variations of trace metals in aquatic insects. *Freshwater Biol.* 27: 13-27.
- Hare, L., P.G.C. Campbell, A. Tessier et N. Belzile. 1989. Gut sediments in a burrowing mayfly (Ephemeroptera: *Hexagenia limbata*): their contribution to trace element burdens, their removal, and the efficacy of a correction for their presence. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 451-456.
- Hare, L., E. Saouter, P.G.C. Campbell, A. Tessier, F. Ribeyre et A. Boudou. 1991a. Dynamics of cadmium, lead, and zinc exchange between nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* (Ephemeroptera) and the environment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 39-47.
- Hare, L., A. Tessier et P.G.C. Campbell. 1991b. Trace element distributions in aquatic insects: variations among genera, elements, and lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 1481-1491.
- Harris, J.H., P.E. Sager, H.A. Regier et G.R. Francis. 1990. Ecotoxicology and ecosystem integrity: the Great Lakes examined. *Environ. Sci. Technol.* 24: 598-603.
- Haukioja, E. et T. Hakala. 1978. Life-history evolution in *Anodonta piscinalis* (Mollusca, Pelecypoda). *Oecologia (Berl.)* 35: 253-266.
- Haux, C. et L. Förlin. 1989. 9 selected assays for health status in natural fish populations. Dans: Landner, L. [éd]. Chemicals in the Aquatic Environment: Advanced Hazard Assessment. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 197-215.
- Havas, M. 1989. Recovery of acidified and metal-contaminated lakes in Canada. Dans: Norton, S.A., S.E. Lindberg et A.L. Page [éds]. Acidic precipitation Vol. 4: Soils, Aquatic processes, and Lake Acidification. Springer-Verlag, New York. pp. 187-205.
- Hemelraad, J., D.A. Holwerda, K.J. Teerds, H.J. Herwig et D.I. Zandee. 1986. Cadmium kinetics in freshwater clams. II. A comparative study of cadmium uptake and cellular distribution in the Unionidae *Anodonta cygnea*, *Anodonta anatina*, and *Unio pictorum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 15: 9-21.

- Hendry, G.A.F., A.J.M. Baker et C.F. Ewart. 1992. Cadmium tolerance and toxicity, oxygen radical processes and molecular damage in cadmium-tolerant and cadmium-sensitive clones of *Holcus lanatus* L. *Acta Bot. Neerl.* 41: 271-281.
- Hidalgo, J., J.S. Garvey et A. Armario. 1991. On the metallothionein, glutathione and cysteine relationship in rat liver. *J. Pharm. Exp. Theor.* 255: 554-564.
- Hogstrand, C. 1991. Regulation of metallothionein in teleost fish during metal exposure. Thèse de doctorat (Ph.D.), Département de Zoophysologie, Université de Göteborg, Suède.
- Hogstrand, C. et C. Haux. 1990. Metallothionein as an indicator of heavy metal exposure in two subtropical fish species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 138: 69-84.
- Jackson, T.A., J.F. Klaverkamp et M.D. Dutton. 1993. Heavy metal speciation and its biological consequences in a group of lakes polluted by a smelter, Flin Flon, Manitoba, Canada. *Appl. Geochem.* 2: 285-289.
- Jacobson, P.J., J.L. Farris, D.S. Cherry et R.J. Neves. 1993. Juvenile freshwater mussel (*Bivalvia*: Unionidae) responses to acute toxicity testing with copper. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 879-883.
- Jenkins, K.D. et A.Z. Mason. 1988. Relationships between subcellular distributions of cadmium and perturbations in reproduction in the polychaete *Neanthes arenaceodentata*. *Aquat. Toxicol.* 12: 229-244.
- Jenkins, K.D. et B.M. Sanders. 1986. Relationships between free cadmium ion activity in seawater, cadmium accumulation and subcellular distribution, and growth in polychaetes. *Environ. Health Persp.* 65: 205-210.
- Johansson, C., D.J. Cain et S.N. Luoma. 1986. Variability in the fractionation of Cu, Ag, and Zn among cytosolic proteins in the bivalve *Macoma balthica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 28: 87-97.
- Jolicoeur, P. 1959. Multivariate geographical variation in the wolf *Canis lupus* L. *Evolution* 13: 283-299.
- Jones, M.M., M.J. Meredith, M.L. Dodson, R.J. Topping et E. Baralt. 1988. Metallothionein synthesis and its induction mechanism: correlation with metal ion electronic configurations and softness parameters. *Inorg. Chim. Acta* 153: 87-92.

- Julshamn, K. et K.-J. Andersen. 1981. Studies on major and minor elements in molluscs in western Norway - V. Protein binding of zinc, cadmium and copper in tissues of oyster (*Ostrea edulis*), common mussel (*Mytilus edulis*) and horse mussel (*Modiolus modiolus*), taken from unpolluted waters. Fisk. Dir. Skr. Ser. Ernoering. 1: 235-245.
- Kägi, J.H.R. et H.J. Hapke. 1984. Biochemical interactions of mercury, cadmium, and lead. Dans: Nriagu, J.O. [éd]. Changing Metal Cycles and Human Health. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. pp. 237-250.
- Keller, A.E. et S.G. Zam. 1990. Simplification of in vitro culture techniques for freshwater mussels. Environ. Toxicol. Chem. 9: 1291-1296.
- Keller, A.E. et S.G. Zam. 1991. The acute toxicity of selected metals to the freshwater mussel, *Anodonta imbecilis*. Environ. Toxicol. Chem. 10: 539-546.
- Klaassen, C.D. 1981. Induction of metallothionein by adrenocortical steroids. Toxicol. 20: 275-279.
- Klaverkamp, J.F. et D.A. Duncan. 1987. Acclimation to cadmium toxicity by white suckers: cadmium binding capacity and metal distribution in gill and liver cytosol. Environ. Toxicol. Chem. 6: 275-289.
- Klaverkamp, J.F., M.D. Dutton, H.S. Majewski, R.V. Hunt et L.J. Wesson. 1991. Evaluating the effectiveness of metal pollution controls in a smelter by using metallothionein and other biochemical responses in fish. Dans: Newman, M.C. et A.W. McIntosh [éds]. Metal Ecotoxicology - Concepts and Applications. Lewis Publishers, Chelsea, MI. chap. 2: 33-64.
- Klerks, P.L., et J.S. Weis. 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: A review. Environ. Pollut. 45: 173-205.
- Langston, W.J. et S.K. Spence. 1994. Biological factors involved in metal concentrations observed in aquatic organisms. Accepté dans: Tessier, A. et D. Turner [éds]. Trace Metal Speciation and Bioavailability. Lewis Publishers, Boca Raton, FLA.
- Langston, W.J. et M. Zhou. 1986. Evaluation of the significance of metal-binding proteins in the gastropod *Littorina littorea*. Mar. Biol. 92: 505-515.

- Legrand, C., D. Huizenga, R. Schenck, A. Tessier et P.G.C. Campbell. 1987. Cadmium-, copper-, and zinc-binding proteins in various tissues of the freshwater pelecypod *Anodonta grandis* collected from a mining area. Dans: Kägi, J.H.R. et Y. Kojima [éds]. Metallothionein II. Birkhäuser-Verlag. Experientia Suppl. 52: 711. (résumé).
- Lingard, S.M., R.D. Evans et B.P. Bourgoïn. 1992. Method for the estimation of organic-bound and crystal-bound metal concentrations in bivalve shells. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 48: 179-184.
- Lobel, P.B. 1989. The effect of dithiothreitol on the subcellular distribution of zinc in the cytosol of mussel kidney (*Mytilus edulis*): isolation of metallothionein and a unique low molecular weight zinc-binding ligand. Comp. Biochem. Physiol. 92C: 189-192.
- Lobel, P.B. et J.F. Payne. 1987. The mercury-203 method for evaluating metallothioneins: interference by copper, mercury, oxygen, silver and selenium. Comp. Biochem. Physiol. 86C: 37-39.
- Lucas, A. et P.G. Beninger. 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. Aquaculture 44: 187-200.
- Luoma, S.N. 1983. Bioavailability of trace metals to aquatic organisms-a review. Sci. Total Environ. 28: 1-22.
- Luoma, S.N. et J.L. Carter. 1991. Effects of trace metals on aquatic benthos. Dans: Newman, M.C. et A.W. McIntosh [éds]. Metal Ecotoxicology - Concepts and Applications. Lewis Publishers, Chelsea, MI. chap. 10: 261-300.
- Mackie, G.L. 1984. Bivalves. Dans: Wilbur, K.L. [éd]. The Mollusca - Vol. 7 - Reproduction. Academic Press, New York, London, Toronto, Montréal. chap. 5: 351-417.
- Malley, D.F., S.B. Brown, C.L. Baron, M.J. Brunskill, S.M. Capel, S.M. Chalanchuk, P.S.S. Chang, E.R. DeBruyn, R.E. Evans, D.L. Findlay, S.E. Harrison, R.H. Hesslein, M.H. Holoka, D. Huebert, R.V. Hunt, J.F. Klaverkamp, S.G. Lawrence, D.A. Majewski, H.S. Majewski, K.H. Mills, R.E. McNichol, V. Palace, C.J. Ranson, E. Scherer, M. Shaw, M. Stephenson, A.R. Stewart et L.J. Wesson. 1991. Biological effects of cadmium on a small Precambrian Shield lake: is the Canadian water quality guideline safe? Dans: Chapman, P., F. Bishay, E. Power, K. Hall, L. Harding, D. McLeay, M. Nassichuk et W. Knapp [éds]. Comptes rendus du dix-septième colloque annuel sur la toxicité aquatique: 5-7 novembre 1990, Vancouver, (C.B.). Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat. 1774 (vol. 1). pp. 40-46.

- Malley, D.F., P.S.S. Chang et R.H. Hesslein. 1989. Whole lake addition of cadmium-109: radiotracer accumulation in the mussel population in the first season. *Sci. Total Environ.* 87/88: 397-417.
- Malley, D.F., J.F. Klaverkamp, S.B. Brown et P.S.S. Chang. 1993. Increase in metallothionein in freshwater mussels *Anodonta grandis grandis* exposed to cadmium in the laboratory and the field. *Water Pollut. Res. J. Canada* 28: 253-273.
- Manly, R. et W.O. George. 1977. The occurrence of some heavy metals in populations of the freshwater mussel *Anodonta anatina* (L.) from the River Thames. *Environ. Pollut.* 14: 139-154.
- Maroni, G. et D. Watson. 1985. Uptake and binding of cadmium, copper and zinc by *Drosophila melanogaster* larvae. *Insect Biochem.* 15: 55-63.
- Maroni, G., J. Wise, J.E. Young et E. Otto. 1987. Metallothionein gene duplications and metal tolerance in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 117: 739-744.
- Matisoff, G., J. Berton Fisher et S. Matis. 1985. Effects of benthic macroinvertebrates on the exchange of solutes between sediments and freshwater. *Hydrobiologia* 122: 19-33.
- Matthews, O.P., H.E. Johansen et G. Rudzitis. 1987. The mineral industry's future. Dans: Johansen, H.E., O.P. Matthews et G. Rudzitis [éds]. Mineral Resource Development-Geopolitics, Economics and Policy. Westview Press / Boulder and London. chap. 15: 345-361.
- McConchie, D.M. et L.M. Lawrance. 1991. The origin of high cadmium loads in some bivalve molluscs from Shark Bay, Western Australia: a new mechanism for cadmium uptake by filter feeding organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21: 303-310.
- McCuaig, J.M. et R.H. Green. 1983. Unionid growth curves derived from annual rings: a baseline model for Long Point Bay, Lake Erie. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40: 436-442.
- McFarlane, G.A. et W.G. Franzin. 1978. Elevated heavy metals: a stress on a population of white suckers, *Catostomus commersoni*, in Hamell Lake, Saskatchewan. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 35: 963-970.
- MENVIQ. 1992. Document d'information en écotoxicologie. I- Principes généraux. Ministère de l'Environnement du Québec, Direction des laboratoires, rapport interne. 9 p.

- Metcalf-Smith, J.L. et R.H. Green. 1992. Ageing studies on three species of freshwater mussels from a metal-polluted watershed in Nova Scotia, Canada. *Can. J. Zool.* 70: 1284-1291.
- Micallef, S., Y. Couillard, P.G.C. Campbell et A. Tessier. 1992. An evaluation of the HPLC-gel chromatographic method for analyzing metallothioneins in aquatic organisms. *Talanta* 39: 1073-1079.
- Minkel, D.T., K. Poulsen, S. Wielgus, C.F. Shaw, III et D.H. Petering. 1980. On the sensitivity of metallothioneins to oxidation during isolation. *Biochem. J.* 191: 475-485.
- Morel, F.M.M. 1983. Principles of Aquatic Chemistry. Wiley, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. 446 p.
- Morel, F.M.M. et J. Hering. 1993. Principles of Aquatic Chemistry 2^e éd. Wiley, New York, Chichester, Toronto, Singapore.
- Morel, F.M.M., R.J.M. Hudson et N.M. Price. 1991. Limitation of productivity by trace metals in the sea. *Limnol. Oceanogr.* 36: 1742-1755.
- Munkittrick, K.R. et D.G. Dixon. 1989. Use of white sucker (*Catostomus commersoni*) populations to assess the health of aquatic ecosystems exposed to low-level contaminant stress. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 1455-1462.
- Newcomb, R. 1987. Shifting patterns of supply and demand in the world's copper industry. Dans: Johansen, H.E., O.P. Matthews et G. Rudzitis [éds]. Mineral Resource Development-Geopolitics, Economics and Policy. Westview Press / Boulder and London. chap. 4: 83-105.
- Nielson, K.B., C. L. Atkin et D.R. Winge. 1985. Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *J. Biol. Chem.* 260: 5342-5350.
- Nriagu, J.O. 1980. Cadmium in the atmosphere and in precipitation. Dans: Nriagu, J.O. [éd]. Cadmium in the Environment-Part I: Ecological Cycling. Wiley, New York, Chichester, Brisbane, Toronto. chap. 3: 71-114.
- Nriagu, J.O. 1979. Copper in the atmosphere and precipitation. Dans: Nriagu, J.O. [éd]. Copper in the Environment-Part I: Ecological Cycling. Wiley, New York, Chichester, Brisbane, Toronto. chap. 3: 43-75.

- Overnell, J. 1984. Use of 2-mercaptoethanol during chromatography of crab (*Cancer pagurus*) metallothionein on DEAE cellulose. *Comp. Biochem. Physiol.* 77C: 245-248.
- Patel, B. et K. Anthony. 1991. Uptake of cadmium in tropical marine lamellibranchs, and effects on physiological behaviour. *Mar. Biol.* 108: 457-470.
- Pennak, R.W. 1989. Fresh-water Invertebrates of the United States. Protozoa to Mollusca, 3^e éd. Wiley, New York, Chichester, Brisbane, Toronto. 628 p.
- Perdue, E.M. 1988. Measurements of binding site concentrations in humic substances. Dans: Kramer, J.R. et H.E. Allen [éds]. Metal Speciation: Theory, Analysis and Application. Lewis Publishers, Chelsea, MI. chap. 7: 135-154.
- Phillips, D.J.H. 1980. Quantitative Aquatic Biological Indicators. Applied Science Publishers. London. 488 p.
- Piotrowski, J.K., W. Bolanowska et A. Sapota. 1973. Evaluation of metallothionein content in animal tissues. *Acta Biochim. Polon.* 20: 207-215.
- Ribera, D., J.F. Narbonne, M. Daubeze et X. Michel. 1989. Characterization, tissue distribution and sexual differences of some parameters related to lipid peroxidation in mussels. *Mar. Environ. Res.* 28: 279-283.
- Ringwood, A.H. 1993. Age-specific differences in cadmium sensitivity and bioaccumulation in molluscs. *Mar. Environ. Res.* 35: 35-39.
- Roch, M. et J.A. McCarter. 1984. Hepatic metallothionein production and resistance to heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*)-II. Held in a series of contaminated lakes. *Comp. Biochem. Physiol.* 77C: 77-82.
- Roch, M., J.A. McCarter, A.T. Matheson, M.J.R. Clark et R.W. Olafson. 1982. Hepatic metallothionein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as an indicator of metal pollution in the Campbell River system. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 1596-1601.
- Rodríguez-Ariza, A., N. Abril, J.I. Navas, G. Dorado, J. López-Barea et C. Pueyo. 1992. Metal, mutagenicity, and biochemical studies on bivalve molluscs from Spanish Coasts. *Environ. Molec. Mutagen.* 19: 112-124.

- Roesijadi, G. 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 22: 81-114.
- Roesijadi, G. 1981. The significance of low molecular weight metallothionein-like proteins in marine invertebrates-current status. *Mar. Environ. Res.* 4: 167-179.
- Roesijadi, G. et A.S. Drum. 1982. Influence of mercaptoethanol on the isolation of mercury-binding proteins from the gills of *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 71B: 455-459.
- Roesijadi, G. et G.W. Fellingham. 1987. Influence of Cu, Cd, and Zn preexposure on Hg toxicity in the mussel *Mytilus edulis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44: 680-684.
- Roesijadi, G. et P.L. Klerks. 1989. Kinetic analysis of cadmium binding to metallothionein and other intracellular ligands in oyster gills. *J. Exper. Zool.* 251: 1-12.
- Roesijadi, G., M.E. Unger et J.E. Morris. 1988. Immunochemical quantification of metallothioneins of a marine mollusc. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 1257-1263.
- Scheuhammer, A.M. et M.G. Cherian. 1986. Quantification of metallothioneins by a silver-saturation method. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 82: 417-425.
- Segar, D.A., J.D. Collins et J.P. Riley. 1971. The distribution of the major and some minor elements in marine animals. Part II. Molluscs. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 51: 131-136.
- Simkiss, K., M. Taylor et A.Z. Mason. 1982. Metal detoxification and bioaccumulation in molluscs. *Mar. Biol. Lett.* 3: 187-201.
- Stegeman, J.J., M. Brouwer, R.T. Di Giulio, L. Förlin, B.A. Fowler, B.M. Sanders et P.A. Van Veld. 1992. Enzyme and protein synthesis as indicators of contaminant exposure and effect. Dans: Hugget, R.J., R.A. Kimerle, P.M. Mehrle, Jr. et H.L. Bergman [éds]. Biomarkers - Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers, Chelsea, MI. chap. 6: 235-335.
- Sunderman, F.W., Jr., A. Marzouk, S.M. Hopfer, O. Zaharia et M.C. Reid. 1985. Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats. *Annals Clin. Lab. Sci.* 15: 229-236.

- Suzuki, K.T., H. Sunaga, S. Hatakeyama, Y. Sumi et T. Suzuki. 1989. Differential binding of cadmium and copper to the same protein in a heavy metal tolerant species of mayfly (*Baetis thermicus*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 94C: 99.
- Tessier, A., P.G.C. Campbell, J.C. Auclair, R.C. Schenck, D. Huizenga et B. Dubreuil. 1987. Contribution à l'amélioration des critères scientifiques pour évaluer la signification biologique de métaux traces dans les sédiments. INRS-Eau, rapport scientifique no 203 (pour Environnement Canada). 139 p. + ann.
- Tessier, A., Y. Couillard, P.G.C. Campbell et J.C. Auclair. 1993. Modeling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve *Anodonta grandis*. *Limnol. Oceanogr.* 38: 1-17.
- U.S. EPA. 1991. Technical support document for water quality-based toxics control. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water Regulations and Standards, Enforcement and Permits Division, Washington, D.C. EPA/505/2-90-001.
- Verboost, P.M., G. Flik, R.A.C. Lock et S.E. Wendelaar Bonga. 1988. Cadmium inhibits plasma membrane calcium transport. *J. Membrane Biol.* 102: 97-104.
- Versteeg, D.J., R.L. Graney et J.P. Giesy. 1988. Field utilization of clinical measures for the assessment of xenobiotic stress in aquatic organisms. Dans: Adams, W.J., G.A. Chapman et W.G. Landis [éds]. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment; 10th Volume. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. ASTM STP 971. pp. 289-306.
- Viarengo, A. 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.* 1: 295-317.
- Viarengo, A., L. Canesi, M. Pertica, G. Poli, M.N. Moore et M. Orunesu. 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comp. Biochem. Physiol.* 97C: 37-42.
- Viarengo, A., G. Mancinelli, M. Orunesu, G. Martino, F. Faranda et A. Mazzucotelli. 1988. Effects of sublethal copper concentrations, temperature, salinity, and oxygen levels on calcium content and on cellular distribution of copper in the gills of *Mytilus galloprovincialis* Lam.: a multifactorial experiment. *Mar. Environ. Res.* 24: 227-231.

- Winsor, M.H., B.L. Boese, H. Lee, II, R.C. Randall et D.T. Specht. 1990. Determination of the ventilation rates of interstitial and overlying water by the clam *Macoma nasuta*. Environ. Toxicol. Chem. 9: 209-213.
- Yan, N.D., G.L. Mackie et P.J. Dillon. 1990. Controls on cadmium in *Holopedium gibberum* (Crustacea, Cladocera) in Canadian Shield lakes. Environ. Toxicol. Chem. 9: 895-908.
- Younes, M. et C.-P. Siegers. 1984. Interrelation between lipid peroxidation and other hepatotoxic events. Biochem. Pharmacol. 33: 2001-2003.
- Zelazowski, A.J., et J.K. Piotrowski. 1977. A modified procedure for determination of metallothionein-like proteins in animal tissues. Acta. Biochim. Polon. 24: 97-103.

C H A P I T R E 6

GLOSSAIRE

6. GLOSSAIRE

Bioaccumulation: l'accumulation temporelle nette d'un contaminant par un organisme, causée par un influx du contaminant supérieur à son efflux.

Bioconcentration: phénomène par lequel un organisme voit sa concentration en un élément ou en un contaminant donné devenir plus élevée que celle de son environnement (au sens large). La bioconcentration peut se visualiser par l'entremise du rapport entre la concentration de la substance dans l'organisme et sa concentration dans l'eau, les sédiments, la nourriture, etc...

Bioindicateur / biosonde / biomoniteur: un organisme entier (bioindicateur) ou une caractéristique biologique utilisée pour évaluer le degré de contamination ou la "santé" d'un écosystème (en opposition avec des mesures physiques ou chimiques). Les caractéristiques biologiques choisies peuvent entre autres être de nature biochimique, physiologique, morphologique ou écologique.

CL₅₀: dans le cadre d'épreuves de toxicité en laboratoire ("toxicity testing"), concentration d'une substance provoquant 50% de mortalité dans la population biologique exposée par contact. Cette concentration létale médiane s'évalue après un temps fixe d'exposition (ex: 24 h, 48 h, 96 h, etc...).

Ecotoxicologie: étude du devenir et des effets des agents toxiques dans les écosystèmes.

Homéostasie: maintien d'un système biologique donné dans un état constant (ex: T° interne des mammifères). La fonction homéostatique de la métallothionéine doit être envisagée comme la régulation de la disponibilité d'un métal pour les fonctions cellulaires qui en dépendent.

Induction: au sens biologique, déclenchement d'un phénomène dont la manifestation se produit avec un certain retard par rapport à l'intervention de la cause responsable. L'induction de la métallothionéine par un métal exprime la synthèse accrue de la protéine (relativement à un niveau basal) en réponse à l'injection interne du métal ou à l'exposition par contact de l'organisme à celui-ci. Un délai dans la production de la MT est anticipé à cause de la complexité du mécanisme de synthèse à l'échelle cellulaire.

Matte: mélange de sulfures de fer et de cuivre, provenant de la première fusion d'un minerai sulfuré.

Modèle général de l'ion libre (équilibre chimique)

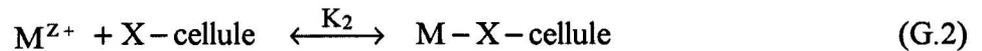
Morel (1983) a formulé le modèle de l'ion libre (MIL) afin d'illustrer mathématiquement comment la prise en charge, le rôle nutritif et la toxicité de tout cation métallique trace dépendent de l'activité de

l'ion libre. Pour s'accumuler dans un organisme, ou pour provoquer une réponse biologique de celui-ci (ex: toxicité), un métal M doit interagir avec ou traverser une membrane cellulaire. Cette interaction peut se concevoir comme une complexation de surface. Les équations suivantes concernent les réactions (simplifiées) de l'espèce M^{Z+} ou du complexe ML à la surface d'une membrane cellulaire (les charges ne sont pas toutes indiquées par souci de simplicité):

Equilibre en solution

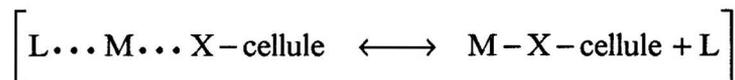
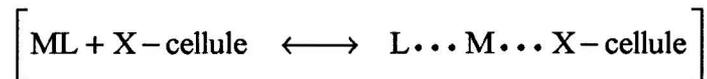
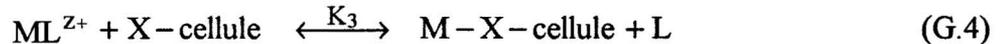


Réaction de surface de l'ion M^{Z+}



$$[M\text{-X-cellule}] = K_2 [X\text{-cellule}][M^{Z+}] \quad (G.3)$$

Réaction du complexe ML



$$[M\text{-X-cellule}] = K_3 \frac{[X\text{-cellule}][ML^{Z+}]}{[L]} \quad (G.5)$$

$$[M\text{-X-cellule}] = K_3 K_1 [X\text{-cellule}][M^{Z+}] \quad (G.6)$$

K_1 , K_2 et K_3 sont des constantes d'équilibre conditionnelles, X-cellule est un site de complexation à la surface de la membrane et L est un ligand en solution. Il est présumé que la réponse biologique varie selon à la concentration du complexe $[M\text{-X-cellule}]$. En admettant que la concentration de sites libres X-cellule reste à peu près constante, les équations G.3 et G.6 prédisent que la réponse biologique variera en fonction de la $[M^{Z+}]$.

L'importance de l'ion libre est souvent interprétée à tort comme indication que l'ion libre soit la seule forme disponible pour l'organisme. En fait, aucune espèce chimique en solution ne peut être considérée plus ou moins disponible qu'une autre. L'importance de l'ion M^{Z+} provient plutôt du fait que la réactivité chimique d'un métal M est modulée par l'équilibre chimique entre l'ion libre et les divers ligands cellulaires. Pour des lectures additionnelles sur le sujet, le lecteur consultera Morel (1983), Morel et Hering (1993) et Campbell (1994: critique et exceptions au modèle).

Résistance: habileté d'un organisme de survivre pour une période limitée dans un environnement qui générera éventuellement un effet létal.

Scorie: résidu solide provenant de la fusion de minerais métalliques, de l'affinage de métaux, etc...

Tolérance / adaptation: habileté d'un organisme de survivre indéfiniment sous un ensemble de conditions environnementales. Cette habileté peut comporter une base génétique.

A N N E X E 1

Informations complémentaires au chapitre 2

A.1.1 Calcul de la concentration de l'ion Cd²⁺ en milieu naturel

Les concentrations de l'ion Cd²⁺ dans notre étude multi-lacustre ont été calculées à l'aide d'un modèle de répartition géochimique du Cd dans les sédiments oxyques lacustres. Nous présentons, dans les pages suivantes, le développement mathématique de ce modèle.

Les eaux superficielles oxyques apparaissent insaturées par rapport aux phases solides des métaux traces (Ex.: Cd_d vs CdCO₃(s)). Par ailleurs, des réactions de sorption du Cd par les sédiments (adsorption, absorption, coprécipitation, etc...) ont récemment été invoquées avec succès pour relier la concentration de ce métal dans les eaux près des sédiments à sa concentration dans les sédiments superficiels (Tessier *et al.*, 1993). On suppose que les deux principales composantes de sorption du Cd dans les sédiments oxyques sont la matière organique et les oxyhydroxydes de fer, et que les concepts de complexation de surface peuvent être utilisés pour décrire cette sorption (Tessier *et al.*, 1993). La réaction de sorption du Cd avec les oxyhydroxydes de fer peut s'écrire de façon simplifiée:



$$*K_{\text{Fe-Cd}} = \frac{\{\equiv\text{Fe-OCd}\} \times [\text{H}^+]^x}{\{\equiv\text{Fe-OH}_x\} \times [\text{Cd}^{2+}]} \quad (\text{A.1.2})$$

où les charges ne sont pas toutes indiquées, par souci de simplicité; *K_{Fe-Cd} est une constante d'équilibre globale apparente; x est le nombre moyen apparent de protons libérés au cours de la réaction; {≡Fe-OH_x} et {≡Fe-OCd} sont respectivement la concentration de sites libres sur les oxyhydroxydes de fer et celle de sites occupés par le Cd; [Cd²⁺] est la concentration d'ion libre du métal Cd; la notation "≡" signifie des sites d'adsorption alors que { } et [] réfèrent à des concentrations respectivement dans les phases solides et aqueuses.

Pour de faibles densités d'adsorption ({≡Fe-OCd} << {≡Fe-OH_x}), on peut poser que:

$$\{\equiv\text{Fe-OH}_x\} \approx \{\equiv\text{Fe-O-}\}_T \quad (\text{A.1.3})$$

où $\{\equiv\text{Fe-O}\}_T$ est la concentration totale de sites sur les oxyhydroxydes de fer. Les concentrations de sites peuvent à leur tour s'exprimer:

$$\{\equiv\text{Fe-O}\} = N_{\text{Fe}} \times \{\text{Fe-ox}\} \quad (\text{A.1.4})$$

où N_{Fe} est la densité de sites d'adsorption et $\{\text{Fe-ox}\}$ est la concentration d'oxyhydroxydes de fer. Si l'on suppose qu'un seul site est occupé par chaque ion métallique sorbé, alors:

$$\{\equiv\text{Fe-OCd}\} = \{\text{Fe-Cd}\} \quad (\text{A.1.5})$$

où $\{\text{Fe-Cd}\}$ est la concentration analytique de Cd associé aux oxyhydroxydes de fer. En combinant les équations A.1.2 à A.1.5, on peut écrire:

$$K_{\text{Fe-Cd}} = \frac{N_{\text{Fe}} \times *K_{\text{Fe-Cd}}}{[\text{H}^+]^x} = \frac{\{\text{Fe-Cd}\}}{\{\text{Fe-ox}\} \times [\text{Cd}^{2+}]} \quad (\text{A.1.6})$$

où $K_{\text{Fe-Cd}}$ est une constante d'équilibre apparente qui est fonction du pH. Par un raisonnement mathématique similaire, l'expression suivante peut être déduite pour la sorption du Cd par la matière organique sédimentaire (OM):

$$K_{\text{OM-Cd}} = \frac{N_{\text{OM}} \times *K_{\text{OM-Cd}}}{[\text{H}^+]^y} = \frac{\{\text{OM-Cd}\}}{\{\text{OM}\} \times [\text{Cd}^{2+}]} \quad (\text{A.1.7})$$

où, par analogie avec l'équation A.1.6, N_{OM} est le nombre de sites de sorption par mole de matière organique et $K_{\text{OM-Cd}}$, $*K_{\text{OM-Cd}}$ sont des constantes d'équilibre globales apparentes. Similairement, y est le nombre moyen apparent de protons libérés par ion Cd^{2+} sorbé, $\{\text{OM}\}$ est la concentration de matière organique, et $\{\text{OM-Cd}\}$, celle du Cd qui y est associé. Les logarithmes des équations A.1.6 et A.1.7 donnent:

$$\log K_{\text{Fe-Cd}} = x \text{ pH} + \log (N_{\text{Fe}} \times *K_{\text{Fe-Cd}}) \quad (\text{A.1.8})$$

$$\log K_{\text{OM-Cd}} = y \text{ pH} + \log (N_{\text{OM}} \times *K_{\text{OM-Cd}}) \quad (\text{A.1.9})$$

Dans des diagrammes de dispersion avec le $\log K_{\text{Fe-Cd}}$ ou le $\log K_{\text{OM-Cd}}$ en ordonnée et le pH en abscisse, on devrait obtenir respectivement des droites de pente x ou y et d'ordonnée à l'origine $\log (N_{\text{Fe}} \times *K_{\text{Fe-Cd}})$ ou $\log (N_{\text{OM}} \times *K_{\text{OM-Cd}})$.

Tessier *et al.* (1993) ont pu estimer les valeurs des constantes $K_{\text{Fe-Cd}}$ et $K_{\text{OM-Cd}}$ en conditions naturelles à partir de l'échantillonnage des sédiments oxyques de plusieurs lacs disséminés sur un territoire de 350,000 km² au Québec et en Ontario. Pour ce faire ils ont déterminé, pour chaque site visité, les valeurs des trois termes de droite des équations A.1.6 et A.1.7. $\{\text{Fe-ox}\}$ et $\{\text{Fe-Cd}\}$ ont pu être déterminées à partir de la dissolution d'oxyhydroxydes de fer diagenétiques (assez purs) déposés sur des collecteurs de téflon enfoncés dans les sédiments. Les concentrations d'ion libre Cd^{2+} ont été estimées par des calculs thermodynamiques, connaissant la concentration totale de Cd dissous, le pH et les concentrations de ligands inorganiques dissous; la complexation par des ligands organiques naturels a du être ignorée, faute de constantes d'équilibre pertinentes. Les concentrations de C organique sédimentaire représentèrent $\{\text{OM}\}$. La concentration totale de Cd sorbé serait:

$$\{\text{Cd}\}_{\text{T}} = \{\text{Fe-Cd}\} + \{\text{OM-Cd}\} \quad (\text{A.1.10})$$

puisqu'on a présumé que seuls les oxyhydroxydes de fer et la matière organique lient le Cd dans les sédiments oxyques. On a obtenu la $\{\text{OM-Cd}\}$ par la combinaison des équations A.1.6 et A.1.10:

$$\{\text{OM-Cd}\} = \{\text{Cd}\}_{\text{T}} - \frac{N_{\text{Fe}} \times *K_{\text{Fe-Cd}} \{\text{Fe-ox}\} [\text{Cd}^{2+}]}{[\text{H}^+]^x} \quad (\text{A.1.11})$$

La connaissance préalable des constantes x et $N_{\text{Fe}} \times *K_{\text{Fe-Cd}}$ était, bien sûr, requise pour le calcul de $\{\text{OM-Cd}\}$. Ces données géochimiques ont permis d'obtenir les valeurs suivantes de constantes: $x = 0.82$, $y = 0.97$, $N_{\text{Fe}} \times *K_{\text{Fe-Cd}} = 10^{-1.30}$, et $N_{\text{OM}} \times *K_{\text{OM-Cd}} = 10^{-2.45}$. La substitution de ces constantes dans leurs équations respectives A.1.6 et A.1.7, et l'isolation à gauche du terme $[\text{Cd}^{2+}]$, conduisent aux équations suivantes:

$$[\text{Cd}^{2+}] = \frac{\{\text{Fe-Cd}\} [\text{H}^+]^{0.82}}{10^{-1.30} \{\text{Fe-ox}\}} \quad (\text{A.1.12})$$

$$[\text{Cd}^{2+}] = \frac{\{\text{OM-Cd}\} [\text{H}^+]^{0.97}}{10^{-2.45} \{\text{OM}\}} \quad (\text{A.1.13})$$

$$[\text{Cd}^{2+}] = \frac{\{\text{Cd}\}_T [\text{H}^+]^{1.79}}{10^{-1.30} \{\text{Fe-ox}\} [\text{H}^+]^{0.97} + 10^{-2.45} \{\text{OM}\} [\text{H}^+]^{0.82}} \quad (\text{A.1.14})$$

En principe, ces trois équations sont aussi adéquates l'une que l'autre pour estimer $[\text{Cd}^{2+}]$. Le choix de l'utilisateur de ces équations sera guidé par la confiance qu'il aura dans les mesures de $\{\text{Fe-Cd}\}$ et $\{\text{Fe-ox}\}$, $\{\text{OM-Cd}\}$ et $\{\text{OM}\}$, $\{\text{Cd}\}_T$, $\{\text{Fe-ox}\}$ et $\{\text{OM}\}$.

A.1.2 Données biologiques de l'étude multi-lacustre

Tableau A.1.1

Concentrations moyennes de métallothionéine (MT: nmol sites de liaison de métal g⁻¹ p. sec) et de métal (nmol M g⁻¹ p. sec) dans les tissus du bivalve d'eau douce *Anodonta grandis* récolté dans 11 lacs de la région minière de Rouyn-Noranda. Ces valeurs, utilisées dans les analyses statistiques, sont présentées sans arrondissement. Les variations de la moyenne sont fournies dans la section 2.3.3 (N=4).

Lac	Branchies				Glande digestive				Corps				Organisme entier			
	MT	Cd	Cu	Zn	MT	Cd	Cu	Zn	MT	Cd	Cu	Zn	MT	Cd	Cu	Zn
BO	195.4	1,388	1,474	9,061	358.3	434.4	444.8	1,631	364.9	609.8	256.7	2,383	287.0	709.9	634.3	3,977
DA	237.5	2,127	3,542	9,069	318.6	365.5	587.5	1,457	268.8	419.5	298.1	1,820	269.6	709.0	860.9	3,024
DU	220.1	770.1	713.7	4,459	232.5	423.7	328.1	1,483	244.0	337.0	150.9	1,504	237.0	448.4	303.8	2,184
DF	153.7	335.9	865.6	4,099	241.7	180.4	323.6	1,328	172.7	90.9	129.2	1,265	182.9	143.2	277.0	1,713
DP	216.6	719.4	6,182	11,893	258.3	73.0	989.6	1,734	252.6	90.4	295.9	1,582	248.6	163.7	1,072	2,834
FL	129.2	491.5	1,071	5,110	232.4	197.2	471.8	1,376	198.1	144.3	270.7	1,255	192.4	201.1	410.8	1,824
HE	262.3	1,172	817.6	4,039	309.5	575.9	384.6	1,714	359.5	424.3	133.0	1,487	329.9	621.8	328.9	2,126
JO	198.6	2,050	2,500	6,399	386.7	375.3	366.9	1,425	420.9	657.9	392.5	2,168	339.0	1,148	1,162	3,645
BR	155.6	742.3	5,371	12,323	306.6	237.5	626.5	1,342	259.0	237.5	391.4	1,603	241.1	350.5	1,520	3,966
OP	100.3	263.9	855.2	5,524	211.9	169.0	372.4	1,390	177.9	134.1	234.3	1,785	162.6	169.9	404.5	2,666
VA	408.5	2,396	2,541	5,857	292.1	536.0	365.9	1,462	436.5	477.3	145.0	1,451	413.6	838.0	613.8	2,261
<u>max.</u> <u>min.</u>	4.1	9.1	8.7	3.1	1.8	7.9	3.1	1.3	2.5	7.3	3.0	1.9	2.5	8.0	5.5	2.3

A.1.3 Analyses en régression multiple

Pour notre étude multi-lacustre, des analyses en régression multiple ont été menées entre la [MT] comme variable prédite et les variables prédictrices [Cd], [Cu] et [Zn], respectivement pour les branchies, le corps et l'organisme entier. Les variables [Cu(tissu)] et [Zn(tissu)] étaient régulièrement autocorrélées entre elles ($r > 0.80$; $P < 0.01$); par conséquent, elles ne pouvaient être incluses en même temps dans une régression multiple donnée. Les coefficients de régression partiels de ces variables ne furent jamais significativement différents de 0 lors de ces analyses. La variable [Cd(tissu)] fut confirmée comme seul prédicteur significatif de [MT(tissu)] à l'intérieur de notre aire d'étude. Les concentrations de MT dans la glande digestive ne purent être prédites par aucune des trois variables prédictrices ci-haut. Les régressions obtenues lors de ces analyses sont:

$[MT(\text{tissu})] = F [Cd(\text{tissu})] + [MT(\text{tissu})]_0$	$N = 11$
$[MT(\text{branchies})] = 0.73 [Cd(\text{branchies})] + 114.0$	$r^2=0.57, P<0.01$
$[MT(\text{corps})] = 3.57 [Cd(\text{corps})] + 154.7$	$r^2=0.76, P<0.001$
$[MT(\text{org})] = 1.67 [Cd(\text{org})] + 169.8$	$r^2=0.69, P<0.01$

A N N E X E 2

Informations complémentaires au chapitre 3

A.2.1 Analyses sur les échantillons de bivalves: expérience de transplantation

Tableau A.2.1

Analyses effectuées sur les échantillons de bivalves de cette expérience. Se référer au chapitre 3 pour leurs descriptions.

Jours après transplant.	Analyses effectuées sur les branchies, le manteau, la glande digestive et les restes					
	[MT]	[Cd]	[Cu]	[Zn]	[Ca]	Ind. de cond. (org. entier)
Bivalves transplantés (T-VA)						
0	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X
14	X	X	X	X	X	X
30	X	X	X	X	X	X
60	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X
90	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X
400	X	X	X	X	X	X
Bivalves témoins du lac Vaudray (C-VA)						
0	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X
14	X	X	X	X	X	X
30	X	X	X	X	X	X
60	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X
90	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X
400	X	X ^b	X ^b	X ^b	X ^b	---
Bivalves témoins du lac Opasatica (C-OP)						
0	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X
90	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X
400	X	X	X	X	X	X
400	Indigènes hors enclos du lac Vaudray (VA IND) et du lac Opasatica (OP IND)					
	X	X	X	X	X	X
Analyses supplémentaires sur les branchies seulement						
Bivalves transplantés (T-VA) et témoins des lacs Opasatica^c(C-OP) et Vaudray (C-VA)						
	[Cd] _{cyt}	[Cu] _{cyt}	[Zn] _{cyt}	[Ca] _{cyt}	[MDA]	Répartition Cd et Cu cyt.
0	X	X	X	X	X	---
5	X	X	X	X	X	---
14	X	X	X	X	X	X ^d
30	X	X	X	X	X	---
60	X	X	X	X	X	---
90	X	X	X	X	X	X ^d
400	X ^b	X ^b	X ^b	X ^b	X ^b	X ^d
400	Indigènes hors enclos du lac Vaudray (VA IND)					
	X	X	X	X	X	X
Série spéciale						
Bivalves indigènes aux lacs Vaudray et Opasatica prélevés 14 jours avant la transplantation						
Déterminations des relations longueur de la coquille vs âge pour ces populations						

^a Analyses effectuées sur les larves retrouvées dans les marsupia branchiaux à ces dates.^b Ces analyses n'ont pu être effectuées sur les branchies, la glande digestive et les organismes entiers témoins du lac Vaudray à cause d'un manque de tissu; il ne restait, à cette date, qu'un échantillon d'un seul individu.^c Analyses effectuées qu'à 0, 5, 90 et 400 j.^d Analyses effectuées sur les bivalves transplantés seulement - 1 échantillon composite de 4 individus.

A.2.2 Effet du marquage et du confinement sur la croissance en longueur des coquilles dans l'expérience de transplantation - travaux durant l'été 1992.

Au démarrage de notre expérience de transplantation, chacun des bivalves destinés à être récoltés après 400 j avait été identifié individuellement en gravant un nombre avec un clou pointu près du sommet de la coquille. Nous désirions en cela détecter l'effet d'un changement dans la biodisponibilité des métaux sur la croissance en longueur des anodontes transplantées (T-VA). Nous devions toutefois tenir compte de l'effet du marquage et d'enclos sur la croissance de ces individus. Contrairement aux groupes T-VA-400 j et C-OP-400 j, nous avons transpercé plusieurs des coquilles très minces des membres du groupe C-VA-400 j lors de l'étape de la gravure. Une mortalité massive de ces individus, provoquée pensons-nous par le marquage, s'en était suivie. Cela nous a fait douter de la validité de notre évaluation de l'effet de marquage et d'enclos sur ces mollusques. Nous avons entrepris durant l'été 1992 cette évaluation avec de nouveaux échantillons de bivalves récoltés aux lacs Opasatica et Vaudray. Ces anodontes ont été marquées plus délicatement en collant, avec de la colle sous-marine (Devcon, Wet Surface Repair Putty (UW), stock no 11,800), des étiquettes de plastique sur la marge postérieure des valves (individus de taille nominale ≈ 80 mm, marqués sur place, gardés lors de cette étape dans des glacières avec de l'eau du lac fréquemment renouvelée). Ces individus furent, dans la même journée, placés en enclos dans leurs lacs d'origine, pour une période de 98 j ($t = 0$ j: 10 juin 1992).

La démarche mathématique suivie pour l'évaluation de l'effet du marquage et du confinement sur la croissance en longueur de ces spécimens reste identique à celle décrite en section 3.5.2. L'équation-type de la courbe de croissance de Von Bertalanffy (McCuaig et Green, 1983) est:

$$L_t = L_\infty (1 - e^{-kt}) \quad (\text{A.2.1})$$

où L_t = longueur de la coquille à l'âge t ; L_∞ = longueur asymptotique pour une population donnée, k = constante. Les valeurs des termes L_∞ et k sont déterminées à partir de diagrammes de Walford. Les équations des courbes de Von Bertalanffy obtenues de nouveaux individus prélevés en dehors des enclos en été 1992 sont:

$$\text{Lac Vaudray:} \quad L_t = 132.74 \text{ mm} (1 - e^{-0.149t}) \quad (\text{A.2.2})$$

Lac Opasatica: $L_t = 119.83 \text{ mm} (1 - e^{-0.215t})$ (A.2.3)

Nous concluons de nos analyses statistiques, que pour les populations d'*A. grandis* des lacs Opasatica et Vaudray, la croissance moyenne en longueur des indigènes en enclos et marqués de façon non-invasive est vraisemblablement différente de celle des indigènes libres en dehors des enclos ($P < 0.001$; tableaux A.2.1 et A.2.2). L'effet de marquage et de confinement sur les bivalves utilisés dans notre expérience de transplantation est donc confirmée de nouveau avec cette seconde manipulation "plus douce".

Tableau A.2.2

Effet du marquage et du confinement sur la croissance des bivalves marqués et mis en enclos dans leur lac d'origine Vaudray durant l'été 1992. Comparaisons de leurs croissances observées avec leurs croissances attendues si ces mollusques avaient été libres et non marqués dans leur milieu naturel.

Traitement C-VA Identification	Age à $j=0$ ^a	Croissance observée après 98 j (mm) ^③ ^b	Croissance attendue après 98 j (mm) ^④ ^c	Colonne ^⑤ ④ - ③
66	7.18	0.44	6.37	5.93
67	6.17	0.59	9.80	9.21
68	6.75	0.35	8.00	7.65
69	6.16	0.82	9.80	8.98
70	6.30	0.52	9.40	8.88
72	7.71	0.66	4.23	3.57
		\bar{X} : 0.56 $S_{\bar{x}}$: 0.07	\bar{X} : 7.93 $S_{\bar{x}}$: 0.92	\bar{X} : 7.37 $S_{\bar{x}}$: 0.91
Intervalle de confiance (I.C.) de la moyenne de la colonne ^⑤ au seuil $\alpha = 0.001$		1.12 mm < μ < 13.62 mm I.C. ne couvre la valeur 0 ^d		

- ^a Age estimé à partir d'une droite d'estimation de l'âge *versus* la longueur totale de la coquille obtenue d'un échantillon distinct de bivalves cueillis à la même occasion.
- ^b Tailles des coquilles mesurées avec un pied à coulisse digital.
- ^c Estimée à partir de l'équation A.2.2. Nous supposons que les spécimens ont atteint 81.7% de leur croissance annuelle après 98 j (98/120 j de croissance effective dans cette région). L'âge à 98 j = âge à $j = 0 + 98/120$.
- ^d Les croissances moyennes observées et attendues sont vraisemblablement différentes ($P < 0.001$).

Tableau A.2.3

Effet du marquage et du confinement sur la croissance des bivalves marqués et mis en enclos dans leur lac d'origine *Opasatica* durant l'été 1992. Comparaisons de leurs croissances observées avec leurs croissances attendues si ces mollusques avaient été libres et non marqués dans leur milieu naturel.

Traitement C-OP Identification	Age à j=0 ^b	Croissance observée après 98 j (mm) ③ ^c	Croissance attendue après 98 j (mm) ④ ^d	Colonne ⑤ ④ - ③
1	6.13	0.37	5.71	5.34
2 ^a	--	--	--	--
3	5.53	0.69	9.28	8.59
4	5.71	4.39	8.24	3.85
5	5.92	0.37	7.06	6.69
6	5.85	0.78	7.39	6.61
7	5.44	4.2	9.88	5.68
8 ^a	--	--	--	--
9	5.90	0.13	7.08	6.95
10 ^a	--	--	--	--
11	5.21	0.47	11.04	10.57
12	5.59	0.93	8.98	8.05
13	5.38	1.06	10.21	9.15
14	5.61	0.86	8.88	8.02
15	5.66	6.37	8.56	2.19
16	5.90	0.36	7.15	6.79
17	5.68	1.74	8.47	6.73
18	5.45	0.35	9.82	9.47
19 ^a	--	--	--	--
20	5.38	4.99	10.15	5.16
21 ^a	--	--	--	--
22 ^a	--	--	--	--
23	5.28	1.75	10.71	8.96
24 ^a	--	--	--	--
25	5.95	1.6	6.79	5.19
26	5.83	1.52	7.50	5.98
27 ^a	--	--	--	--
28 ^a	--	--	--	--
29	6.17	1.48	5.40	3.92
30	5.25	2.34	10.80	8.46
31	5.73	0.83	8.11	7.28
32	5.94	2.56	6.88	4.32
		\bar{X} : 1.75 $S_{\bar{X}}$: 0.35	\bar{X} : 8.44 $S_{\bar{X}}$: 0.34	\bar{X} : 6.69 $S_{\bar{X}}$: 0.43
Intervalle de confiance (I.C.) de la moyenne de la colonne ⑤ au seuil $\alpha = 0.001$		5.06 mm < μ < 8.33 mm I.C. ne couvre la valeur 0 ^e		

^a Spécimen mort en cours d'expérience, ou non retrouvé à la fin.

^b Age estimé à partir d'une droite d'estimation de l'âge *versus* la longueur totale de la coquille obtenue d'un chantillon distinct de bivalves cueillis à la même occasion.

^c Tailles des coquilles mesurées avec un pied à coulisse digital.

^d Estimée à partir de l'équation A.2.3. Nous supposons que les spécimens ont atteint 81.7% de leur croissance annuelle après 98 j (98/120 j de croissance effective dans cette région). L'âge à 98 j = âge à j = 0 + 98/120.

^e Les croissances moyennes observées et attendues sont vraisemblablement différentes ($P < 0.001$).

Méthode de dosage des métallothionéines par saturation au mercure-203

Application au bivalve *Anodonta grandis*

A.3.1 Introduction

La métallothionéine (MT) est une protéine cytoplasmique riche en cystéine (30% des résidus d'acides aminés) dont les groupements sulfhydryl chélatent fortement les métaux ayant une affinité pour ce type de ligand (Ag, Cd, Cu, Hg, Zn). Les fonctions qu'on lui accorde jusqu'à maintenant sont notamment l'homéostasie des métaux essentiels Cu et Zn et la participation à la détoxification des métaux non essentiels; celles-ci sont plus amplement discutées au chapitre 1. La MT est ubiquiste dans le règne animal.

A.3.1.1 Principe des méthodes de dosage par saturation métallique

L'extraction de la métallothionéine (figure A.3.1) débute par une homogénéisation tissulaire suivie d'une centrifugation (comme la protéine est thermostable, certains suivent également la séquence homogénéisation - chauffage - centrifugation). On ajoute ensuite au surnageant un excès d'un métal comme l'Ag, le Hg ou le Cd. Ce métal doit pouvoir expulser tout métal présent originellement sur la métallothionéine. Le métal lié non spécifiquement est récupéré en incorporant une dose massive d'une protéine accessoire (P.A.: albumine, hémoglobine; "exogenous protein") dont l'affinité pour le métal suit préférentiellement la séquence $K_{MT-M} > K_{P.A.-M} > K_{GSH-M}$ etc. Le complexe P.A.-M est précipité en chauffant ou en abaissant le pH de la préparation (la MT est résistante à l'acide). Après centrifugation, le surnageant ne contient que le chélate métallothionéine-métal. Le métal du chélate est dosé par spectrophotométrie d'absorption atomique ou par spectrométrie γ si un émetteur γ est utilisé. On calcule enfin une "capacité de sequestration tissulaire" (molar binding capacity; nmoles M g⁻¹ tissu); si le rapport stoechiométrique M-MT est connu, on peut calculer la concentration de métallothionéine du tissu.

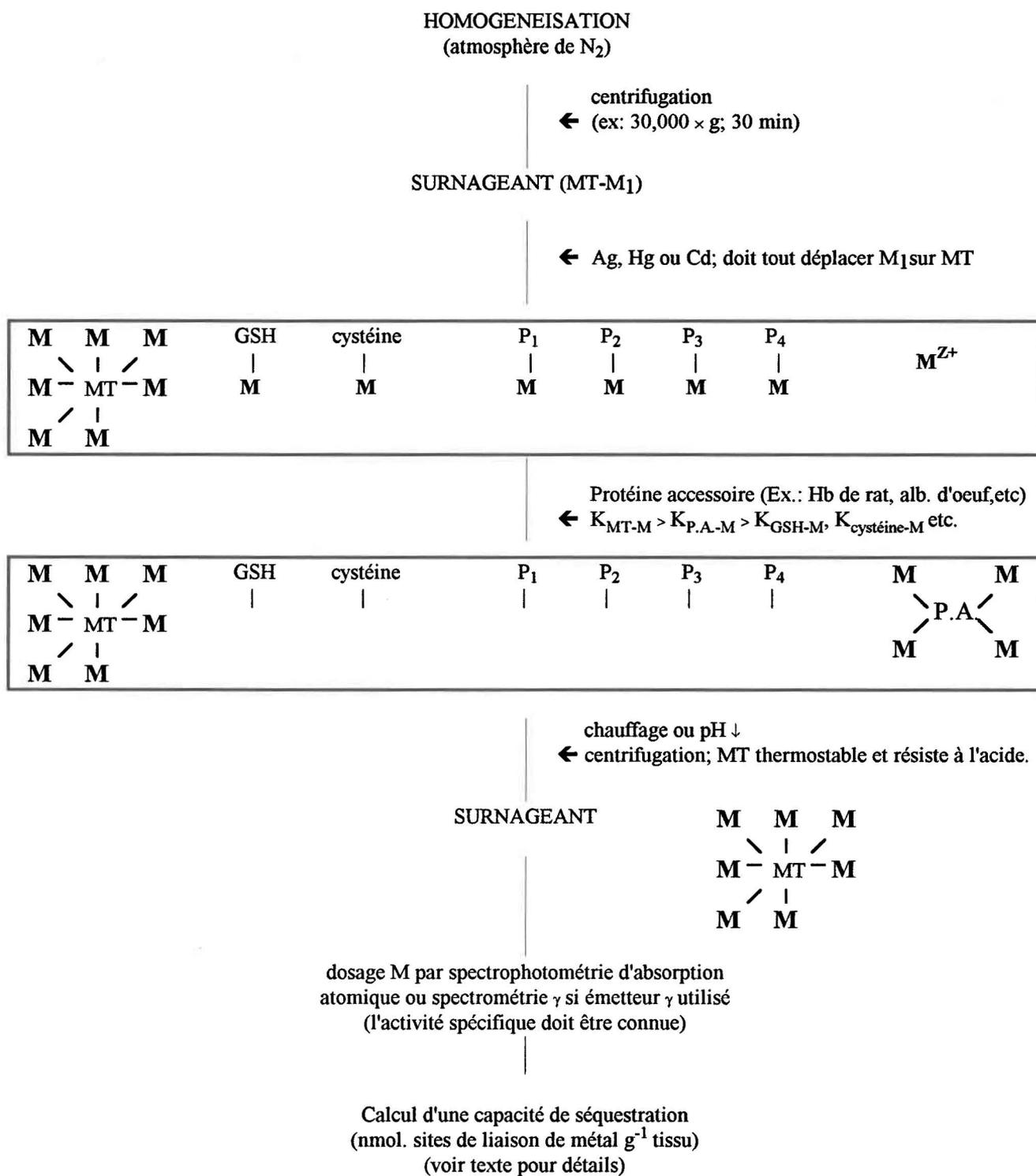


Figure A.3.1: Etapes des méthodes de saturation métallique pour doser les métallothionéines. Abréviations: GSH: glutathione; P₁, P₂, P₃, P₄: enzymes et protéines labiles dans le surnageant; P.A.: protéine accessoire.

Dosage des métallothionéines par saturation par le ^{203}Hg

Cette méthode de dosage a été enseignée à Y.C. par J.F. Klaverkamp et M. Dutton (Canadian Dept. of Fisheries and Oceans, Freshwater Institute, Winnipeg, Can. R3T 2N6) et modifiée à l'INRS-Eau pour le dosage de la protéine chez le bivalve *Anodonta grandis*. Les modifications sont discutées dans les sections qui suivent. La saturation effectuée en présence d'acide trichloroacétique offre trois avantages: elle permet d'éliminer l'interférence apportée par les protéines de haut poids moléculaire qui précipitent; elle minimise l'interférence possible des métaux constitutifs initialement présents chez la métallothionéine; sous pH 1 le Cu n'est plus fortement complexé contrairement à ce qu'affirment Lobel et Payne (1987) et Zelazowski et Piotrowski (1977); et elle permet de précipiter le complexe P.A.-M chargé d'éliminer l'interférence causée par les composés de haut comme de faible poids moléculaire. Voici quelques caractéristiques analytiques de la méthode de dosage déterminées à l'aide de tissus d'*A. grandis*:

- précision $\pm 10\%$;
- limite de détection $\approx 1 \text{ nmole Hg g}^{-1}$ poids sec (celle-ci serait d'autant plus basse que l'activité spécifique est élevée);
- réponse linéaire de 1 à 100 nmoles Hg mL^{-1} d'homogénat;
- récupération d'un étalon de MT mammalienne $100 \pm 5\%$;
- spécificité satisfaisante (voir annexe 4).

La méthode de dosage par saturation au Cd (Cd-hem assay: Eaton et Toal, 1982), bien que simple et rapide, n'est pas recommandée pour la mesure des métallothionéines ayant un fort contenu en cuivre (observation personnelle et Scheuhammer et Cherian, 1986).

La méthode de dosage par saturation à l'Ag (Scheuhammer et Cherian, 1986) s'avère intéressante. Elle possède une bonne sensibilité; la MT de rat lierait 17-18 $\text{atm-g Ag}^+ \text{ mole}^{-1}$ protéine comparativement à 7 pour Cd, Zn et Hg; à pH 8.5, l'ion Ag^+ expulserait aisément le Cu, le Cd, le Hg et le Zn de la MT. Toutefois, la précipitation incomplète du complexe P.A.-M (P.A. étant de

l'hémoglobine de rat) peut être une source potentielle de variabilité, en raison d'un chauffage inadéquat de la préparation. De plus, on aurait avantage à utiliser le radioisotope ^{110m}Ag et à "miniaturiser" la méthode. Le tableau A.3.1 indique les résultats d'un essai effectué sur des branchies d'*A. grandis*.

A.3.1.2. Considérations méthodologiques importantes

Homogénéisation des tissus

Il est préférable d'effectuer une homogénéisation tissulaire en milieu isotonique de façon à perpétuer l'environnement cellulaire de la protéine et par conséquent à ne pas favoriser l'apparition d'artéfacts méthodologiques. Alors que la pression osmotique des fluides internes des mammifères atteint 300 mmol, la pression osmotique de l'hémocoèle d'*Anodonta cygnea* n'atteint que 22 mmol, la plus faible pression connue chez les Métazoaires (voir Bedford, 1973). A l'instar d'Hemelraad *et al.* (1986: homogénéisation de *A. cygnea* et *A. anatina*), nous utiliserons, pour l'homogénéisation des tissus d'*A. grandis*, une solution légèrement hypertonique de Tris 25 mM tamponnée à pH 7.2. Y.C. n'a toutefois pas détecté de problèmes de dosage des métallothionéines lors d'homogénéisations précédentes de tissus d'*A. grandis* avec une solution très hypertonique de NaCl 0.9%.

Emploi d'un antioxydant non recommandable

L'exposition à moyen terme (3-15 jours) d'homogénats ou de surnageants d'homogénats à des conditions oxydantes nuirait vraisemblablement à l'extraction de la métallothionéine (Minkel *et al.*, 1980; voir aussi Lobel et Payne, 1987). En effet, les groupements sulfhydryl présents dans la protéine formeraient des ponts disulfures résultant en des polymérisations indésirables (Minkel *et al.*, 1980). Pour pallier cette complication, plusieurs ont donc préconisé l'inclusion d'antioxydants dans les solutions d'homogénéisation et les phases mobiles en chromatographie liquide (2-mercaptoéthanol: Minkel *et al.*, 1980; Overnell, 1984; dithiothreitol, DTT: Lobel, 1989). On s'est par la suite rendu compte que ces substances produisaient elles-mêmes des artéfacts tels que la formation de complexes avec des ions métalliques relâchés par les métallothionéines (Roesijadi et Drum, 1982; DTT à une concentration de 4 mM: Lobel, 1989) et la cassure de dimères naturels de Hg-thionéines (Roesijadi *et al.*, 1988). Dans un autre ordre d'idée, chez le mulot *Mugil cephalus*, la concentration de Zn associée

Tableau A.3.1

Comparaisons des performances de quatre méthodes de dosage de la métallothionéine par saturation métallique: Ag-Hb fraîche, ^{203}Hg -blanc d'oeuf frais, ^{203}Hg -Hb fraîche, ^{203}Hg -ovalbumine "Sigma" (le second terme du couple est la protéine accessoire). Matériel d'essai: surnageant $30,000 \times \text{g}$ d'homogénat de branchies du bivalve *A. grandis*, L. Bousquet, Abitibi. [MT] exprimées en nmol sites de liaison de métal g^{-1} p. hum. ^{a,b}

Réplicat (pseudo)	vol. sous-éch. (mL)	Méthode Ag-Hb monovalent	vol. sous-éch. (mL)	Méthode de dosage		
				^{203}Hg -blanc oeuf	^{203}Hg -Hb	^{203}Hg - ovalbumine
1	0.2	118.2	0.1	148.7	37.4	moy.:4 sous. éch. série 1, 1/3,1/9,1/18 12.1 32.3
	0.4	120.1	0.2	34.8	32.2	
	\bar{X}	119.2	\bar{X}	91.8	34.8	
	C.V. (%)	1.2	C.V. (%)	87.7	10.5	
2	0.2	119.8	0.1	45.9	35.0	19.8 86.8
	0.4	117.6	0.2	32.2	33.8	
	\bar{X}	118.7	\bar{X}	39.1	34.4	
	C.V. (%)	1.3	C.V. (%)	24.8	2.3	
3	0.2	107.9	0.1	52.1	32.6	13.3 17.6
	0.4	111.4	0.2	30.9	34.6	
	\bar{X}	109.7	\bar{X}	41.5	33.6	
	C.V. (%)	2.2	C.V. (%)	36.1	4.2	
4	0.2	111.1	0.1	62.4	34.0	17.2 8.7
	0.4	121.4	0.2	37.4	37.6	
	\bar{X}	116.2	\bar{X}	49.9	35.8	
	C.V. (%)	6.3	C.V. (%)	35.4	7.0	
\bar{X} totale	\bar{X}	115.9	\bar{X}	55.6	34.7	15.7
	C.V. (%)	4.4	C.V. (%)	70.6	5.7	56
STD MT 55.95 nmol M(II) 100 μg^{-1} MT	0.2	129.2	0.1	52.1	53.7	38.6 19.6 70.7
	0.4	119.4	0.2	57.8	53.7	
	\bar{X}	124.3	\bar{X}	55.0	53.7	
	C.V. (%)	5.6	C.V. (%)	4.0	0	
	% récupér.	91.5 ^c	% récupér.	98.2	96.0	70.7
BLANC	\bar{X}	0.49 sur 53 nmol. Ag mL^{-1} ajoutées		inutilisable ^d	86 sur 15,540 cpm ^{203}Hg , 0.5% du total	74 sur 16,496 cpm ^{203}Hg , 0.4% du total

^a Sources: Méthode Ag-hem: Scheuhammer et Cherian (1986); Méthode ^{203}Hg : Dutton *et al.* (1993).

^b Nous avons retenu les critères suivants pour l'évaluation de la performance des méthodes: précision (C.V.) des déterminations, récupération d'un étalon de MT mammalienne, capacité de la protéine accessoire de récupérer tout le M d'un blanc sans aucun ligand biologique. L'étalon et le blanc sont inclus de façon routinière dans les essais de dosage MT.

$$\text{Le \% de récupération pour cet essai} = \frac{\text{moy. nmol Ag } 100 \mu\text{g}^{-1} \text{ MT}}{17/7 \times 55.95 \text{ nmol M } 100 \mu\text{g}^{-1} \text{ MT}}$$

^d Le blanc est contaminé par des fragments de blanc d'oeuf précipité provenant du culot.

à la MT a augmenté significativement de 100 à $\approx 1,200$ nmol Zn g⁻¹ p. hum. (augmentation de MT probable), dans les sept jours suivant la capture des poissons, leur transport au laboratoire et leur transfert dans des réservoirs (Baer et Thomas, 1990). Nous suggérons donc les règles suivantes pour éviter les effets du stress de capture et de l'oxydation sur les concentrations de métallothionéines:

- (i) rapidement après le prélèvement des organismes (qq. heures), dissection et congélation des tissus. Les pièces sont mises dans deux sacs de polyéthylène: l'intérieur scellé sous vide et l'extérieur rempli d'azote; le tout est congelé à $\leq -40^{\circ}\text{C}$. Les échantillons ont pu être gardés 2 à 3 mois de cette façon. La congélation dans l'azote liquide serait tout aussi efficace;
- (ii) maintien de conditions anoxyques lors de l'étape critique de l'homogénéisation tissulaire (tente d'azote);
- (iii) extraction rapide de la métallothionéine à l'intérieur de quelques heures: 3-4.

Protéine accessoire

Le choix d'une protéine accessoire pour récupérer le métal lié non spécifiquement dans la préparation s'avère crucial. L'affinité de cette protéine pour le métal doit suivre préférentiellement la séquence $K_{\text{MT-M}} > K_{\text{P.A.-M}} > K_{\text{GSH-M}}, K_{\text{cystéine-M}}$ etc. (consulter Kagi et Häpke, 1984 et la documentation scientifique à ce sujet). La quantité de protéine accessoire ajoutée à la préparation ne doit pas provoquer la décomplexation du métal lié avec la métallothionéine en raison de la dilution ("stripping effect"). La précipitation du complexe P.A.-M doit être complète et le précipité assez compact et ferme après précipitation.

L'hémoglobine de sang de rat utilisé dans le présent essai satisfait bien à ces conditions (voir le tableau A.3.1). La préparation de cette solution est décrite en section A.3.2.

Inactivation des protéases

L'activité des protéases pourra être réduite considérablement:

- (i) en effectuant les homogénéisations avec une solution d'homogénéisation dont la température avoisine 0°C;
- (ii) en gardant les homogénats et leurs surnageants sur la glace jusqu'au moment de la saturation métallique.

L'utilisation du chlorure de phénylméthylsulfonyl pour inactiver les protéases est inutile parce que celui-ci est insoluble en milieu aqueux.

Interférences

Lobel et Payne (1987) décrivent les interférences possibles sur la méthode de dosage au ^{203}Hg produites par le Cu, le Hg, l'Ag, le Se et l'oxygène.

Mentionnons finalement que nous avons retenu la méthode de dosage par saturation par le ^{203}Hg avec Hb comme P.A. pour la métallothionéine du bivalve *A. grandis* sur la base des critères de performance suivants: précision (C.V.) des déterminations, récupération d'un étalon de MT mammalienne, capacité de la protéine accessoire de récupérer tout le métal d'un témoin sans aucun ligand biologique, simplicité et rapidité (par rapport à la méthode Ag-hem). Nous avons éliminé la dilution en série chargée d'estimer la décomplexation MT-M, et suggérée par Dutton *et al.* (1993) pour chaque échantillon (p. ex.: 1 - 1/3 - 1/9 - 1/18), parce que notamment elle apportait trop de variabilité aux résultats (voir le tableau A.3.1). Par ailleurs, lors d'un essai modifié, nous avons ajouté un étalon interne ("internal standard") de MT de foie de lapin commercialement disponible (Sigma Co.) à des surnageants 30,000 × g d'homogénats de branchies, de glande digestive ou de restes de spécimens provenant du lac Saint-Joseph (peu contaminé par les métaux) avant l'addition de ^{203}Hg . La récupération de l'étalon a atteint respectivement 93 ± 1% (N=3), 93 ± 7% (N=3) et 96±1% (N=4: tableau A.4.4).

A.3.2 Protocole

A.3.2.1 Matériel et réactifs

Matériel spécifique

- Pour l'homogénéisation, dépendant du volume, flacons "Dilu-Vial" Fisherbrand no cat. 3-341-13 de 20 mL ou contenant poly-stérile "Falcon" de 4.5 onces no cat. 4014.
- Un homogénéisateur Brinkman "Kinematica" CH-6010.
- Sac gonflable à gants grand (glovebag "Atmosbag") Aldrich no cat. Z10, 608-9 chez Biopharm Inc.
- Cylindre d'azote de 6.21 m³.
- Tubes microcentrifuge "Eppendorf" de 1.5 mL; no cat. C3515-10 chez Canlab.
- Petite centrifugeuse "Eppendorf" ou, à défaut, une centrifugeuse conventionnelle Sorvall RC2-B (les tubes "Eppendorf" sont très solides).
- Support à tubes "Eppendorf" de fabrication artisanale: planche de "styrofoam" avec un réseau cartésien de trous du diamètre des tubes.
- Compteur γ LKB Compugamma 1282 et porte-échantillons.
- Pipettes automatiques avec embouts 50-200 μ L et 200-1000 μ L.
- Scelleur à sac pour étalons individuels MT et tissus.

La vaisselle, sans être nécessairement lavée à l'acide, doit être propre (contamination significative au Hg improbable).

Réactifs

- Chlorure de mercure, HgCl_2 "reagent grade".
- ^{203}Hg sous forme de nitrate de mercure New England Nuclear no cat. NEZ 041; 5 mCi; dilution de 50 à 100 fois pour solution-mère. Un permis de radioprotection est nécessaire.
- Tris ultra-pur 99.95% ICN Biochemicals no cat. BC-372 103 133.
- Acide trichloroacétique (TCA) "Aristar" de BDH; 500 g; no cat. B45013-34.
- Métallothionéine de foie de lapin Sigma; 5 mg; no cat. M-7641; disponible chez Biopharm. Les étalons devraient être constitués de $100 \mu\text{g MT mL}^{-1}$ d'eau désionisée, séparés par "portion individuelle" de 2 mL sous atmosphère d'azote, et chaque portion congelée individuellement sous atmosphère d'azote. Avec 5 mg on peut faire ≈ 25 portions.

Préparation de 10 mL de solution de travail de ^{203}Hg

- Préparer une solution-mère de mercure "froid" en diluant 1.3535 g HgCl_2 dans 100 mL TCA 20%.
- Nous ajoutons $200 \mu\text{L}$ de la solution de travail contenant $10 \mu\text{g}$ de mercure "froid" à chaque réplikat analytique; un stock de 10 mL de cette solution contient donc $500 \mu\text{g}$ de mercure "froid". Comme la solution-mère contient $10^4 \mu\text{g Hg mL}^{-1}$, nous avons besoin de $50 \mu\text{L}$ de solution-mère.
- La solution de travail est donc composée de: $50 \mu\text{L}$ de la solution-mère de Hg froid + $x \mu\text{L}$ de la solution-mère de ^{203}Hg + $[10,000 - (x + 50)] \mu\text{L TCA 10\%}$.

Le volume "x" dépend de l'activité de ^{203}Hg voulue par réplikat; 100,000 cpm fournissent des comptages rapides. On ajoute 5×10^6 cpm dans 10 mL de solution de travail. L'activité spécifique serait dans ce cas de $10,000 \text{ cpm } \mu\text{g}^{-1} \text{ Hg}$.

La solution de travail devrait être dosée pour le mercure "froid" par spectrométrie d'émission atomique au plasma. A cette fin, on préparera des étalons de 50 et de 100 ppm de Hg dans du TCA 10%; ensuite, on diluera 5 fois les étalons et les solutions à doser pour éviter les problèmes de viscosité (TCA \rightarrow 2%). Les conditions d'analyse seront les suivantes: largeur de la fente à 6 (slit), hauteur d'observation à 12 mm, longueur d'onde à 184.95 nm. La cellule de détection sera purgée pendant 2 heures avant l'analyse. La hauteur d'observation se définit par rapport à un point de référence qui devra être très bien ajusté. L'apex de la flamme colorée bleue lorsqu'est aspirée une solution de 1000 mg L^{-1} d'yttrium devra se trouver à 1 mm sous le rebord de la torche. Ceci est réalisé en jouant sur la pression d'argon appliquée au nébuliseur.

Préparation de sang de rat hémolysé

Réactifs

- 10 mL de sang de rat hépariné.
- Héparine standard.

à se procurer au Centre des Animaux de laboratoire, Pavillon des Sciences, Cité Universitaire, Université Laval, Ste-Foy, G1K 7P4, Attn: Mme Fournier; Tél: 656-2551.

- Solution-stock de 1.15% KCl: 2.3 g KCl / 200 mL d'eau désionisée + 1 mL d'héparine.
- Solution-stock de 30 mM Tris: 3.63 g Tris / L d'eau désionisée; ajuster le pH à 8 avec HCl 6N.

Protocole:

10 mL de sang hépariné



← 1.15% KCl; 20 mL; dans un tube centrifuge de 50 mL, ajouter KCl puis le sang; vortex. Centrifuger à $6,000 \times g$ pour 5 min.

Culot



← 1.15% KCl; 30 mL; vortex. Centrifuger à $6,000 \times g$ pour 5 min. Répéter le lavage 3 fois.

Culot



← 30 mM Tris-HCl pH 8, 20 mL; vortex; laisser reposer 10 min à température ambiante. Centrifuger à $10,000 \times g$ pour 10 min.

Le surnageant est l'hémolysat.

- L'hémolysat, au réfrigérateur, est stable pour 2 semaines (jusqu'à ce qu'il tourne au rouge sombre).
- Un précipité se formera au second jour; agiter bien avant usage; l'hémolysat est encore bon.

A.3.2.2 Les étapes de la méthode

Homogénéisation

1.- Dépendant des quantités de tissu disponible, diluer sur une base poids/poids avec une solution de Tris 25 mM à pH 7.2. Nous recommandons ces dilutions à titre indicatif:

Organe	Dilution avec Tris 25 mM pH 7.2	Contenant
Manteau	1:2 ou 1:3	"Dilu-Vial" 20 mL
Branchies	1:2 ou 1:3	"Dilu-Vial" 20 mL
Glande digestive	1:4	"Dilu-Vial" 20 mL
Restes	1:1 ou 1:2	"Falcon" 4.5 on.

On calcule précisément la dilution D.

Chaque échantillon est composé des organes de 4 spécimens sortant du congélateur. Un sous-échantillon d'homogénat d'une taille minimale de 1 mL (2 mL préférablement) sert au dosage des MT; un autre sert à la détermination du rapport {poids humide / poids sec}. Pour une série d'un tissu donné (Ex.: branchies de 11 lacs), il est préférable de garder la même dilution.

2.- Placer dans la tente d'azote, les échantillons mis préalablement sur la glace et les tubes recueillant les sous-échantillons, pipettes et emboûts, l'homogénéisateur, une quantité suffisante d'eau de rinçage (deminéralisée, \approx 2 Mohms), un bac à vidange et des chiffons "Kimtowel".

Emplir et vider le mieux possible la tente avec de l'azote à 3 reprises; le 4^e remplissage devrait être alors de l'azote assez pur.

Homogénéiser à basse vitesse (3,000-4,000 rpm) tout en s'assurant que l'homogénat reste froid (30-60 sec.); terminer à 10,000 rpm pendant 15 secondes. S'assurer de la qualité de l'homogénat (absence de grumeaux, consistance uniforme).

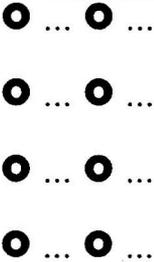
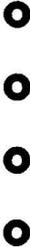
Immerger entièrement le couteau dans l'eau de rinçage, faire tourner à haute vitesse dans 3 bains successifs; le couteau est propre lorsqu'il n'y a plus de débris dans l'eau de rinçage. Entre chaque séance d'homogénéisation le couteau est laissé dans une solution "Décon" \approx 5%.

Le sous-échantillon servant au dosage des métallothionéines (2 mL) est transféré dans un tube à centrifuger. On peut vider la tente et ne garder que le nécessaire pour fabriquer les sous-échantillons.

Saturation au ^{203}Hg

3.- Centrifuger à $30,000 \times g$ pendant 30 minutes à une température de 4°C ou moins.

4.- Manipuler délicatement les tubes et les mettre sur la glace. Réaliser les replicata suivants (4 replicata: étapes décrites ci-dessous).

			
Echantillons	Etalon MT	Témoin	CPM total
200 μL de surnageant et réactifs	200 μL d'étalon (décongeler à l'avance une portion individuelle) et réactifs	200 μL Tris 25 mM pH 7.2 200 μL sln de travail 400 μL de sang	600 μL Tris 25 mM pH 7.2 200 μL sln de travail

Pour les échantillons, pipetter délicatement 200 μL de surnageant, en traversant la couche de lipides si nécessaire, et placer dans le tube "Eppendorf" de 1.5 mL. Les tubes sont préalablement identifiés et placés dans la planche de "styrofoam".

5.- Ajouter 200 μL de la solution de travail de ^{203}Hg ; vortex; le surnageant est maintenant trouble. Laisser incuber 10 minutes au moins.

Prendre toute mesure requise pour la radioprotection; on doit notamment porter une double paire de gants, des lunettes et un dosimètre personnel.

6.- Cette étape doit être réalisée sans perte de temps.

Ajouter 400 μL de sang hémolysé et aussitôt agiter au vortex pour provoquer la précipitation de Hb. On empêche ainsi la décomplexation du Hg d'avec la MT.

Sans tarder centrifuger à $10,000 \times g$ pendant 10 minutes. N'ajouter le sang hémolysé qu'au nombre de tubes que le rotor peut accepter.

7.- Transférer tout le surnageant à un autre tube "Eppendorf" de 1.5 mL préalablement identifié. S'assurer que le surnageant est raisonnablement peu turbide (absence de gros fragments provenant du culot, < 50 fines particules en suspension); autrement centrifuger de nouveau.

8.- Compter l'activité du ^{203}Hg au compteur γ .

Couper entièrement avec un ciseau la charnière du tube "Eppendorf" afin que celui-ci puisse se loger aisément dans le porte-échantillon.

Compter un minimum de 2500 cpm fournit habituellement une erreur de comptage plus petite que 2%.

Voici le programme fourni au "LKB Compugamma 1282":

ID: Hg

MODE 1

1	LISTING	Y
2	TIME	14,000
3	COUNTS1	2,500
4	COUNTS2	0
5	LRC COUNTS	0
6	LRC TIME	0
7	BACKGROUND 1	0
8	BACKGROUND 2	0
9	WINDOW 1	158-171
10	WINDOW 2	000-000
11	HALFLIFE 1	0
12	HALFLIFE 2	0
13	FACTOR 1	1
14	FACTOR 2	1
15	SUMMATION	N
16	REPLICATE	1
17	REPEAT	1
18	LABELS (½)	1
19	CODING	POS-CODE
20	PRINT	-1-2-3-4-5-6-7-8

La liste de sortie comprend notamment le temps de comptage, le nombre de comptes minute⁻¹ et l'erreur de comptage (%).

9.- Calcul de la capacité de séquestration du tissu ("molar binding capacity"):

$$\text{nmol sites de liaison de métal g}^{-1} \text{ tissu hum.} = \frac{\text{CPM}(\text{réplicat}) - \text{CPM}(\text{blanc})}{\text{CPM total}} \times C \times D;$$

D = dilution; 1:1 = 2; 1:2 = 3; 1:3 = 4; 1:4 = 5, ou la dilution utilisée pour un tissu donné;

$$C = \frac{\text{nmole Hg}}{\text{mL}} = \frac{10 \mu\text{g Hg}}{0.2 \text{ mL}} \times \frac{1,000 \text{ nmoles}}{\mu\text{mole}} \times \frac{1 \mu\text{mole Hg}}{200.59 \mu\text{g Hg}} = 249.265;$$

$$r = \frac{\text{poids humide}}{\text{poids sec}}. \text{ Remplacer D par r si l'on désire exprimer les résultats par rapport au poids sec.}$$

La moyenne des 4 replicata donne la capacité de séquestration du tissu.

10.- Récupération de l'étalon MT:

(i) On calcule l'expression:

$$\text{nmol sites de liaison de métal mL}^{-1} = \frac{\text{CPM}(\text{réplicat}) - \text{CPM}(\text{blanc})}{\text{CPM total}} \times C$$

(ii) On détermine le nombre de moles de Cd et de Zn par mL⁻¹ d'étalon avant dosage (trois étalons sur les 25).

- soit à l'aide des quantités de Cd et de Zn par mg de MT indiquées sur le vial "Sigma";
- soit par le dosage du Cd et du Zn dans l'étalon MT par spectrophotométrie d'absorption atomique (en guise de contrôle de qualité, le dosage d'un étalon certifié de métal en solution est fortement recommandé).

Comme les stoechiométries du Hg, du Cd et du Zn sont semblables pour la MT de lapin (7 atomes M molécule⁻¹ MT), la comparaison est directe.

Ex.:

	nmoles M mL ⁻¹ étalon				
	Cd	Zn	Σ	Hg	récupération (Hg/Σ)
	59.2	11.6	70.8	68.0	96 %

Expériences:

- 1. Spécificité de notre méthode de dosage des métallothionéines du bivalve *Anodonta grandis***
- 2. Effet du temps d'entreposage (-40°C, atm. d'azote) sur les concentrations de métallothionéine mesurées sur des tissus de mollusques**
- 3. Effets de conditions d'extraction sur les concentrations cytosoliques de métaux**

A.4.1 Série d'expériences visant à démontrer la spécificité de la méthode de dosage des métallothionéines du bivalve *A. grandis* par saturation par le mercure-203.

En principe, la spécificité de la méthode de dosage des métallothionéines est assurée de la manière suivante (voir figure A.3.1). La saturation par le mercure est effectuée en milieu acide (10% TCA) afin de précipiter les protéines et enzymes de haut poids moléculaire; on s'en débarrasse ensuite par une simple centrifugation. L'interférence par les composés de faible poids moléculaire (surtout la glutathione et la cystéine renfermant des groupements thiol) est éliminée en en décomplexant le mercure par une dose massive d'une protéine accessoire (ici hémoglobine de sang de rat: Hb). La constante d'association de Hb avec le Hg est plus élevée que celle de ce dernier avec les ligands cytosoliques de faible poids moléculaire, mais reste plus faible que la K_a entre le Hg et la MT. Il nous faut toutefois vérifier, en pratique, la variante de la méthode de dosage des métallothionéines utilisée dans notre laboratoire (modifications au niveau de la préparation de l'échantillon, du choix de la protéine accessoire et de la réalisation de la réplique). Nous étudierons ainsi l'interférence causée par la "contamination" d'un étalon MT par la glutathione ou la cystéine, et nous comparerons les chromatogrammes de cytosols de spécimens entiers d'*Anodonta grandis* avant et après l'application de la méthode de dosage.

A.4.1.1 Expérience de "contamination" d'un étalon métallothionéine par la glutathione ou la cystéine

Hypothèse

Si la glutathione ou la cystéine interfère avec le dosage d'un étalon MT de foie de lapin, une préparation d'étalonnage les contenant devrait vraisemblablement retenir plus de Hg qu'une solution pure de l'étalon MT.

Matériel et méthodes

- Toutes les préparations sont dosées pour la MT par la méthode de saturation au ^{203}Hg telle que décrite en annexe 3.
- Réactifs: l'étalon MT est composé de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ d'eau désionisée de métallothionéine de foie de lapin (Sigma Co.). La glutathione réduite est pure à 98-100%, "free-acid"; tous les groupes thiol sont théoriquement disponibles. La L-cystéine est pure, "free-base".
- Les volumes totaux d'échantillons pour cette expérience doivent être égaux à $200 \mu\text{L}$ tel que requis par l'essai de dosage de la MT.

Tableau A.4.1Plan de l'expérience de dopage d'un étalon MT avec de la glutathione ou de la cystéine ^a

100 μL d'étalon MT + 100 μL NaCl 0.9% 4 replicata = témoin	100 μL d'étalon MT + 100 μL glutathione réduite 10^{-3} M 4 replicata	100 μL d'étalon MT + 100 μL glutathione réduite 10^{-4} M 4 replicata
100 μL d'étalon MT + 100 μL cystéine 10^{-3} M 4 replicata	100 μL d'étalon MT + 100 μL cystéine 10^{-4} M 4 replicata	100 μL d'étalon MT + 100 μL glutathione réduite 10^{-3} M chauffée 70°C -5 min, ^b centrifugée $10,000 \times g$ -15 min. 4 replicata
100 μL d'étalon MT + 100 μL cystéine 10^{-3} M chauffée 70°C -5 min, ^b centrifugée $10,000 \times g$ -15 min. 4 replicata		

^a Les concentrations de glutathione et de cystéine retenues pour l'expérience se veulent dans la gamme des concentrations retrouvées naturellement dans les cellules animales.

^b Si la glutathione ou la cystéine précipitent lors de ce traitement, le Hg retenu dans les surnageants devrait être similaire au témoin.

*Résultats***Tableau A.4.2**

Intervalles de confiance des moyennes des [Hg(réplikat)] (nmoles Hg mL⁻¹ sln.) des différents traitements tels que décrits en méthodologie.

Comparaisons avec le témoin	Décision statistique	Intervalle de confiance de la moyenne au seuil $\alpha = 0.05$
témoin	H_0 : témoin = μ traitement H_1 : témoin < μ traitement	<u>32.48-34.77</u>
100 μ L étalon MT + 100 μ L GSH 10 ⁻³ M	N.S.	26.14- <u>31.99</u>
100 μ L étalon MT + 100 μ L GSH 10 ⁻⁴ M	N.S.	30.53- <u>32.29</u>
100 μ L étalon MT + 100 μ L cyst. 10 ⁻³ M	N.S.	28.96- <u>31.03</u>
100 μ L étalon MT + 100 μ L cyst. 10 ⁻⁴ M	N.S.	30.05- <u>32.01</u>
100 μ L étalon MT + 100 μ L GSH 10 ⁻³ M chauffée	N.S.	26.67- <u>28.60</u>
100 μ L étalon MT + 100 μ L cyst. 10 ⁻³ M chauffée	N.S.	28.06- <u>31.38</u>

Interprétation

La glutathione réduite et la cystéine n'interfèrent vraisemblablement pas avec le dosage de la métallothionéine mammalienne par saturation par le ²⁰³Hg.

A.4.1.2 Comparaison de chromatogrammes (obtenus par chromatographie liquide haute performance) de cytosols de spécimens entiers d'*Anodonta grandis* avant et après l'application de la méthode de dosage de la MT par saturation par le ^{203}Hg

Hypothèse

La comparaison de chromatogrammes de cytosols de spécimens entiers d'*Anodonta grandis* obtenus avant et après l'application de la méthode de dosage devrait nous indiquer la persistance seule des pics d'absorbance (254 et 280 nm) caractéristiques de protéines de type métallothionéine ou, du moins, la détection de ^{203}Hg que dans les fractions correspondant au volume d'élution de ces protéines.

Méthodologie

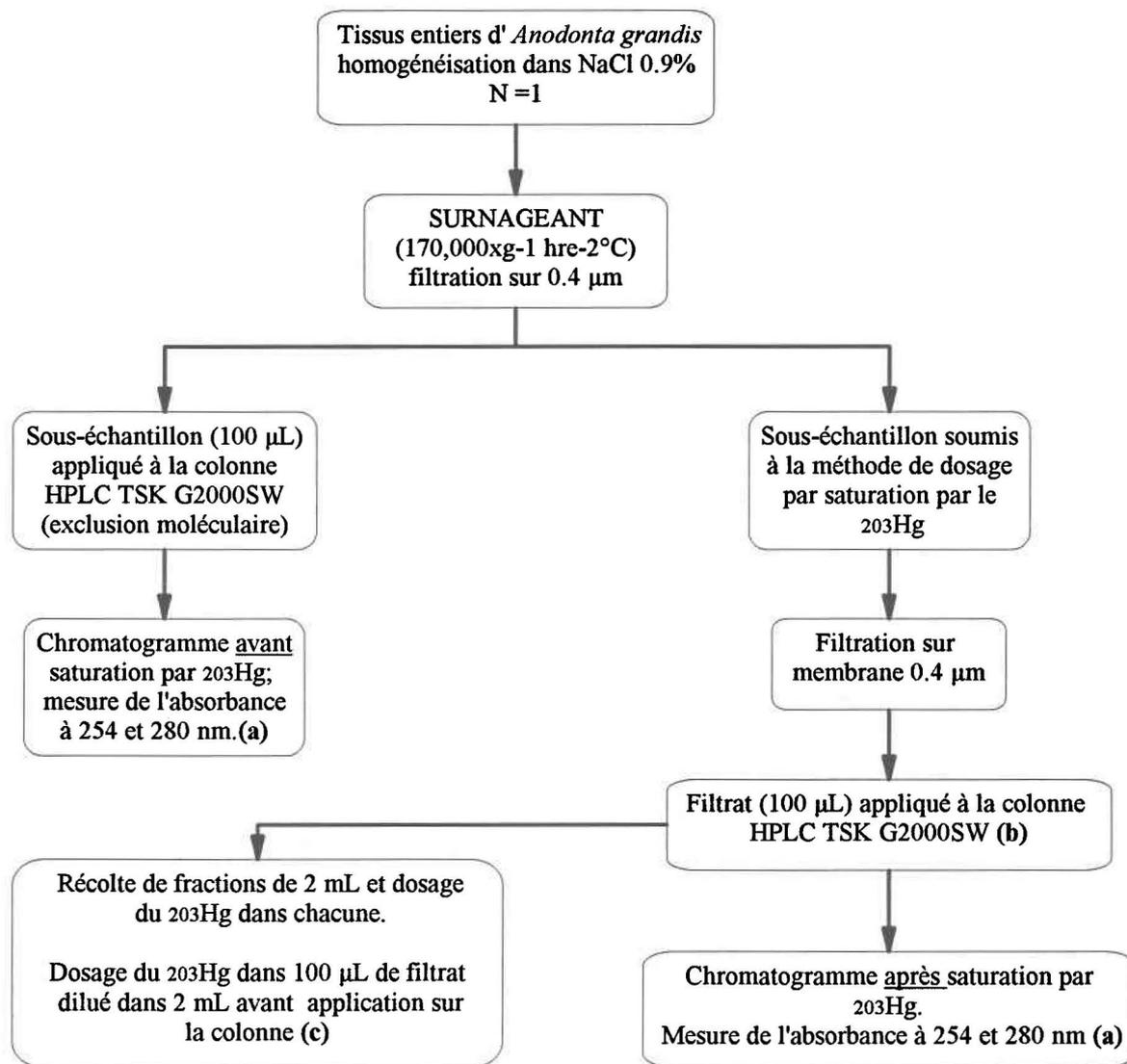


Figure A.4.1: Schéma expérimental du fractionnement d'un cytosol par HPLC, d'un spécimen entier d'*A. grandis*, avant et après l'application de la méthode de dosage de la MT par saturation au ^{203}Hg . (a) L'absorbance à 254 nm est indicatrice du lien métal-thiol retrouvé dans les métallothionéines; l'absorbance à 280 nm est indicatrice de la présence d'acides aminés aromatiques (rares dans les métallothionéines). (b) L'éluant est une solution de Tris 10 mM ajustée à pH 7; l'appareil est opéré en mode "isocratique". (c) Toutes les préparations à être doser pour le ^{203}Hg doivent avoir le même volume pour éviter un effet de géométrie de l'échantillon sur le comptage.

Résultats

L'examen des chromatogrammes (non fournis) indique vraisemblablement la présence d'une protéine de type "métallothionéine" chez *Anodonta grandis*: un temps d'élution correspondant à une protéine de poids moléculaire entre 12 et 13.5 kD; une absorbance beaucoup plus élevée à 254 qu'à 280 nm (10.8 fois) et la persistance des pics correspondants en milieu acide. Dans ce milieu, les pics de poids moléculaire élevé ont disparu alors que ceux de faible poids moléculaire ont persisté.

Tableau A.4.3

Détection du ^{203}Hg (CPM) dans les fractions chromatographiques recueillies après l'élution de 100 μL de la préparation résultant de la méthode de dosage (se rappeler qu'il existe une étape de récupération par Hb, du Hg lié non spécifiquement). Echantillon dosé: surnageant $170,000 \times \text{g}$ d'un homogénat de spécimen entier d'*Anodonta grandis*.^a

Fraction (mL)	CPM ^{203}Hg ^b
0-2	118
2-4	99
4-6	87
6-8	88
8-10	160
10-12	101
12-14	153
14-16	138
16-18	95
18-20	91
100 μL de la préparation	427

^a Calcul de la récupération du sous-échantillon appliqué à la colonne:

$$\text{Récupération (\%)} = \frac{\sum_{i=\text{fr.6-8}}^{j=\text{fr.18-20}} (\text{CPM}_i - \text{bruit de fond éluant})}{427}$$

Le bruit de fond est représenté par le CPM moyen des fractions du volume mort de la colonne (0-6 mL) ≈ 101 .
% de récupération $\approx 35\%$.

^b Le bruit de fond de l'éluant n'est soustrait d'aucune de ces fractions.

Interprétation

La présente expérience ne nous permet pas de conclure sur l'interférence possible des composés de faible poids moléculaire lors du dosage des MT. Apparemment ils sont encore là dans la préparation résultante de la méthode de dosage, mais on ne peut dire s'ils complexent encore du Hg en raison de la récupération incomplète du sous-échantillon appliqué à la colonne (35% !). Au moment de cette expérience, nous avons utilisé un éluant fait de Tris 10 mM ajusté à pH 7. Nous nous sommes seulement plus tard rendus compte qu'un tel éluant trop dilué ne pouvait prévenir l'adsorption de protéines sur la phase stationnaire de la colonne HPLC utilisée lors de cette expérience (Micallef *et al.*, 1992). Notre ignorance de ce fait peut nous avoir fait contaminer notre colonne par du ^{203}Hg lors de ces travaux et d'essais préliminaires.

A.4.1.3 Conclusion

En dépit du succès mitigé de l'expérience de comparaison des chromatogrammes avant et après l'essai de dosage de la MT par saturation au ^{203}Hg , nous concluerons à la spécificité de cette méthode de dosage pour ces protéines chez le mollusque *A. grandis*:

- (a) l'examen des chromatogrammes nous révèle la dénaturation et la disparition des protéines de haut poids moléculaire à la suite de leur exposition à l'acide;
- (b) même si les composés de faible poids moléculaire sont apparemment résistants à la dénaturation par l'acide, nous avons démontré que les ligands les plus susceptibles d'interférer (glutathione et cystéine) ne résistent pas à la décomplexation du Hg par Hb dans le dosage de la MT mammalienne. Ces ligands devraient être encore moins disponibles pour lier du Hg, dans les tissus de *A. grandis*, en raison des réactions redox dans lesquelles ils sont impliqués et de la complexation possible d'autres xénobiotiques. De plus, lors d'un essai modifié, nous avons ajouté un étalon interne ("internal standard") de MT de foie de lapin commercialement disponible (Sigma Co.) à des surnageants $30,000 \times g$ d'homogénats de branchies, de glande digestive ou de restes de spécimens provenant du lac Saint-Joseph (peu contaminé par les métaux) avant l'addition de ^{203}Hg . La récupération de l'étalon a atteint respectivement $93 \pm 1\%$ (N=3), $93 \pm 7\%$ (N=3) et $96 \pm 1\%$ (N=4: tableau A.4.4).

Tableau A.4.4

Récupération d'un étalon interne ("internal standard") de métallothionéine de foie de lapin commercialement disponible (Sigma Co.) ajouté avant l'incorporation du ^{203}Hg dans des surnageants 30,000 × g d'homogénats de branchies, de glande digestive ou de restes de spécimens d'*A. grandis* provenant du lac St-Joseph (Co. Portneuf) (N=4).

Traitement	[MT] ^a	Valeur de [MT] pour trait. 2 ^a		% récupération
		Attendue	Observée	
		Branchies		
1: 150 µL homog. 30,000 × g + 50 µL NaCl 0.9%	1: 2.8 ± 0.1 étalon MT:	19.0	17.6	92.6
2: 150 µL homog. 30,000 × g + 50 µL étalon MT	64.9 ± 1.3			
		Glande digestive		
1: 150 µL homog. 30,000 × g + 50 µL NaCl 0.9%	1: 7.4 ± 0.2 étalon MT:	23.6	21.9	92.8
2: 150 µL homog. 30,000 × g + 50 µL étalon MT	64.8 ± 2.3			
		Restes		
1: 150 µL homog. 30,000 × g + 50 µL NaCl 0.9%	1: 13.5 ± 0.3 étalon MT:	28.9	27.8	96.2
2: 150 µL homog. 30,000 × g + 50 µL étalon MT	61.5 ± 2.3			

^a Concentrations de MT exprimées en nmol de sites de liaison de métal par g de p. hum. pour les traitements 1 et 2 ou par mL pour l'étalon MT.

Si l'utilisateur veut s'assurer qu'il y a suffisamment de Hg pour saturer tous les sites dans le cytosol, il pourra le faire en évaluant la récupération d'un étalon interne de MT mammalienne dans un cytosol de mollusque avec différentes combinaisons de quantités de Hg et d'hémoglobine ajoutées par réplikat.

A.4.2 Effet du temps d'entreposage (-40°C, atm. d'azote) sur les concentrations de métallothionéine mesurées sur des tissus de mollusques

Afin de statuer sur la stabilité de la métallothionéine durant l'entreposage au froid avant son dosage, nous l'avons dosée dans des tissus du bivalve *A. grandis* qui avaient été entreposés pour 15 ou 60 j à -40°C, sous atmosphère d'azote. Ces concentrations se sont avérées non significativement différentes de celles déterminées à t = 0 j sur des échantillons frais des mêmes tissus. Pour des raisons incontournables, ces résultats ne peuvent être montrés (égarés !). Les étalons de MT utilisés lors des essais de dosage par le ^{203}Hg , étaient fabriqués en lot (nombre de portions individuelles de 2 mL [100 μg MT mL $^{-1}$ d'eau désionisée] obtenues d'un flacon de 5 mg de MT [Sigma Co.]), et gardés au congélateur en prenant les mêmes précautions (voir section A.3.2.1) que pour l'entreposage des tissus de mollusques. Ces étalons MT étaient théoriquement plus vulnérables à une oxydation prolongée que la MT dans les tissus non encore homogénéisés; en effet, l'oxygène moléculaire rencontrerait moins de résistance à sa diffusion dans de telles préparations. Pourtant, ces étalons affichaient une remarquable stabilité dans le temps, tels qu'en font foi les pourcentages de récupération (près de 100%) de portions aliquotes d'étalon employées plus ou moins longtemps après leurs fabrications. Nous montrons ces pourcentages (tableau A.4.5) en guise de substitut à l'information perdue mentionnée ci-dessus. Nous avons conclu que notre procédure de conservation des tissus était adéquate pour le dosage de la MT.

Tableau A.4.5

Pourcentages de récupération d'étalons MT utilisés plus ou moins longtemps après la fabrication de leur lot ^a, pour le dosage de la métallothionéine de tissus de bivalves.

no. du lot	[MT] mesurée ^b nmol sites de liaison de métal mL $^{-1}$	% de récupération d'un étalon provenant de ce lot après x jours d'entreposage ^c			
		0 j	≈ 15 j	≈ 60 j	100-120 j
1	65.87	--	121	--	102
2	65.47	--	102	103	--
3	66.33	102	--	--	--

^a Un lot ≈ 40 portions aliquotes de 2 mL (100 μg MT mL $^{-1}$ d'eau désionisée) provenant d'un même flacon de 5 mg de MT (Sigma Co.).

^b [MT] déterminée à partir du dosage du Cd et du Zn, par spectrophotométrie d'absorption atomique à la flamme, dans une portion individuelle d'étalon MT.

^c Conditions d'entreposage décrites en section A.3.2.1.

A.4.3 Effets des conditions d'extraction sur les concentrations de Cd, de Cu, de Zn et de Ca dans le cytosol des branchies du bivalve *Anodonta grandis*

A.4.3.1 Introduction

Dans le cadre de ce projet, nous avons réalisé une expérience de transplantation impliquant le transfert de bivalves de l'espèce *Anodonta grandis* d'un lac peu contaminé vers un lac très contaminé en métaux traces dans la région de Rouyn-Noranda. Des résultats intéressants ont été obtenus du suivi temporel des concentrations cytosoliques en Cd, en Ca, en Cu et en Zn des individus transférés et de témoins mis en enclos dans leur lac d'origine. Il est ensuite apparu nécessaire de statuer sur la similarité des concentrations cytosoliques mesurées et de celles réellement présentes dans la cellule intacte. En effet, certaines étapes d'extraction utilisées dans ce travail étaient susceptibles d'altérer la composition du cytosol.

Présentement, toute méthode d'extraction des métaux cytosoliques affectera plus ou moins l'intégrité de ce compartiment cellulaire. On minimiserait beaucoup cette altération en effectuant l'homogénéisation tissulaire sur du tissu frais, entre deux surfaces de cisaillement en verre (Julshamn et Andersen, 1981), en conditions beaucoup plus réductrices que l'air libre (voir De Robertis *et al.*, 1975 et Alberts *et al.*, 1983), en respectant l'équilibre osmotique du tissu (les pressions osmotiques du tissu et du tampon d'homogénéisation doivent être semblables; P_{osm} de *A. cygnea* = 22 mmoles: Bedford, 1973) et en inhibant l'action des protéases (homogénat tenu sur glace). Nous comparerons donc les concentrations cytosoliques en métaux traces obtenues par une méthode d'extraction englobant les caractéristiques ci-dessus et par la méthode d'extraction utilisée lors de nos travaux.

A.4.3.2 Matériel et méthodes

Nous avons disposé de 17 spécimens de l'espèce *Anodonta grandis* provenant du lac Vaudray (très contaminé en Cd^{2+} dissous) pour réaliser cette expérience. Expédiés vivants, les bivalves ont été laissés à dépurer pendant 24 h. Leurs branchies ont alors été prélevées et regroupées pour constituer un seul et même homogénat de référence, réalisé la journée même: homogénéisation douce verre-verre sous atmosphère d'azote, avec 3 volumes de Tris 25 mM pH 7.2, homogénat tenu sur glace, V total = 72 mL. On a alors continué l'homogénéisation à l'air libre sur la moitié de l'homogénat (30 coups) pour ensuite constituer 24 aliquots de 3 mL au total, répartis selon le plan d'expérience suivant pour une analyse de variance à 2 critères de classification (two-way anova).

Homogénéisation et congélation ^b	Temps de décongélation à 4°C		
	0 h ^a	5 h	12 h
avec N ₂	casier 11 N = 4	casier 12 N = 4	casier 13 N = 4
sans N ₂	casier 21 N = 4	casier 22 N = 4	casier 23 N = 4

^a Pas de congélation, l'homogénat est frais

^b 3 semaines de congélation à -40°C.

Les homogénats frais et décongelés (3 semaines de congélation à -40°C) ont été centrifugés ($170,000 \times g$ - 1 h - 2°C) et le surnageant résultant (cytosol défini opérationnellement) a été acidifié à une concentration finale de 0.5% HNO₃ Aristar. On a dosé le Cd, le Ca, le Cu et le Zn dans les surnageants par spectrométrie d'émission atomique au plasma (Thermo Jarrell-Ash Atomscan 25).

A.4.3.3 Résultats

Tableau A.4.6

Concentrations en Cd ($\mu\text{g mL}^{-1}$ cytosol) d'échantillons d'un homogénat composite de branchies du bivalve *A. grandis* provenant du lac Vaudray (Rouyn-Noranda) dont des aliquots ont été soumis à différents traitements avant leurs centrifugations. ^{a,b}

Homogénéisation et congélation	Temps de décongélation à 4°C		
	0 h ^c	5 h	12 h
avec N ₂	\bar{X} : 4.88 † S _x : 0.14	\bar{X} : 5.06 S _x : 0.10	\bar{X} : 5.08 S _x : 0.04
sans N ₂	\bar{X} : 4.79 S _x : 0.16	\bar{X} : 4.75 S _x : 0.11	\bar{X} : 4.39 § S _x : 0.04

^a La concentration de Cd dans le cytosol n'est vraisemblablement pas influencée de façon simplement additive par les conditions de traitement de l'homogénat. Il y a interaction entre les facteurs [F(2:15) = 12.0, P < 0.001]. Les variances de casier sont vraisemblablement égales entre elles.

^b Les symboles différents à côté des moyennes des casiers 11 et 23 signifient qu'elles sont vraisemblablement différentes entre elles (intervalle de confiance à 95%).

^c Pas de congélation, l'homogénat est frais.

Tableau A.4.7

Concentrations en Cu ($\mu\text{g mL}^{-1}$ cytosol) d'échantillons d'un homogénat composite de branchies du bivalve *A. grandis* provenant du lac Vaudray (Rouyn-Noranda) dont des aliquots ont été soumis à différents traitements avant leurs centrifugations. ^{a,b}

Homogénéisation et congélation	Temps de décongélation à 4°C		
	0 h ^c	5 h	12 h
avec N ₂	\bar{X} : 0.84 † S _x : 0.04	\bar{X} : 0.88 S _x : 0.03	\bar{X} : 0.90 S _x : 0.02
sans N ₂	\bar{X} : 0.78 S _x : 0.04	\bar{X} : 0.84 S _x : 0.05	\bar{X} : 0.88 † S _x : 0.02

^a La concentration de Cu dans le cytosol est vraisemblablement influencée de façon simplement additive par les conditions de traitement de l'homogénat [Effet lignes-F(1:17)=6.6, P<0.05; Effet colonnes-F(2:17)=8.4, P<0.01]. Les variances de casier sont vraisemblablement égales entre elles.

^b Les mêmes symboles à côté des moyennes des casiers 11 et 23 signifient qu'elles sont vraisemblablement égales entre elles (intervalle de confiance à 95%).

^c Pas de congélation, l'homogénat est frais.

Tableau A.4.8

Concentrations en Zn ($\mu\text{g mL}^{-1}$ cytosol) d'échantillons d'un homogénat composite de branchies du bivalve *A. grandis* provenant du lac Vaudray (Rouyn-Noranda) dont des aliquots ont été soumis à différents traitements avant leurs centrifugations. ^{a,b}

Homogénéisation et congélation	Temps de décongélation à 4°C		
	0 h ^c	5 h	12 h
avec N ₂	\bar{X} : 5.23 † S _x : 0.53	\bar{X} : 5.28 S _x : 0.16	\bar{X} : 4.81 S _x : 0.21
sans N ₂	\bar{X} : 4.85 S _x : 0.24	\bar{X} : 3.82 S _x : 0.11	\bar{X} : 2.79 § S _x : 0.07

^a La concentration de Zn dans le cytosol n'est vraisemblablement pas influencée de façon simplement additive par les conditions de traitement de l'homogénat. Il y a interaction entre les facteurs [F(2:17) = 12.2, P < 0.001]. Les variances de casier ne sont vraisemblablement pas égales entre elles (0.01 < P < 0.05).

^b Les symboles différents à côté des moyennes des casiers 11 et 23 signifient qu'elles sont vraisemblablement différentes entre elles (intervalle de confiance à 95%).

^c Pas de congélation, l'homogénat est frais.

Tableau A.4.9

Concentrations en Ca ($\mu\text{g mL}^{-1}$ cytosol) d'échantillons d'un homogénat composite de branchies du bivalve *A. grandis* provenant du lac Vaudray (Rouyn-Noranda) dont des aliquots ont été soumis à différents traitements avant leurs centrifugations. ^{a,b}

Homogénéisation et congélation	Temps de décongélation à 4°C		
	0 h ^c	5 h	12 h
avec N ₂	\bar{X} : 377.9 † S _x : 8.1	\bar{X} : 346.5 S _x : 11.9	\bar{X} : 345.3 S _x : 8.2
sans N ₂	\bar{X} : 384.1 S _x : 13.7	\bar{X} : 366.7 S _x : 15.3	\bar{X} : 358.7 † S _x : 10.3

^a La concentration de Ca dans le cytosol est vraisemblablement influencée de façon simplement additive par les conditions de traitement de l'homogénat [Effet lignes-F(1:17)=6.3, P<0.05; Effet colonnes-F(2:17)=13.2, P<0.001]. Les variances de casier sont vraisemblablement égales entre elles.

^b Les mêmes symboles à côté des moyennes des casiers 11 et 23 signifient qu'elles sont vraisemblablement égales entre elles (intervalle de confiance à 95%).

^c Pas de congélation, l'homogénat est frais.

A.4.3.4 Discussion et conclusion

Les extractions de cytosol de branchies d'*A. grandis*, effectuées lors de nos travaux au département d'Océanologie de l'UQAR (labo de J. Pellerin-Massicotte) comprenaient les étapes suivantes:

- (i) homogénéisation de branchies fraîchement décongelées (celles-ci congelées sous atmosphère d'azote à -40°C) à l'aide d'un piston de téflon et d'une éprouvette de 50 mL en Pyrex à une vitesse de 80 RPM dans une solution Tris 25 mM pH 7.2. L'homogénat était tenu sur la glace;
- (ii) congélation à -80°C (expulsion rapide de O_2 de l'homogénat);
- (iii) transport à l'INRS-Eau où la congélation se poursuit pendant 1 à 3 semaines à -40°C ;
- (iv) décongélation durant 12 h à 4°C ;
- (v) l'homogénat était agité pendant 10-20 secondes (par "vortex" ou non) et tenu sur la glace;
- (vi) ultracentrifugation de l'homogénat ($170,000 \times g$ - 1 h - 2°C);
- (vii) acidification du surnageant à une concentration finale de 0.5% HNO_3 Aristar, et entreposage à 4°C jusqu'aux dosages;
- (viii) dosage du Cd, Ca, Cu et Zn par spectrométrie d'émission atomique au plasma.

Il est apparu nécessaire d'évaluer l'effet de certaines étapes "stressantes" pour l'intégrité du cytosol soit (i) l'effet d'une homogénéisation et d'une congélation à l'air libre, (ii) l'effet d'une décongélation de l'homogénat d'une durée de 12 h et (iii) l'effet de la pré-congélation du tissu disséqué avant son homogénéisation et sa congélation subséquente. Malheureusement, une baisse importante de la population de bivalves du lac Vaudray ne nous a pas permis d'obtenir un nombre suffisant de spécimens pour réaliser un plan d'expérience pour une ANOVA intégrant les 3 critères de classification ci-dessus; le plan d'expérience a été ramené aux critères (i) et (ii). Le lac Vaudray avait été sélectionné à cause des hautes $[\text{Cd}]_{\text{cytosol}}$ aisées à doser par ICP.

Les concentrations cytosoliques (définies opérationnellement) des branchies en Ca, en Cd, en Cu et en Zn sont vraisemblablement influencées de façon simplement additive (Ca, Cu) ou non (interaction: Cd, Zn) par les conditions de traitement de l'homogénat (voir tableaux A.4.6 à A.4.9). Le casier 11 représenterait les conditions d'extraction les plus douces pour l'intégrité du cytosol (soit une extraction sur du tissu frais homogénéisé sous atmosphère d'azote). Le casier 23 se rapprocherait le plus du genre d'extraction effectuée lors de nos travaux (soit une extraction du cytosol à partir d'un homogénat décongelé 12 h, qui a été "fabriqué" à l'air libre). Les concentrations moyennes de Cd et de Zn du casier 23 seraient vraisemblablement plus faibles que celles du casier 11 avec $[Cd]_{23} \approx 0.9 [Cd]_{11}$ et des effets particulièrement sévères pour le Zn, $[Zn]_{23} \approx 0.5 [Zn]_{11}$.

Les présents résultats suggèrent que les concentrations de Ca, Cd, Cu et Zn seraient représentatives de celles de la cellule intacte dans la mesure où la meilleure procédure d'extraction cytosolique disponible est utilisée. Les caractéristiques de cette procédure sont énumérées en introduction. On peut s'attendre à ce que les concentrations cytosoliques obtenues lors des expériences de transplantation soient entachées par les effets (i), (ii) et (iii) présentés plus haut, de façon majeure pour le zinc et probablement de façon bien moins sévère pour le Ca, le Cd et le Cu. Comme la même procédure d'extraction cytosolique a été conservée tout au long de nos expériences de transplantation, on peut qualifier le biais méthodologique de **systematique**. Seules les conclusions tirées de comparaisons **relatives** des concentrations cytosoliques en métaux des différents traitements de l'expérience de transplantation (soit T-VA, C-VA et C-OP) pourraient par conséquent être considérées comme valides.

Travaux préliminaires
avec la larve de l'éphémère *Hexagenia limbata*

A.5.1 Introduction

Dans le cadre de ce projet doctoral, une étude des populations de larves de l'éphémère *Hexagenia limbata*, concurrente à celle des populations d'*A. grandis*, était prévue au long du gradient de contamination environnemental en métaux détecté dans la région de Rouyn-Noranda (voir chapitre 2). Par suite de difficultés méthodologiques, cette partie du projet n'a pu être rendue à terme. D'intéressants résultats préliminaires ont cependant été obtenus; il convient de les présenter ici. Les hypothèses qui suivent sont tirées du rapport d'étape II, ma proposition de recherche doctorale présentée aux Drs Campbell et Tessier en mars 1988.

En postulant que les concentrations des protéines chélatrices des métaux suivent fidèlement les concentrations métalliques dans le cytosol, on s'attendrait à retrouver de fortes concentrations de ces protéines dans les tissus animaux les plus en contact avec les métaux, du moins dans les régions contaminées. Soit un organisme filtreur et un organisme se nourrissant de sédiment; alors:

$$\frac{[\text{MT}(\text{branchies})]/[\text{MT}(\text{organisme entier})]_{\text{filtreur}}}{[\text{MT}(\text{branchies})]/[\text{MT}(\text{organisme entier})]_{\text{nour:séd.}}} > 1 \quad (\text{A.5.1})$$

$$\frac{[\text{MT}(\text{tract digestif})]/[\text{MT}(\text{organisme entier})]_{\text{filtreur}}}{[\text{MT}(\text{tract digestif})]/[\text{MT}(\text{organisme entier})]_{\text{nour:séd.}}} < 1 \quad (\text{A.5.2})$$

Les taxons retenus pour éprouver ces hypothèses étaient le bivalve *A. grandis* et la larve de l'éphémère *Hexagenia limbata*. *A. grandis* est un organisme filtreur, producteur de métallothionéine; la contribution de ses branchies et de son manteau à son contenu total en Cd est plus importante que la contribution de ces organes au poids total (voir chapitre 2). La larve fouisseuse d'*H. limbata* ingère des sédiments; la contribution de son tract digestif à son contenu total en Cd est beaucoup plus importante que la contribution de cette partie du corps au poids total (Hare *et al.*, 1991a, b). L'occurrence de métallothionéine chez la larve est discutée plus loin.

A.5.2 Matériel et méthodes

Le territoire d'investigation fut le même que l'étude multi-lacustre détaillée au chapitre 2. Des 11 lacs de ladite étude, 4 seulement nous fournirent des larves de taille "décente" et en nombre suffisant pour envisager le minimum d'analyses requises pour le présent travail. Ainsi, lors de nos visites s'étendant entre le 12 et le 25 juin 1989, nous avons réuni les effectifs suivants: lac Bousquet, N = 14; lac Duprat, N = 11; lac Héva, N = 16; et le lac La Bruère, N = 20. Le lac St-Joseph, près de Québec et d'accès aisé, nous livra 26 individus le 31 octobre 1989.

La technique de récolte fut celle développée par Landis Hare. Les sédiments étaient prélevés avec une benne Ekman 9 po. × 9 po.; les larves étaient isolées par tamisage à l'aide d'un filet de maille appropriée pour être ensuite transférées délicatement dans un sac de polyéthylène empli d'eau du site et d'un peu de sédiment. Lors du retour au laboratoire de l'INRS-Eau, nous nous efforcions de garder les organismes à la température de leur milieu de provenance.

Au laboratoire, les larves étaient retirées des sédiments et disséquées immédiatement sous une loupe binoculaire (pas de période de dépuración allouée). Les branchies étaient détachées, et le tract digestif entier était extrait des restes; il ne fut vidé que partiellement. Un seul échantillon composite par site fut constitué et les échantillons (branchies, tract digestif, restes) furent gardés sous atmosphère d'azote à -40°C pour les traitements ultérieurs (qq. jours). L'homogénéisation des tissus larvaires est identique à celle décrite en section 2.3.3. Un poids suffisant d'une solution NaCl 0.9% était incorporé pour rendre cette opération aisée. La dilution résultante variait entre 11 et 41 pour les branchies, entre 13 et 51 pour les tracts digestifs et entre 3 et 6 pour les restes. Les surnageants produits par une centrifugation 30,000 × g à 4°C des homogénats furent soumis à notre méthode de dosage des MT (annexe 3) la journée même des homogénéisations. Le dosage du Cd, du Cu et du Zn n'apparut possible que pour les restes à cause des quantités obtenues d'homogénat. La procédure de dosage est identique à celle exposée en section 2.3.3.

A.5.3 Résultats

Il importe de s'attarder à la performance de notre méthode d'homogénéisation appliquée ici à de petites quantités de tissus mais adaptée à l'origine au traitement de la plus grosse espèce de bivalve *A. grandis*.

Description des homogénats et de leurs surnageants 30,000 × g

Les homogénats de branchies apparaissent gris foncé avec quelques débris chitineux en suspension. Eu égard à la grande dilution utilisée, il nous est objectivement difficile de statuer sur la qualité de ces préparations. Leurs surnageants 30,000 × g sont jaune verdâtre avec un bon culot.

Les tracts digestifs ne furent que partiellement vidés. Ainsi les homogénats, après agitation, trahissent la présence de particules minérales sédimentant rapidement au fond du contenant. Leurs surnageants 30,000 × g sont presque incolores avec un gros culot de sédiment.

Les homogénats de restes renferment une grande quantité de fragments chitineux rendant difficiles leurs pipettages. Le couteau circulaire de l'homogénéisateur électrique réussit manifestement mal à triturer l'exosquelette. Le surnageant est jaune prononcé accompagné d'un bon culot.

Quantité de tissu obtenue pour les analyses

Lobel et Payne (1987) ont pu réussir à l'aide de la méthode de saturation au ^{203}Hg à doser les métallothionéines en utilisant seulement 110 mg en poids humide de matériel par essai. En se basant sur cette valeur, nous avons besoin des nombres suivants d'individus par essai (L. Hare; comm. pers.):

Espèce	Taille du spécimen	Effectif / réplikat
	"gros"	20
<i>Hexagenia limbata</i>	(6 mg branchies p. hum.)	
(larve)	"petit"	100
	(1 mg branchies p. hum.)	

Compte tenu de l'effort considérable de récolte, nous n'avions retenu que les sites nous procurant de gros individus et nous n'avions synthétisé qu'un réplikat par site. De manière générale, les échantillons composites de plus de 110 mg p. hum. ont pu être dosés pour la métallothionéine; leurs activités en ^{203}Hg étaient significativement différentes de celle du témoin analytique (tableau A.5.1). En contrepartie, des 3 sites où nous obtenions près de 20 individus, un seul nous fournit plus de 110 mg p. hum. de branchies. Les replicata de deux de ces sites (L. Héva et St-Joseph) ont pu être dosés pour la MT. La détection de métallothionéine dans un échantillon dépend de la concentration tissulaire de la protéine, du poids du réplikat et de la dilution de celui-ci apportée par le tampon d'homogénéisation. Cette dilution était d'autant plus grande que le poids du réplikat était faible, pour permettre une homogénéisation satisfaisante (tableau A.5.1).

Concentrations de métallothionéine dans les tissus

Les concentrations de métallothionéine dans les différentes parties corporelles de la larve d'*Hexagenia limbata* sont indiquées dans le tableau A.5.2. Pour un même site, la concentration de MT varie selon le tissu considéré. Pour un même tissu, la variabilité inter-site peut être assez considérable; le ratio {valeur max./valeur min.} des [MT] (sur une base p. hum.) atteint 3.9 et 15 respectivement pour les branchies et les restes. Comme les tracts digestifs n'ont été débarrassés que partiellement de leur contenu, les concentrations résultantes des MT sont probablement très sous-estimées en raison de la surestimation du poids des replicata. En raison de données manquantes, les concentrations de MT des organismes entiers reconstitués n'ont pu être calculées. En conséquence, les hypothèses A.5.1 et A.5.2 n'ont malheureusement pas été éprouvées.

Tableau A.5.1

Poids des tissus de larves d' *H. limbata* obtenus par lac et détection de métallothionéine dans ceux-ci. La comparaison des activités moyennes de ^{203}Hg dans l'échantillon et le témoin de la méthode de dosage de la MT s'est fait à l'aide d'un test de t de comparaison de moyennes.

Lac	Effectif	Poids des branchies/ réplicat (mg)	Dilution par le tampon d'homog.	Différence blanc-éch. pour ^{203}Hg	Poids du tract digestif / réplicat	Dilution par le tampon d'homog.	Différence blanc-éch. pour ^{203}Hg	Poids des restes / réplicat (mg)	Dilution par le tampon d'homog.	Différence blanc-éch. pour ^{203}Hg
Bousquet (BO)	14	47	31	oui, P<0.01	--	--	---	852	5	oui ^a
Duprat (DP)	11	30	41	oui, P<0.05	26	51	non, P>0.05	535	6	oui ^a
Héva (HE)	16	42	32	oui, P<0.05	50	30	non, P>0.05	811	5	oui ^a
La Bruère (BR)	20	44	29	non, P>0.05	60	25	oui, P<0.001	840	5	oui ^a
St-Joseph (STJ)	26	160	12	oui, P<0.01	149	13	oui, P<0.01	1,866	3	oui ^a

^a Les ratios {activité ^{203}Hg éch. / activité ^{203}Hg témoin anal.} sont respectivement 9 (BO), 7 (DP), 4 (HE), 21 (BR) et 3(STJ).

Tableau A.5.2

Concentrations de métallothionéine (nmol sites de liaison de métal g^{-1} de tissu p. hum.) dans différentes parties corporelles de la larve de l'éphémère *Hexagenia limbata* dans les lacs à l'étude.

Lac	[MT] dans la larve d' <i>H. limbata</i>		
	Branchies	Tract digestif ^c	Restes
Bousquet	5.5	--	13.1
Duprat	9.3	--	11.5
Héva	8.6	--	4.6
La Bruère	--	9.4	32.2
St-Joseph	2.4	4.1	2.1

^c Le tract digestif n'a pas été vidé de son contenu.

Tableau A.5.3

Concentrations de métallothionéine (nmol sites de liaison de métal g^{-1} p. sec) et de Cd, de Cu et de Zn dans les restes ($\mu g g^{-1}$ p. sec) de la larve de l'éphémère *Hexagenia limbata* dans les lacs à l'étude..

Lac	Concentrations dans les restes larvaires			
	MT	Cd	Cu	Zn
Bousquet	56	3.0	115	172
Duprat	55	2.1	71	174
Héva	21	1.3	46	121
La Bruère	157	15.1	66	159
St-Joseph	24	0.4	33	110

Concentrations de métallothionéine et de métaux dans les restes

Les [MT (restes)] sur une base de poids sec varient d'un facteur 6.5 pour l'ensemble des lacs de l'étude (tableau A.5.3), en contraste avec l'observation précédente sur une base de poids humide. Les ratios {valeur max./valeur min.} des [Cd], [Cu] et [Zn] des restes s'élèvent respectivement à 42, 3.5 et 1.6. Les corrélations r de Pearson entre la métallothionéine d'une part, et le Cd, le Cu ou le Zn d'autre part sont respectivement de 0.98 ($P < 0.01$), 0.25 ($P > 0.05$) et 0.50 ($P > 0.05$).

A.5.4 Discussion et Conclusion

Homogénéisation tissulaire

L'homogénéisation de faibles quantités de branchies et de tracts digestifs à l'aide d'un broyeur tel que celui utilisé dans ces travaux a pu résulter en:

- une grande hausse de température des préparations rendant la MT très susceptible à la dégradation par les protéases, même si nous utilisons un bain de glace pendant cette opération;
- une piètre trituration des pièces chitineuses, celles-ci se faufilant facilement entre les surfaces de cisaillement du couteau circulaire;
- une détermination moins fiable voire impossible des [MT] à cause de leurs dilutions par de gros volumes de solution d'homogénéisation requis pour réaliser cette étape.

Heureusement, des mesures palliatives sont envisageables.

- (i) On cherche à obtenir une masse suffisante de branchies ou de tract digestif de la larve benthique pour réaliser le dosage de la MT, c.-à.-d. au moins 110 mg réplikat⁻¹. Nos résultats nous indiquent qu'une telle masse peut nécessiter la récolte de 100 spécimens ou plus par site, un effort de capture très considérable.
- (ii) Le recours à une homogénéisation verre sur verre est probablement le meilleur moyen d'éviter le réchauffement de petites préparations, d'obtenir une meilleure qualité d'homogénéat et d'éviter des dilutions outrancières, car il existe des homogénéisateurs de verre de plusieurs tailles. Le bain de glace reste obligatoire durant l'opération.
- (iii) La sensibilité de la méthode de dosage des métallothionéines par saturation par le ²⁰³Hg peut être considérablement accrue (nous faisons référence ici au rapport signal/bruit de fond cosmique ~ 80 cpm) en utilisant simplement une activité spécifique plus forte. Dans les présents essais, l'activité spécifique tournait autour de 19,000 cpm µg⁻¹ Hg "froid" et, d'expérience, elle peut être augmentée jusqu'à 500,000 cpm µg⁻¹ Hg "froid".

- (iv) Il reste possible d'adapter une méthode très sensible au dosage de la MT de la larve d'*H. limbata*, soit: ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay") ou RIA ("radio-immuno assay").
- (v) Enfin, il apparaît impératif que les tracts digestifs soient vidés de leur contenu si l'on veut mesurer la MT dans ceux-ci (voir résultats).

Occurrence de métallothionéine chez la larve d'H. limbata

Au début de nos travaux avec la larve de l'éphémère *Hexagenia limbata*, nous ne savions pas si cet animal produisait de la métallothionéine. Un examen de la documentation scientifique jusqu'à ce jour ne fait état d'aucune étude à ce sujet. Suzuki *et al.* (1989) ont détecté la présence d'une protéine liant le Cd et le Zn chez la larve de l'éphémère *Baetis thermicus*. En dépit de la rareté de l'information requise, nous avons soumis des surnageants $30,000 \times g$ d'homogénats de branchies, de tract digestif et de restes de larves d'*H. limbata* à notre méthode de dosage des MT par saturation par le ^{203}Hg . Le mercure retenu dans les préparations en fin d'essai peut nous renseigner sur l'identité du composé responsable de cette complexation. Il est permis de supposer que ce composé est stable en condition acide, que la $K_{\text{composé-Hg}} > K_{\text{Hb-Hg}}$ et que ce composé n'est ni de la glutathione, ni de la cystéine. En effet, la glutathione et la cystéine ne résistent vraisemblablement pas à la décomplexation du Hg par l'hémoglobine dans notre méthode de dosage (*cf.*: expérience A.4.1.1). En l'absence d'autres indices, nous appellerons tentativement ce composé métallothionéine. Cependant, l'identification hors de tout doute de la protéine passe par sa caractérisation en acides aminés et par la détermination de sa séquence en acides aminés.

Relation entre les concentrations tissulaires de métallothionéine et de métaux

Un des résultats fort intéressants obtenus de ces travaux est la relation hautement significative ($r = 0.98$; $P < 0.01$), même avec un faible effectif, entre la [MT (restes)] et la [Cd (restes)], le Cu et le Zn étant de piètres prédicteurs de [MT] chez la larve d'*H. limbata*. Le tout concorde avec d'autres études traitant également des relations entre la métallothionéine et les métaux intratissulaires: en laboratoire, Jones *et al.* (1988: mammifères), Roesijadi *et al.* (1988: bivalve marin), Maroni et Watson (1985: diptère); en milieu naturel, Couillard *et al.* (1993: bivalve d'eau douce; étude présentée au

chapitre 2), et Elliott *et al.* (1992: oiseaux marins). Des éléments d'explication à ce phénomène sont discutés dans Couillard *et al.* (1993) et au chapitre 2.

Une intéressante comparaison peut être réalisée entre les [MT (restes)] de la larve d'*H. limbata* et du bivalve *A. grandis* [restes = org. - (branchies + glande digestive)] (voir tableau A.5.4) pour le même ensemble de lacs. Si on classe par ordre décroissant ces valeurs (p. sec), on obtient:

$$[\text{MT}] \text{ } H. \text{ limbata} : \text{BR} > \text{BO} \approx \text{DP} > \text{STJ} \geq \text{HE}$$

$$[\text{MT}] \text{ } A. \text{ grandis} : \text{BO} \geq \text{HE} > \text{STJ} > \text{BR} \approx \text{DP}$$

De même, on peut comparer, pour les mêmes lacs, les concentrations de Cd dans les restes de la larve et du bivalve, et les concentrations de Cd dans les branchies et le tract digestif de larves d'*H. limbata* prélevées par L. Hare lors d'autres occasions (1988, 1989, 1990, données inédites; voir tableau A.5.4). Si on classe par ordre décroissant ces valeurs (p. sec), on a :

$$H. \text{ limbata, restes:} \quad \text{BR} \gg \text{BO} > \text{DP} > \text{HE} > \text{STJ}$$

$$H. \text{ limbata, t.d.:} \quad \text{BR} \gg \text{BO} > \text{DP} > \text{HE} > \text{STJ}$$

$$H. \text{ limbata, branchies:} \quad \text{BR} > \text{BO} > \text{HE} > \text{DP} \approx \text{STJ}$$

$$A. \text{ grandis, restes:} \quad \text{BO} > \text{STJ} \geq \text{HE} > \text{BR} > \text{DP}$$

La similitude des classements des données de notre étude et de celles de Hare suggère la relative constance inter-annuelle de la contamination, par le Cd, des populations des larves d'*H. limbata* dans ces lacs. Les fluctuations annuelles des concentrations de Cd chez cette espèce peuvent être pourtant considérables pour un même lac (Hare et Campbell, 1992).

La dissemblance des classements de données pour la MT et le Cd de la larve d'*H. limbata* et du bivalve *A. grandis* est énigmatique. L'ion Cd^{2+} dissous est apparu, parmi un ensemble de variables abiotiques, comme la meilleure variable prédictrice des concentrations de Cd

Tableau A.5.4

Concentrations de métallothionéine (nmol sites de liaison de métal g^{-1} p. sec) dans les restes de la larve d'*H. limbata* et du bivalve *A. grandis*, concentrations de Cd ($\mu g g^{-1}$ p. sec) dans les branchies, le tract digestif et les restes de la larve benthique, et concentrations de Cd ($\mu g g^{-1}$ p. sec) dans les restes d'*A. grandis*, pour les lacs à l'étude.

Lac	[MT(restes)]		[Cd] dans <i>H. limbata</i>			[Cd] <i>A.g</i>
	<i>H. limbata</i> ^a	<i>A. grandis</i> ^b	branchies ^c	tract dig. ^c	restes ^a	restes ^b
Bousquet (BO)	56	365	2.8	75	3.0	69
Duprat (DP)	55	253	0.4	1989-7.5 1990-45	2.1	10
Héva (HE)	21	359	0.8	8.5	1.3	47
La Bruère (BR)	157	259	5.5	360	15.1	27
St-Joseph (STJ)	24	319 ^e	0.3 ^d	3.8 ^d	0.4	52 ^e

Sources:

^a Cette étude; N=1.

^b Couillard *et al.*, (1993); concentrations moyennes: N=4. Les restes = org.- (branchies + glande digestive).

^c Hare, données inédites produites en 1988, 1989 et 1990; concentrations moyennes: N variables.

^d Hare et Campbell, (1992); concentrations moyennes estivales seulement: N variables.

^e Couillard *et al.*, données inédites; concentrations moyennes: N=4.

($r = 0.93$; $P < 0.001$; Tessier *et al.*, 1993) et de MT ($r = 0.72$; $P < 0.05$; Couillard *et al.*, 1993) dans les restes de populations d'*A. grandis* en milieu naturel. Hare (résultats inédits) a constaté que le rapport $[Cd^{2+}]_d/[H^+]_d$, plutôt que la $[Cd^{2+}]_d$ seule, s'avérait un meilleur prédicteur des [Cd (branchies)] ($r = 0.71$, $P < 0.001$) et des [Cd (tract digestif)] ($r = 0.59$, $P < 0.01$) de populations naturelles de larves de l'éphémère *H. limbata*. Ainsi, si l'on classe par ordre décroissant les valeurs de $[Cd^{2+}]_d$ et du rapport $[Cd^{2+}]_d/[H^+]_d$ pour nos lacs à l'étude, on a:

$$[Cd^{2+}]_d: \quad HE > BO > BR > DP$$

$$[Cd^{2+}]_d/[H^+]_d: \quad BR > BO > HE > DP$$

Malgré la nature fragmentaire des résultats de Hare, ceci suggère par exemple que les animaux du lac Héva, malgré une haute contamination ambiante en Cd^{2+} , en seraient possiblement protégés par

un antagonisme $\text{Cd}^{2+} - \text{H}^+$ à l'interface biologique (branchies, tégument). La réciproque est suggérée pour le lac La Bruère (Hare: comm. pers.).

En conclusion, à l'instar du bivalve d'eau douce *Anodonta grandis* (voir Tessier *et al.*, 1993 et Couillard *et al.*, 1993), les éléments nécessaires existent pour tester les différents jalons d'un modèle *in situ* tenant compte de la spéciation du Cd en solution et de ses effets dans la larve de l'éphémère *Hexagenia limbata*:

- (a) les concentrations de Cd et de ligands en solution (ou de sites de sorption dans les sédiments oxydés) déterminent l'activité de l'ion libre Cd^{2+} dissous;
- (b) les activités des ions Cd^{2+} et H^+ dissous déterminent la prise en charge du Cd par l'organisme;
- (c) la prise en charge du Cd détermine les réponses biologiques (détoxification par synthèse de MT et effets adverses);
- (d) la biosynthèse de métallothionéine exerce à son tour une rétroaction sur la toxicité et la prise en charge du Cd.

L'identification hors de tout doute de la substance séquestrant le ^{203}Hg dans les cytosols larvaires est évidemment le premier travail à accomplir avant de s'attaquer au modèle ci-dessus et de tester les hypothèses A.5.1 et A.5.2.

**Relation entre le cuivre dans le bivalve *Anodonta grandis*
et le cuivre dissous dans les lacs de la région de Rouyn-Noranda.**

A.6.1 Introduction

Les résultats ci-après discutés sont issus de l'étude inter-lacustre présentée au chapitre 2 que nous avons intitulé: "Réponse des concentrations de métallothionéine chez le bivalve *Anodonta grandis* à un gradient environnemental de cadmium". A cette occasion, il n'existait vraisemblablement pas de relations entre les [MT] d'une part, et les [Cu] internes et dans l'environnement externe de l'animal d'autre part (comparer les valeurs des tableaux 2.1, 2.2 et 2.3; voir figure 2.3). Ceci nous apparut en concordance avec le faible potentiel du Cu d'induire la biosynthèse de MT noté par plusieurs (chapitre 2). Par ailleurs, pour expliquer cette absence de relation dose-réponse, on ne peut évoquer un fort contrôle homéostatique du Cu tissulaire dans *A. grandis* comme cela semble être le cas pour le Zn. Rappelons que les rapports {valeur max./ valeur min.} des concentrations moyennes de cuivre dans les branchies, la glande digestive, le corps et l'organisme entier atteignent respectivement 8.7, 3.1, 3.0 et 5.5 pour les populations d'*A. grandis* des 11 lacs de la région minière de Rouyn-Noranda (tableau 2.3). De fait, on dénote de fortes corrélations entre les concentrations internes de Cu et les concentrations de Cu dissous (figure A.6.1, tableau A.6.2). Nous nous penchons ici sur ces relations dans un effort pour comprendre l'accumulation du Cu chez le bivalve *A. grandis*.

A.6.2 Les aérosols émis par les usines d'extraction de cuivre

Les fortes corrélations indiquées ci-dessus sont quelque peu surprenantes. D'une part, les concentrations tissulaires de métaux dans le bivalve *A. grandis* sont intégratrices de changements à long terme des niveaux ambiants de contaminants ($t_{1/2}$ pour Cu: 0.4 année; Tessier *et al.*, 1987). D'autre part, les concentrations de métaux dissous montrent habituellement une variabilité temporelle appréciable (ex. avec Cd: Yan *et al.*, 1990). Cependant, pour le présent ensemble de données, nous pouvons avancer certains éléments d'explication.

Il est possible de détecter l'influence du Cu aéroporté de la raffinerie de Rouyn-Noranda sur les concentrations de Cu dissous dans les lacs de la région. Des études portant sur les aérosols de cuivre générés par des fonderies dans le Missouri et par les raffineries de cuivre-nickel de Sudbury (rapportées dans Nriagu, 1979) montrent que $\approx 67\%$ des particules cuivriques sont de

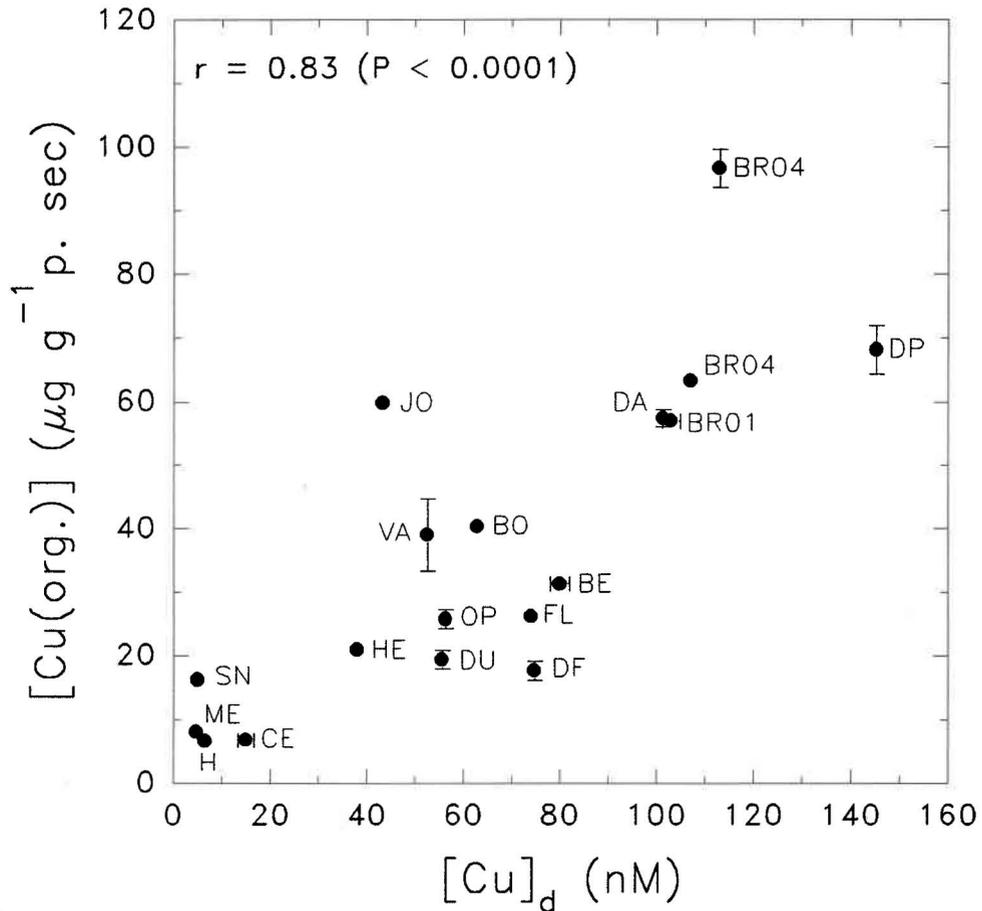


Figure A.6.1: Diagramme de dispersion des concentrations de Cu dans des spécimens entiers d'*A. grandis* en fonction des concentrations de Cu dissous dans des lacs de la région de Rouyn-Noranda (12), de l'Estrie (2) et de la région de Muskoka, Ont. (2) $[\bar{X} \pm S_{\bar{x}}]$. La correspondance entre les codes et les lacs est indiquée au tableau A.6.2.

Tableau A.6.1

Répartition en taille des aérosols de cuivre émis d'une fonderie au Missouri (adapté de Nriagu, 1979).

Diamètre de la particule (μm)	Pourcentage à 800 m de fonderie	Pourcentage à 75 km de fonderie
> 11	22	8.4
7-11	9.3	38
4.7-11	15	9.5
3.3-4.7	13	7.4
2.1-3.3	7.7	6.3
1.1-2.1	8.2	11.6
0.65-1.1	4.1	9.5
0.43-0.65	21	13
Σ	100	100

taille supérieure à 2.1 μm , et que celles-ci ont une propension à retomber relativement rapidement après leur émission à la cheminée (voir tableau A.6.1). Par contraste, 78% du cadmium dans les aérosols à 800 m de telles fonderies est associé à des particules de diamètre < 2 μm , ces dernières retombant relativement lentement (voir Nriagu, 1980).

De ces observations et de la connaissance de la direction des vents dominants dans la région de Rouyn-Noranda (extrapolation à partir de données atmosphériques à Val d'Or: BEST, 1978), on peut déduire que toutes les eaux situées dans le demi-cercle sud, est, nord-nord-ouest ayant la raffinerie de cuivre de Rouyn-Noranda en son centre seront d'autant plus affectées par la pollution aéroportée qu'elles sont près du centre. Les lacs situés à l'ouest et au sud-ouest seront bien moins touchés. Nous observons de fait des relations positives assez étroites entre d'une part l'intensité des retombées atmosphériques (estimée par la position des plans d'eau), et d'autre part les concentrations de Cu dissous et de Cu interne dans *A. grandis* (tableau A.6.2). Par ailleurs, les lacs ne semblent pas afficher de dépendance envers leur proximité de la source d'émission quant à leur concentration en Cd dissous. En regard de ces résultats, nous suggérons qu'en présence d'une source d'aérosols continue dans le temps (raffinerie de cuivre), il s'est établi un état stationnaire entre les [Cu] atmosphérique et les [Cu] dissous et particulaire dans les plans d'eau de la région de Rouyn-Noranda.

Tableau A.6.2

Position des lacs à l'étude par rapport à la raffinerie de cuivre de Rouyn-Noranda, leur concentration en Cd et en Cu dissous, les concentrations internes moyennes de Cu (N=4) dans le bivalve *A. grandis* et les corrélations (r de Pearson) entre [Cu]_d et [Cu(*A. grandis*)]; (****, P<0.0001).

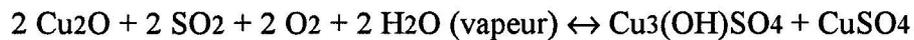
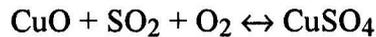
Lac et code	Par rapp. à raffinerie		[Cd] _d (nM)	[Cu] _d (nM)	[Cu] internes (µg g ⁻¹ p. sec)			organisme entier
	distance (km)	position (N. magn.)			branchies	glande digestive	restes	
Harp, H ^a	≈ 320	S (Muskoka)	< 0.9	6.5	11	18	4	7
Brompton, CE ^a	> 600	SE (Estrie)	< 1	15	15	16	3	7
St-Nora, SN ^a	≈ 340	S (Muskoka)	< 0.9	5.0	16	58	9	16
Memphréma- gog, ME ^a	> 600	SE (Estrie)	< 0.9	4.7	17	17	6	8
Dufay, DU	39	W	2.1	56	45	21	10	19
Héva, HE	52	ESE	2.2	38	52	24	8	21
Opasatica, OP	26	WSW	0.8	56	54	24	15	26
Dufresnoy, DF	16	NNE	1.0	75	55	21	8	18
Flavrian, FL	16	NW	2.7	74	68	30	17	26
Bousquet, BO	34	ESE	2.8	63	94	28	16	40
Beauchastel, BE ^a	12	WSW	1.2	80	161	21	12	31
Vaudray, VA	29	SE	1.2	53	161.5	23	9	39
Joannès, JO ^a	26	ESE	0.9	43	216	31	14	60
D'Alembert, DA	15.5	N	2.1	101	225	37	19	57
La Bruère BR-01 ^a	13	S	1.1	103	290	27	16	57
BR-04			0.8	113	341	40	25	97
BR-04 ^a			< 1	107	400	35	18	63
Duprat, DP	11	N	1.2	145	393	63	19	68
Corrélations avec [Cu] _d					0.85 ****	0.45	0.83 ****	0.80 ****

^a Données tirées de Tessier *et al.* (1987). Les [M]_d sont des moyennes de 10 cellules de dialyseurs comprises entre 0 et 5 cm au-dessus du sédiment. Les [Cu] dans *A. grandis* sont basées sur un échantillon composite de 10 spécimens.

Ces concentrations sont d'autant plus élevées que les lacs sont à "proximité" de la fonderie, à cause du comportement des aérosols de cuivre.

A.6.3 Biodisponibilité du Cu dissous pour le bivalve filtreur *A. grandis*

Les relations mentionnées ci-haut nous amènent intuitivement à penser qu'une grande partie du cuivre dissous des lacs aux environs de Rouyn-Noranda pourrait être biodisponible aux mollusques. Nriagu (1979) rapporte notamment que les formes chimiques prédominantes de cuivre dans les aérosols de fonderies englobent entre autres les sels solubles d'acides forts synthétisés dans les panaches de fumée. En présence d'oxygène, les réactions suivantes se produiraient:



Comme la raffinerie de Cu de Rouyn-Noranda est considérée une source majeure de SO_2 au Québec (BEST, 1978), il est probable qu'une bonne partie des retombées de cuivre représentera pour les lacs de la région un apport considérable en sel soluble CuSO_4 , une source potentielle de Cu biodisponible. A partir des données produites par Tessier *et al.* (1987), nous constatons à l'instar du bivalve *A. grandis*, qu'il existe une forte corrélation entre les $[\text{Cu}]_d$ et les $[\text{Cu}(\text{org.})]$ pour le bivalve filtreur *Elliptio complanata* ($r=0.91$, $P<0.0001$; figure A.6.2). Quatre des sites influençant le plus la relation sont situés dans la région de Rouyn-Noranda; ils subiraient donc les apports riches en sels solubles de Cu mis en relief ici.

Plusieurs arguments ont été avancés au chapitre 2 pour appuyer l'idée que la voie principale d'accumulation du Cd chez le bivalve *A. grandis* est le vecteur eau. Ces arguments peuvent être de nouveau retenus dans le cas de l'accumulation du Cu par *A. grandis* (ou par le filtreur *E. complanata*). Dans une telle situation, conformément au modèle de l'ion libre (Morel et Hering, 1993) on peut, en guise d'hypothèse, poser l'équation:

$$[\text{Cu} (A. grandis)] \propto [\text{Cu}^{2+}]_{\text{eau}} \quad (\text{A.6.1})$$

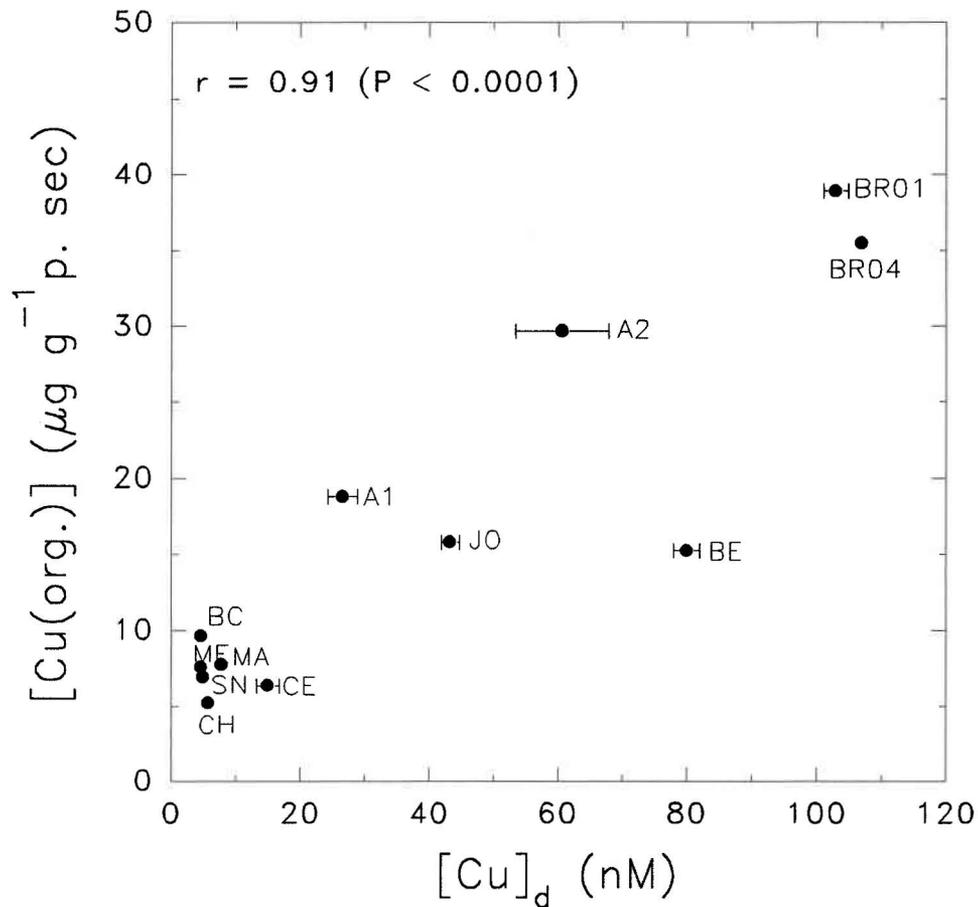
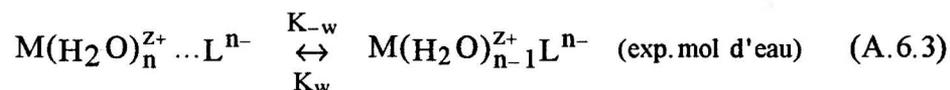
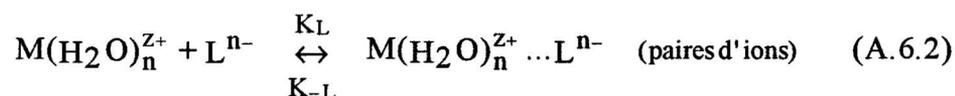


Figure A.6.2: Diagramme de dispersion des concentrations de Cu dans des spécimens entiers d'*E. complanata* en fonction des concentrations de Cu dissous dans des lacs de la région de Rouyn-Noranda (3), de l'Estrie (4) et de la région de Muskoka, Ont. (3) $[\bar{X} \pm S_{\bar{x}}]$. La correspondance entre les codes et les lacs est indiquée au tableau A.6.2; de plus: A1 et A2, lac Aylmer, Estrie; MA, lac Massawipi, Estrie; BC, lac Blue Chalk, Muskoka; CH, lac Chub, Muskoka. Source: Tessier *et al.* (1987).

Pour statuer sur cette équation, la spéciation chimique du cuivre en solution dans les plans d'eau étudiés devrait être déterminée. Cet exercice est cependant difficile, surtout à cause de l'absence de constantes thermodynamiques pour décrire la complexation du Cu avec la matière organique dissoute (Perdue, 1988).

Par ailleurs, selon les idées récentes de Morel sur le MIL, il conviendrait de considérer le contrôle cinétique de la réaction de l'ion M^{Z+} avec un ligand à la surface d'une membrane biologique, L (Morel et Hering, 1993; Morel *et al.*, 1991). Cette complexation est théoriquement envisageable en 2 étapes:



Il apparaît que la vitesse d'échange des molécules d'eau d'hydratation (K_{-w} : désolvatation) serait le principal facteur limitant pour cette réaction. Morel *et al.* (1991) indiquent que la complexation d'ions avec des ligands inorganiques pourrait accroître le taux de dissociation (K_{-w}) de l'eau d'hydratation en décroissant la charge nette sur l'ion métallique. Par exemple, une cellule algale marine "préfererait" les espèces "réactives" $Fe(OH)_2^+$ et $Fe(OH)_4^-$ plutôt que l'espèce Fe^{3+} comme source d'ions Fe^{3+} . En laboratoire, l'ion Fe^{3+} présente une constante K_w "lente" de $3.3 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$, tandis que l'ion Cu^{2+} a une constante K_w "très rapide" de $\geq 9 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$. Le contrôle cinétique qu'évoquent Morel et ses collègues pour l'ion Fe^{3+} est probablement beaucoup moins critique dans la réaction de l'espèce réactive Cu^{2+} avec L.

La compétition entre les ions H^+ et Cu^{2+} , observée en laboratoire avec des poissons, pour les sites de prise en charge membranaires pourrait ne pas être détectable avec le présent ensemble de données à cause de la faible gamme de $[H^+]$.

NOTRE ÉTUDE ET LA THÉORIE DU CONTRÔLE DE LA POLLUTION

A.7 Notre étude et la théorie du contrôle de la pollution

Nous abordons dans ce chapitre deux aspects quelques peu philosophiques, mais complémentaires au sujet de cette thèse, qu'il paraît maintenant approprié de discuter. La première question concerne l'entreprise Minéraux Noranda Inc. La fonderie de cuivre de Rouyn-Noranda lui appartenant a pollué impunément pendant des décennies l'eau, l'air, les lacs et forêts autour de cette ville. Dans les années 1970, cette usine s'avérait la seconde source en importance en Amérique du Nord pour les émissions d'anhydride sulfureux (BEST, 1978). En dépit de ces torts, nous tenterons de montrer que, compte tenu du cadre économique et politico-technique dans lequel le contrôle de la pollution est conçu et exercé, la firme Minéraux Noranda s'est fort bien comportée depuis 25 ans, en cherchant à minimiser ses émissions polluantes. Pour ce faire, il nous faut aborder la théorie du contrôle de la pollution, son application dans le secteur minier et il nous faut analyser les caractéristiques de la firme Minéraux Noranda Inc. et de son usine lesquelles découlent d'impératifs économiques et environnementaux. Nous parlerons ensuite du rôle actif que peut jouer l'écotoxicologie dans le contrôle de la pollution.

A.7.1 Éléments de la théorie du contrôle de la pollution

Nous ne traiterons que des principaux éléments permettant au lecteur d'avoir une compréhension suffisante de cette théorie du contrôle de la pollution. Ces informations sont tirées du cours d'Administration publique de l'eau dirigé par le professeur J. L. Sasseville.

Dans notre système économique, l'investisseur, le producteur (ex.: l'exploitant minier) et le consommateur tentent de maximiser leurs utilités (intérêts, satisfactions et bénéfices) en minimisant les coûts consentis à ces activités. Dans la recherche d'une organisation socio-économique optimale, l'accroissement du bien-être d'un segment de la population ne doit pas se faire au détriment du bien-être d'un autre segment. A ce point d'équilibre, **l'optimum de Pareto**, l'organisation socio-économique est dite efficace. Pour que cet équilibre soit approché en pratique, tous les coûts et bénéfices doivent être pris en compte dans les diverses transactions. En l'absence de droits de propriété pour l'eau et l'air, et plus généralement pour les biens d'environnement, les usages qui en sont faits par les producteurs et les consommateurs ne sont pas traduits complètement en coûts parce

que personne ne réclame de dédommagements auprès de ces derniers. On nomme ce phénomène une **externalité** (négative) de marché, c.-à-d. un coût n'étant pas internalisé dans les coûts de production et les prix à la consommation. A titre d'exemple, le fumeur tire un avantage de fumer pour lui, mais crée un dommage (de manière intentionnelle ou non) aux autres qui l'entourent. Ce dommage représente une externalité qui n'est pas prise en compte dans son analyse coût-bénéfice de fumer.

Le **coût social** d'une production ou d'une activité se définit comme le coût à la société correspondant à l'ensemble des coûts des divers facteurs de production (capital, travail, ressources: **coûts privés**) + les externalités (c.-à-d. le coût de l'usage d'une ressource collective). Le contrôle de la pollution passe par l'établissement d'une **vérité** sur le coût de restauration des dommages causés aux ressources d'environnement au cours de leur exploitation (c.-à-d. le coût d'externalité). La théorie économique établit qu'on atteint un optimum de bien-être socio-économique à l'égalité des coûts sociaux et des coûts privés des productions.

L'internalisation des coûts sociaux par le producteur-pollueur, suivant le principe du pollueur-payeur, ne se traduit pas nécessairement par une hausse de la qualité de vie sans coûts pour le citoyen. Cette prise en compte se répercute sur le citoyen par une diminution globale de sa capacité de consommation de biens et services (ceux-ci augmentent de prix et une proportion des revenus du consommateur est affectée au contrôle de la pollution) et par une transformation de la structure de l'offre de prix sur le marché. Ces groupes d'individus intéressés à produire et à consommer un bien public (le bien d'environnement) verraient un avantage à s'entendre pour partager les coûts de production et pour recevoir une quantité optimale du bénéfice de ce bien collectif. Rappelons que pour le citoyen ordinaire, le bénéfice du contrôle de la pollution réside en la réduction du risque pour celui-ci d'un environnement pollué et en la valeur esthétique et psychologique d'un environnement amélioré. Il est dans le rôle de l'Etat d'arbitrer (présument de façon impartiale) les négociations entre ces divers groupes d'individus (les pollueurs et les pollués). Les ententes qui en résultent, ou **arrangements institutionnels**, mèneront à l'utilisation de divers instruments de contrôle de la pollution: contrôles directs et normes; investissements publics; subventions; redevances et taxes; permis de pollution.

A.7.1.1 Contexte du contrôle de la pollution dans le secteur minier

L'application de normes environnementales à l'industrie minière s'avère une tâche particulièrement délicate. Le degré de sévérité de ces normes et la rigueur de leur application pourraient porter atteinte à la productivité⁹ et la compétitivité internationale de l'industrie. En effet, l'exploitant minier oeuvre dans un environnement de marché (mondial) de plus en plus compétitif et sur lequel il n'a que peu de contrôle. Dans ce contexte, l'agence de contrôle environnementale et l'exploitant économique verront un avantage à arriver à une entente "négociée" sur l'application de ces normes.

Lors des rapports conciliatoires (= **approche conciliatoire**), les individus incarnant l'action de l'agence de contrôle et de l'exploitant minier agiront dans le sens de la maximisation de leurs intérêts propres, sous l'influence d'objectifs organisationnels et de contraintes issues de leur environnement d'action. La production optimale d'une qualité d'environnement, Q , correspondra au risque minimal encouru par chacun des intervenants (fig. A.7.1). Pour l'industrie, ce risque sera de nature économique, perçu comme augmentant avec la sévérité des contrôles. Pour l'agence de contrôle, le risque sera de nature politique et institutionnelle. Celle-ci devrait être sensible au contexte de l'exploitant et devrait s'assurer de la faisabilité économique de son programme. Autrement, elle s'expose à une perte de crédibilité auprès des autres ministères, des autres exploitations et compromet sa survie institutionnelle auprès de l'appareil d'Etat. Pour atténuer le risque politique¹⁰ de ses décisions, l'agence devrait également être sensible aux citoyens et aux groupes environnementaux et démontrer (du moins le laisser croire) qu'elle est en mesure d'améliorer la qualité de l'environnement et de restaurer les usages. La position de l'agence quant à la production du bien d'environnement se voudrait ainsi mitoyenne entre celles des groupes pro-environnementaux et des exploitants. La figure 4.1 présente une zone de tolérance " Q_{\min} - Q_{\max} ", correspondant à une zone d'incertitude sur la nature véritable du risque encouru. On peut s'attendre à ce qu'il y ait rupture des relations conciliantes à l'extérieur de cette zone.

⁹ Il est fait référence ici à la productivité totale des facteurs, qui se définit, notamment pour une entreprise donnée: valeur totale de la production/coûts de production totaux. L'application de normes environnementales entraîne habituellement une réduction de cette productivité puisqu'elle fait hausser les coûts de production sans effet positif sur le "output" total.

¹⁰ Le risque politique est lié aux enjeux de pouvoir. Il y a risque politique, dans la mesure où la population est bien informée; le risque pour la santé environnementale est inclus dans le premier.

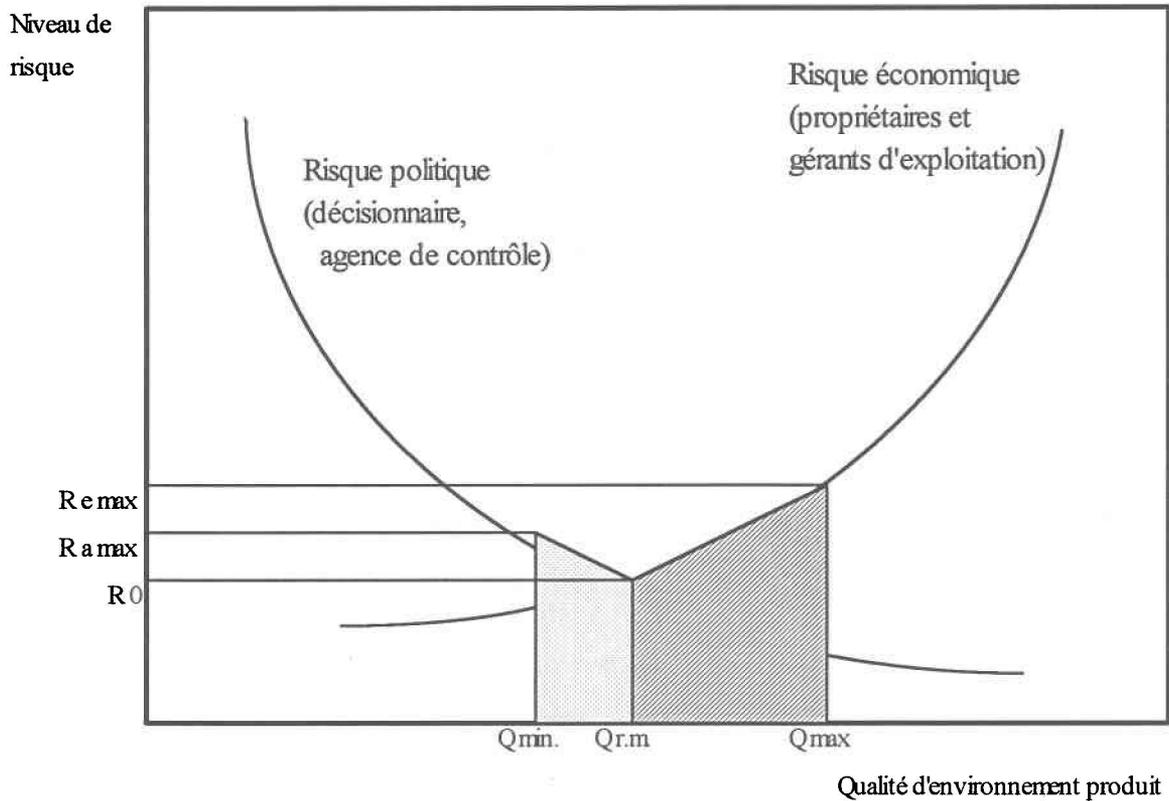


Figure A.7.1: Niveau de risque perçu par les décideurs de l'agence de contrôle et par les propriétaires et gérants d'exploitation en regard du niveau de production de la qualité d'environnement, faisant l'hypothèse de l'application du principe du "pollueur-payeur".

$Q_{r.m}$ correspond à la production d'une qualité d'environnement minimisatrice des risques (R_0) pour les intervenants. Il existe une zone de tolérance " Q_{min} - Q_{max} " qui correspond à une zone d'incertitude sur la nature véritable du risque encouru. $R_{a\ max}$, le risque maximum tolérable pour l'agence, est associé à Q_{min} ; de même, $R_{e\ max}$, le risque maximum tolérable pour l'exploitant, est associé à Q_{max} .

On accorde à l'approche conciliatoire qu'elle maximise l'efficacité socio-économique dans le sens de l'optimum de Pareto. Des rapports conciliatoires ont été maintenus entre l'équipe d'intervention du Plan d'Action Saint-Laurent (PASL) et les 50 établissements industriels, jugés prioritaires le long du fleuve, dans leurs efforts consentis pour réduire leurs rejets toxiques liquides (Le Fleuve, vol. 4, mars 1993). Une telle approche a dû être suivie par le Ministère de l'Environnement du Québec dans ses négociations avec les dirigeants de Minéraux Noranda Inc. pour réduire les émanations de SO₂ de la fonderie Horne (des subventions furent accordées par le gouvernement; Dupont, 1992). La rupture de relations conciliantes est probablement à l'origine des poursuites légales intentées par le gouvernement Canadien contre Tioxide Canada et de la fermeture de l'usine de pigments de titane dans la région de Sorel-Tracy (The Gazette, mardi le 2 février 1993, pp.A1-A2).

A.7.1.2 Le marché minier mondial

Dans l'industrie minière, il existerait six catégories de facteurs pouvant porter atteinte à la productivité industrielle (telle que définie précédemment) sur le continent nord-américain (Newcomb, 1987):

- la diminution des gisements de haute teneur,
- l'augmentation du coût de la main-d'oeuvre et des autres facteurs de production,
- la désuétude des équipements de raffinage,
- une réglementation gouvernementale préjudiciable relative à la sûreté dans les mines et à l'environnement,
- la mauvaise gestion gouvernementale des gisements et des territoires minéralisés,
- les taxes élevées.

Le secteur du cuivre apparaît particulièrement dans une situation précaire.

(i) Les gisements nord-américains renferment en moyenne 0.7% de Cu. Par comparaison, les teneurs moyennes en Cu des gisements au Chili, en Australie, en Zambie et au Zaïre s'élèvent respectivement à 1.1%, 2.6%, 3% et 3.9% (Newcomb, 1987).

(ii) Les changements technologiques ont conduit à une substitution du cuivre par d'autres matériaux dans les industries traditionnellement partenaires: l'aluminium tend à remplacer le Cu dans les réseaux de transmission et de distribution d'électricité; les circuits électroniques adoptent de plus en plus le silicium et la fibre optique; les radiateurs d'automobiles sont maintenant fabriqués en Al (Newcomb, 1987).

(iii) Une des préoccupations majeures de l'industrie minière s'avère la transition sociale, généralisée dans les économies occidentales, s'accomplissant dans les façons de gérer l'environnement (Matthews *et al.*, 1987). Jusqu'au milieu de notre siècle, les écosystèmes étaient gérés selon une économie de front pionnier (ressources considérées inépuisables, peu d'égard à l'environnement). Le balancier a poursuivi sa course jusqu'à nos jours, présumément vers un écologisme sélectif (respect de l'environnement, viabilité économique faible des efforts de conservation; Gouvernement du Canada, 1991).

(iv) En 1975, la consommation mondiale de cuivre s'élevait à 8×10^6 t an⁻¹. Newcomb (1987) a estimé la demande du métal en l'an 2000 à 14.8×10^6 t an⁻¹. La majeure partie de cette demande proviendrait des nouveaux marchés se développant dans les pays en voie d'industrialisation (Newcomb, 1987). En regard d'un marché nord-américain en stagnation, les exploitants miniers seraient tentés par les investissements outre-mer. Les facteurs d'attraction seraient notamment les gisements de hautes teneurs en minéraux, les coûts d'exploitation plus faibles et la proximité de nouveaux marchés (Matthews *et al.*, 1987).

Pour survivre, l'industrie minière nord-américaine doit donc s'adapter à un marché mondial de plus en plus compétitif et aux exigences actuelles et futures en matière de protection de l'environnement. Matthews *et al.* (1987) ont suggéré une stratégie d'adaptation. L'industrie minière devrait choisir un horizon de planification plus long (ex.: 15 ans plutôt que 5), organisant sa croissance future sans pour autant modifier en profondeur le *statu quo* de son opération actuelle. L'accent ne serait pas placé sur l'identification des problèmes futurs (ex.: récession anticipée) mais plutôt sur la détermination d'opportunités futures de croissance (gains en productivité apportés par les avances technologiques; croissance dans les pays moins développés et caractéristiques de ces futurs marchés). Avec cette approche, Matthews et ses collaborateurs ont prétendu que les corporations

pourront apporter les changements requis à leurs opérations pour se conformer à de nouvelles lois et réglementations (environnementales). Ils ont ajouté que plusieurs compagnies ont opté pour cette stratégie et ont assuré leurs vitalités à long terme. La firme Minéraux Noranda Inc. et sa fonderie Horne ont apparemment suivi ce cheminement. Dans sa publicité, la compagnie indique: "Minéraux Noranda...assurera sa croissance par sa faculté d'innover, en suscitant et saisissant les conjonctures favorables, et en s'adaptant au changement". Les caractéristiques de cette firme et de son usine sont analysées dans la section suivante en relation avec cet environnement de marché.

A.7.2 La compagnie Minéraux Noranda Inc.

Minéraux Noranda Inc. se compose de quatre unités sectorielles: le groupe Cuivre Noranda, le groupe Zinc Noranda, le groupe Société Minière et Noranda Sales Corporation Ltd. Elle est une filiale de Noranda Inc. Cette dernière, une entreprise internationale à 95.5% canadienne, compte 45 filiales et compagnies associées et plus de 140 unités d'exploitation réparties dans 13 pays. La fonderie de la division Horne (Rouyn-Noranda) est le pivot du réseau de transformation du cuivre de Noranda Inc.

Pour l'industrie minière, les prix des métaux et des minéraux sont établis au niveau international en vertu de principe de l'offre et de la demande au niveau mondial. Minéraux Noranda Inc. a donc cherché à s'assurer une meilleure mainmise sur ses marchés d'exportation et sur les prix mondiaux. La Noranda Sales Corporation s'occupe de la commercialisation des produits de Minéraux Noranda Inc. et possède une firme spécialisée dans le courtage des marchandises sur la Bourse des métaux de Londres ¹¹.

Noranda Inc. s'est introduit dans les secteurs traditionnellement partenaires de celui du cuivre, pour contrebalancer l'érosion du marché de ce métal dans ces secteurs causée par sa substitution (discuté en section A.7.1.2). Par exemple, Canstar Communications s'occupe de fibres optiques et Les Câbles Canada Limitée fabrique des câbles de transport et de distribution d'énergie.

¹¹ Dans le cadre du GATT (General Agreement on Tariffs and Trades), les prix mondiaux à l'exportation ne peuvent intégrer les disparités créées par l'application de normes environnementales. Cela apporterait une telle complexité dans les négociations, que l'organisme cesserait d'exister (J. L. Sasseville, comm. pers.).

Le cuivre à faible teneur dans le minerai canadien (souligné en section A.7.1.2) peut être extrait à faible coût en raison de la coproduction de métaux précieux.

Le développement d'une nouvelle technologie de traitement de cuivre a permis à la compagnie Minéraux Noranda Division Horne (raffinerie de Rouyn-Noranda) à la fois d'améliorer sa compétitivité internationale (en abaissant ses coûts de production) et d'obtenir un meilleur contrôle de ses émissions polluantes. Cette nouvelle technologie est le procédé Noranda de traitement en continu du cuivre; les principales étapes de ce traitement sont illustrées en figure A.7.2.

Les caractéristiques prédominantes de la fonderie de cuivre Horne et les avantages qu'elles confèrent aux niveaux économique et environnemental sont indiqués dans le tableau A.7.1. En matière de recherche environnementale (Gouvernement du Canada, 1991), Minéraux Noranda Inc. a investi 4.4 M\$ en 1990, et 5 M\$ en 1991 dans le centre de technologie Noranda. La compagnie effectue également des vérifications internes de sa performance environnementale.

A.7.2.1 Resquilleur ¹² réformé ou chef de file en matière de protection de l'environnement?

La présente analyse nous fait apprécier l'ampleur des efforts de Minéraux Noranda Inc. pour réduire ses externalités négatives dans l'environnement. Pourtant, on pourrait interpréter ce comportement comme celui du resquilleur réformé, maître dans l'art de négocier son programme de dépollution avec les autorités de l'agence de contrôle gouvernementale. En effet, cet exploitant aura engendré des dégâts considérables à l'environnement pour plus de 60 ans sans dédommager quiconque. Il aura consenti tardivement des investissements importants pour la restauration du milieu, ayant l'assurance d'obtenir des subventions compensatoires des gouvernements pour demeurer en activité (ex.: usine d'acide sulfurique: Dupont, 1992). Il aura vu un avantage à susciter des appuis dans la population en se développant une image publique reflétant son intérêt de protéger l'environnement.

¹² Le comportement du resquilleur correspond à un comportement de consommation sans payer les ressources qui appartiennent à tout le monde et de laquelle on ne peut l'exclure, ceci lui évitant de payer pour la valeur véritable du bien qu'il consomme (Cours d'Administration publique de l'eau).

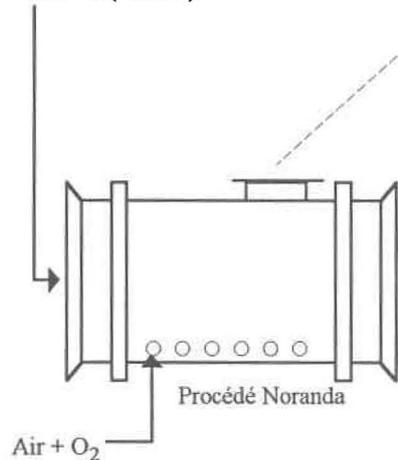
L'auteur adhère plutôt à une seconde interprétation. Le concept économique d'une "valeur au bien d'environnement" n'a émergé qu'au début des années 1970. Durant les 43 années d'opération de la fonderie Horne précédant 1970, le monde industrialisé gérait les écosystèmes suivant une économie de front pionnier (définie en section A.7.1.2) et personne ne remettait en question cette perception du monde. Le 1^{er} mars 1973, le procédé Noranda était mis en opération à la raffinerie de Rouyn-Noranda. Celui-ci permettait déjà à l'époque de réduire la consommation d'énergie, d'envisager une récupération plus efficace des émissions d'anhydride sulfureux et d'ouvrir la porte au traitement des matériaux de recyclage (en 1976; Bédard *et al.*, 1991; Davenport, 1980). L'entreprise semble donc avoir été précoce à accomplir ce "mariage" entre les impératifs de croissance économique et la protection de l'environnement (*cf.* idées de Matthews *et al.* [1987] sur l'horizon de planification des firmes); l'épithète de resquilleur s'applique mal à cette situation. Cette interdépendance entre l'économie et l'environnement n'est pas sans rappeler le concept du développement durable.

Le concept de développement durable s'entend généralement comme une forme de développement socio-économique conduisant à la satisfaction des besoins des individus composant les présentes populations, sans compromettre les capacités des individus qui composeront les générations futures de satisfaire leurs besoins propres (cours d'Administration publique de l'eau). Les considérations qui en découlent incluent des facteurs tels que (Gouvernement du Canada, 1991):

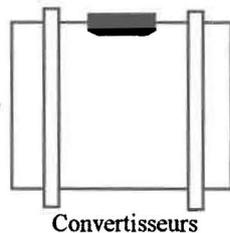
- l'utilisation de l'énergie,
- la gestion des ressources renouvelables et non-renouvelables (ex.: métaux - recyclage, réutilisation, valorisation),
- la gestion des déchets,
- la diversité biologique,
- la contribution au bilan mondial du carbone,
- la planification écosystémique intégrée.

Figure A.7.2: Principales étapes du procédé de traitement en continu Noranda; source: documentation fournie par Minéraux Noranda Inc. Division Horne. Le four à réverbère, de facture conventionnelle, consommait énormément d'énergie, se montrait moins versatile que le procédé Noranda, et il était difficile de récupérer le SO₂ dans les gaz émis (Davenport, 1980).

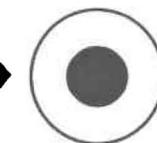
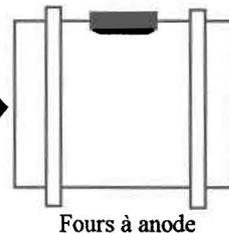
Concentrés de cuivre
ou concentrés complexes
ou matériaux de recyclage et
fondant (silicate)



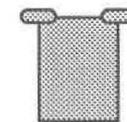
Cu: 55-73%



Cu: 98%



Roues de coulée



Anodes Cu 99.4%

Purification des gaz SO_2
et transformation en acide sulfurique, qualité pharmaceutique.
Poussières récupérées et récupération du Pb, Ag, Cu, Bi
à l'usine de la Brunswick Mining and Smelting

Procédé Noranda

T°: 1300°C

Oxygène soufflé dans la masse en fusion;
temps de résidence relativement long;
le fer oxydé se retrouve dans les scories;
le cuivre oxydé se dégage sous forme de SO_2 -80%
en teneur;
la matte contient 55 à 73% de Cu sous forme de
CuS.

Principaux avantages:

grande efficacité énergétique;
degré supérieur de récupération du cuivre et des
métaux précieux;
habileté de pouvoir traiter une charge hétérogène:
résidus de cuivre, concentrés complexes de métaux,
matériaux de recyclage;
récupération plus efficace du SO_2 et destruction
complète des contaminants organiques: dioxines et
furanes, etc...

Convertisseurs (de matte)

T°: 1200°C

Oxydation du soufre, du fer, du
cuivre et des autres métaux
présents dans la matte;
le gaz SO_2 n'est pas dérivé vers
l'usine d'acide sulfurique;
cuivre pur à 98%.

Fours à anode

Oxydation finale du soufre et du
fer;
réduction de l'oxygène contenu
dans le cuivre;
cuivre pur à 99.4%.

Affinage

Affinage à l'usine Canadian Copper
Refiners à Montréal-Est; purification
du cuivre par électrolyse;
cuivre pur à 99.9%;
récupération des métaux précieux:
Au, Ag, Pt, Pd.

Tableau A.7.1

Principales caractéristiques de la fonderie de cuivre Horne et les avantages qu'elles confèrent aux niveaux économique et environnemental. ^a

CARACTERISTIQUES	AVANTAGE ECONOMIQUE	AVANTAGE POUR LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT
Procédé de traitement en continu Noranda	Valeur accrue de la production. Abaissement des coûts de production. Causes: moins d'énergie requise, moins d'étapes de purification du cuivre, habileté de traiter une charge hétérogène (ex: métaux précieux). Permet la récupération des métaux recyclables.	Grande efficacité énergétique. Récupération plus efficace des gaz polluants. Permet la récupération des métaux recyclables.
Récupération des métaux recyclables	Assure une continuité dans une conjoncture économique difficile. Economies substantielles d'énergie. Réduit les dépenses improductives. ^b Charge d'alimentation: 27,000 t / 1977 120,000 t / 1989	Conservation des ressources non-renouvelables. Economies substantielles d'énergie. Réduction de la pollution de l'air et de l'eau. Réduction des pressions sur les décharges actuelles et futures.
Usine d'acide sulfurique	Valeur ajoutée à la production grâce à la commercialisation d'acide sulfurique de qualité pharmaceutique.	Réduction considérable des émissions atmosphériques de SO ₂ (contaminants particuliers également; voir tableau 4.1).

^a Sources: Bédard *et al.* (1991), Gouvernement du Canada (1991) et Davenport (1980).

^b Il peut en coûter jusqu'à 500M\$ pour mettre un gisement en exploitation, sans aucun retour sur l'investissement.

Le concept du développement durable implique de nouveaux rapports société-nature qui attribuent une valeur d'existence propre au bien d'environnement indépendante des systèmes socio-économiques. Dans cet optique, la théorie du contrôle de la pollution, assujettie telle qu'elle est au processus sociaux et économiques, devrait être repensée (voir section A.7.1.1).

Etant donné son rapprochement avec le développement durable, peut-on clamer que la firme Minéraux Noranda est, parmi ses consœurs, un chef de file de protection de l'environnement? Une nuance est à apporter. En 1990, l'Association minière du Canada a produit un guide de pratique environnementale dans lequel il est mentionné que les compagnies membres de l'Association "adhèrent

au concept du développement durable, qui requiert de prendre les mesures nécessaires pour bien équilibrer la protection de la santé humaine et du milieu naturel avec les besoins de croissance économique" (rapporté dans Gouvernement du Canada, 1991). Cet énoncé d'intention implique de nouveaux schèmes de pensée de la part des entreprises; elles pourraient avoir à fournir des efforts accrues pour s'engager dans cette voie. Cependant, certaines firmes comme Minéraux Noranda Inc. peuvent être mieux positionnées pour s'engager dans la voie du développement durable que bon nombre de citoyens ordinaires. En effet, le style de vie des canadiens est marqué par une forte consommation et une grande production de déchets (Gouvernement du Canada, 1991).

A.7.3 L'écotoxicologie et le contrôle de la pollution

Le contrôle de la pollution, tel qu'il a été défini dans les sections précédentes, revêt plutôt une saveur socio-économico-politique. Même s'il est question de protection et de restauration du milieu naturel, les sciences de l'environnement et l'écotoxicologie sont évacuées de cette problématique. Malgré tout, cette approche peut-elle être quand même efficace à réduire la pollution et à rétablir les usages du bien d'environnement? Souvent, cette approche s'est montrée inefficace à atteindre ces objectifs. Les investissements et les dépenses pour réduire la pollution ont été improductifs en ce sens qu'ils n'ont pas résulté en les bénéfices environnementaux attendus par la société; par surcroît, l'efficacité socio-économique attendue, l'optimum de Pareto, n'a pas été atteinte. Deux importantes causes à cet état de fait peuvent être identifiées; nous en discutons dans le texte qui suit.

A.7.3.1 **Rationalité de chacun des intervenants dans un problème de pollution donné**

La **rationalité** exprime une façon de décider en relation avec un enjeu décisionnel. La théorie du contrôle de la pollution (section A.7.1) nous indique que le comportement décisionnel de chacun des intervenants dans un problème donné (contrôleur, pollueur, pollué) est conditionné par la maximisation des intérêts de chacun. Cette caractéristique s'avérerait le point faible de la théorie et le tout est bien illustré avec la Politique d'assainissement des eaux du Québec (PAEQ: politique prise en exemple dans le cours d'Administration publique de l'eau). L'objectif environnemental théorique du PAEQ reste de réduire la charge polluante et toxique apportée aux eaux de surface du Québec habité, et d'assurer la pérennité des sources d'eau potable et la récupération des usages. Cet objectif

environnemental a apparemment été loupé, du moins dans les débuts du programme ¹³ (on cite en exemple l'usine de Montréal). En effet, les objectifs à atteindre pour le gouvernement avec le PAEQ étaient tout autres, et étaient conditionnés par les types de rationalité adoptés par celui-ci dans ce dossier, soit:

- une rationalité politique: création d'emplois à une époque où il y a absence de chantiers majeurs au Québec (début des années '80), volonté de relancer le génie au Québec;
- une rationalité économique: analyses coûts/bénéfices des projets de construction.

Le gouvernement n'aurait pas tenu compte des aspects environnementaux de la problématique de l'épuration des eaux en raison de la complexité du problème et du manque de formation de ses décideurs en la matière.

A.7.3.2 Inefficacité des instruments de contrôle de la pollution à restaurer et maintenir l'intégrité des écosystèmes.

Il existe un type de difficultés communes et fondamentalement liées aux instruments de contrôle de la pollution, soit leurs inefficacités à restaurer et à maintenir l'intégrité des écosystèmes. Prenons en exemple l'application des normes de rejets et la surveillance des effluents basée sur des épreuves de toxicité en laboratoire. Ces instruments sont inadéquats à déterminer la concentration critique d'un polluant dans l'écosystème aquatique au-dessous de laquelle il n'est pas possible d'observer d'effets toxiques (Cairns et Mount, 1990; exemple avec l'écosystème complexe de Green Bay, lac Michigan: Harris *et al.*, 1990). Toute dépense supplémentaire engagée dans la dépollution au-delà de ce seuil critique le serait en pure perte. Il est ici question de surprotection ou de sous-protection de l'écosystème.

L'analyse précédente fait ressortir la nécessité d'efforts concertés entre les scientifiques, le gouvernement et l'agence de contrôle dans le contrôle de la pollution. A cet égard, les analyses écotoxicologiques ont un rôle majeur à jouer dans la description des écosystèmes dégradés (Harris *et*

¹³ Les deux grandes tares du programme à cette époque ont été d'ignorer la pollution des eaux de surface par les rejets industriels et agricoles, et les déficiences majeures des ouvrages d'épuration des eaux usées (malformation du personnel et défauts de conception des équipements).

al., 1990; voir aussi le tableau 1.1). La création d'une meilleure base de données serait nécessaire dans l'avenir (entre autres dans l'optique du développement durable: Gouvernement du Canada, 1991). Elle devrait permettre:

- d'obtenir une meilleure connaissance du fonctionnement des écosystèmes;
- d'établir un réseau national de surveillance qualitative intégrée;
- l'adoption d'un ensemble national d'indicateurs environnementaux. Ceux-ci permettraient de déterminer à quel point l'environnement réagit aux agressions et aux mesures correctrices (*cf.* chapitre 3).

Les scientifiques et les universités sont bien placés pour contribuer au développement de l'écotoxicologie puisqu'ils sont suffisamment dégagés des contextes socio-politiques et économiques contraignants dans lesquels évoluent le gouvernement et l'industrie (ils ont une liberté de pensée et un intérêt illimité).

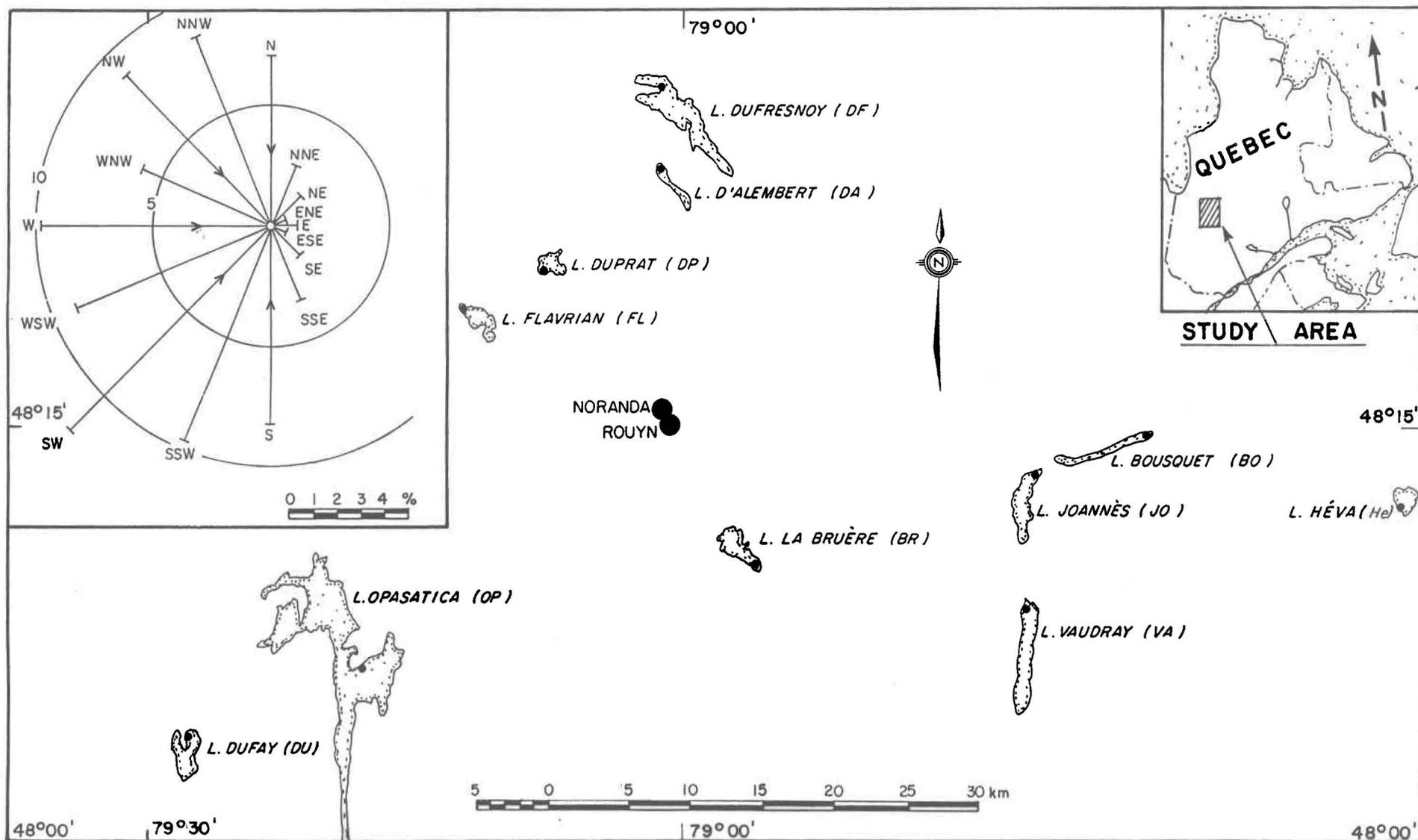


Figure 2.1: Localisation des sites d'échantillonnage pour l'étude multi-lacustre. La direction moyenne des vents au complexe minier de Rouyn-Noranda sont indiquées