

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC  
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**EAU, TERRE ET ENVIRONNEMENT**

**LA RÉPARTITION SUBCELLULAIRE DU CADMIUM ET DU SÉLÉNIUM CHEZ DEUX  
INVERTÉBRÉS BENTHIQUES : ÉVOLUTION TEMPORELLE ET RELATION AVEC LE  
TRANSFERT TROPHIQUE VERS UN INSECTE PRÉDATEUR.**

**PAR**

**Maïté Dubois  
(B.Sc. Biologie)**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ**

**POUR L'OBTENTION DU GRADE DE**

**MAÎTRISE ÈS SCIENCES (M.Sc.)**

**EN SCIENCES DE L'EAU**

**JURY D'ÉVALUATION**

<b>EXAMINATEUR EXTERNE</b>	<b>ALICE HONTELA UNIVERSITÉ DE LETHBRIDGE</b>
<b>EXAMINATEUR INTERNE</b>	<b>PETER G.C. CAMPBELL INRS-EAU, TERRE ET ENVIRONNEMENT</b>
<b>DIRECTEUR DE RECHERCHE</b>	<b>LANDIS HARE INRS-EAU, TERRE ET ENVIRONNEMENT</b>

**JANVIER 2008**



## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier particulièrement ma petite « familia » : maman, papa et ma tite-soeur Stéphanie qui ont été des plus importants. La houle a fortement secoué notre voilier pendant ces trois dernières années et elle a su nous en faire voir de toutes les couleurs. Nous y avons vu des abysses obscures, des cieux bleus éclatants et ensoleillés, puis aperçu des nuages d'orages gris-noirs, menaçants. Enfin, un vent léger s'est levé et j'espère de tout mon coeur qu'il nous portera vers de meilleures contrées, là où le soleil brille de mille feux. Tout l'Univers est avec nous, en nous. Il conspirera à vous apporter bonheur, sourires et sérénité pour l'infini, j'en suis persuadée. Tous ensemble, voguons sur les flots de cette magnifique vie qui nous est offerte. Unis, nous défierons tous les obstacles qui se présenteront et, derrière une essoufflante tempête, le futur saura toujours nous dévoiler des paysages époustouflants. Vous êtes, tous et chacun, formidables. Je vous aime énormément.

Je voudrais aussi remercier les techniciens de l'INRS-ETE (Lise, Michelle, Pauline, Pierre, René) ainsi que mes collègues de labo du 5<sup>e</sup> étage. Merci à David, bien loin de l'autre côté de l'Atlantique, mais qui, comme par magie, était toujours présent au bon moment. Un merci tout spécial à Landis qui s'est révélé être un véritable guide pour mes premiers pas en recherche. Vous avez su, grâce à vos lumières, éclairer des coins qui m'apparaissaient sombres tout en me laissant progresser tranquillement vers les réponses. Merci d'avoir été si réconfortant et si débordant de compassion. J'ai beaucoup appris sur le plan de la recherche, mais aussi énormément sur le plan humain, en m'efforçant davantage de prendre conscience du monde dans lequel nous sommes immergés. Je vous remercie pour chaque rencontre où vous me rappeliez, indirectement, de saisir le moment présent ainsi que de savoir reconnaître et apprécier tous ceux qui croisent notre chemin. Merci à vous.

Le bonheur ne se trouve pas avec beaucoup d'effort et de volonté,  
mais réside là, tout près, dans la détente et l'abandon.  
Ne t'inquiète pas, il n'y a rien à faire.  
Tout ce qui s'élève dans l'esprit n'a aucune importance  
parce qu'il n'a aucune réalité.  
Ne t'y attache pas. Ne te juge pas.  
Laisse le jeu se faire tout seul, s'élever et retomber, sans rien changer,  
et tout s'évanouit et commence à nouveau, sans cesse.  
Seule cette recherche du bonheur nous empêche de le voir.  
C'est comme un arc-en-ciel qu'on poursuit sans jamais le rattraper.  
Parce qu'il n'existe pas, qu'il a toujours été là  
et t'accompagne à chaque instant.  
Ne crois pas à la réalité des expériences bonnes ou mauvaises,  
elles sont comme des arcs-en-ciel.  
A vouloir saisir l'insaisissable, on s'épuise en vain.  
Dès lors qu'on relâche cette saisie, l'espace est là,  
ouvert, hospitalier et confortable.  
Alors, profite-en. Tout est à toi, déjà. Ne cherche plus.  
Ne va pas chercher dans la jungle inextricable  
l'éléphant qui est tranquillement à la maison.  
Rien à faire. Rien à forcer. Rien à vouloir.  
Et tout s'accomplit spontanément.  
Laisse cet esprit qu'est le tiens dans cet état naturel,  
là où rien n'est artificiel.  
In this state, seeing a thought move,  
rest on it, relaxed.  
In this state, stability will come.  
No attachment to stability no fear of movement,  
aware that there is no difference between stability and movement,  
mind arising from mind.  
In this state, where there is no grasping, no attachment,  
rest natural and relaxed.  
In this state, natural reality itself,  
the essence of your own mind,  
primordial awareness, empty clarity will arise...  
and you won't know what to say.  
In this state you will settle, suspended and relaxed.  
Without grasping at the stability as something,  
naturally in place, naturally free;  
without seizing on or rejecting the mind's productions,  
please settle... THERE.

(Lama Gendun Rinpoche)

Apprendre à se nourrir de joie chaque jour. Être capable de vivre dans la fraîcheur, la solidité et la liberté. (Thich Nhat Hanh)

Comme l'étoile filante, le mirage, la flamme, l'illusion magique, la goutte de rosée, la bulle sur l'eau ; comme le rêve l'éclair ou le nuage : Considère ainsi toutes choses. (Bouddha)

## AVANT-PROPOS

Ce mémoire de type « par article » se compose de deux parties. La première partie, soit la synthèse, est consacrée à une introduction générale reliée à l'étude des éléments traces et à leur accumulation par les animaux aquatiques. On y décrit brièvement les connaissances actuelles dans notre domaine de recherche, les objectifs du projet, la méthodologie, les résultats, les conclusions et finalement, les perspectives de recherche. La seconde partie du mémoire est destinée aux articles à soumettre à la revue Environmental Pollution.

La contribution des auteurs des deux articles s'établit comme suit :

### ARTICLE 1 :

**Dubois M, Hare L (2008) Subcellular distribution of cadmium in two aquatic invertebrates: change over time and relationship to Cd assimilation by a predatory insect.**

### ARTICLE 2 :

**Dubois M, Hare L (2008) Selenium assimilation by a freshwater insect and its relationship to Se subcellular partitioning in two prey types.**

### MAÏTÉE DUBOIS

- Conception du projet
- Réalisation des expériences
- Analyse des données
- Rédaction des articles

### LANDIS HARE

- Conception du projet
- Analyse des données
- Rédaction des articles

## RÉSUMÉ

La prise en charge des éléments traces par les prédateurs aquatiques peut-être expliquée en partie par la distribution de ces contaminants dans les cellules de leurs proies. Les mécanismes de détoxification étant spécifiques aux espèces, nous avons déterminé si l'assimilation du cadmium (Cd) et du sélénium (Se) par un prédateur aquatique, la mouche des aulnes *Sialis velata* (Mégaloptère), différait selon deux types de proies, l'insecte *Chironomus riparius* (Diptère) et l'oligochète *Tubifex tubifex*. Nous avons exposé ces deux espèces de proies dans des sédiments contaminés au Cd ou au Se pour une période allant jusqu'à 28 jours, et avons fractionné ces proies par une série de centrifugations différentielles afin de déterminer la distribution du Cd et du Se dans leurs cellules.

Le cadmium chez *T. tubifex* était distribué comme suit (pour tous les temps confondus, moyenne  $\pm$  ES) : débris (35%  $\pm$  3%) > organites (27%  $\pm$  3%) > protéines dénaturées par la chaleur (HDP, 22%  $\pm$  1%) > protéines stables à la chaleur (HSP, 12%  $\pm$  1%) > granules (2%  $\pm$  0.5%), alors que chez *C. riparius* les proportions étaient : HDP (39%  $\pm$  8%) - HSP (37%  $\pm$  10%) > débris (13%  $\pm$  2%) > organites (5%  $\pm$  0.3%) - granules (5%  $\pm$  2%). Ces proportions ont peu varié dans le temps chez les deux taxons de proies. Le prédateur a assimilé le Cd à partir des deux types de proies et les efficacités d'assimilation étaient plus grandes avec la diète d'insecte (72%  $\pm$  5%) qu'avec la diète d'oligochète (46%  $\pm$  3%). Ces efficacités d'assimilation correspondaient à la somme des fractions des proies qui, pense-t-on, sont disponibles au prédateur, c'est-à-dire la somme des fractions des organites, des HDP et des HSP. Cependant, afin d'obtenir une relation 1:1 entre l'assimilation du Cd par le prédateur et la distribution subcellulaire du Cd chez les proies, nous avons dû assumer qu'approximativement la moitié du Cd associé à la fraction organites de *T. tubifex* est présente sous forme de particules qui ne sont pas disponibles à la digestion par le prédateur. Les mesures de Cd dans les fèces du prédateur ont appuyé cette assumption. En somme, le Cd a été transféré efficacement entre les deux niveaux trophiques et la proportion assimilée par le prédateur a pu être prédite en se basant sur la distribution subcellulaire du Cd dans les cellules des proies.

*Sialis velata* a assimilé plus de la moitié du sélénium (Se) présent dans les deux types de proies; soit 70%  $\pm$  7% du Se chez *Tubifex tubifex* et 62%  $\pm$  7% du Se chez *Chironomus riparius*. Le protocole de fractionnement a aussi montré que la distribution du Se au sein des fractions subcellulaires des proies a peu varié dans le temps d'exposition, ce qui était en accord avec l'observation que la durée d'exposition des proies au Se avait peu d'influence sur l'assimilation par le prédateur. La fraction potentiellement disponible au prédateur (organites + HDP + HSP) était similaire pour les deux types de proies (~62%) et on a pu obtenir une approximation de la portion de Se transférée au prédateur. Or, la prédiction du transfert du Se s'est avérée moins efficace que dans les expériences avec le Cd. La facilité avec laquelle le Se a pu être transféré entre les niveaux trophiques confirme d'autres observations en nature portant sur les poissons vivant dans des eaux contaminées au Se et qui, via leur diète, font face à un risque élevé d'exposition à cet élément trace.

## TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	I
Avant-propos	II
Résumé	III
Table des matières	IV
Liste des figures	VI

### 1<sup>ÈRE</sup> PARTIE : SYNTHÈSE

<b>CHAPITRE I - INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1. LES ÉLÉMENTS TRACES ET LEUR ACCUMULATION PAR LES INVERTÉBRÉS D'EAU DOUCE</b>	<b>1</b>
<b>2. NOURRITURE ET EFFICACITÉ D'ASSIMILATION</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Mesures de l'efficacité d'assimilation</b>	<b>3</b>
<b>3. « GESTION » DES ÉLÉMENTS TRACES PAR LES ANIMAUX</b>	<b>4</b>
<b>4. CHOIX DES ORGANISMES À L'ÉTUDE</b>	<b>5</b>
<b>4.1 <i>Tubifex tubifex</i></b>	<b>6</b>
<b>4.2 <i>Chironomus riparius</i></b>	<b>7</b>
<b>4.3 <i>Sialis velata</i></b>	<b>7</b>
<b>5. ÉLÉMENTS TRACES : LE CADMIUM ET LE SÉLÉNIUM</b>	<b>8</b>
<b>5.1 Le sélénium</b>	<b>8</b>
<b>5.2 Le cadmium</b>	<b>10</b>
<b>6. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES</b>	<b>11</b>
<b>CHAPITRE II - MÉTHODES</b>	<b>13</b>
<b>CHAPITRE III - RÉSULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>18</b>
<b>1. EXPÉRIENCES AVEC LE CADMIUM</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Le Cd dans la proie <i>T. tubifex</i></b>	<b>18</b>
<b>1.2 Le Cd dans la proie <i>C. riparius</i></b>	<b>21</b>
<b>1.3 Le transfert trophique du cadmium</b>	<b>22</b>

<b>2. EXPÉRIENCES AVEC LE SÉLÉNIUM</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Le Se dans la proie <i>T. tubifex</i></b>	<b>26</b>
<b>2.2 Le Se dans la proie <i>C. riparius</i></b>	<b>27</b>
<b>2.3 Le transfert trophique du sélénium</b>	<b>28</b>
<b>3. CALCUL DE L'EFFICACITÉ D'ASSIMILATION</b>	<b>32</b>
<b>4. LE Cd, LE Se ... ET LA DIGESTION</b>	<b>33</b>
<b>CHAPITRE IV - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE</b>	<b>35</b>
<b>CHAPITRE V - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>38</b>
<b>ANNEXE 1 - Distribution subcellulaire et transfert trophique</b>	

**2<sup>e</sup> PARTIE : ARTICLE 1 - Le cadmium**

**3<sup>e</sup> PARTIE : ARTICLE 2 - Le sélénium**



## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE I - INTRODUCTION :

**Figure 1.** (page 4)

---

Représentation idéalisée de la perte d'un contaminant d'un prédateur ayant consommé un repas contaminé.

**Figure 2.** (page 5)

---

Compartiments subcellulaires et disponibilité pour le transfert trophique (selon Wallace et Luoma, 2003 ; Cheung et Wang, 2005).

**Figure 3.** (page 6)

---

a) Représentation de *Tubifex tubifex* dans des sédiments.

(<http://zooex.baikal.ru/worms/annelida.htm>).

b) photographie par microscopie électronique de la tête de *T. tubifex*.

([http://www.marlin.ac.uk/php/image\\_viewer.php?images=tubtub2&topic=Species](http://www.marlin.ac.uk/php/image_viewer.php?images=tubtub2&topic=Species)).

**Figure 4.** (page 7)

---

a) Représentation de la larve de *Chironomus riparius*.

([www.bio5.rwthachen.de/.../Chironomiden.htm](http://www.bio5.rwthachen.de/.../Chironomiden.htm)).

b) Cycle de vie des chironomides montrant les stades d'oeuf, de larve (4 stades), la puppe, et l'adulte terrestre. (Groenendijk, 1999).

**Figure 5.** (page 8)

---

Images représentant l'insecte *Sialis*.

a) Tête de la larve ([www.xerces.org](http://www.xerces.org)).

b) Vue de profil de la larve ([www.troutnut.com](http://www.troutnut.com)).

c) Adulte ([www.answers.com/topic/megaloptera-1](http://www.answers.com/topic/megaloptera-1)).

## CHAPITRE II - MÉTHODES :

### Figure 6.

(page 16)

Schéma de la procédure utilisée pour isoler les cinq fractions cellulaires opérationnellement définies.

## CHAPITRE III - RÉSULTATS ET DISCUSSION :

### 1. EXPÉRIENCES AVEC LE CADMIUM

### Figure 7.

(page 18)

Évolution temporelle des concentrations totales de Cd (moyennes  $\pm$  ES, n = 4 échantillons composés) des deux espèces de proies exposées dans des microcosmes dont les sédiments et l'eau surnageante étaient contaminés au Cd.

### Figure 8.

(page 20)

Concentrations totales de Cd dans les proies (ces [Cd] différentes résultaient des différentes durées d'exposition) en relation avec les concentrations de Cd dans les cinq fractions subcellulaires opérationnellement définies (débris, granules, organites, protéines dénaturées par la chaleur (HDP), protéines stables à la chaleur (HSP). Chaque point représente un échantillon composite de proies.

### Figure 9.

(page 21)

Pourcentages de Cd (moyennes, n = 4) dans les cinq fractions subcellulaires (détaillées dans la description de la fig. 3) qui ont été isolées à partir de proies exposées au Cd pour différentes durées d'exposition. Org = organites. La fraction de Cd disponible au prédateur (HDP + HSP + organites) est aussi indiquée sous chacun des graphiques.

### Figure 10.

(page 22)

Courbe de rétention du Cd dans le temps chez le prédateur *S. velata* suite à la consommation (au temps 0) d'un repas contaminé, soit de *T. tubifex*, soit de *C. riparius*, ayant été exposés au Cd pour différentes périodes de temps.

**Figure 11.**

(page 23)

Efficacités d'assimilation (% , moyennes  $\pm$  ES, n = 5) du Cd par *S. velata* lorsque nourri avec *T. tubifex* ou bien *C. riparius* comparativement au pourcentage de Cd qui est possiblement disponible, tel que prédit par le fractionnement subcellulaire des proies (moyennes  $\pm$  ES, n = 4) : les triangles représentent le cas où le métal disponible est présent dans la fraction cytosolique des proies (HDP + HSP), alors que les cercles considèrent le métal disponible comme étant la somme des fractions cytosoliques et de la fraction organites des proies. Les valeurs à proximité des points de données représentent les durées de temps (jours) pour lesquelles les proies ont été exposées au Cd. Les lignes pointillées sont les relations 1:1. Les lignes hachurées et pleines sont des régressions linéaires posées sur chacun des cas expliqués ci-haut.

**Figure 12.**

(page 24)

a) Efficacités d'assimilation (% , moyennes  $\pm$  ES) du Cd par *S. velata* lorsque nourri avec *T. tubifex* ou bien *C. riparius* comparativement au pourcentage de Cd qui est possiblement disponible, tel que prédit par le fractionnement subcellulaire des proies (moyennes  $\pm$  ES) : les cercles considèrent le métal disponible comme étant la somme des fractions cytosoliques (HDP + HSP) et de la totalité (100%) de la fraction organites (Org) des proies; les triangles représentent le cas où le métal disponible est présent dans la fraction cytosolique des proies en plus de 45% de la fraction organites.

b) Pourcentage représentant les fèces produites à partir du Cd total ingéré via les proies par le prédateur *S. velata* comparé aux pourcentages de Cd chez les deux proies qui est possiblement non-disponible à l'assimilation par le prédateur. Les cercles réfèrent à un cas où le Cd non-disponible se retrouve dans les fractions débris + granules des proies ; les triangles considèrent un scénario où un 55% de Cd additionnel provenant de la fraction organites n'est pas disponible au prédateur. Les valeurs à proximité des points de données représentent les durées de temps (jours) pour lesquelles les proies ont été exposées au Cd. Les lignes pointillées sont les relations 1:1.

## 2. EXPÉRIENCES AVEC LE SÉLÉNIUM

**Figure 13.** (page 26)

---

Changement temporel des concentrations totales de Se (moyennes  $\pm$  ES, n = 4 échantillons composés) des deux espèces de proies exposées dans des microcosmes dont les sédiments étaient contaminés au Se.

**Figure 14.** (page 27)

---

Concentrations de Se (moyennes + ES, n = 4) dans les 5 fractions opérationnellement définies de proies qui ont été exposées au Se durant 28 jours (*T. tubifex*, a) ou 20 jours (*C. riparius*, b). Fractions: débris, granules (Gr), organites (Org), HDP (protéines dénaturées à la chaleur), et HSP (protéines stables à la chaleur). Les lettres différentes indiquent une différence significative (p < 0.05) entre les moyennes.

**Figure 15.** (page 28)

---

Pourcentages de Se (moyennes, n = 4) dans les cinq fractions subcellulaires qui ont été isolées à partir de proies exposées au Se pour différentes durées. Org = organites, HDP = protéines dénaturées à la chaleur, HSP = protéines stables à la chaleur.

**Figure 16.** (page 29)

---

Courbe de rétention du Se dans le temps chez le prédateur *S. velata* suite à la consommation (au temps 0) d'un repas contaminé, soit de *T. tubifex* (a) ; soit de *C. riparius* (b), ayant été exposés au Se pour différentes périodes de temps. Valeurs moyennes  $\pm$  ES pour différents groupes de *S. velata* (pour *T. tubifex* n = 7, alors que pour *C. riparius* n = 8 (4 j), 4 (12 j) ou 3 (20 j)).

**Figure 17.** (page 29)

---

Courbe de rétention du Se dans le temps chez le prédateur *S. velata* (moyennes,  $\pm$  ES) suite à la consommation (au temps 0) d'un repas contaminé de *T. tubifex* ayant été exposés au Se pour différentes périodes de temps. Les symboles en croix indiquent l'individu non-contaminé qui avait été nourri avec un repas de *T. tubifex* exposés durant 28 jours.

---

**Figure 18.**

(page 31)

Moyennes ( $\pm$  ES) de l'efficacité d'assimilation du Se par *S. velata* lorsque nourri avec *T. tubifex* ou *C. riparius* comparativement au pourcentage de Se qui est potentiellement disponible tel que prédit par le fractionnement subcellulaire des proies (ce qui correspond à la somme des fractions organites, HDP et HSP). Les nombres entre parenthèses indiquent la durée d'exposition des proies (jours). Deux valeurs sont montrées pour *T. tubifex* exposés au Se pendant 28 jours ; les prédateurs ayant ingéré, auparavant, 2 repas contaminés au Se (28) et un individu qui n'avait ingéré aucun repas contaminé auparavant (28\*).

## 3. CALCUL DE L'EFFICACITÉ D'ASSIMILATION

**Figure 19.**

(page 32)

Efficacités d'assimilation (% , moyennes  $\pm$  ES) du Cd (a) ou du Se (b) par *S. velata* lorsque nourri avec *T. tubifex* ou bien *C. riparius* comparativement aux pourcentages de ces éléments qui sont potentiellement disponibles (la somme des fractions cytosoliques (HDP + HSP) et organites) des proies (moyennes  $\pm$  ES). Les cercles représentent les valeurs d'efficacité d'assimilation calculées par régression non-linéaire ( $A = AE e^{-(bx)}$ ) des valeurs qui représentent la perte physiologique et les triangles représentent les valeurs d'efficacité d'assimilation calculées par la méthode du ratio élément ingéré / élément retenu (%) après l'égestion du matériel non-assimilable (fèces). Les lignes pointillées sont les relations 1:1.

## 4. LE Cd, LE Se ... ET LA DIGESTION

**Figure 20.**

(page 34)

Efficacités d'assimilation du Cd, Ni, Se et Tl par l'insecte prédateur *S. velata* lorsque nourri avec les proies *T. tubifex* ou *C. riparius* exposées à des sédiments et à leur eau surnageante contaminés avec ces éléments traces.

## ANNEXE 1

**Figure 21.**

(Annexe 1)

Efficacités d'assimilation en relation avec le pourcentage d'élément présent dans la fraction cytoplasmique des proies. a) Copépodes et diatomées (tirée de Reinfelder et Fisher, 1991) ; b) Larves de bivalves et phytoplancton (tirée de Reinfelder et Fisher, 1994).



# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

### 1. LES ÉLÉMENTS TRACES ET LEUR ACCUMULATION PAR LES INVERTÉBRÉS D'EAU DOUCE

Les métaux et métalloïdes sont retrouvés de façon naturelle dans les milieux aquatiques. S'ils sont abondants (> ppm) on parle d'éléments majeurs (ex. Ca, Mg, Mn, Na) et s'ils sont présents à des concentrations inférieures au ppm on les nomme éléments traces (ex. Cd, Cu, Pb, Se, Zn). Le groupe des métaux rassemble la majorité des éléments, soit tous ceux qui sont situés à gauche du tableau périodique (Meyer et al. 2005). Les métaux sont lustrés, ductiles, conducteurs de chaleur et d'électricité ; chimiquement, ils ont la possibilité de former des ions positifs en perdant leurs électrons (Newman et Unger, 2003) Le groupe des métalloïdes comprend des éléments dont les caractéristiques sont intermédiaires entre les métaux et les non-métaux ; selon Newman et Unger (2003) on y retrouve des éléments tels l'arsenic (As), l'antimoine (Sb), le sélénium (Se) et le silicium (Si). Bien que le domaine de la toxicologie aquatique ait traditionnellement classé le Se parmi les métalloïdes (Meyer et al. 2005), le tableau périodique de Mendeleiev lui attribuerait plutôt une place dans le groupe des non-métaux. Certains éléments tels que le Cu, le Fe, le Se, le Zn sont essentiels au métabolisme, et donc doivent être disponibles aux invertébrés à des concentrations optimales, afin de ne pas engendrer une déficience ou encore une toxicité (Chapman et Wang, 2000). D'autres éléments comme le cadmium, le plomb et le mercure n'ont pas de rôle connu dans le bon fonctionnement des organismes (Rainbow, 2002).

Depuis le début de l'ère industrielle, les humains ont engendré un relargage accru des métaux et des métalloïdes soit par l'exploitation minière, les centrales au charbon et certains types d'usines (Nriagu, 1990 ; Chapman et Wang, 2000 ; Chapman et al. 2003). Le drainage accru des terres naturellement riches en certains éléments, l'utilisation de suppléments dans l'agriculture, ainsi que la revalorisation des boues municipales via leur épandage par l'industrie agricole ont aussi contribué à la mobilisation de ces contaminants (Jackson et Alloway, 1992 ; Chapman et Wang, 2000 ; Newman et Unger, 2003). Que les éléments traces soient déversés directement dans les cours d'eau, drainés à partir des sols contaminés ou amenés à distance par voie atmosphérique, ceux-ci pourront donc se retrouver dans les écosystèmes aquatiques. Par les processus d'adsorption à la matière organique ou inorganique, de précipitation et de sédimentation, les sédiments constituent souvent le réservoir final des métaux et métalloïdes qui sont entrés dans un milieu aquatique (Wang et al. 1998 ; Chapman et al. 2003).

Chez les animaux aquatiques, on distingue deux voies d'entrées possibles des éléments traces : l'eau et la nourriture. Chez certains invertébrés d'eau douce, les éléments traces viennent majoritairement de l'eau (Meyer et al. 2005 ; Orvoine et al. 2006). Cependant, chez d'autres, c'est la nourriture qui contribue pour la majeure partie du métal accumulé (Hare et al. 2003 ; Meyer et al. 2005 ; Croisetière et al. 2006). L'exposition aux métaux via la diète pourrait engendrer des effets toxiques, même si la nourriture a été exposée à des concentrations aqueuses situées sous le seuil des normes environnementales (Wallace et al. 2000 ; Fisher et Hook, 2002). Il devient donc important de mieux caractériser la nourriture en tant que matrice et route d'exposition, le tout dans le but d'améliorer les prédictions de bioaccumulation et d'effets des éléments traces chez les invertébrés d'eau douce.

## 2. NOURRITURE ET EFFICACITÉ D'ASSIMILATION

L'un des paramètres critiques à considérer pour prédire l'accumulation des métaux via la nourriture est l'efficacité d'assimilation (Wang et Fisher, 1999 ; Luoma et Rainbow, 2005). On peut définir « l'assimilation » comme un processus interactif entre la nourriture et le système digestif d'un consommateur (Zhang et Wang, 2006). « L'efficacité d'assimilation » (AE) est donc la fraction d'un produit absorbé et incorporé dans les tissus (Penry, 1998). La facilité avec laquelle un élément associé à la nourriture sera assimilé variera en fonction de plusieurs paramètres tels que le métal, la qualité de la nourriture et son taux d'ingestion, le temps de passage dans le tractus et les conditions chimiques dans le tractus (pH, enzymes digestives, agents chélateurs : Hare, 1992 ; Campbell et al. 2005a). Pour un prédateur qui accumule un métal trace à partir de ses proies seulement, la modélisation de la variation temporelle des concentrations en métal,  $[M]$ , se définit comme suit :

$$\frac{d[M]_{\text{prédateur}}}{dt} = (AE \times IR \times [M]_{\text{proie}}) - (k_e [M]_{\text{prédateur}}) - (k_g [M]_{\text{prédateur}}) \quad (1)$$

où  $[M]_{\text{prédateur}}$  et  $[M]_{\text{proie}}$  sont les concentrations du métal dans le prédateur et la proie (respectivement), AE (%) est l'efficacité d'assimilation du métal, IR (g de proie par g de prédateur<sup>-1</sup> par jour<sup>-1</sup>) est le taux d'ingestion,  $k_e$  (jour<sup>-1</sup>) est une constante d'élimination,  $k_g$  (jour<sup>-1</sup>) est une constante de croissance, et  $t$  (jour) est le temps (Thomann, 1981 ; Croteau et al. 2001). Étant donné l'importance clé de l'efficacité d'assimilation comme paramètre influençant la prise en charge des éléments traces à partir de la nourriture (Luoma et Rainbow, 2005), l'un des objectifs de cette étude est d'estimer l'efficacité avec laquelle un prédateur assimile certains éléments traces présents chez ses proies.



## 2.1 Mesures de l'efficacité d'assimilation

Pour mesurer l'efficacité d'assimilation, on peut utiliser la technique du « pulse-chase feeding » (Wang et Fisher, 1999). Il suffit d'offrir à un prédateur un repas contaminé suivi d'un repas non-contaminé, ce dernier permettant de « chasser » la nourriture contaminée de son tractus intestinal. Pour contaminer la nourriture, l'utilisation de traceurs radioactifs permet de mesurer précisément la teneur des invertébrés en éléments traces, et ce, à des concentrations réalistes. L'autre avantage d'utiliser certains radioisotopes est la possibilité qu'ils nous offrent de réaliser des mesures répétitives sur des individus vivants. Ainsi, à partir des données obtenues, nous pouvons estimer l'efficacité d'assimilation des éléments traces de deux façons. La première consiste à calculer la fraction de l'élément ingéré qui est retenue par le prédateur à un temps donné suite au repas, soit lorsque plus de 90% des fèces sont évacuées. La deuxième consiste à mesurer le traceur dans le prédateur à plusieurs temps suivant le repas et d'utiliser l'ensemble de ces données pour estimer l'efficacité d'assimilation (figure 1). Pour cette deuxième approche, on modélise la perte comme une décroissance exponentielle :

$$A = AE e^{-bt} \quad (2)$$

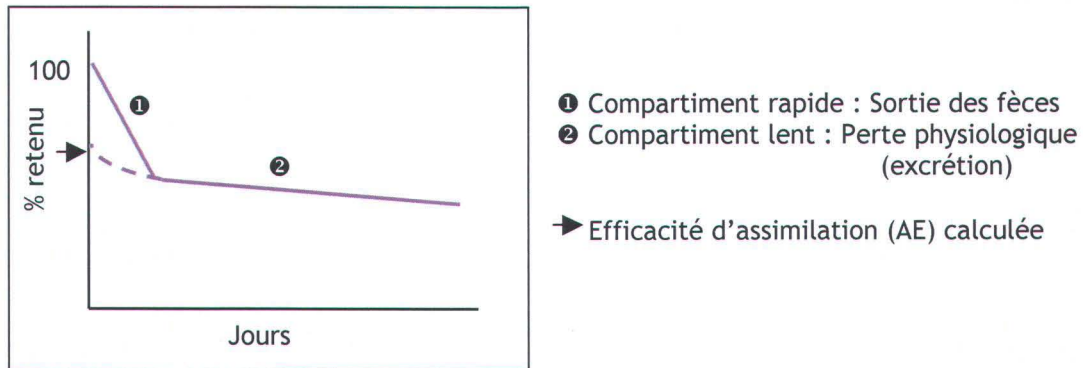
où  $A$  est le pourcentage de l'élément radioactif ingéré retenu par l'animal au temps  $t$ ,  $AE$  est l'efficacité d'assimilation,  $b$  est la constante de perte de l'élément du prédateur et  $t$  le temps. Cette équation provient d'une autre expression qui définit l'élimination d'un contaminant par un prédateur que l'on aura placé dans un milieu propre suite à l'ingestion de son repas contaminé. Dans celle-ci, on imagine l'animal comme une boîte contenant une certaine quantité de l'élément ( $C$ ) et dont la sortie dans le temps ( $t$ ) sera régie par la constante d'élimination du compartiment d'excrétion lente ( $b$ ).

$$\frac{dC}{dt} = -bt \quad (3)$$

En intégrant l'équation (3), on obtient l'équation suivante :

$$C_t = C_0 e^{-bt} \quad (4)$$

Il suffit ensuite de remplacer les quantités dans l'animal dont l'élimination est étudiée par des pourcentages retenus, soit en relativisant la quantité mesurée au temps  $t$  à la quantité de départ qui a été ingérée au temps 0. Ainsi, on pourra utiliser l'équation (2) pour calculer l'efficacité d'assimilation ( $AE$ ) en l'appliquant au compartiment le plus lent de la courbe de perte de l'animal (Fig.1 - ②).



**Figure 1.**

Représentation idéalisée de la perte d'un contaminant d'un prédateur ayant consommé un repas contaminé au jour 0.

### 3. « GESTION » DES ÉLÉMENTS TRACES PAR LES ANIMAUX

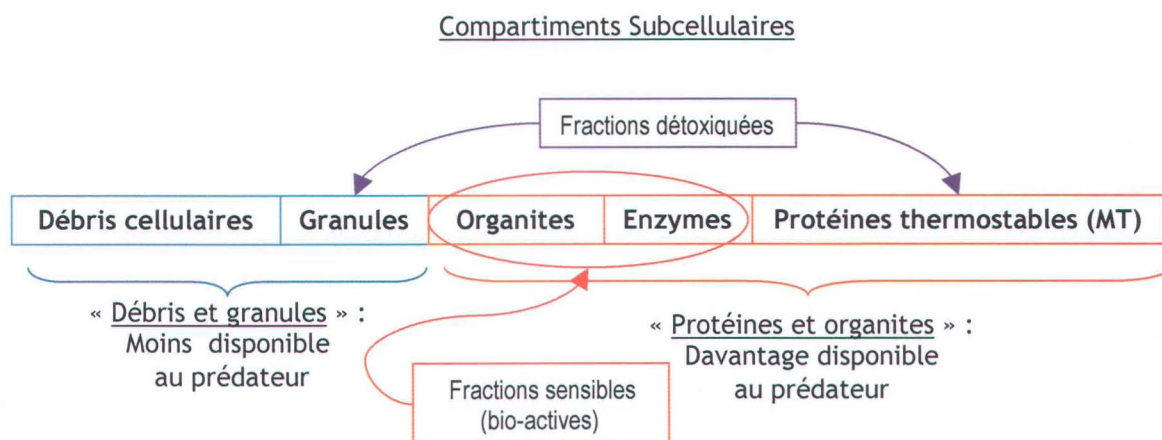
Les processus d'accumulation des éléments essentiels, comme le Se, le Zn ou le Cu diffèrent de ceux des éléments non-essentiels tels que le Cd, le Pb ou le Hg. Un élément essentiel au métabolisme d'un organisme, mais en surplus, pourrait être limité dès l'entrée, excrété davantage, stocké sous des formes inertes ou éliminé suite à un stockage sous une forme détoxiquée. Un métal non-essentiel pris en charge aurait tendance à être accumulé par stockage interne, bien souvent sous des formes détoxiquées qui à leur tour, pourraient être excrétées. Ainsi, en étant sous une forme détoxiquée, l'élément sera prévenu d'agir sur des sites métaboliques sensibles. Or, s'il advenait l'entrée d'une trop grande quantité d'élément non détoxiquée dans l'organisme, les sites métaboliques pourraient être plus à risque d'être perturbés. C'est ici qu'il y a un potentiel de toxicité.

L'interaction des éléments traces avec la machinerie cellulaire lors du processus de détoxification mènera à l'association des éléments avec diverses structures de la cellule. Un organisme peut synthétiser des protéines de faible poids moléculaire et riches en soufre liant les métaux dans le cytosol, les métallothionéines, et/ou préconiser le stockage dans des granules insolubles riches en soufre ou en phosphore (Hopkin, 1989 ; Hare, 1992). Il en résultera d'une séquestration du métal sous des formes détoxiquées qui préviendrait leur action sur des sites métaboliques sensibles tels que les enzymes (Ahearn et al. 2004 ; Vijver et al. 2004). En fait, les formes chimiques présentes



dans un organisme sont très variées : 1) sous forme d'ion libre ; 2) lié à des protéines fonctionnelles (e.g., le Fe dans l'hémoglobine) ou à de petits peptides ; 3) lié au centre actif des enzymes ; 4) lié à des acides organiques ; 5) lié à des métallothionéines ou à des protéines de transport (e.g., ferritine) ; 6) lié à des vésicules lysosomiques ou des granules intracellulaires ; 7) précipités dans des granules extracellulaires riches en S ou en P, dans des dépôts minéraux ou des corps résiduels ; 8) lié à des enzymes, à l'ADN, à des canaux ioniques ou à l'exosquelette (Ahearn et al. 2004 ; Vijver et al. 2004).

Il a été démontré dans des études antérieures que la distribution intracellulaire des métaux pouvait donner, d'une part, des indications quant à leur potentiel toxique, la détoxification visant à restreindre l'action des éléments sur des sites métaboliques sensibles (figure 2) (Rainbow, 2002). D'autre part, l'allocation des éléments dans certaines fractions solubles de la cellule d'une proie (ex. cytosol) pourrait les rendre davantage disponible à un prédateur que des éléments associés à des composantes insolubles telles que les granules et les membranes cellulaires (Nott et Nicolaidou, 1990 ; Reinfelder et Fisher, 1991,1994 ; Wallace et Lopez, 1997 ; Wallace et al. 2003 ; Seebaugh et Wallace, 2004).



**Figure 2.**  
Compartiments subcellulaires et disponibilité pour le transfert trophique  
(selon Wallace et Luoma, 2003 ; Cheung et Wang, 2005)

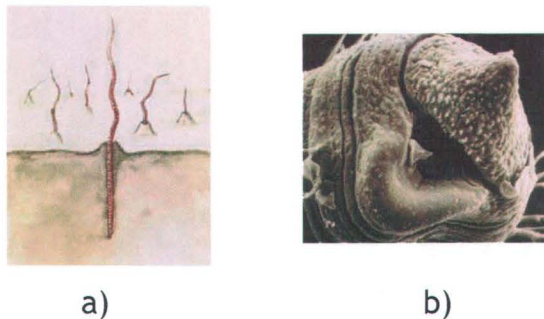
#### 4. CHOIX DES ORGANISMES À L'ÉTUDE

Avec une chaîne trophique expérimentale en laboratoire constituée d'un prédateur et deux types de proies, soit l'insecte *Chironomus riparius* (diptère) et l'oligochète *Tubifex tubifex* donnés comme nourriture à un insecte *Sialis velata* (mégaloptère), nous pourrions mesurer l'impact de la

distribution subcellulaire du Cd et du Se chez les proies sur l'efficacité d'assimilation par ce dernier. Roy et Hare (1999), ont démontré antérieurement que la nourriture contribuait à 80% pour l'accumulation du Cd chez *S. velata* lorsqu'en présence d'une eau contaminée en Cd et nourri avec une autre espèce de chironomide (*Cryptochironomus* sp.). Croisetière et al. (2006) ont mis en lumière que la nourriture était la source presque exclusive d'As, de Cd, de Co, de Cu et de Zn pour *S. velata* nourri avec *C. riparius*. Quant à la différence de l'importance relative de la nourriture comme source de Cd chez *Sialis* entre les deux études (80% versus 100%), les plus faibles concentrations du Cd qui ont été employées dans l'étude de Roy et Hare (1999) par rapport à celles employées par Croisetière et al. (2006) peuvent expliquer un tel écart (Croisetière et al. 2006). *Sialis* a aussi été proposé comme biomoniteur des métaux puisque très largement répandu (Roy et Hare, 1998). Quant aux deux types de proies sélectionnées (chironomides et oligochètes), elles se retrouvent couramment en milieux naturels, font partie intégrante de la plupart des chaînes alimentaires d'eau douce et sont consommées par les larves de *Sialis* en nature (Locklin et al. 2006).

#### 4.1 *Tubifex tubifex*

*Tubifex tubifex* est un oligochète de la famille des tubificidés (Oligochaeta, Tubificidae) reconnu pour être très tolérant aux environnements pollués (Bouché et al. 1999b) et largement distribué en eaux douces (Bouché et al. 2000). Il vit à l'interface eau-sédiment, sa partie antérieure creusant les sédiments et sa partie postérieure ondulant dans l'eau (Bouché et al. 2000). Il est un maillon important des chaînes trophiques aquatiques et des tests de toxicité ont été développés en l'utilisant pour des essais avec les sédiments (Reynoldson et al. 1991). Il est bien souvent le dernier à disparaître lors de la contamination d'un site et le premier à le recoloniser (Milbrink, 1983 ; Bouché et al. 1999b). Lorsque son milieu est contaminé en métaux, il a la possibilité d'utiliser une stratégie particulière de détoxification. Il stocke le métal dans sa partie caudale et la perd par autotomie. Cette amputation sera par la suite régénérée (Bouché et al. 1999a).



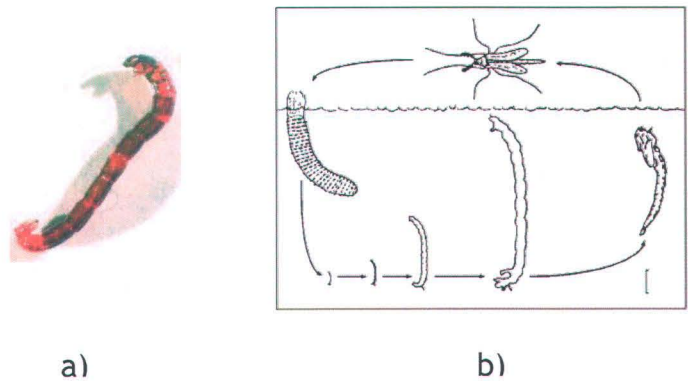
**Figure 3.**

- a) Représentation de *Tubifex tubifex* dans des sédiments (<http://zoex.baikal.ru/worms/annelida.htm>), et  
 b) photographie par microscopie électronique de la « tête » de *T. tubifex*  
 ([http://www.marlin.ac.uk/php/image\\_viewer.php?images=tubtub2&topic=Species](http://www.marlin.ac.uk/php/image_viewer.php?images=tubtub2&topic=Species))



## 4.2 *Chironomus riparius*

*Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) est une espèce de mouche qui ne pique pas et, au stade larvaire, est pourvue d'hémoglobine à titre de transporteur d'O<sub>2</sub>. Son cycle de vie débute par l'oeuf, ensuite ont lieu quatre stades larvaires, la formation de la puppe, puis l'adulte. Les larves vivent dans des tubes construits à partir d'algues, de particules de sédiments ou d'autres types de particules. Elles se nourrissent de substances organiques (algues, bactéries, champignons, microdétritus) en projetant leur tête à l'extérieur de leur tube ou en consommant des sédiments en dessous de l'interface eau-sédiment (Ristola, 2000). L'adulte émergera de l'eau suite au stade pupal. *Chironomus riparius* est largement distribué dans l'hémisphère nord et est souvent retrouvé dans des eaux polluées étant donné sa tolérance à diverses conditions (Postma et al. 1995). Aussi, on considère que cette espèce peut être importante dans la diète d'autres invertébrés (ex. odonates), des poissons et des oiseaux aquatiques (Tokeshi, 1995). *Chironomus riparius* est communément utilisée dans le cadre de tests de toxicité de sédiments contaminés (Ingersoll et al. 1995).



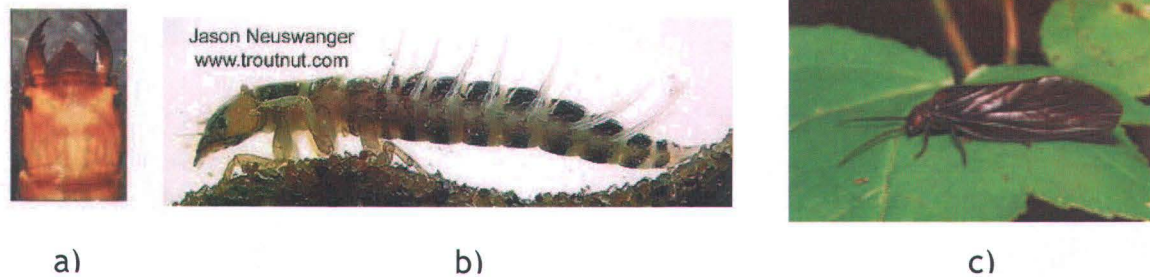
**Figure 4.**

- a) Représentation de la larve de *Chironomus riparius* ([www.bio5.rwthachen.de/.../Chironomiden.htm](http://www.bio5.rwthachen.de/.../Chironomiden.htm)) ;  
 b) Cycle de vie des chironomides montrant les stades d'oeuf, de larve (4 stades), la puppe, et l'adulte terrestre (Groenendijk, 1999).

## 4.3 *Sialis velata*

La « mouche des aulnes » du genre *Sialis* fait partie de l'ordre des Mégaloptères et de la famille des Sialidae. Elle est répandue mondialement et on en trouve 23 espèces en Amérique du Nord (Ross, 1937 ; Whiting, 1991). Sa larve est aquatique, sédimentaire et cette période larvaire peut durer d'un à deux ans et comprend environ 10 stades pour des espèces telles que *Sialis itasca* et *Sialis velata*. Durant cette période, les larves sont prédatrices et on a retrouvé des organismes tels

des chironomides, des oligochètes et des ostracodes dans les contenus intestinaux de *Sialis* (Locklin et al. 2006). Lorsque la larve est mature, elle sort de l'eau et s'ensevelit sous terre où elle y restera environ deux semaines (Elliott, 1996). L'adulte pourvu d'ailes émergera, s'accouplera et pondra ses oeufs sur des feuilles ou des branches situées au-dessus de l'eau (Elliott, 1995).



**Figure 5.**

Images représentant l'insecte *Sialis*. a) Tête de la larve. ([www.xerces.org](http://www.xerces.org)) ; b) Vue de profil de la larve ([www.troutnut.com](http://www.troutnut.com)) ; et c) Adulte ([www.answers.com/topic/megaloptera-1](http://www.answers.com/topic/megaloptera-1))

## 5. ÉLÉMENTS TRACES : LE CADMIUM ET LE SÉLÉNIUM

### 5.1 Le sélénium

Le sélénium (Se) est un non-métal, groupe dans lequel on retrouve aussi le carbone, l'oxygène, le phosphore, le soufre, etc. (Meyer et al. 2005). Les déchets industriels, les centrales au charbon, les eaux lessivant les sols agricoles des zones sélénifères, les activités minières visant le phosphate, le soufre ou les métaux sont tous des facteurs qui ont contribué au relargage du Se dans les écosystèmes (Maier et Knight, 1994 ; Lemly, 1997 ; Cutter et Cutter, 1998). En milieu aquatique, le Se peut paraître sous 4 états d'oxydation. Les organismes aquatiques peuvent être exposés aux oxyanions libres, soit au Se IV (sélénite ;  $\text{SeO}_3^{-2}$ ) ou au Se VI (sélénate ;  $\text{SeO}_4^{-2}$ ). Luoma et al. (1992), ont démontré que les animaux filtreurs étaient à même d'incorporer le Se soit sous forme d'oxyanions libres, le Se associé aux particules de sédiment ou le Se élémentaire insoluble (Se 0). Dans les milieux anaérobies, on peut retrouver aussi le sélényde (Se II) inorganique, une forme insoluble du Se. La forme de Se la plus biodisponible est sans doute le sélényde organique, (ou organosélényum), incorporé dans les algues ou les bactéries par exemple, et qui serviront de nourriture aux niveaux trophiques supérieurs (Luoma et al. 1992 ; Besser et al. 1993 ; Schlekot et al. 2000 ; Baines et al. 2004 ; Simmons et Wallschläger, 2005). Cette présence du Se dans les molécules organiques serait due en partie au fait que le soufre et le sélénium se comportent de façon similaire dans les systèmes biologiques (Wrench et Campbell, 1981). Les organismes des

maillons inférieurs tels que les microorganismes ou le phytoplancton sont aptes à synthétiser des sélénio-acides-aminés tels que la séléno-méthionine et la séléno-cystéine en utilisant le sélénium comme analogue du soufre (Maier et Knight, 1994 ; Fan et al. 2002 ; Simmons et Wallschläger, 2005). Ces acides aminés entrèrent à leur tour dans la composition des protéines ou d'enzymes. Chez les producteurs primaires, le sélénite serait plus disponible pour être transformé en acides aminés que le sélénate (Adams et al. 1997). Toutefois, on a aussi démontré que les sélénoïdes organiques dissous provenant de lysats de cellules algales peuvent être pris en charge par le phytoplancton (Baines et al. 2001). De cette façon, la biotransformation du sélénium favoriserait son transfert à travers les niveaux trophiques et pourrait engendrer des effets toxiques chez les prédateurs au sommet des chaînes alimentaires (Maier et Knight, 1994 ; Fan et al. 2002 ; Hamilton, 2004).

La nourriture semble être si importante dans l'exposition au Se que certains ont même pensé écarter les études basées sur le Se dissout lors de discussions sur la toxicité potentielle du Se chez les poissons (DeForest et al. 1999). Plusieurs expériences viennent appuyer le fait que la prise en charge du Se se ferait en grande partie par la nourriture chez divers organismes en laboratoire (Reinfelder et Fisher, 1991 ; Luoma et al. 1992 ; Wang et al. 1996 ; Reinfelder et al. 1998 ; Wang et Fisher, 1998). Ainsi donc aux États-Unis, on a proposé un critère d'effet toxique basé sur la concentration dans les tissus animaux et dans la diète, comme dans le cas du mercure (Hamilton, 2002).

Le Se étant un élément trace essentiel, il peut être limitant dans des zones appauvries en Se, ou encore toxique dans les écosystèmes aquatiques touchés par certaines activités anthropiques. En tant qu'élément essentiel, il est nécessaire pour la croissance et le développement et entre dans la composition de plusieurs protéines associées au métabolisme oxydatif tels que la famille d'enzymes des glutathione peroxydase sélénio-dépendantes, les thyroïdes déiodinases et les thiorédoxines réductases (Yoshiro et Takahashi, 2002). Chez les mammifères, qui ont été davantage étudiés, une quinzaine d'enzymes sont en fait des sélénoprotéines connues pour leurs fonctions biologiques (Hatfield et Gladyshev, 2002). L'écart entre les concentrations dans les organismes susceptibles d'amener la toxicité ( $> 8 \mu\text{g/g}$  ( $100 \text{ nmol/g}$ ) dans les tissus et  $4 \mu\text{g/g}$  ( $50 \text{ nmol/g}$ ) dans la diète) sont de l'ordre de 2 à 4 fois celles des seuils qui n'engendreraient pas d'effets ( $< 2 \mu\text{g/g}$  ( $25 \text{ nmol/g}$ )) (Hamilton, 2004) ; de là, tout l'intérêt que l'on porte à la compréhension du comportement du sélénium.

## 5.2 Le cadmium

Le cadmium est un métal de transition (« border-line » de classe B) considéré comme très toxique pour la vie aquatique. Il s'est révélé être le plus néfaste lors de tests de toxicité effectués sur *Hyalella azteca* et 63 éléments du tableau périodique (Borgmann et al. 2005). Il a une grande affinité pour le soufre et donc pour les groupements sulfurés tels que -SH, -S-S-, etc., pouvant ainsi interférer avec les métaux essentiels tels que le Cu et le Zn en amenant une altération des caractéristiques fonctionnelles des protéines (Nieboer et Richardson, 1980). Son entrée dans les cellules animales pourrait être réalisée grâce aux canaux calciques, l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  lui ressemblant chimiquement (Simkiss et Taylor, 1995). Les concentrations en cadmium peuvent être élevées dans les régions marquées par l'industrie minière (extraction et transformation des minerais) et où on utilise le charbon comme source d'énergie. On l'utilise pour la pigmentation des peintures, dans les batteries et dans les plastiques. Le cadmium est présent dans les minerais de zinc et peut être retrouvé lors du raffinage ou de l'extraction du cuivre (Mebane, 2006).

Au Québec, il a été beaucoup étudié dans la région de Rouyn-Noranda, là où l'activité minière règne depuis les années 20 (Arafat, 1985 ; Borgmann et al. 2004). L'équipe de biogéochimie des éléments traces de l'INRS-ETE est particulièrement active dans cette région. En effet, plusieurs travaux portant sur l'accumulation du cadmium y ont été réalisés, entre autres chez les invertébrés benthiques et les poissons (Tessier et al. 1993 ; Hare et Tessier, 1996 ; Campbell et al. 2005b ; Michaud et al. 2005 ; Kraemer et al. 2006). Dans cette région, au pourtour d'une fonderie de cuivre, les sédiments peuvent avoir des concentrations en Cd jusqu'à  $585 \text{ nmol g}^{-1}$  et qui diminueront d'environ 10 fois en s'éloignant de 25 à 43 km de la source (Dumontet et al. 1990). Les concentrations en cadmium dans les sédiments de lacs situés près d'une fonderie de cuivre et de zinc au Manitoba se situaient entre 130 et  $520 \text{ nmol g}^{-1}$ . En s'éloignant du plus de 20 km, on trouvait des concentrations allant de  $<1$  à  $62 \text{ nmol g}^{-1}$  (Harrison et Klaverkamp, 1990). Dans le port de Hamilton, une zone très industrialisée de l'Ontario, les concentrations moyennes en Cd des sédiments sont de  $133 \text{ nmol g}^{-1}$  (Mayer et Manning, 1990).



## 6. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

En considérant que deux groupes d'organismes distincts (insectes et oligochètes) peuvent avoir des mécanismes de détoxification différents, un élément donné pourrait donc être distribué différemment entre les diverses fractions subcellulaires chez les deux groupes d'animaux. Ces différences peuvent influencer l'efficacité avec laquelle les éléments traces présents dans différents types d'animaux seront transférés vers un niveau trophique supérieur. Nos objectifs sont :

- 1) D'une part, mesurer les changements temporels dans la distribution interne du cadmium (Cd) et du sélénium (Se) chez deux types de proies (*C. riparius* et *T. tubifex*) qui ont été exposées à des sédiments contaminés en Cd ou en Se ;
  
- 2) D'autre part, mesurer l'efficacité d'assimilation du Cd et du Se chez le prédateur *Sialis velata* lorsque nourri avec ces deux types de proies ayant été exposées à ces éléments pour des durées différentes. Nous tenterons de voir les liens, s'il y en a, entre la répartition subcellulaire des éléments traces dans les proies et l'efficacité d'assimilation de ceux-ci par le prédateur.



## CHAPITRE II

### MÉTHODES

#### Collecte et culture des invertébrés

Les larves de *Sialis velata* ont été récoltées au Lac St-Joseph, Québec (46°55'N, 71°40'W) à une profondeur de ~4.5 m à l'aide d'une benne Ekman ou d'un filet manipulé par des plongeurs. Afin d'isoler les invertébrés, les sédiments ont été tamisés avec un filet dont les ouvertures étaient de 1 mm. De retour au laboratoire, les larves de *S. velata* ont été placées individuellement dans des pots de 40 ml contenant de l'eau du lac à 10 °C. En laboratoire, nous avons établi un élevage de *Chironomus riparius* sur sable fin à partir de masses d'œufs provenant du Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (Québec, QC). Quant à *Tubifex tubifex*, les cultures ont été achetées chez Aquatic Research Organisms (Hampton, NH, USA) puis gardées dans des aquariums contenant du sédiment du lac St-Joseph. Les deux élevages de proies étaient exposés à une période de 16 h de lumière : 8 h de noirceur, maintenus dans de l'eau reconstituée à 20 °C et nourris avec de la nourriture pour poisson Aquatox™ (Aquatic Eco-systems Inc, Apoka, FL, USA). La dureté totale de l'eau des élevages était de 11 mg l<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> et de 112 mg l<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> pour *T. tubifex* et *C. riparius*, respectivement. Le prédateur était nourri avec 1-2 proies par semaine (soit *T. tubifex* ou *C. riparius*)

#### Exposition des proies au Cd et au Se

Des sédiments non-tamisés (les 10 premiers cm en surface) du site de collection de *S. velata* ont été contaminés avec du Cd « froid » et le <sup>109</sup>Cd, un radiotracteur (activité spécifique de 0,7 µCi nmol<sup>-1</sup> de Cd total), pour atteindre une concentration nominale en Cd de 265 nmol g<sup>-1</sup> de poids sec de sédiments. Cette concentration environnementalement réaliste peut se retrouver dans des sédiments de lacs situés au pourtour de zones impactées par l'industrie minière (ex. Rouyn-Noranda) (Arafat, 1985 ; Andres et al. 1998 ; Hare et Tessier, 1998 ; Borgmann et al. 2004 ; Croisetière et al. 2006). De façon similaire, le <sup>75</sup>Se (sous forme de sélénite) et le Se stable (activité spécifique de 5,4 µCi nmol<sup>-1</sup> de Se) ont été ajoutés dans une autre portion de sédiment afin d'obtenir une concentration nominale en Se de 15 nmol g<sup>-1</sup> de poids sec. Cette concentration en Se se trouve dans la gamme de concentrations pour des sédiments qui amènent un risque modéré pour les écosystèmes (12-50 nmol g<sup>-1</sup> (1-4 µg g<sup>-1</sup>) : Lemly, 1997 ; Hamilton, 2004). Cette concentration a été choisie afin de limiter la toxicité envers les animaux d'expérimentation. En effet, on a signalé une toxicité possible chez les organismes benthiques à partir de 2 µg g<sup>-1</sup> (25 nmol g<sup>-1</sup>) de Se dans les sédiments (Lemly, 1997 ; Hamilton, 2004). Les sédiments ont été conservés à 10 °C et mélangés 3 fois par semaine pendant 1 mois. Afin de minimiser la production de déchets radioactifs, nous avons réutilisés ces sédiments contaminés pour plusieurs expériences sur une

période de 8 mois. Toutefois, l'influence de l'âge des sédiments sur la biodisponibilité des éléments traces n'a pas été vérifiée.

Nous avons versé 150 ml de sédiments contaminés (5 ml proie individuelle<sup>-1</sup>) dans des bouteilles de HDPE (« High Density Poly-Ethylene ») de 1 l puis ajouté 600 ml d'eau reconstituée de façon à ne pas resuspendre les sédiments. Dans les microcosmes contenant *T. tubifex*, nous avons utilisé une eau reconstituée dont les concentrations en cations et anions majeurs étaient similaires à celles des eaux douces du Lac St-Joseph (82 µM Ca, 25 µM Mg, 62 µM Na, 5 µM K, dureté de 11 mg l<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>). De l'eau plus dure (28 mg l<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>) a été utilisée pour les larves de *C. riparius* puisqu'il s'est avéré que leur croissance était meilleure sous ces conditions. Notons ici que cette différence de dureté a probablement pu influencer la prise en charge des éléments traces (Craig et al. 1998), or le but ultime étant d'obtenir des proies contaminées pour en mesurer la distribution subcellulaire, le mode de prise en charge devenait d'importance secondaire. Les contenants d'exposition ont été préparés une semaine avant l'addition des proies afin de permettre l'équilibration entre l'eau et les sédiments. Les proies ont été acclimatées à 10 °C pendant une journée préalablement à l'exposition, et toutes les expériences ont été menées à cette température dans le but de ralentir la croissance des insectes et ainsi, éviter l'émergence. Les pH mesurés dans l'eau pendant les expositions au Cd et au Se étaient similaires (6.5 et 6.9, respectivement).

Suite à une exposition de 4, 12, 20 ou 28 jours, les proies ont été retirées de 3 contenants, dépurées pendant 5 h dans les sédiments non-radioactifs du lac St-Joseph, puis transférées dans de l'eau propre pour un autre 18-20 h afin de permettre l'élimination complète des sédiments dans le tractus. Approximativement 80 individus ont été congelés à -80 °C dans des microtubes à centrifugation afin de procéder, ultérieurement, au fractionnement subcellulaire.

Aux jours 12, 20 et 28 (*T. tubifex*) et aux jours 4, 12, 20 (*C. riparius*) des proies additionnelles ont été enlevées des sédiments, dépurées tel que décrit ci-haut, pesées, comptées au compteur gamma, puis données comme repas vivant à *S. velata*. La moyenne individuelle des poids frais ( $\pm$  ET) des proies offertes à *S. velata* (toutes expériences confondues) étaient de  $7.8 \pm 1.8$  mg pour *T. tubifex* et  $4.5 \pm 0.4$  mg pour les larves de 4<sup>e</sup> stade de *C. riparius*.

### Assimilation du Cd et du Se par le prédateur

Avant les expositions au Cd ou au Se, les larves de *S. velata* ( $87.8 \pm 8.6$  mg de poids frais ( $\pm$  ET)) ont été nourries avec une larve de *C. riparius* pendant 4 jours, puis, non-nourries 3 jours. À chaque temps d'exposition (donnés ci-haut), le prédateur recevait suffisamment de proies contaminées (2) pour remplir son tractus. Les proies ont été consommées dans un délai de 15 minutes et aucune radioactivité significative n'a pu être mesurée dans l'eau pendant cette période. Le <sup>75</sup>Se ou le <sup>109</sup>Cd du prédateur a ensuite été mesuré à intervalles pendant une durée de 8 jours. Durant cette

période, l'eau a été changée tous les jours et *S. velata* a été nourri pendant 4 jours consécutifs avec une proie non-radioactive, puis non-nourri les 3 prochains jours ; l'eau et les fèces ont aussi été récoltées et mesurées pour la radioactivité. Subséquemment, à chaque prédateur était offert son prochain repas contaminé et la procédure se continuait comme lors du premier repas. Avant de procéder aux mesures du  $^{109}\text{Cd}$  ou du  $^{75}\text{Se}$ , les invertébrés ont été rincés 12 fois avec de l'EDTA 0.1 mM afin de retirer quelque radiotracer qui aurait pu être adsorbé.

Les calculs d'efficacité d'assimilation (% AE) ont été réalisés en traçant une régression non-linéaire ( $A = AE e^{-bt}$ , où A est le pourcentage de radioactivité ingérée qui est retenu par le prédateur pendant la période de perte du compartiment d'échange lent (perte physiologique), AE est l'efficacité d'assimilation, b est la constante du taux de dépuración du compartiment de perte lente et t est le temps de dépuración) sur nos données de perte de l'élément trace après 3 ou 4 jours (soit lorsqu'il n'y avait plus de matières fécales radioactives dans le tractus du prédateur), puis en déterminant l'intercepte en y pour estimer les pourcentages d'AE du  $^{109}\text{Cd}$  ou du  $^{75}\text{Se}$  (Wallace et al. 1998 ; Wang et Fisher, 1999). Puisque les prédateurs ont reçu plus d'un repas contaminé, nous avons effectué des corrections afin d'évaluer exclusivement la perte associée au dernier repas contaminé en présumant que la perte de  $^{109}\text{Cd}$  suivant un repas de *T. tubifex* était linéaire après 12 jours. La même méthode a été appliquée pour les expériences avec le  $^{75}\text{Se}$ . Cette correction n'était pas nécessaire suite à un repas de *C. riparius* puisque lorsque cette espèce était ingérée, la perte physiologique du Cd par le prédateur n'était pas mesurable après 4 jours en raison des concentrations de Cd plus faible chez *C. riparius*.

### Distribution subcellulaire du Cd et du Se chez les proies

La radioactivité a été mesurée dans les échantillons de proies ; -85 mg de poids humide pour *C. riparius* et -150 mg poids humide pour *T. tubifex*. Ces derniers ont ensuite été homogénéisés à la main (25 tours dans un homogénéisateur de verre de 2 ml, sur glace, dans un tampon Tris (25 mM Omnipure 9210, 99.8% de pureté, à pH ajusté à 7.2 avec du HCl 35% de grade trace-métal pour un ratio tissus : tampon de 1 : 4 pour *T. tubifex* et de 1 : 8 pour *C. riparius*). Les tissus homogénéisés étaient alors retournés dans leur microtube initial et des aliquots de 30  $\mu\text{l}$  ont été prélevés puis déposés sur des feuilles de Teflon pré-pesées en vue des mesures totales et radioactives de Cd et de Se.

À l'aide d'une technique de fractionnement utilisant une série de centrifugations différentielles (Wallace et al. 1998 ; Cain et al. 2004 ; Giguère et al. 2006), on définira opérationnellement cinq fractions : 1) débris cellulaires et noyaux ; 2) granules et exosquelette ; 3) organites et lysosomes ; 4) protéines dénaturées par la chaleur comme les enzymes (« Heat-Denatured Proteins » - HDP) ; 5) protéines stables à la chaleur incluant la métallothionéine, les glutathions, les petits peptides et les acides aminés (« Heat-Stable Proteins » - HSP). Pour les détails de la procédure voir le schéma de la figure 6.

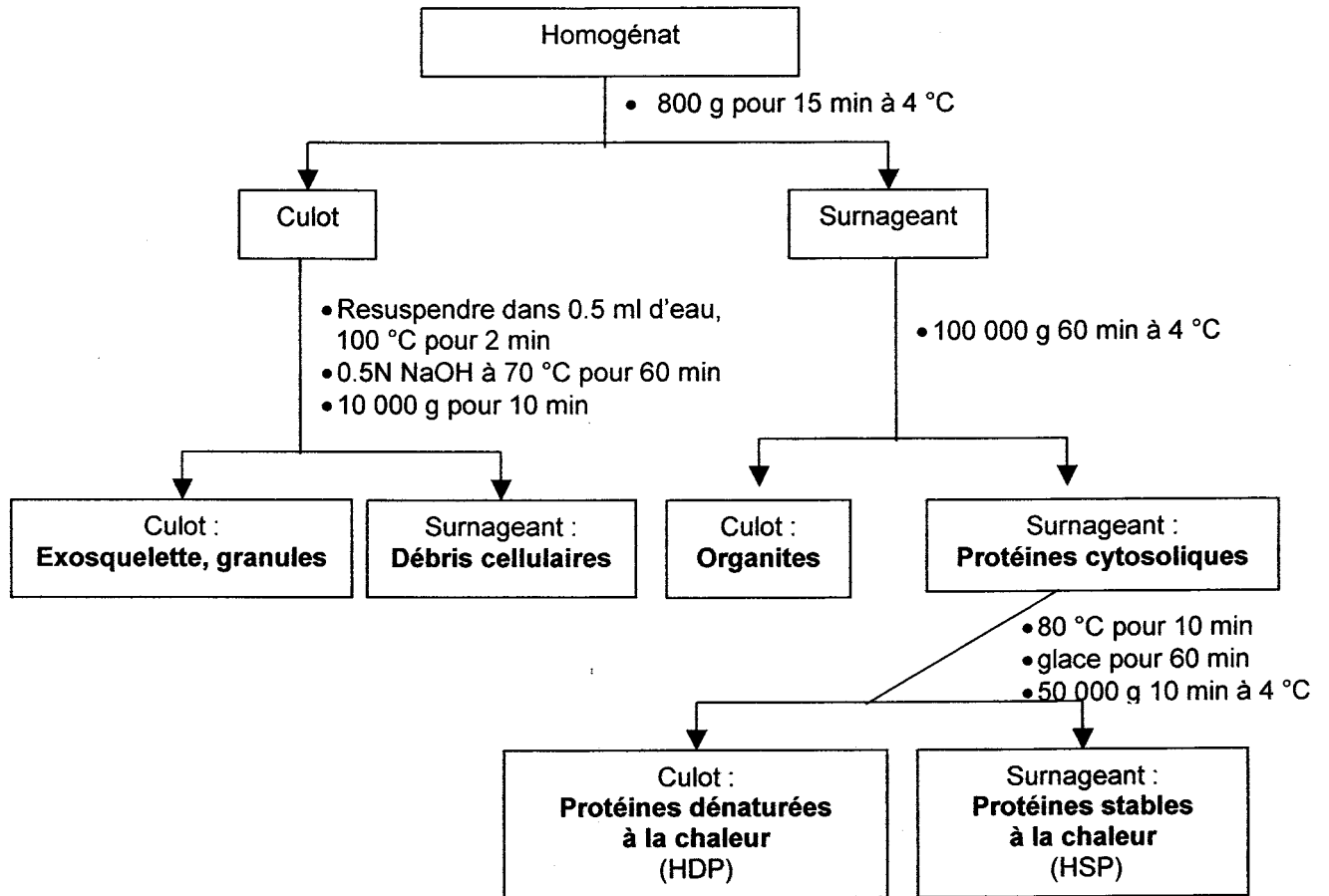


Figure 6.

Schéma de la procédure utilisée pour isoler les cinq fractions cellulaires opérationnellement définies

### Mesure de la radioactivité

La radioactivité a été mesurée avec un compteur-gamma (1480 Wallac Wizard 3, NaI well-type). Les émissions gamma pour le  $^{109}\text{Cd}$  et pour le  $^{75}\text{Se}$  ont été déterminées pour les fenêtres de 16-32 keV et de 60-365 keV, respectivement. L'efficacité de comptage (30% pour le  $^{109}\text{Cd}$  ; 100% pour le  $^{75}\text{Se}$ ) et la géométrie des échantillons ont été considérées et les temps de comptage ont été ajustés de façon à obtenir une erreur de comptage  $< 5\%$ . La somme moyenne des fractions radioactives ( $\pm$  ET) était près des valeurs mesurées pour les homogénats avant la procédure de fractionnement, ainsi pour le Cd on obtenait un pourcentage de recouvrement de  $90.1 \pm 4.9\%$  pour *T. tubifex* et de  $88.1 \pm 2.0\%$  pour *C. riparius*. Quant au Se on retrouvait  $93.7 \pm 2.1\%$  et  $89.1 \pm 2.8\%$  chez *T. tubifex* et *C. riparius*, respectivement. Ceci suggère donc que la perte des éléments était plutôt faible à la fin de la procédure de centrifugation différentielle.

### Analyse des éléments traces totaux

Tout le matériel de laboratoire a été trempé dans du  $\text{HNO}_3$  15% pour au moins 12 h, rincé avec de l'eau ultrapure et séché sous une hotte à flux laminaire. Les aliquotes congelés des tissus homogénéisés ont été lyophilisés (FTS Systems<sup>TM</sup>) dans leur microtubes, pesés, puis digérés dans du  $\text{HNO}_3$  de grade métal-trace ( $100 \mu\text{l mg}^{-1}$  de tissus secs) pour 5 jours à la température de la pièce. Ensuite  $40 \mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a été ajouté et la digestion s'est poursuivie pour 1 jour supplémentaire. Les échantillons ont été dilués avec  $860 \mu\text{l}$  d'eau ultrapure avant l'analyse du Cd et du Se total par ICP-MS (Thermo Instrument, X7). Un matériel de référence certifié (Conseil National de Recherche du Canada TORT-2 - hépatopancréas de homard) et de poids comparable aux échantillons a été soumis à la même procédure de digestion. Le pourcentage de récupération du Tort-2 était de  $102 \pm 4\%$  pour le Cd et de  $100 \pm 4\%$  pour le Se. Des échantillons de 0.1 g de sédiments secs ont été digérés dans 5 ml de  $\text{HNO}_3$  pour 5 jours, puis 2 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a été ajouté, la digestion s'est poursuivie pendant une journée puis les échantillons ont été dilués pour obtenir un volume final de 50 ml. Un matériel de référence certifié (Conseil National de Recherche du Canada MESS-3 - sédiment marin) a été utilisé afin d'évaluer l'efficacité de la digestion avec des pourcentages de récupération de  $105 \pm 2\%$  et de  $96 \pm 2\%$  pour le Cd et le Se, respectivement.

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### 1. EXPÉRIENCES AVEC LE CADMIUM

Les concentrations totales de Cd chez le ver *T. tubifex* ont augmenté approximativement linéairement durant les 4 semaines d'exposition dans les sédiments contaminés (fig. 7a). Gillis et al. (2004) ont aussi observé une prise en charge linéaire du Cd par cette espèce, et ce, sur une période de 6 semaines. De la même façon, les concentrations en Cd dans les trois fractions subcellulaires majoritaires (débris, organites, HDP) ont augmenté avec les concentrations internes de *T. tubifex*, alors que les fractions HSP et granules tendent vers un plateau (fig. 8a). Steen-Redeker et al. (2007) ont aussi rapporté un plateau dans les concentrations en Cd de ces deux fractions suite à une exposition au Cd de *T. tubifex* pendant 2 semaines. Nous n'avons pas noté d'effet toxique tel qu'une diminution de la croissance ou une hausse de la mortalité chez les vers exposés.

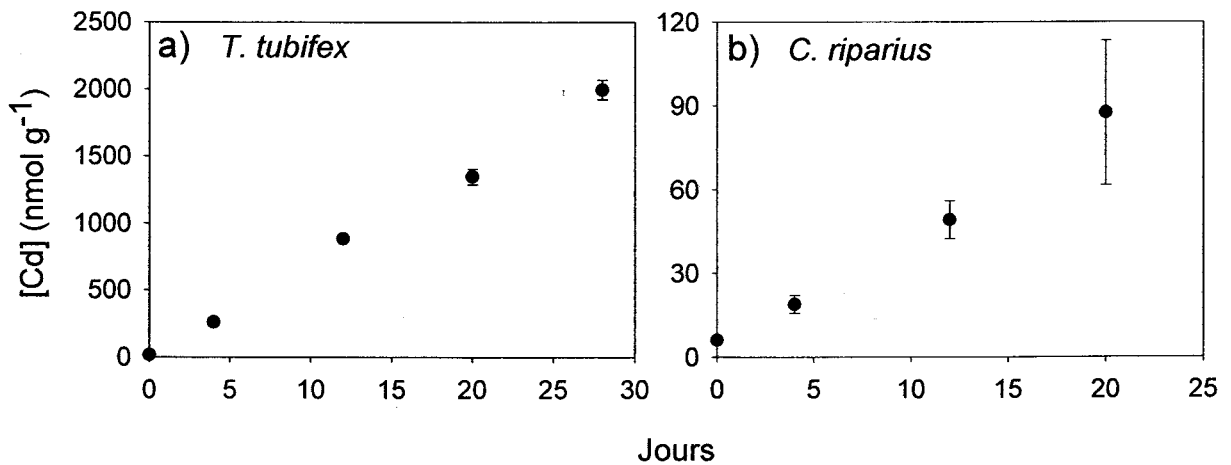


Figure 7.

Évolution temporelle des concentrations totales de Cd (moyennes  $\pm$  ES, n = 4 échantillons composés) des deux espèces de proies exposées dans des microcosmes dont les sédiments et l'eau surnageante étaient contaminés au Cd.



Une minorité du Cd (~34%) se retrouvait dans le cytosol (HDP + HSP) des cellules de *T. tubifex*, tout comme Steen-Redeker et al. (2007) l'avaient observé antérieurement (32-46%). Les proportions moyennes ( $\pm$  ES) en Cd dans les différentes fractions subcellulaires se classaient ainsi par ordre d'importance ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis puis comparaison multiple avec Student-Newman-Keuls (SNK)) : débris ( $35\% \pm 3\%$ ) > organites ( $27\% \pm 3\%$ ) > HDP ( $22\% \pm 1\%$ ) > HSP ( $12\% \pm 1\%$ ) > granules ( $2\% \pm 0.5\%$ ) (fig. 9a). Steen-Redeker et al. (2007) ont aussi retrouvé une grande proportion (26%) de Cd associé à la fraction organites de *T. tubifex* contaminés au Cd ; l'importance de cette fraction organites est probablement due à la présence de chloragosomes et de lysosomes, qui sont reconnus comme étant des sites de stockage de choix pour les métaux chez les oligochètes terrestres (Back, 1990 ; Affar et al. 1998 ; Peeters-Joris, 2000 ; Morgan et Turner, 2005). Chez les vers de terre, les chloragosomes sont quasi sphériques, leur diamètre varie largement et ils traversent une large gamme de stades développementaux tel que reflété par l'hétérogénéité de leur densité électronique (Cancio et al. 1995). Ces organites montrent aussi une activité lysosomale (phosphatase acide) chez les vers de terre exposés aux métaux (Morgan et al. 2002). Si les lysosomes et les granules qui sont présents chez les oligochètes tubificidés (Wallace et al. 1998) montrent cette vaste gamme de morphologies et de fonctions comme dans le cas des chloragosomes des oligochètes terrestres, alors on pourrait penser que ces structures pourraient être à même d'influencer l'assimilation des métaux par des prédateurs aquatiques.

La petite proportion de Cd (2%) retrouvée dans la fraction granules est identique à celle reportée par Wallace et al. (1998) pour un oligochète tubificidé (*Limnodrilus hoffmeisteri*) récolté dans un site non-contaminé. Toutefois, à des concentrations élevées en Cd, cette même espèce avait  $\approx 30\%$  de son  $^{109}\text{Cd}$  associé aux granules (Wallace et al. 1998), et une valeur similaire a aussi été observée chez *T. tubifex* pour le Cd total associé aux granules (Steen-Redeker et al. 2007). Toutefois, les comparaisons entre nos résultats et ceux des études ci-haut doivent être faites avec prudence puisque, dans ces autres études, les expositions au Cd avaient lieu dans l'eau seulement, ce qui influence la route de prise en charge (épiderme versus tractus intestinal) et donc, peuvent affecter la distribution interne et la répartition subcellulaire du Cd. L'histoire de pré-exposition des animaux expérimentaux peut aussi influencer la distribution des métaux au niveau cellulaire (Wang et Rainbow, 2005).

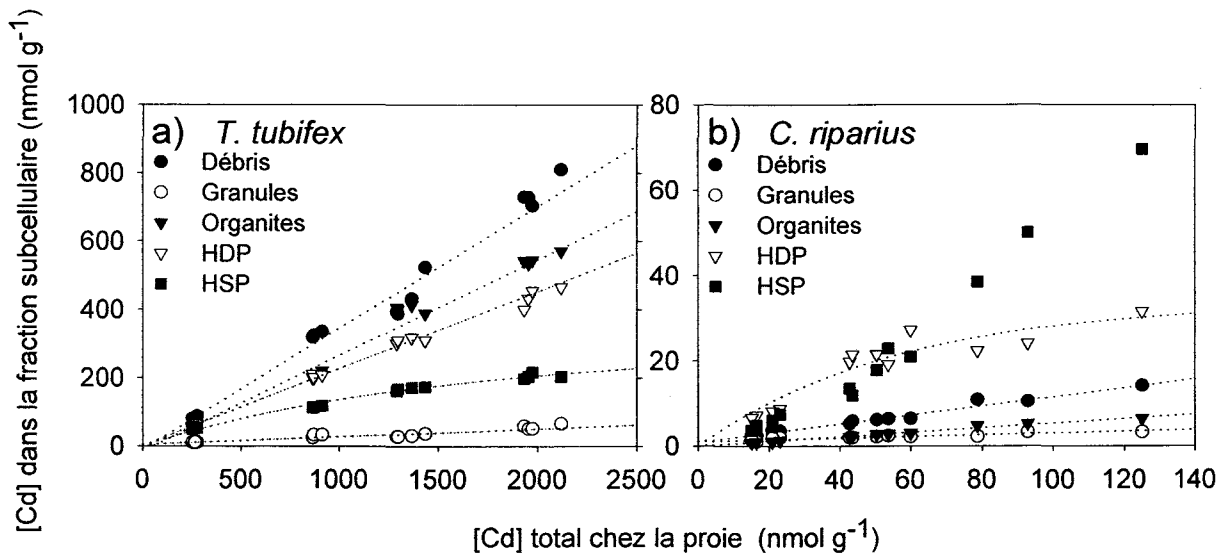
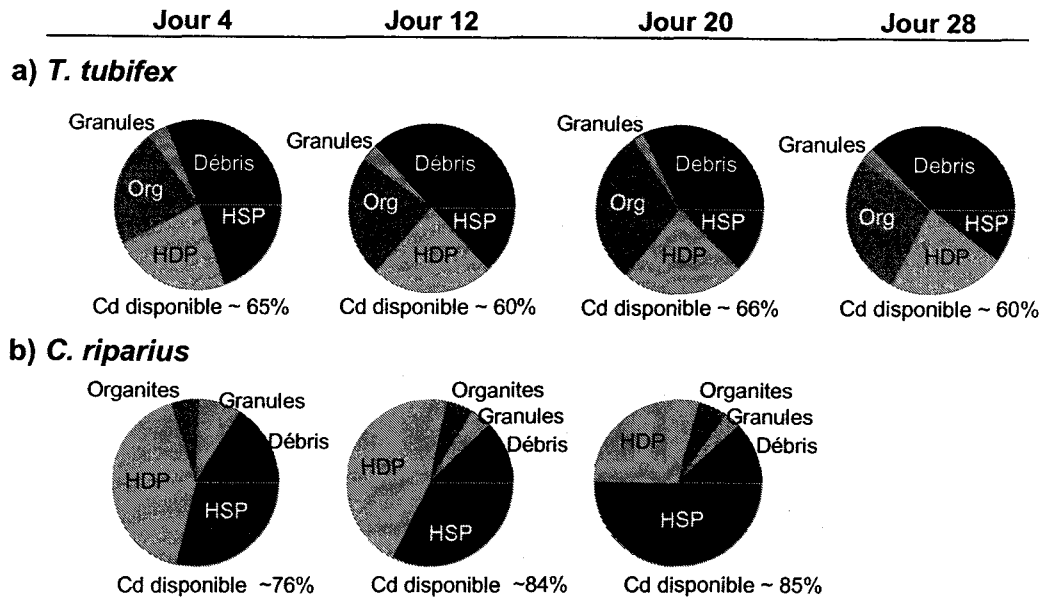


Figure 8.

Concentrations totales de Cd dans les proies (ces [Cd] différentes résultaient des différentes durées d'exposition) en relation avec les concentrations de Cd dans les cinq fractions subcellulaires opérationnellement définies (débris, granules, organites, protéines dénaturées par la chaleur (HDP), protéines stables à la chaleur (HSP)). Chaque point représente un échantillon composite de proies.

La distribution des proportions de Cd parmi les compartiments subcellulaires de *T. tubifex* ont varié très faiblement dans le temps, avec une exception notable de la fraction HSP qui était plus élevée au début de la période d'exposition (fig. 9a). Steen-Redeker et al. (2007) ont noté que le Cd total dans la majorité des fractions subcellulaires a peu changé pendant la durée de l'exposition, sauf pour la fraction organites qui augmentait (de 10 à 26%), et la fraction HSP, qui diminuait (de 14 à 6%). Si nous assumons que le Cd retrouvé dans les organites et dans les fractions HDP et HSP est disponible pour un prédateur (Wallace et Luoma, 2003), alors la majorité du Cd chez *T. tubifex* (60-65% ; fig. 11a, cercles) devrait être disponible pour *S. velata*.



**Figure 9.**

Pourcentages de Cd (moyennes,  $n = 4$ ) dans les cinq fractions subcellulaires (détaillées dans la description de la fig. 3) qui ont été isolées à partir de proies exposées au Cd pour différentes durées. Org = organites. La fraction de Cd disponible au prédateur (HDP + HSP + organites) est aussi indiquée sous les graphiques.

#### Le Cd dans la proie *C. riparius*

L'accumulation du Cd chez *C. riparius* était aussi approximativement linéaire durant la période d'exposition totalisant 20 jours, mais les concentrations en Cd étaient beaucoup plus faibles que celles de *T. tubifex* (fig. 7). La variabilité de la prise en charge par *C. riparius* semblait aussi augmenter avec le temps (fig. 7b). Les concentrations en cadmium dans les fractions subcellulaires augmentaient en même temps que les concentrations totales de *C. riparius* (fig. 8b). Les proportions moyennes ( $\pm$  ES) de Cd chez cet animal se classaient comme suit par ordre d'importance ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis puis comparaison multiple avec Student-Newman-Keuls (SNK)) : HDP ( $39\% \pm 8\%$ ) - HSP ( $37\% \pm 10\%$ ) > débris ( $13\% \pm 2\%$ ) > organites ( $5\% \pm 0.3\%$ ) - granules ( $5\% \pm 2\%$ ). Donc, la majorité du Cd chez *C. riparius* se retrouvait dans le cytosol (HDP + HSP), contrairement à *T. tubifex* chez qui le Cd cytosolique ne contribuait que pour un tiers du total. Similairement, Yamamura et al. (1983) et Seidman et al. (1986) ont vu 60 et 75% du Cd dans le cytosol des larves de *Chironomus yoshimatsui* et *Chironomus thummi*, respectivement. Les proportions de Cd dans les différentes fractions subcellulaires ont généralement peu varié avec le temps d'exposition de cette proie (fig. 9b) ; toutefois, après 20 jours d'exposition, les fractions protéiques ont changé dans leur importance relative. En effet, en fin d'exposition, la proportion de Cd dans la fraction HSP avait presque doublé alors que dans la fraction HDP, la

proportion de Cd avait diminué environ du tiers. Un taux de mortalité de 30% a aussi été noté à la fin de l'exposition indiquant possiblement une incapacité de certains animaux à détoxifier le métal. La majorité du Cd chez *C. riparius* était potentiellement disponible à la prise en charge par un prédateur (Fig. 11a, cercles).

#### Le transfert trophique du cadmium

Suite à un repas de l'une ou l'autre des proies, le prédateur *S. velata* a initialement perdu rapidement le Cd ingéré, principalement sous la forme de fèces, puis le taux de perte a diminué à mesure que la perte physiologique du Cd devenait la seule contribution dans le déclin de son contenu en Cd (fig. 10). Les courbes de perte pour les proies exposées au métal pour différentes périodes de temps était toutes similaires, quoi qu'une certaine tendance est apparue pour le prédateur de retenir moins de Cd lorsqu'il avait consommé *C. riparius* qui avait été exposée pour une plus courte durée de temps (fig. 10), cette tendance n'était toutefois pas significative ( $p > 0,05$ ).

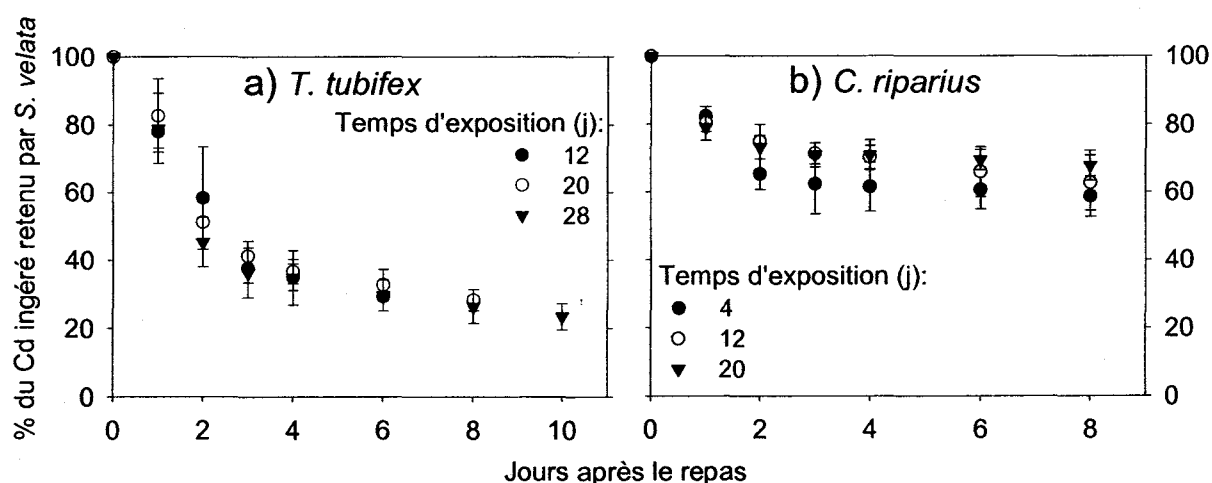


Figure 10.

Courbe de rétention du Cd dans le temps chez le prédateur *S. velata* suite à la consommation (au temps 0) d'un repas contaminé, soit de *T. tubifex*, soit de *C. riparius*, ayant été exposés au Cd pour différentes périodes de temps.

En utilisant les données de perte de *S. velata* (fig. 10), nous avons estimé (voir la section méthodes) l'efficacité avec laquelle le prédateur assimilait le Cd de ses proies. Le métal a été assimilé efficacement (fig. 11, cercles) avec un minimum moyen de 46% (pour *T. tubifex*), une valeur se rapprochant de celle reportée pour *S. velata* nourrit avec le chironomide *Cryptochironomus* sp. (~50% ; Roy et Hare, 1999). Les efficacités d'assimilation pour des repas de *C. riparius* (~72%) sont encore plus élevées que celles de *T. tubifex* (fig. 11, cercles). Des valeurs observées pour l'assimilation du Cd chez plusieurs autres invertébrés aquatiques sont dans la gamme de celles mesurées ici pour *S. velata*, par exemple, la larve de *Chaoborus*

*americanus* se nourrissant de copépodes (58%; Croteau et al. 2001 ; Orvoine et al. 2006), une mite d'eau nourrie avec *C. riparius* (61% ; Timmermans et al. 1992), une crevette avec une diète d'amphipodes (~62% ; Seebaugh et al. 2006) et le crustacé *Mysis relicta* se nourrissant de *Daphnia magna* (72% ; Smokorowski et al. 1998).

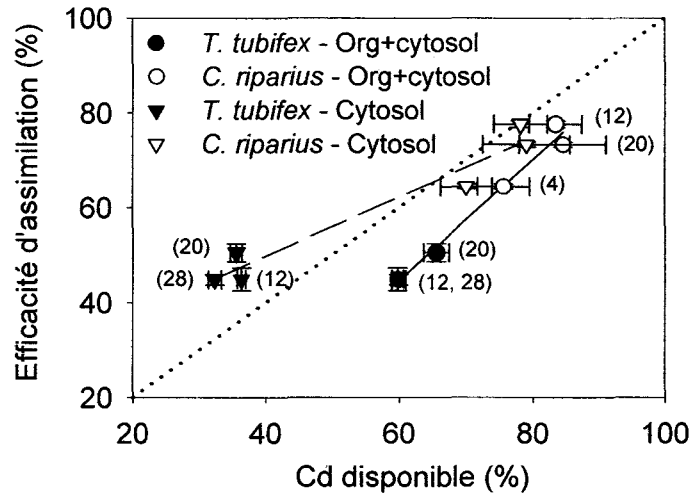


Figure 11.

Efficacités d'assimilation (% , moyennes  $\pm$  ES, n = 5) du Cd par *S. velata* lorsque nourri avec *T. tubifex* ou bien *C. riparius* comparativement au pourcentage de Cd qui est possiblement disponible, tel que prédit par le fractionnement subcellulaire des proies (moyennes  $\pm$  ES, n = 4) : les triangles représentent le cas où le métal disponible est présent dans la fraction cytosolique des proies (HDP + HSP), alors que les cercles considèrent le métal disponible comme étant la somme des fractions cytosoliques et de la fraction organites (Org) des proies. Les valeurs à proximité des points de données représentent les durées de temps (jours) pour lesquelles les proies ont été exposées au Cd. La ligne pointillée est une relation 1:1. Les lignes hachurées et pleines sont des régressions linéaires posées sur chacun des cas expliqués ci-haut.

Pour certaines combinaisons d'organismes prédateurs-proies, l'efficacité d'assimilation du Cd est reconnue, d'une part, pour être dépendante de la concentration dans les proies. Donc, lorsque les concentrations en Cd dans les proies sont élevées, le pourcentage d'assimilation par le prédateur est plus faible (Reinfelder et al. 1998 ; Xu et al. 2001 ; Guan et Wang, 2004 ; Seebaugh et al. 2005). Nos résultats suggèrent que ce n'est pas le cas pour *S. velata* puisque, pour une proie donnée, l'efficacité d'assimilation du Cd n'était pas reliée à la durée de l'exposition au Cd de la proie, cette dernière étant directement reliée à la concentration de la proie (fig. 7).

D'autre part, l'efficacité d'assimilation du cadmium a aussi été démontrée comme étant dépendante de la disponibilité du métal chez les proies. En effet, nos données suggèrent qu'il y a une relation fortement positive ( $p < 0.001$ ) entre l'efficacité d'assimilation du Cd à partir d'une proie donnée et le pourcentage du Cd qui est associé aux somme des fractions d'organites, de HDP et de HSP de la proie (fig. 11). Cependant, la relation entre ces variables

s'avère être inférieure à 1:1 (fig. 11, cercles), ce qui suggère que l'une de ces fractions ne serait pas entièrement disponible au prédateur. Tel que discuté plus haut, la fraction organites de *T. tubifex* serait probablement un amalgame de chloragosomes et de lysosomes qui varient largement en structure et en fonction et donc influencerait la facilité avec laquelle le Cd s'en dissocierait dans le tractus du prédateur. Si nous considérons uniquement le Cd dans le cytosol des proies (fig. 11, triangles), nos points de données pour *C. riparius* se retrouveraient plus près de la ligne 1:1 (les organites contenant seulement 5% du Cd) tandis que les points pour *T. tubifex* tomberaient maintenant au-dessus de la ligne 1:1. Ce résultat suggère donc qu'une partie, mais pas tout le Cd dans la fraction organites, est disponible à l'assimilation par le prédateur. La meilleure façon de positionner les points sur la ligne 1:1 est lorsque nous assumons que 45% du Cd dans la fraction organites de *T. tubifex* est disponible au prédateur (fig. 12a, triangles).

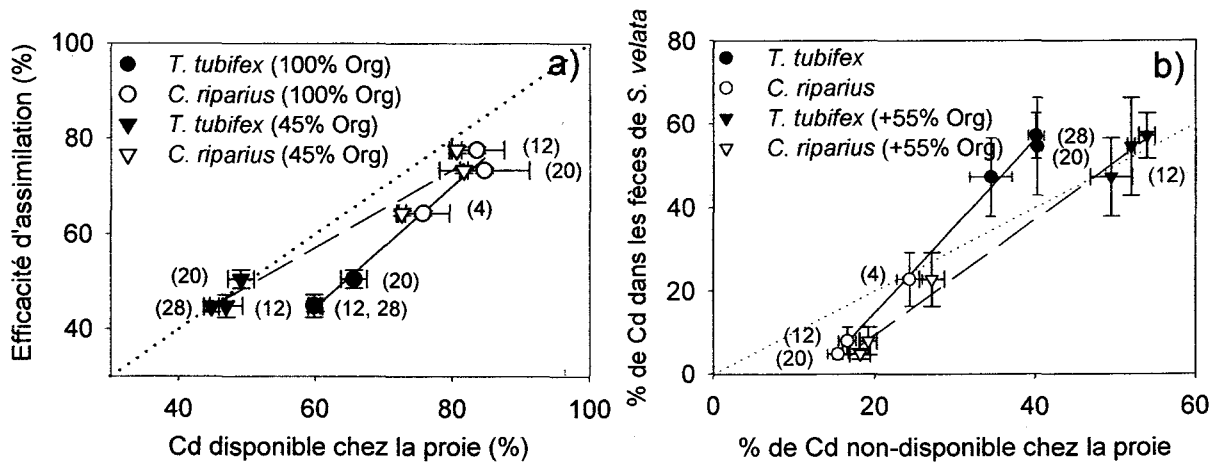


Figure 12.

a) Efficacités d'assimilation (% , moyennes  $\pm$  ES) du Cd par *S. velata* lorsque nourri avec *T. tubifex* ou bien *C. riparius* comparativement au pourcentage de Cd qui est possiblement disponible, tel que prédit par le fractionnement subcellulaire des proies (moyennes  $\pm$  ES) : les cercles considèrent le métal disponible comme étant la somme des fractions cytosoliques (HDP + HSP) et de la totalité (100%) de la fraction organites (Org) des proies ; les triangles représentent le cas où le métal disponible est présent dans la fraction cytosolique des proies en plus de 45% de la fraction organites.

b) Pourcentage représentant les fèces produites à partir du Cd total ingéré via les proies par le prédateur *S. velata* comparé aux pourcentages de Cd chez les deux proies qui est possiblement non-disponible à l'assimilation par le prédateur. Les cercles réfèrent à un cas où le Cd non-disponible se retrouve dans les fractions débris + granules des proies ; les triangles considèrent un scénario où un 55% de Cd additionnel provenant de la fraction organites n'est pas disponible au prédateur. Les valeurs à proximité des points de données représentent les durées de temps (jours) pour lesquelles les proies ont été exposées au Cd. Les lignes pointillées sont les relations 1:1.

Nous pouvons tester l'hypothèse qu'une partie seulement du Cd dans la fraction organite est disponible pour l'assimilation au prédateur en comparant les proportions de Cd mesurées dans les fèces du prédateur (i.e. métal non-absorbé) avec les proportions de Cd de la proie qui sont

susceptibles d'être résistantes à la digestion. Tel que prédit, le % de Cd présent dans les fèces de *S. velata* était directement relié ( $p < 0.001$ ) à la somme des pourcentages présent dans les fractions subcellulaires de la proie qui sont reconnues pour être non-assimilables par un prédateur à digestion simple (fractions débris + granules) (fig. 12b, cercles). Donc, si nous assumons tel que décrit précédemment, que 55% de la fraction organites n'est pas assimilée, alors les points pour *T. tubifex* se retrouvent très près de la ligne 1:1 (fig. 12b, triangles). Wallace et al. (1997) ont nourri la crevette *Palaemonetes pugio* avec une fraction pure d'organites provenant d'oligochètes exposés au cadmium (*Limnodrilus hoffmeisteri*) et ont trouvé que le prédateur n'assimilait que 70% du Cd associé à cette fraction. Ces données supportent l'idée que la fraction organites est un amalgame hétérogène de particules variant dans leur digestibilité par le prédateur.

## 2. EXPÉRIENCES AVEC LE SÉLÉNIUM

### 2.1 Le sélénium dans la proie *T. tubifex*

Suite à une exposition de 12 jours dans les sédiments et à l'eau surnageante contaminés en Se, les concentrations en Se chez l'oligochète *T. tubifex* ont augmenté d'environ 50% (jusqu'à ~90 nmol g<sup>-1</sup> ou 7 µg g<sup>-1</sup>) (fig. 13a). Par la suite, les concentrations en Se sont demeurées à peu près constantes (fig. 13a) tout comme les concentrations de cet élément dans les différentes fractions subcellulaires (fig. 14a). Nous n'avons pu trouver d'autre publication concernant des mesures de Se chez les oligochètes d'eau douce avec lesquelles nous aurions pu comparer nos résultats. La distribution des proportions de Se à l'intérieur des fractions subcellulaires a très peu varié entre les jours 12 et 28 (fig. 15a) et les diverses fractions se classent comme suit (moyenne ± ES,  $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis puis comparaisons multiples avec Student-Newman-Keuls (SNK)) : débris (~36% ± 9%) - HSP (29% ± 7%) > organites (23% ± 2%) > HDP (11% ± 2%) > granules (1% ± 0.5%). Une minorité (~40%) du Se total était localisé dans le cytosol de ces vers (HDP + HSP). Si nous présumons que seul le Se cytosolique et celui dans la fraction organites peuvent être assimilé par un prédateur (Wallace et al. 2003), alors la majorité (~63%) du Se chez *T. tubifex* devrait être disponible à *S. velata*.

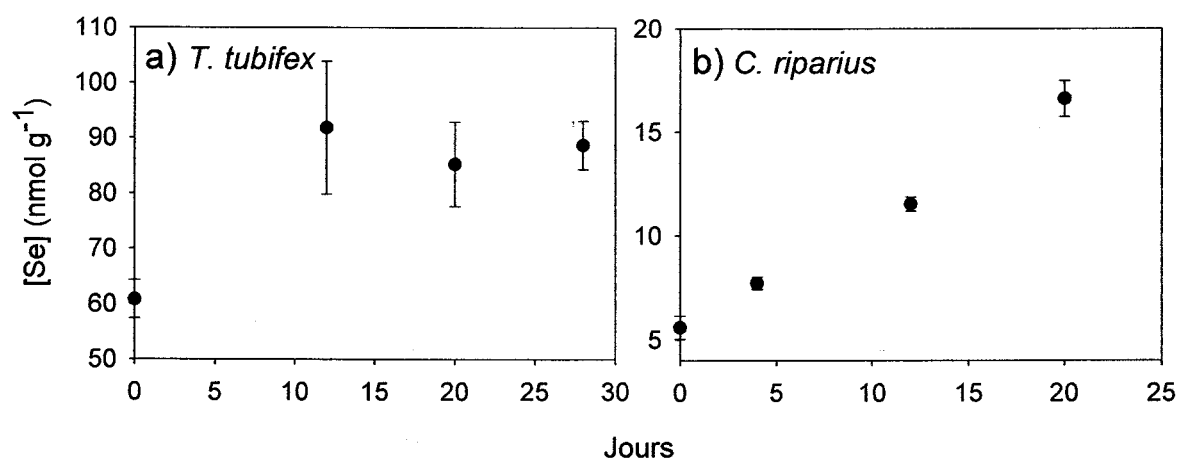


Figure 13.

Changeement temporel des concentrations totales de Se (moyennes ± ES, n = 4 échantillons composés) des deux espèces de proies exposées dans des microcosmes dont les sédiments étaient contaminés au Se.



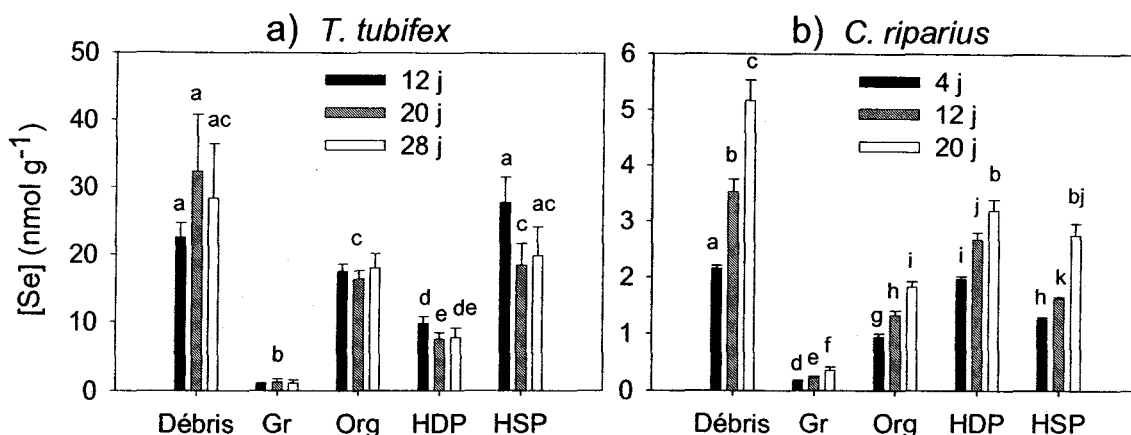


Figure 14.

Concentrations de Se (moyennes + ES, n = 4) dans les 5 fractions opérationnellement définies de proies qui ont été exposées au Se durant 28 jours (*T. tubifex*, a) ou 20 jours (*C. riparius*, b). Fractions: débris, granules (Gr), organites (Org), HDP (protéines dénaturées à la chaleur), et HSP (protéines stables à la chaleur). Les lettres différentes indiquent une différence significative ( $p < 0.05$ ) entre les moyennes.

## 2.2 Le sélénium dans la proie *C. riparius*

L'accumulation du sélénium chez la larve de l'insecte *C. riparius* s'est faite de manière linéaire pendant les 20 jours d'exposition (fig. 13b). Les concentrations de Se maximales atteintes à ce terme ( $\sim 17 \text{ nmol g}^{-1}$  ou  $1.3 \mu\text{g g}^{-1}$ ) étaient environ 5 fois plus faibles que celles rencontrées chez *T. tubifex*. Des concentrations de Se beaucoup plus élevées que nos mesures ont été obtenues dans une autre étude avec *Chironomus decorus* ( $400 \text{ nmol g}^{-1}$  après 4 jours d'exposition ; Alaimo et al. 1994). Dans les fractions subcellulaires, les concentrations en sélénium chez *C. riparius* ont augmenté graduellement au fil du temps (fig. 14b). En regardant les proportions relatives des fractions, celles-ci se classaient ainsi par ordre d'importance (moyenne  $\pm$  ES ;  $p < 0.05$ , même test statistique que ci-haut) : débris ( $\sim 37\% \pm 3\%$ ) > HDP ( $\sim 28\% \pm 3\%$ ) > HSP ( $\sim 19\% \pm 1\%$ ) > organites ( $\sim 14\% \pm 1\%$ ) > granules ( $\sim 2\% \pm 0.4\%$ ). Une légère tendance à la baisse a été remarquée du côté des proportions de Se dans la fraction HDP alors qu'une hausse a été notée dans la fraction débris (fig. 15b). Le Se cytosolique contribuait pour  $\sim 47\%$  du total, alors que la proportion de Se dans *C. riparius* qui était potentiellement disponible pour le prédateur était  $\sim 61\%$ . Cette dernière valeur est quasi identique à la valeur obtenue pour *T. Tubifex* ( $\sim 63\%$ ). L'importance relative du Se dans les deux fractions protéiques (HDP + HSP) était inversée en comparant les deux espèces de proies.

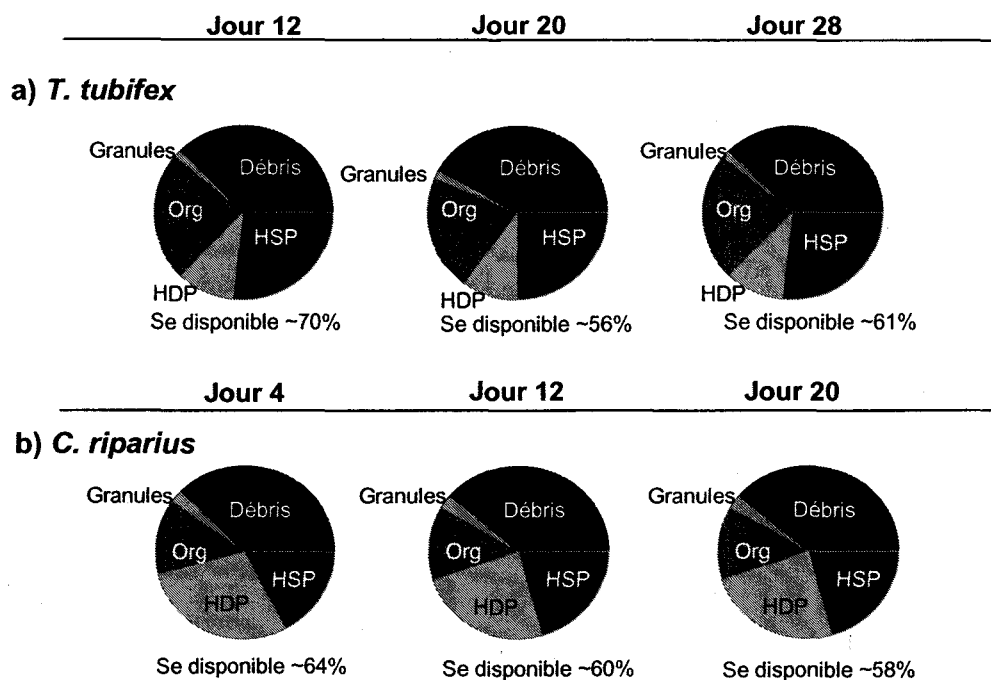


Figure 15.

Pourcentages de Se (moyennes, n = 4) dans les cinq fractions subcellulaires qui ont été isolées à partir de proies exposées au Se pour différentes durées. Org = organites, HDP = protéines dénaturées à la chaleur, HSP = protéines stables à la chaleur.

### 2.3 Le transfert trophique du sélénium

La dépuration du Se chez le prédateur *Sialis velata*, lorsque nourri avec l'une ou l'autre des proies, montrait un modèle de perte caractérisé par deux phases ; soit une perte rapide engendrée par l'évacuation du tractus digestif du contenu contaminé au Se, puis un ralentissement lorsque la perte physiologique est devenue dominante (fig. 16). Les pertes du Se par les fèces semblaient plus rapide suite à un repas de *C. riparius* (2 jours) comparativement à *T. tubifex* (3-4 jours). La durée d'exposition des proies semblaient avoir peu d'influence sur la perte de Se chez le prédateur, avec l'exception apparente des données obtenues pour *T. tubifex* contaminé pendant 28 jours (fig. 16a) pour lequel l'activité dans les fèces a confirmé une perte rapide du <sup>75</sup>Se entre les jours 2 et 3. Il est difficile d'expliquer cette perte sauf pour dire qu'elle n'était pas due aux différences de répartition subcellulaires chez les proies qui ont été consommées puisque les modèles de distribution subcellulaire du Se chez les proies exposées durant 28 jours ne différaient pas substantiellement des proies exposées durant 12 ou 28 jours (fig. 15). Afin d'éliminer la possibilité que les différences chez les proies puissent être à la source de cette anomalie apparente, nous avons nourri un prédateur individuel, qui n'avait pas

été pré-exposé au Se via des proies contaminées, avec un repas de vers ayant été exposé au Se pendant 28 jours ; la tendance de perte pour cet individu s'est révélée être très similaire à celui des prédateurs qui avaient ingéré des proies exposées pendant 20 jours (fig. 17).

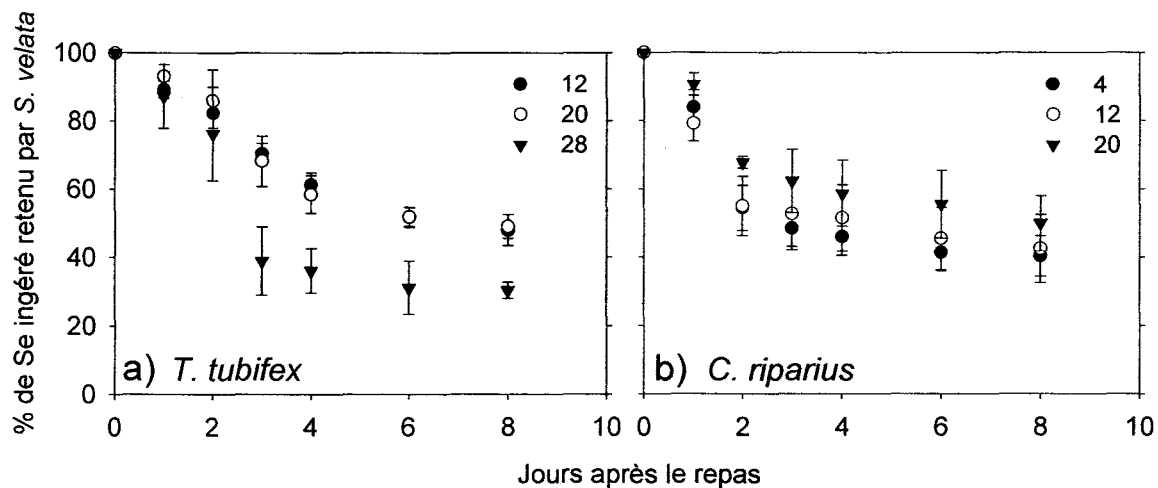


Figure 16.

Courbe de rétention du Se dans le temps chez le prédateur *S. velata* suite à la consommation (au temps 0) d'un repas contaminé, soit de *T. tubifex* (a) ; soit de *C. riparius* (b), ayant été exposés au Se pour différentes périodes de temps. Valeurs moyennes  $\pm$  ES pour différents groupes de *S. velata* (pour *T. tubifex* n = 7, alors que pour *C. riparius* n = 8 (4 j), 4 (12 j) ou 3 (20 j)).

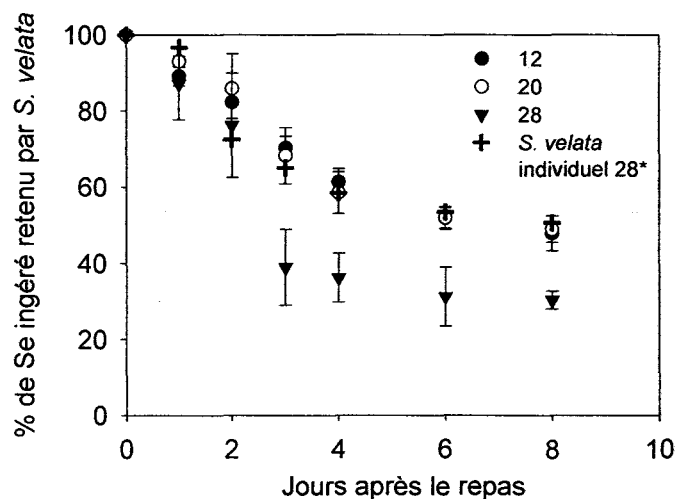


Figure 17.

Courbe de rétention du Se dans le temps chez le prédateur *S. velata* (moyennes  $\pm$  ES) suite à la consommation (au temps 0) d'un repas contaminé de *T. tubifex* ayant été exposés au Se pour différentes périodes de temps. Les symboles en croix indiquent l'individu non-contaminé qui avait été nourri avec un repas de *T. tubifex* exposés durant 28 jours.

En utilisant ces données de perte de Se, nous avons pu estimer l'efficacité de transfert du Se entre proie et prédateur. *Sialis velata* a assimilé la majorité du Se qui était présent dans les deux types de proies, avec des efficacités d'assimilation moyennes pour tous les temps d'exposition de ~70% pour *T. tubifex* (en excluant les données du jour 28 dans la figure 16a) et ~62% pour *C. riparius*. Nous avons trouvé que les efficacités d'assimilation n'étaient pas dépendantes de la durée d'exposition des proies ( $p > 0,05$ ) pour l'une ou l'autre des proies, ce qui est en accord avec la constance de la répartition subcellulaire du Se dans le temps chez les proies. Néanmoins, les concentrations de Se chez *C. riparius* ont augmenté dans le temps (fig. 13b), ce qui n'a pourtant pas amené une réduction dans l'efficacité d'assimilation (fig. 16b) tel qu'on l'a reporté chez certains invertébrés prédateurs (Xu et al. 2001 ; Guan et Wang, 2004 ; Seebaugh et al. 2005).

Les données, trop peu nombreuses, qui sont disponibles concernant les estimations de l'assimilation du Se par les invertébrés aquatiques prédateurs suggèrent généralement que le Se provenant des proies est assimilé de manière efficace. Ainsi, les mysides et les balanes (des crustacés) assimilent la majeure partie du Se présent dans des copépodes (61-73% (Schlekat et al. 2004) et 74% (Rainbow et Wang, 2001), respectivement), ce qui est similaire aux résultats de notre étude concernant *S. velata* (62-70%).

La proportion moyenne de Se chez les proies qui était disponible à la prise en charge par le prédateur (~62%) est très similaire à l'efficacité d'assimilation moyenne pour le Se contenu dans les deux types de proies (~66%), ce qui laisse présager qu'une variable peut être utilisée dans le but de prédire l'autre. Toutefois, les valeurs prises individuellement pour chaque temps d'exposition et espèce de proie ne tombent pas exactement sur une relation 1 : 1 entre le pourcentage de Se qui est potentiellement disponible au prédateur (HDP + HSP + organites) et l'efficacité d'assimilation (fig. 18), suggérant ainsi que la distribution subcellulaire du Se chez les proies peut être utilisée afin d'obtenir une approximation de l'efficacité d'assimilation par le prédateur, mais n'est pas un prédicateur parfaitement exact.

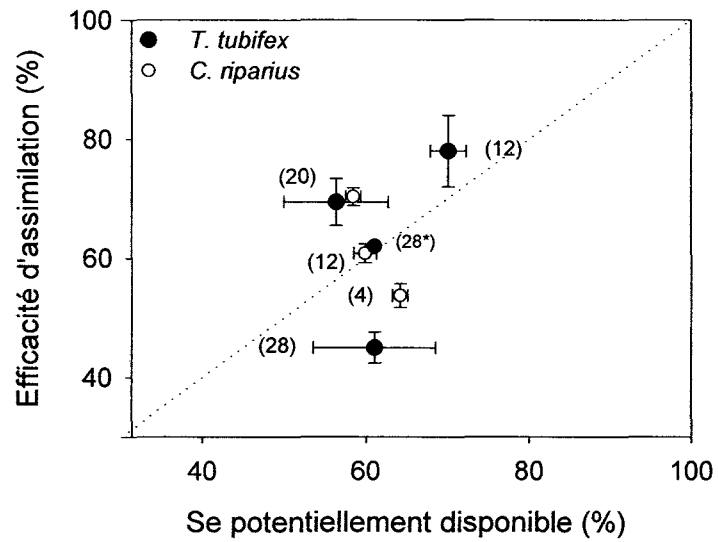


Figure 18.

Moyennes ( $\pm$  ES) de l'efficacité d'assimilation du Se par *S. velata* lorsque nourri avec *T. tubifex* ou *C. riparius* comparativement au pourcentage de Se qui est potentiellement disponible tel que prédit par le fractionnement subcellulaire des proies (ce qui correspond à la somme des fractions organites, HDP et HSP). Les nombres entre parenthèses indiquent la durée d'exposition des proies (jours). Deux valeurs sont montrées pour *T. tubifex* exposés au Se pendant 28 jours ; les prédateurs ayant ingéré, auparavant, 2 repas contaminés au Se (28), et un individu qui n'avait ingéré aucun repas contaminé auparavant (28\*).

### 3. CALCUL DE L'EFFICACITÉ D'ASSIMILATION

La méthode que nous avons choisie pour calculer l'efficacité d'assimilation de *S. velata* (en intégrant les valeurs pour la perte physiologique dans le temps à l'aide d'une régression non-linéaire ; voir section 2.1 et chapitre II - Méthodes) donne généralement des résultats plus élevés que lorsque l'approche du simple ratio est utilisée (*quantité retenue après digestion / quantité ingérée (%)* ; Wallace et Lopez, 1997) (fig. 19, triangles). Xu et al. (2001) l'ont aussi observé en utilisant la méthode du bilan de masse. Par la méthode « ratio », la moyenne des efficacités d'assimilation (EA) du Cd pour un repas de *T. tubifex* est de ~38% et pour *C. riparius*, on obtient ~69%. Pour le sélénium, on obtient donc une EA de 59% pour un repas de *T. tubifex* et une EA de ~55% lorsque *C. riparius* a été offert. Ainsi la différence entre les deux méthodes est d'environ 5 à 10%. La méthode que nous avons choisie semblerait donc mieux considérer l'assimilation dans un cas où la perte de l'élément par le compartiment physiologique du prédateur se ferait plutôt rapidement (ex. diète de *C. riparius* et Se, fig. 16b), tout en évaluant adéquatement un cas où, suite à l'évacuation du matériel non-absorbé, la perte par excrétion serait quasi-négligeable (ex. *C. riparius* et Cd, fig. 10b).

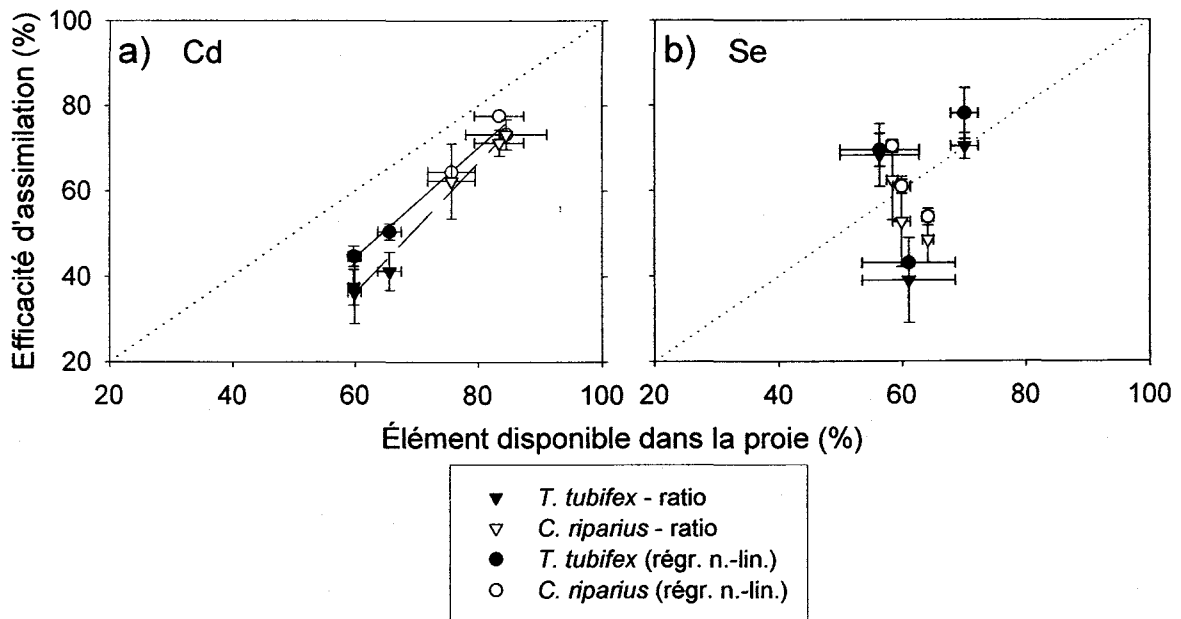


Figure 19.

Efficacités d'assimilation (%), moyennes  $\pm$  ES) du Cd (a) ou du Se (b) par *S. velata* lorsque nourri avec *T. tubifex* ou bien *C. riparius* comparativement aux pourcentages de ces éléments qui sont potentiellement disponibles (la somme des fractions cytosoliques (HDP + HSP) et organites) des proies (moyennes  $\pm$  ES). Les cercles représentent les valeurs d'efficacité d'assimilation calculées par régression non-linéaire ( $A = AE e^{-(bx)}$ ) des valeurs qui représentent la perte physiologique et les triangles représentent les valeurs d'efficacité d'assimilation calculées par la méthode du ratio élément ingéré / élément retenu (%) après l'égestion du matériel non-assimilable (féces). Les lignes pointillées sont les relations 1:1.

#### 4. LE Cd, LE Se ... ET LA DIGESTION

Globalement, la moyenne d'efficacité d'assimilation (EA) de l'élément non-essentiel (le Cd) était de ~60% pour une proportion moyenne de Cd potentiellement disponible chez les proies d'environ 72%. Du côté du Se, un élément essentiel, on obtenait ~66% d'assimilation pour une proportion de Se potentiellement disponible chez les proies de ~62%. Ces efficacités d'assimilation sont donc très semblables, quelle que soit la nature de l'élément trace. À la lumière d'études antérieures réalisées avec le Se et étant donné son caractère essentiel, on aurait pu penser que *S. velata* aurait assimilé le Se de façon plus efficace que le Cd. En effet, Reinfelder et Fisher (1991 et 1994) ont réalisé des études avec des copépodes et des larves de bivalves chez lesquels on a trouvé des EA de ~80% et 97-100%, respectivement, pour le Se provenant d'algues contaminées. Ils ont aussi pu relier significativement (~1:1) l'assimilation au pourcentage de Se ou de Cd associé au cytoplasme des algues ingérées. Dans cette étude, le temps de passage dans le tractus des animaux expérimentaux était très court, soit < 30 min pour les copépodes et < 24 h pour les larves de bivalves. Ces temps de résidence sont inférieurs à ceux de *S. velata* dans notre expérience (~48 h). Toutefois, il faut effectuer de telles comparaisons avec précaution puisque les mécanismes de digestion (enzymes, digestion intra- et extra-cellulaires, pH, etc.) sont sans doute différents entre carnivores et herbivores. Ainsi, on aurait pu imaginer que les éléments dans les proies qui sont vraisemblablement associés à des formes plus réfractaires à la digestion (fraction débris ou granules) auraient pu être assimilés avec un plus fort pourcentage étant donné le long temps de passage de la nourriture dans le tractus de *S. velata*. En effet, plus le temps est long, plus les métaux risquent de devenir labiles et donc plus biodisponibles. Il serait intéressant de tenter d'autres expériences avec le prédateur *S. velata* nourri avec des proies dont la proportion d'éléments dans la fraction potentiellement disponible (organites + HDP + HSP) varierait sur une plus grande fourchette de valeurs que dans l'expérience présente. D'autre part, le pH dans le tractus et la nature chimique de l'élément trace (Cd, cation ; Se, anion) auront certainement une influence sur sa solubilisation et sur sa spéciation dans le système digestif du prédateur. La forme résultante sera donc plus ou moins assimilable. Somme toute, le Se semble être régulé de manière davantage efficace que le Cd, probablement à cause de sa nature essentielle.

En utilisant les mêmes proies et prédateurs que dans cette étude, des mesures d'efficacité d'assimilation ont été réalisées pour d'autres éléments traces. *Sialis velata* assimilait la majorité du Cd (~60%) et du Se (~66%) aussi bien que le Ni et le Tl (~70% ; Dumas et Hare, 2007) présents dans les proies *C. riparius* et *T. tubifex* (fig. 20). Ces efficacités d'assimilation pour une larve d'insecte se révèlent donc être supérieures à celles généralement trouvées chez d'autres espèces de prédateurs tels que les poissons (Van Campenhout et al. 2007 ; Zhang et Wang, 2006).

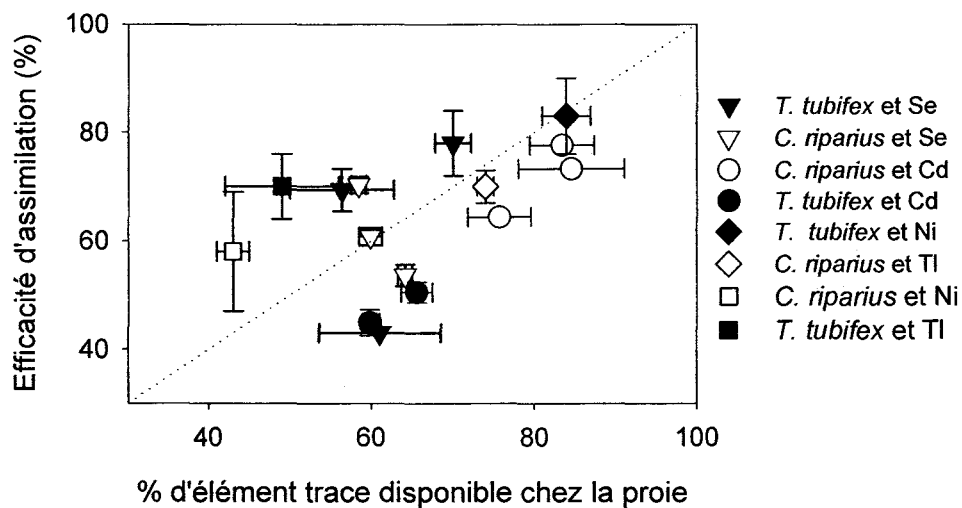


Figure 20

Efficacités d'assimilation du Cd, Ni, Se et Tl par l'insecte prédateur *S. velata* lorsque nourri avec les proies *T. tubifex* ou *C. riparius* exposées à des sédiments et à leur eau surnageante contaminés avec ces éléments traces.



## CONCLUSIONS

Nous avons mesuré temporellement les distributions subcellulaires du Cd chez l'insecte *C. riparius* et chez le ver *T. tubifex* et avons mis en lumière que celles-ci étaient directement reliées à l'efficacité avec laquelle la mouche des aulnes *S. velata* assimilait le Cd de ces proies. Le modèle de distribution du Cd dans les différentes fractions différait selon le type de proie. Toutefois, pour une espèce de proie donnée, ces proportions demeuraient plutôt stables pendant toute la durée de l'exposition aux sédiments contaminés. La majorité du Cd chez *C. riparius* était associée à la fraction cytosolique des cellules, et donc était facilement assimilée par le prédateur. Une portion substantielle du Cd dans le ver *T. tubifex* était liée à la fraction organites, et une partie de ce Cd n'était pas disponible à l'assimilation par *S. velata*, tel que démontré par les plus faibles valeurs d'efficacité d'assimilation obtenues pour ce type de proie. La somme des fractions organites, HDP et HSP surestimait la prédiction de l'efficacité d'assimilation par *S. velata*, plus spécialement lorsque nourri avec l'oligochète. En résumé, l'assimilation du Cd différait selon le type de proies et cette différence était reliée au fractionnement subcellulaire du Cd chez ces proies. Or, nos résultats suggèrent que certaines fractions des proies contiennent un mélange de particules de divers types qui varient dans la facilité avec laquelle le Cd qui y est lié peut en être dissocié et assimilé dans le tractus alimentaire du prédateur.

En ce qui a trait au sélénium, les proportions moyennes de Se dans les deux types de proies qui étaient potentiellement disponibles à *S. velata* étaient très semblables (-61% et -63% pour *C. riparius* et *T. tubifex*, respectivement) et demeuraient stables dans le temps. Ces proportions se rapprochaient beaucoup de l'efficacité d'assimilation moyenne pour le Se provenant des deux espèces de proies (-66%), ce qui suggère qu'une variable pourrait être utilisée pour prédire l'autre. Ainsi, en considérant l'ensemble de nos résultats, ceux-ci ont montré que la distribution subcellulaire du sélénium chez les proies peut être utilisée afin d'obtenir une approximation de l'efficacité d'assimilation du Se par le prédateur, mais ne prédisait pas aussi bien que dans le cas du cadmium.

## PERSPECTIVES DE RECHERCHE

L'entrée des éléments traces par la voie de la nourriture est une facette de la bioaccumulation qu'il ne faut pas négliger lorsqu'on considère la prise en charge de contaminants par des animaux prédateurs. Dans ce projet, nous avons mis en lumière le fait que les mécanismes de détoxification chez les proies semblent jouer un rôle clé qui déterminera l'importance de l'accumulation au niveau trophique supérieur. De façon générale, il importerait de connaître davantage les processus cellulaires qui interagissent avec les éléments, qui créeront certaines associations, et dont la résultante sera l'accumulation dans l'un ou l'autre des compartiments de la cellule.

La méthode de centrifugation différentielle utilisée dans ce projet pour isoler les divers compartiments cellulaires permet d'évaluer opérationnellement l'accumulation au niveau cellulaire dans un animal donné. Cependant des questionnements quant à l'identité exacte et à la pureté des fractions obtenues demeurent en suspens. De plus, la technique d'homogénéisation étant l'étape cruciale dans le protocole, sa réalisation de façon inadéquate pourrait amener le bris de certains organites, tels que les mitochondries, qui pourraient libérer leur contenu. Il conviendrait donc de s'assurer de l'intégrité des organites au terme du processus. Aussi, il serait avantageux d'adopter des protocoles standardisés qui permettraient de faire de véritables comparaisons entre les études, puisqu'à ce jour, il existe de multiples variantes dans les protocoles de fractionnement subcellulaire.

Comme nous l'avons vu dans le cas du Cd, la composition des fractions telles que les granules, les lysosomes et les organites semble plutôt hétérogène et devrait être explorée davantage. La fraction « débris cellulaires » qui contient souvent une forte proportion d'éléments est aussi particulièrement mal définie. Plus de connaissances sur ces fractions plutôt obscures aideraient donc à comprendre d'une part les mécanismes de détoxification de la proie, mais contribueraient tout autant à mieux prédire le potentiel de transfert d'un élément vers un prédateur. Les conditions dans le tractus digestif des prédateurs comme *Sialis velata* (pH, enzymes digestives,...) seraient aussi des données intéressantes à connaître lors de mesures d'efficacité d'assimilation en laboratoire. De plus, puisqu'en nature on retrouve rarement un seul type de contaminant, l'interaction entre ceux-ci devrait être davantage étudiée au niveau du tractus des animaux. À titre d'exemple, on sait que le sélénium a un effet protecteur sur la toxicité du Cd chez les rats (Wahba et al. 1993) et aurait un effet antagoniste sur l'assimilation du Hg chez les invertébrés et les poissons (Belzile et al. 2006, Chen et al. 2001). On pourrait bien sûr étudier l'effet de la combinaison de divers éléments traces, qu'ils soient essentiels ou non.

La variable « efficacité d'assimilation » (AE) utilisée dans la modélisation de l'accumulation d'un contaminant pourrait être influencée elle-même par d'autres variables. Afin de mieux mesurer

l'effet de celles-ci, des expériences pourraient être faites sur l'impact de la quantité de nourriture ingérée et sur sa qualité (valeur protéique, si on pensait au sélénium) ou encore sur des concentrations variables en éléments pour un seul type de proie, par exemple. De plus, en travaillant avec des concentrations plus élevées dans les proies que celles que nous avons expérimentées ici, il serait intéressant de voir les niveaux de Cd ou de Se qui engendreraient une réponse toxique chez *S. velata* et de tenter de relier l'effet toxique à la distribution subcellulaire de l'élément chez *S. velata*. On pourrait aussi évaluer les effets d'une pré-exposition du prédateur à un élément sur l'efficacité d'assimilation de celui-ci, lors d'expériences subséquentes avec de la nourriture contaminée. En utilisant *T. tubifex* et *C. riparius*, on pourrait aussi imaginer des expériences avec d'autres espèces de prédateurs tels que des odonates.

Pour les invertébrés benthiques qui se nourrissent de sédiments, tels que *T. tubifex* et *C. riparius*, la spéciation du sélénium dans leur milieu (e.g., Se organique versus Se inorganique) pourrait amener une variation de leurs concentrations en Se à l'état stationnaire, mais aussi des distributions subcellulaires différentes. On pourrait donc mesurer cette répartition subcellulaire du Se chez des organismes exposés à des sédiments où la spéciation du Se est contrôlée. De plus, on pourrait aller chercher des données plus précises quant au type d'acide aminé (séléméthionine, sélénocystéine) ou encore au type de protéine (glutathione, MT) auquel est associé le nouveau sélénium accumulé.

Clairement, plus d'expériences devraient être réalisées pour mieux comprendre les mécanismes derrière l'accumulation et le transfert trophique des éléments traces chez les invertébrés d'eaux douces, particulièrement en ce qui a trait à l'accumulation du sélénium. De cette façon, nous aurons de plus vastes connaissances qui nous permettront de raffiner les modèles utilisés pour prédire l'accumulation des éléments traces chez les animaux aquatiques.

## RÉFÉRENCES

- Adams WJ, Brix KV, Fairbrother A, Cardwell R (1997) Understanding selenium in the aquatic environment. A learned discourse. *SETAC News* 17: 22-23.
- Affar EB, Dufour M, Poirier GG, Nadeau D (1998) Isolation, purification and partial characterization of chloragocytes from the earthworm species *Lumbricus terrestris*. *Mol Cell Biochem* 185: 123-133.
- Ahearn GA, Mandal PK, Mandal A (2004) Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *J Comp Physiol B* 174: 439-452.
- Alaimo J, Ogle RS, Knight AW (1994) Selenium uptake by larval *Chironomus decorus* from a *Ruppia maritima*-based benthic/detrital substrate. *Arch Environ Contam Toxicol* 27: 441-448.
- Andres S, Ribeyre F, Boudou A (1998) Effects of temperature and exposure duration on transfer of cadmium between naturally contaminated sediments and burrowing mayfly nymphs (*Hexagenia rigida*). *Arch Environ Contam Toxicol* 35: 295-301.
- Arafat NM (1985) The impact of mining and smelting on trace metal distribution in lake sediments around Rouyn-Noranda, Quebec. *Water Poll Res J Canada* 20: 1-8.
- Back H (1990) Epidermal uptake of Pb, Cd, and Zn in tubificid worms. *Oecologia* 85: 226-232.
- Baines SB, Doblin MA, Cutter GA (2001) Uptake of dissolved organic selenides by marine phytoplankton. *Limnol Oceanogr* 46: 1936-1944.
- Baines SB, Fisher NS, Doblin MA, Cutter GA, Cutter LS, Cole B (2004) Light dependence of selenium uptake by phytoplankton and implications for predicting selenium incorporation into food webs. *Limnol Oceanogr* 49: 566-578.
- Besser JM, Canfield TJ, La Point TW (1993) Bioaccumulation of organic and inorganic selenium in a laboratory food chain. *Environ Toxicol Chem* 12: 57-72.
- Belzile N, Chen YW, Gunn JM, Tong J, Alarie Y, Delonchamp T, Lang CY (2006) The effect of selenium on mercury assimilation by freshwater organisms. *Can J Fish Aquat Sci*: 63: 1-10.
- Borgmann U, Couillard Y, Doyle P, Dixon DG (2005) Toxicity of sixty-three metals and metalloids to *Hyalella azteca* at two levels of water hardness. *Environ Toxicol Chem* 24: 641-652.
- Borgmann U, Nowierski M, Grapentine LC, Dixon DG (2004) Assessing the cause of impacts on benthic organisms near Rouyn-Noranda, Quebec. *Environ Pollut* 129: 39-48.
- Bouché M-L, Biagianti-R. S, Arzac F, Vernet G. (1999a) An original decontamination process developed by the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to copper and lead. *Aquat Toxicol* 45: 9-17.
- Bouché M-L, Biagianti-Risbourg S, Vernet G (1999b) A light and scanning electron microscope study of the morphology of the chaetae of *Tubifex tubifex* in a non-polluted medium. *Hydrobiologia* 411: 39-44.
- Bouché M-L, Habets F, Biagianti-Risbourg S, Vernet G (2000) Toxic effects and bioaccumulation of cadmium in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*. *Ecotox Environ Saf* 46: 246-251.

- Cain DJ, Luoma SN, Wallace WG (2004) Linking metal bioaccumulation of aquatic insects to their distribution patterns in a mining-impacted river. *Environ Toxicol Chem* 23: 1463-1473.
- Campbell PGC, Clearwater SJ, Brown PB, Fisher NS, Hogstrand C., Lopez GR, Mayer LM, Meyer JS (2005a) dans: Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms, *Edited by JS Meyer, WJ Adams, KV Brix, SN Luoma, DR Mount, WA Stubblefield, CM Wood*, SETAC press, Pensacola (FL), 329 p.
- Campbell PGC, Giguère A, Bonneris E, Hare L (2005b) Cadmium-handling strategies in two chronically exposed indigenous freshwater organisms—the yellow perch (*Perca flavescens*) and the floater mollusc (*Pyganodon grandis*). *Aquat Toxicol* 72: 83-97.
- Cancio I, Gwynn I, Ireland MP, Cajaraville MP (1995) Lysosomal origin of the chloragosomes in the chloragogenous tissue of the earthworm *Eisenia foetida*: Cytochemical demonstration of acid phosphatase activity. *Histochem J* 27: 591-596.
- Chapman PM, Wang F, Janssen CR, Goulet RR, Kamunde CN (2003) Conducting ecological risk assessments of inorganic metals and metalloids: current status. *Human Ecol Risk Assess* 9: 641-697.
- Chapman PM, Wang F (2000) Issues in ecological risk assessment of inorganic metals and metalloids. *Human Ecol Risk Assess* 6: 965-988.
- Chen YW, Belzile N, Gunn JM (2001) Antagonistic effect of selenium on mercury assimilation by fish populations near Sudbury metal smelters?. *Limnol Oceanogr* 46: 1814-1818.
- Cheung M, Wang WX (2005) Influence of subcellular metal compartmentalization in different prey on the transfer of metals to a predatory gastropod. *Mar Ecol Prog Ser* 286: 155-166.
- Craig A, Hare L, Tessier A (1998) Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in the aquatic insect *Chironomus staegeri*. *Aquatic Toxicol* 44: 255-262.
- Croisetière L, Hare L, Tessier A (2006) A field experiment to determine the relative importance of prey and water as sources of As, Cd, Co, Cu, Pb, and Zn for the aquatic invertebrate *Sialis velata*. *Environ Sci Technol* 40: 873 -879.
- Croteau M-N, Hare L, Tessier A (2001) Differences in Cd accumulation among species of the lake-dwelling biomonitor *Chaoborus*. *Can J Fish Aquat Sci* 58: 1737-1746.
- Cutter GA, Cutter LS (1998) Metalloids in the high latitude north Atlantic Ocean: Sources and internal cycling. *Mar Chem* 61: 25-36.
- DeForest DK, Brix KV, Adams WJ (1999) Critical review of proposed residue-based selenium toxicity thresholds for freshwater fish. *Human Ecol Risk Assess* 5: 1187-1228.
- Dumontet S, Levesque M, Mathur SP (1990) Limited downward migration of pollutant metals copper, zinc, nickel and lead in acidic virgin peat soils near a smelter. *Water Air Soil Pollut* 49: 329-342.
- Elliott JM (1995) The effect of temperature on egg hatching for three populations of *Sialis lutaria* (L.) and two populations of *Sialis fuliginosa* Pictet (Megaloptera: Sialidae) *Ent Gaz* 46: 155-159.
- Elliott JM (1996) Temperature-related fluctuations in the timing of emergence and pupation of the Windermere alder-flies over 30 years. *Ecol Ent* 21: 241-247.

- Fan TWM, Teh SJ, Hinton DE, Higashi RM (2002) Selenium biotransformations into proteinaceous forms by foodweb organisms of selenium-laden drainage waters in California. *Aquat Toxicol* 57: 65-84.
- Fisher NS, Hook SE (2002) Toxicology tests with aquatic animals need to consider the trophic transfer of metals. *Toxicol* 181-182: 531-536.
- Gillis PL, Dixon DG, Borgmann U, Reynoldson TB (2004) Uptake and depuration of cadmium, nickel, and lead in laboratory-exposed *Tubifex tubifex* and corresponding changes in the concentration of a metallothionein-like protein. *Environ Toxicol Chem* 23: 76-85.
- Giguère A, Campbell PGC, Hare L, Couture P (2006) Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquat Toxicol* 77: 178-189.
- Groenendijk D (1999) Dynamics of metal adaptation in riverine chironomids. Référence internet : [www.science.uva.nl/news/object.cfm/objectid=4C3F0AF1-BB6D-4D1B-B1E200D7CDEA7157/download=true](http://www.science.uva.nl/news/object.cfm/objectid=4C3F0AF1-BB6D-4D1B-B1E200D7CDEA7157/download=true)
- Guan R, Wang WX (2004) Dietary assimilation and elimination of Cd, Se, and Zn by *Daphnia magna* at different metal concentrations. *Environ Toxicol Chem* 23: 2689-2698.
- Hamilton SJ (2002) Rationale for a tissue-based selenium criterion for aquatic life. *Aquat Toxicol* 57: 85-100.
- Hamilton SJ (2004) Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Sci Total Environ* 326: 1-31.
- Hare L (1992) Aquatic insects and trace metals: Bioavailability, bioaccumulation, and toxicity. *Crit Rev Toxicol* 22: 327-369.
- Hare L, Tessier A (1996) Predicting animal cadmium concentration in lakes. *Nature* 380: 430-432.
- Hare L, Tessier A (1998) The aquatic insect *Chaoborus* as a biomonitor of trace elements in lakes. *Limnol Oceanogr* 43: 1850-1859
- Hare L, Tessier A, Borgmann U (2003) Metal sources for freshwater invertebrates: Pertinence for risk assessment. *Human Ecol Risk Assess* 9: 779-793.
- Harrison SE, Klaverkamp JF (1990) Metal contamination in liver and muscle of northern pike (*Esox lucius*) and white sucker (*Catostomus commersoni*) and in sediments from lakes near the smelter at Flin Flon, Manitoba. *Environ Toxicol Chem* 9: 941-956.
- Hatfield DL, Gladyshev VN (2002) How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol* 22: 3565-3576.
- Hopkin SP (1989) *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Elsevier Applied Science, London, U.K., 366 pp.
- Ingersoll CG, Ankley GT, Benoit DA, Brunson EL, Burton GA, Dwyer FJ, Hoke RA, Landrum PF, Norberg-King TJ, Winger PV (1995) Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. *Environ Toxicol Chem* 14: 1885-1894.

- Jackson AP, Alloway BJ (1992) The transfer of cadmium from agricultural soils to the human food chain, dans *Biochemistry of trace metals*, Adriano, D.C., Ed., Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Kraemer L, Campbell PGC, Hare L, Auclair JC (2006) A field study examining the relative importance of food and water as sources of Cd for juvenile yellow perch. *Can J Fish Aquat Sci* 63: 549-557
- Lemly AL (1997) Ecosystem recovery following selenium contamination in a freshwater reservoir. *Ecotoxicol Environ Saf* 36: 275-281.
- Locklin JL, Arsuffi TL, Bowles DE (2006) Life history of *Sialis* (Megaloptera: Sialidae) in a lentic and lotic ecosystem in central Texas. *Am Midl Nat* 155: 50-62.
- Luoma SN, Johns C, Fisher NS, Steinberg NA, Oremland RS, Reinfelder JR (1992) Determination of selenium bioavailability to a benthic bivalve from particulate and solute pathways. *Environ Sci Technol* 26: 485-491.
- Luoma SN, Rainbow PS (2005) Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environ Sci Technol* 39: 1921-1931.
- Maier KJ, Knight AW (1994) Ecotoxicology of selenium in freshwater systems. *Rev Environ Contam Toxicol* 134: 31-48.
- Mayer T, Manning PO (1990) Inorganic contaminants in suspended solids from Hamilton Harbour. *J Great Lakes Res* 16: 299-318.
- Mebane CA (2006) Cadmium risks to freshwater life: Derivation and validation of low-effect criteria values using laboratory and field studies (version 1.1). U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2006-5245, 130 p.
- Meyer JS, Adams WJ, Brix KV, Luoma SN, Mount DR, Stubblefield WA, Wood CM (2005) Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms, SETAC press, Pensacola (FL), 329 p.
- Michaud A, Hare L, Campbell PGC (2005) Exchange rates of cadmium between a burrowing mayfly and its surrounding in nature. *Limnol Oceanogr* 50: 1701-1717.
- Milbrink G (1983) Characteristic deformities in tubificid oligochaetes inhabiting polluted bays of Lake Vanern, Southern Sweden. *Hydrobiologia* 106: 169-184.
- Morgan AJ, Turner M (2005) Quantitative ultrastructure of metal sequestering cells reflects inter-site and inter-species differences in earthworm metal burdens. *Arch Environ Contam Toxicol* 49: 45-52.
- Morgan AJ, Turner MP, Morgan JE (2002) Morphological plasticity in metal-sequestering earthworm chloragocytes: Morphometric electron microscopy provides a biomarker of exposure in field populations. *Environ Toxicol Chem* 21: 610-618.
- Newman MC, Unger MA (2003) *Fundamentals of ecotoxicology* 2<sup>nd</sup> Edition, CRC Press, Boca Raton, FL, 458 p.

- Nieboer E, Richardson DHS (1980) The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ Poll (series B)* 1: 3-26.
- Nott JA, Nicolaidou A (1990) Transfer of detoxification along marine food chains. *J Mar Biol Assoc UK* 70: 905-912.
- Nriagu JO (1990) Global metal pollution: poisoning the biosphere? *Environ* 32(7): 6-11.
- Orvoine J, Hare L, Tessier A (2006) Competition between protons and cadmium ions in the planktonic food chain leading to the phantom midge *Chaoborus*. *Limnol Oceanogr* 51: 1013-1020.
- Peeters-Joris C (2000) The lysosomes of earthworm chloragocytes: Biochemical and morphological characterization. *Comp Biochem Physiol A* 126: 323-340.
- Penry DL (1998) Applications of efficiency measurements in bioaccumulation studies: definitions, clarifications and a critique of methods. *Environ Toxicol Chem* 17: 1633-1639.
- Postma JF, Van Kleunen A, Admiraal W (1995) Alterations in life-history traits of *Chironomus riparius* (Diptera) obtained from metal contaminated rivers. *Arch Environ Contam Toxicol* 29: 469-475.
- Rainbow PS (2002) Trace metal concentrations in aquatic organisms: Why and so what? *Environ Pollut* 120: 497-507.
- Rainbow PS, Wang WX (2001) Comparative assimilation of Cd, Cr, Se, and Zn by the barnacle *Elminius modestus* from phytoplankton and zooplankton diets. *Mar Ecol Prog Ser* 218: 239-248.
- Reinfelder JR, Fisher NS (1991) The assimilation of elements ingested by marine copepods. *Science* 251: 794-796.
- Reinfelder JR, Fisher NS (1994) The assimilation of elements ingested by marine planktonic bivalve larvae. *Limnol Oceanogr* 39: 12-20.
- Reinfelder JR, Fisher NS, Luoma SN, Nichols JW, Wang WX (1998) Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach. *Sci Tot Environ* 219: 117-135.
- Reynoldson TB, Thompson SP, Bamsey JL (1991) A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environ Toxicol Chem* 10: 1061-1072.
- Ristola T (2000) Assessment of sediment toxicity using the midge *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae), Biology, University of Joensuu, Joensuu, Finland, 101 pp.
- Ross HH (1937) Nearctic alder flies of the genus *Sialis* (Megaloptera: Sialidae). *Bull Illinois Nat Hist Surv* 21: 57-99.
- Roy I, Hare L (1998) First Quebec record, outside the Montreal region, of the alderfly *Sialis velata* Ross (Megaloptera; Sialidae) and the potential of the genus as a contaminant biomonitor. *Entomol News* 109: 285-287.
- Roy I, Hare L (1999) Relative importance of water and food as Cd sources to the predatory insect *Sialis velata* (Megaloptera). *Can J Fish Aquat Sci* 56: 1143-1149.



- Schlekat CE, Pukerson DG, Luoma SN (2004) Modeling selenium bioaccumulation through arthropod food webs in San Francisco Bay, California, USA. *Environ Toxicol Chem* 23: 3003-3010.
- Schlekat CE, Dowdle PR, Lee BG, Luoma SN, Oremland RS (2000) Bioavailability of particle-associated Se to the bivalve *Potamocorbula amurensis*. *Environ Sci Technol* 34: 4504-4510.
- Seebaugh DR, Estephan A, Wallace WG (2006) Relationship between dietary cadmium absorption by grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and trophically available cadmium in amphipod (*Gammarus lawrencianus*) prey. *Bull Environ Contam Toxicol* 76: 16-23.
- Seebaugh DR, Goto D, Wallace WG (2005) Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain. *Mar Environ Res* 59: 473-491.
- Seebaugh DR, Wallace WG (2004) Importance of metal-binding proteins in the partitioning of Cd and Zn as trophically available metal (TAM) in the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Mar Ecol Prog Ser* 272: 215-230.
- Seidman LA, Bergtron G, Gingrich DJ, Remsen CC (1986) Accumulation of cadmium by the fourth instar larva of the fly *Chironomus thummi*. *Tiss Cell* 18: 395-405.
- Simkiss K, Taylor MG (1995) Metal speciation and bioavailability in aquatic systems *Edited by* Tessier A, Turner DR. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 1-45.
- Simmons DBD, Wallschläger D (2005) A critical review of the biogeochemistry and ecotoxicology of selenium in lotic and lentic environments. *Environ Toxicol Chem* 24: 1331-1343.
- Smokorowski KE, Lasenby DC, Evans RD (1998) Quantifying the uptake and release of cadmium and copper by the opossum shrimp *Mysis relicta* preying upon the cladoceran *Daphnia magna* using stable isotope tracers. *Can J Fish Aquat Sci* 55: 909-916.
- Steen-Redeker E, Van Campenhout K, Bervoets L, Reijnders H, Blust R (2007) Subcellular distribution of Cd in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*, implications for trophic availability and toxicity. *Environ Poll* 148: 166-175.
- Tessier A, Couillard Y, Campbell PGC, Auclair JC (1993) Modeling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve *Anodonta grandis*. *Limnol Oceanogr* 38: 1-17.
- Tessier, A., Couillard, Y., Campbell, P. G. C., Auclair, J. C. 1993. Modeling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve *Anodonta grandis*. *Limnology and Oceanography* 38: 1-17.
- Thomann R V (1981) Equilibrium model of fate of microcontaminants in diverse aquatic food chains. *Can J Fish Aquat Sci* 38: 280-296.
- Timmermans KR, Spijkerman E, Tonkes M, Govers HAJ (1992) Cadmium and zinc uptake by two species of aquatic freshwater invertebrate predators from dietary and aqueous sources. *Can J Fish Aquat Sci* 49: 655-662.
- Tokeshi M (1995) The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges, *Edited by* Armitage PD, Cranston PS, Pinder LCV, Chapman & Hall, London, UK, pp. 297-334.

- Van Campenhout K, Bervoets L, Blust R (2007) Assimilation efficiencies of Cd and Zn in the common carp (*Cyprinus carpio*): Effects of metal concentration, temperature and prey type. *Environ Poll* 145: 905-914.
- Vijver MG, Cornelis AM, Van Gestel CAM, Lanno RP, Van Straalen NM, Peijnenburg WJGM (2004) Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: A review. *Environ Sci Technol* 38: 4705-4712.
- Wahba ZZ, Coogan TP, Rhodes SW, Waalkes MP (1993) Protective effects of selenium on cadmium toxicity in rats: Role of altered toxicokinetics and metallothionein. *J Toxicol Environ Health* 382: 171-182.
- Wallace WG, Hoexum Brouwer TM, Brouwer M, Lopez GR (2000) Alterations in prey capture and induction of metallothioneins in grass shrimp fed cadmium-contaminated prey. *Environ Toxicol Chem* 19: 962-971.
- Wallace WG, Lee BG, Luoma SN (2003) Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fraction (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar Ecol Prog Ser* 249: 183-197.
- Wallace WG, Lopez GR, Levinton JS (1998) Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. *Mar Ecol Prog Ser* 172: 225-237.
- Wallace WG, Lopez GR (1997) Bioavailability of biologically sequestered cadmium and the implications of metal detoxification. *Mar Ecol Prog Ser* 147: 149-157.
- Wallace WG, Luoma SN (2003) Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Mar Ecol Prog Ser* 257: 125-137.
- Wang WX, Fisher NS (1999) Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: a synthesis. *Environ Toxicol Chem* 18: 2034-2045.
- Wang WX, Fisher NS (1998) Accumulation of trace elements in a marine copepod. *Limnol Oceanogr* 43: 273-283.
- Wang WX, Lee BG, Reinfelder JR, Fisher NS (1996) Assimilation and regeneration of trace elements by marine copepods. *Limnol Oceanogr* 42: 70-81.
- Wang WX, Rainbow PS (2005) Influence of exposure history on trace metal uptake and bioaccumulation by marine invertebrates. *Ecotox Environ Saf* 61: 145-159.
- Wang WX, Stupakoff I, Gagnon C, Fisher NS (1998) Bioavailability of inorganic and methylmercury to a marine deposit-feeding polychaete. *Environ Sci Technol* 32: 2564-2571.
- Whiting MF (1991) New species of *Sialis* from Southern California (Megaloptera: Sialidae). *Great Basin Nat* 51: 411-413.
- Wrench JJ, Campbell NC (1981) Protein bound selenium in some marine organisms. *Chemosphere* 10: 1155-1161.
- Xu Y, Wang WX, Hsieh DPH (2001) Influences of metal concentration in phytoplankton and seawater on metal assimilation and elimination in marine copepods. *Environ Toxicol Chem* 20: 1067-1077.

Yamamura M, Suzuki KT, Hatakeyma S, Kubota K (1983) Tolerance to cadmium and cadmium-binding proteins induced in the midge larva *Chironomus yoshimatsui* (Diptera, Chironomidae). *Comp Biochem Physiol* 75C: 21-24.

Yoshiro SY, Takahashi K (2002) Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *Eur J Biochem* 269: 5746-5751.

Zhang L, Wang WX (2006) Significance of internal metal speciation in prey in influencing the trophic transfer of metals in marine fish. *Limnol Oceanogr* 51: 2008-2017



## ANNEXE 1 - Distribution subcellulaire et transfert trophique

Le stockage des métaux, soit dans les protéines ou encore dans les granules des cellules des proies peut affecter différemment la biodisponibilité chez les prédateurs. La biodisponibilité des granules riches en métal présentes chez les proies a été démontrée comme étant négligeable ou substantiellement réduite lorsque consommées par un prédateur (Wallace et al. 1998, 2003 ; Wang et Fisher 1999 ; Nott et Nicolaidou, 1990). Cette biodisponibilité des granules des proies peut cependant varier selon les métaux et le type de granule impliqué ainsi que selon la physiologie de la digestion du prédateur (pH du tractus, temps de rétention,...) (Nott et Nicolaidou, 1990). Reinfelder et Fisher (1991), ont démontré que des copépodes ont assimilé tout le métal qui était associé au cytosol du phytoplancton avec lequel ils avaient été nourris (figure 21a). Plus tard, Reinfelder et Fisher (1994), ont aussi démontré la même relation, cette fois, avec des larves de bivalves (figure 21b). Des travaux de Wallace et Lopez (1996, 1997) ont mis en évidence que des crevettes assimilaient de la même manière les métaux liés au cytosol de leurs proies, des oligochètes.

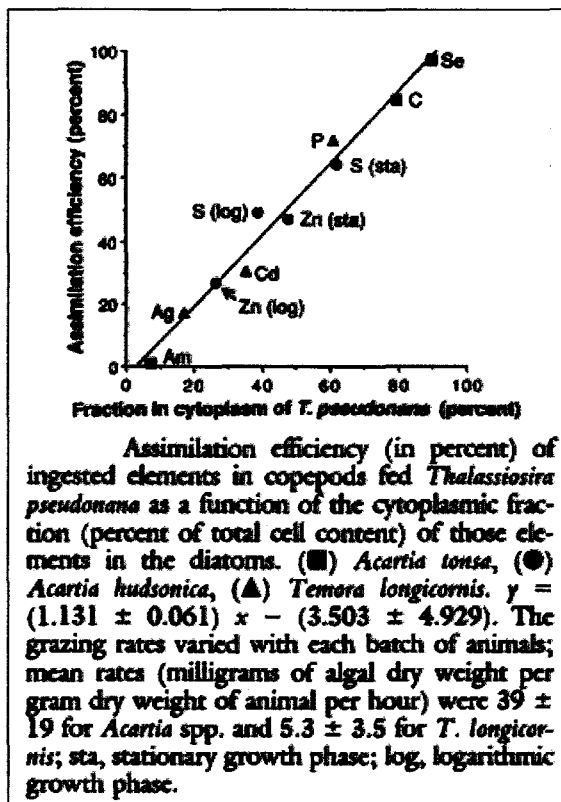


Figure 21 a.  
(tirée de Reinfelder et Fisher, 1991)

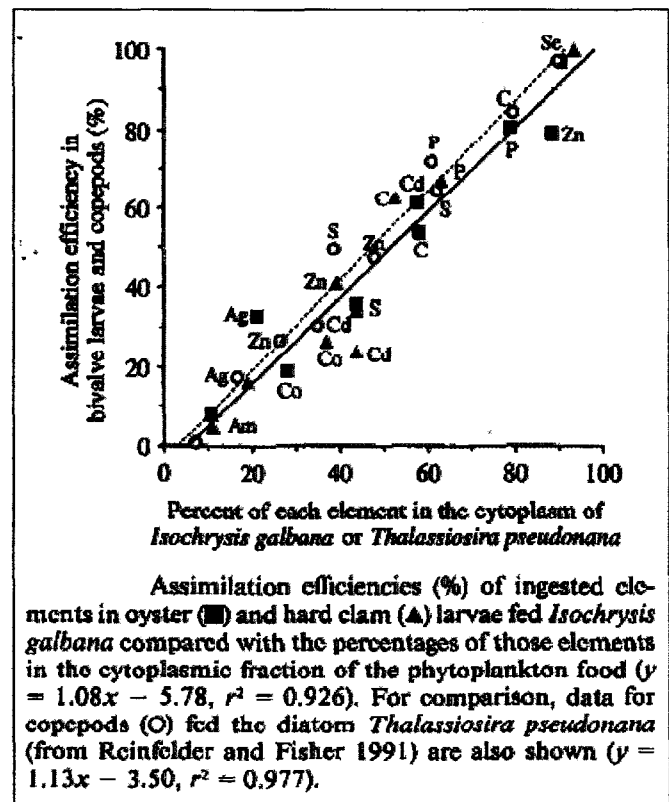


Figure 21 b.  
(tirée de Reinfelder et Fisher, 1994)









**2<sup>E</sup> PARTIE**

**ARTICLE 1 - LE CADMIUM**

## ARTICLE 1

### **Subcellular distribution of cadmium in two aquatic invertebrates: change over time and relationship to Cd assimilation by a predatory insect**

*Maïtée Dubois and Landis Hare\**

Institut national de la recherche scientifique - Eau, Terre et Environnement  
(INRS-ETE), Quebec City, Québec, G1K 9A9, Canada

For submission as an article to Environmental Pollution

**Key words:** cadmium, *Chironomus*, *Tubifex*, trophic transfer, subcellular partitioning

Running head: Cd subcellular distribution and trophic transfer

---

\*Corresponding author (landis@ete.inrs.ca)

## ABSTRACT

Uptake of trace metals by aquatic predators is reported to be explained in part by the distribution of these contaminants in the cells of their prey. Detoxification strategies being species specific, we set out to determine if cadmium (Cd) assimilation by an aquatic predator, the alderfly *Sialis velata* (Megaloptera), differs between two prey types, the insect *Chironomus riparius* (Diptera) and the oligochaete *Tubifex tubifex*. We held these prey species for various lengths of time in Cd-contaminated sediments and then fractionated prey to determine the distribution of Cd in their cells. Cadmium in *T. tubifex* was distributed as follows: debris (35%) > organelles (27%) > heat denatured proteins (HDP, 22%) > heat stable proteins (HSP, 12%) > granules (2%), whereas in *C. riparius* the proportions were: HDP (39%) ~ HSP (37%) > debris (13%) > organelles (5%) ~ granules (5%). These proportions varied little over time (4-28 days) in both prey taxa. The predator assimilated Cd readily from both prey types, although mean ( $\pm$  SE) assimilation efficiencies were greater from the insect ( $72 \pm 5\%$ ) than from the oligochaete ( $46 \pm 3\%$ ). These assimilation efficiencies were similar to the proportion of prey Cd that would theoretically be available to a predator, that is, the sum of the organelles, HDP and HSP fractions. However, to obtain an exact 1:1 relationship between predator assimilation efficiency and prey subcellular distribution we needed to assume that approximately half of the Cd associated with the organelle fraction of *T. tubifex* is present as refractory particles that are unavailable for digestion by the predator. Measurements of Cd in predator feces supported this assumption. Overall, Cd was readily transferred between the two trophic levels and the proportion transferred could be predicted on the basis of Cd subcellular partitioning in prey.

## INTRODUCTION

Sediments in aquatic ecosystems can be an important sink for trace metals (Hare and Tessier, 1998; Selck et al. 1998) such that these contaminants are accumulated by, and can have toxic effects on, benthic organisms (Borgmann et al. 2004). Animals living in the water column above sediments can be affected in two ways. First, a decline in benthic production could limit fish populations (Campbell et al. 2003). Second, benthic animals could act as a vector for the transfer of trace metals to higher trophic levels where these contaminants could have toxic effects. Indeed, it is now acknowledged that for many aquatic animals, including fish, food can be a major source of potentially toxic trace metals (Hare et al. 2003; Meyer et al. 2005).

Many parameters have to be considered when assessing the availability of trace metals in an animal's food. First, conditions related to the consumer such as its gut morphology, gut transit time and digestive chemistry will influence trace metal uptake (Hare, 1992; Meyer et al. 2005). Second, the manner in which the metal is bound in the food matrix will influence the ease with which digestive processes can solubilize the metal and make it available for uptake by the gut wall. Several studies have shown that the availability of metals in prey can be estimated using simple fractionation techniques, the results of which indicate how metals are likely to be partitioned within prey cells. Thus metals associated with proteins in the cell cytosol have been shown to be more available to predators than those associated with insoluble components such as granules or cell membranes (Nott and Nicolaidou, 1990; Reinfelder and Fisher, 1991, 1994; Wallace and Lopez, 1996, 1997; Wallace et al. 2003; Seebaugh and Wallace, 2004; Giguère et al. 2006; Cheung and Wang, 2005; Seebaugh et al. 2005, 2006; Zhang and Wang, 2006). Understanding the speciation of metals in food will lead to better estimates of their availability to predators, thereby resulting in more realistic predictions of metal transfer along food chains and effects at higher trophic levels.

We measured the distribution of cadmium (Cd) in the cells of two prey types and its influence on Cd assimilation by a predator. We chose Cd because it is a priority pollutant that is readily accumulated by aquatic animals (Hare et al. 1991) and causes toxic effects in lakes impacted by this metal (Borgmann et al. 2004; Campbell, 2006). We compared Cd assimilation by the alderfly *Sialis velata* (Insecta, Megaloptera) from two common prey types, the insect *Chironomus riparius* (Diptera) and the oligochaete *Tubifex tubifex*; both prey types are consumed by this predator in nature (Locklin et al. 2006) and *Sialis* larvae accumulate the majority of their Cd and other trace metals from their prey (Roy and Hare, 1999; Croisetière et al. 2006). We investigated how the subcellular distribution of Cd differs with prey type and prey Cd-exposure duration and how these differences influence Cd assimilation by the predator.

## METHODS

### Invertebrate collection and culture

We collected larvae of the alderfly *S. velata* in Lake St. Joseph (46° 55'N, 71° 40'W), Quebec, at a depth of 4.5 m, using an Ekman grab and a 1-mm mesh-aperture net to separate larvae from sediment. In the laboratory, larvae were held individually in 40 ml plastic containers, in lake water, at 10 °C. *Chironomus riparius* was cultured in our laboratory on fine sand from egg masses obtained from the Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (Quebec, QC). *Tubifex tubifex* were purchased from Aquatic Research Organisms (Hampton, NH, USA) and kept in aquaria containing un-sieved sediment from Lake St. Joseph. Both prey types were exposed to a 16 to 8 light to dark photoperiod, maintained in reconstituted water at 20 °C, and fed Aquatox™ fish food (Aquatic Eco-systems Inc., Apopka, FL, USA). The predator was fed 1-2 uncontaminated prey per week (either *T. tubifex* or *C. riparius*).

### Exposure of prey to Cd

Un-sieved sediments (uppermost 10 cm) from the *S. velata* collection site were spiked with stable Cd and the radiotracer <sup>109</sup>Cd giving a nominal total sediment Cd concentration of 265 nmol g<sup>-1</sup> dry-weight (specific activity of 0.7 µCi nmol<sup>-1</sup> of total Cd). This Cd concentration is environmentally realistic since Cd is present at this concentration in sediments from lakes located near metal smelters (Arafat, 1985; Andres et al. 1998; Hare and Tessier, 1998; Borgmann et al. 2004; Croisetière et al. 2006). Sediments were held at 10 °C and mixed 3 times per week for 1 month. To minimize the quantity of radioactive waste, contaminated sediment was reused for several experiments over an 8 month period.

We poured 150 ml of contaminated sediment (5 ml (individual prey)<sup>-1</sup>) into 1 l high-density polyethylene (HDPE) bottles and then carefully added 600 ml of reconstituted water so as to not resuspend sediment. For *T. tubifex* we used reconstituted water having major ions at concentrations similar to those in the soft-waters of Lake St. Joseph (82 µM Ca, 25 µM Mg, 62 µM Na, 5 µM K; hardness of 11 mg/l as CaCO<sub>3</sub>), whereas for *C. riparius* we used harder water (28 mg/l as CaCO<sub>3</sub>) because this insect grew faster under such conditions. Bottles were left for 1 week prior to the addition of prey and prey were acclimated at 10 °C for 1 d prior to exposure. All experiments were conducted at 10 °C to prevent insect emergence. The pH of water during the Cd exposures was 6.5. After exposure for 4, 12, 20 or 28 d, prey were removed from three containers then depurated for 5 h in non-radioactive sediment from Lake St. Joseph and transferred to clean water for another 18-20 h to evacuate all sediment from their gut. Approximately 80 individuals were frozen at -80 °C in micro-centrifuge tubes for

later subcellular fractionation. In addition, contaminated prey were removed on days 12, 20, and 28 (*T. tubifex*) or on days 4, 12, and 20 (*C. riparius*), depurated as described above, weighed, gamma-counted and then offered live to *S. velata*. The mean ( $\pm$  SE) individual fresh weights of prey fed to *S. velata* were  $9.0 \pm 1.1$  mg for *T. tubifex* and  $4.6 \pm 0.4$  mg for *C. riparius*.

#### Cd assimilation by the predator

Prior to Cd exposure, *S. velata* ( $91.7 \pm 4.2$  (SE) mg fresh weight) were fed one uncontaminated *C. riparius* daily for 4 d and then starved for 3 d. At each exposure time (given above) the predator consumed sufficient contaminated prey (2) to fill its gut. Prey were consumed whole within 15 min and there was no measurable loss of radioactivity from prey to water during this time. Predator  $^{109}\text{Cd}$  was measured daily over the following 8 d. During this period, water was changed daily and *S. velata* were fed one non-radioactive prey daily for the first 4 d and then starved for the next 3 d; feces and water were also collected daily and measured for radioactivity. This feeding procedure was repeated at the times mentioned above. Prior to  $^{109}\text{Cd}$  measurements, invertebrates were rinsed 12 times using 0.1 mM EDTA to remove any adsorbed radiotracer.

To calculate assimilation efficiency (AE, %), we fit the non-linear regression  $A = AE e^{-bt}$  (where  $A$  is the percentage of ingested radioactivity remaining in the predator at time  $t$ , and  $b$  is the depuration rate constant for physiological Cd loss) to our data for trace element loss after 72 h (when there was no remaining fecal matter in the predator's gut) and used the corresponding y-intercept to estimate Cd AE (Wallace et al. 1998; Wang and Fisher, 1999). Since each predator received more than one contaminated meal, we corrected for metal loss from previous meals by assuming that the loss of  $^{109}\text{Cd}$  following a *T. tubifex* meal was linear after 12 d. This correction was unnecessary following a *C. riparius* meal because when this species was eaten, physiological Cd loss from the predator was not measurable after 4 d.

#### Subcellular distribution of Cd in prey

Radioactivity was measured in samples of pooled prey ( $\sim 85$  mg ww for *C. riparius* and  $\sim 150$  mg ww for *T. tubifex*) that were then homogenized manually (25 turns of a 2 ml Potter-Elvehjem glass homogenizer), on ice, in Tris buffer ( $25 \text{ mmol l}^{-1}$ , Omnipure 9210, 99.8% purity, adjusted to pH 7.2 with 35% trace metal-grade HCl) at a tissue to buffer dilution of 1 to 4 for *T. tubifex* and 1 to 8 for *C. riparius*. Homogenized tissues were returned to their initial micro-centrifuge

tubes and 30 µl aliquots were removed and deposited on pre-weighed pieces of Teflon sheeting for measurement of total and radioactive Cd (described below).

A fractionation procedure adapted from Wallace et al. (1998), Cain et al. (2004), and Giguère et al. (2006) was used to separate prey into the following operationally-defined fractions: 1) cellular debris and nuclei; 2) granules and exoskeleton; 3) organelles and lysosomes; 4) heat-denatured proteins such as enzymes (HDP); and 5) heat-stable proteins including metallothionein, glutathione, small peptides and amino acids (HSP). The fractionation procedure is shown in Figure 1 and can be summarized as follows. The homogenate was first centrifuged at 800 x g (centriSorvall RC 5C Plus with an HB-4 rotor) to give a pellet that was then resuspended in 0.5 ml of ultrapure water, heated at 100 °C for 2 min, and digested in 0.5-ml of 1N NaOH at 70 °C for 1 h. Centrifugation of this digestate at 10,000 x g for 10 min allowed a solubilized fraction, containing cellular debris and nuclei, to be separated from a residual fraction that included granules and exoskeleton. The supernatant of the 800 x g centrifugation was re-centrifuged at 100,000 x g (Beckman TL-100 with a TLA-100.3 fixed-angle rotor) to yield a pellet containing organelles and lysosomes. The resulting supernatant was held at 80 °C for 10 min and left on ice for 1 h. A final centrifugation at 50,000 x g (Beckman TL-100 with a TLA-100.3 fixed-angle rotor) yielded a supernatant containing peptides and heat-stable proteins and a pellet composed of heat-denatured proteins.

### Analyses

Radioactivity was measured using a Wallac NaI-well type gamma detector (1480 Wallac Wizard 3). Gamma emissions for <sup>109</sup>Cd were determined at 16-32 keV. Counting efficiency (30%) and sample geometry were considered and counting times were adjusted so that counting error was < 5 %. The mean sum (±SD) of radioactive Cd in the subcellular fractions was close to the values measured for whole homogenate prior to fractionation, that is, 90.1% ± 4.9% for *T. tubifex* and 88.1% ± 2.0% for *C. riparius*, suggesting that there was little loss of Cd during the fractionation procedure.

Before use all labware used for total trace-element analyses was soaked in 15 % HNO<sub>3</sub> for at least 12 h, rinsed with ultrapure water and dried under a laminar-flow hood. Frozen aliquots of homogenized tissues were freeze-dried (FTS Systems™) in micro-centrifuge tubes, weighed, then digested in trace-metal grade HNO<sub>3</sub> (100 µl mg<sup>-1</sup> dry weight) for 5 d at room temperature. Then 40 µl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added and digestion was allowed to continue for 1 d. Samples were diluted with 860 µl of ultrapure water prior to measuring total Cd by Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (Thermo Instrument, X7). Samples of a certified reference material

(National Research Council of Canada TORT-2; lobster hepatopancreas), of comparable weight to the samples, was submitted to the same digestion procedure. Mean ( $\pm$  SD) recovery of Cd in samples of Tort-2 was  $102 \pm 4\%$ . Samples of 0.1 g of freeze-dried sediments were digested in 5 ml of HNO<sub>3</sub> for 5 d at room temperature and then 2 ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added and the digestion was continued for another day followed by dilution to a final volume of 50 ml. Certified reference material (National Research Council of Canada MESS-3, marine sediment) was used to verify digestion efficiency with a mean percentage recovery of Cd of  $105 \pm 2\%$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Cadmium in prey*

Total Cd concentrations in *T. tubifex* increased approximately linearly over the 4-week exposure period (Fig. 2a). Gillis et al. (2004) also observed linear uptake of Cd by this species, and this over a 6-week period. Likewise, Cd concentrations in the 3 major subcellular fractions increased in approximately linear fashion as total Cd concentrations increased in *T. tubifex*, whereas Cd concentrations in the HSP and granule fractions tended to plateau (Fig. 3a). Steen-Redeker et al. (2007) also reported a plateau in the Cd concentrations in these latter two fractions following a 2 week exposure of *T. tubifex* to Cd. Our data suggest that there is no threshold below which this oligochaete is able to maintain Cd concentrations low and constant in potentially sensitive subcellular fractions (e.g., HDP); similar results have been reported for a freshwater fish (Giguère et al. 2006).

Less than half of the Cd in *T. tubifex* (~34%) was located in the cytosol (HDP + HSP), as has been reported previously (32-46%; Steen-Redeker et al. 2007). The mean proportions of Cd in the various subcellular fractions decreased ( $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis followed by Student-Newman-Keuls (SNK) multiple pairwise comparisons) in the order: debris (35%) > organelles (27%) > HDP (22%) > HSP (12%) > granules (2%). Steen-Redeker et al. (2007) found a similarly large proportion (26%) of Cd in the organelle fraction of Cd-contaminated *T. tubifex*. The large contribution from of the organelle fraction is likely due to the presence of Cd in chloragosomes and lysosomes, which are reported to be important sites of metal storage in terrestrial oligochaetes (Back, 1990; Affar et al. 1998; Peeters-Joris, 2000; Morgan and Turner, 2005). Because such structures can vary widely in both their size and developmental stage, as reflected by their heterogeneous electron densities (Cancio et al. 1995), they would likely have been present in both the organelles and granules fractions.



The small proportion of Cd in the granule fraction (2%) is similar to that reported for the tubificid oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri* collected from an uncontaminated site (Wallace et al. 1998). However, at high ambient Cd concentrations, this same species had ~30% of its <sup>109</sup>Cd associated with granules (Wallace et al. 1998), and a similar value has been reported for the total Cd associated with granules in *T. tubifex* (Steen-Redeker et al. 2007). However, comparisons between our results and those of the two earlier studies should be made with caution because Cd-exposure in the other studies was from water alone, which would influence the route of Cd uptake into worms (skin versus gut) and thus could affect the internal distribution and subcellular partitioning of Cd. The pre-exposure history of experimental animals can also influence metal distribution patterns at the cellular level (Wang and Rainbow, 2005).

The proportional distribution of Cd among the subcellular fractions in *T. tubifex* varied little over time, with the possible exception of the HSP fraction that was somewhat higher early in the Cd exposure period (Fig. 4a). Steen-Redeker et al. (2007) noted that the proportion of Cd in most subcellular fractions of *T. tubifex* changed little with exposure duration, with the exception of the organelle fraction, in which proportions tended to increase (from 10 to 26%), and the HSP fraction, in which they tended to decrease (from 14 to 6%). If we assume that Cd in the organelles, HDP and HSP fractions is available for uptake by a predator (Wallace and Luoma, 2003) then the majority of the Cd in *T. tubifex* (60-65%) should be available to *S. velata*.

Total Cd accumulation by *C. riparius* was also approximately linear during the exposure period, although its Cd concentrations were much lower than those of *T. tubifex* (Fig. 2). Cadmium concentrations in all subcellular fractions increased with increasing Cd concentrations in *C. riparius* (Fig. 3b). Mean proportions of Cd in *C. riparius* were, in decreasing order ( $p < 0.05$ ): HDP (39%) - HSP (37%) > debris (13%) > organelles (5%) - granules (5%). Thus the majority of the Cd in *C. riparius* (76%) was in the cytosol (HDP + HSP), unlike *T. tubifex* in which cytosolic Cd was only about one-third of the total. Similarly, Yamamura et al. (1983) and Seidman et al. (1986) recovered 60 and 75% of Cd in the cytosol of *Chironomus yoshimatsui* and *Chironomus thummi* larvae, respectively. The proportions of Cd in the various subcellular fractions varied little with prey exposure time (Fig. 4b), with the exception of those for the two protein fractions which changed in relative importance after 20 d of Cd exposure. The majority of the Cd in *C. riparius* (~80%) was potentially available for uptake by a predator.

### *Cadmium trophic transfer*

Following a meal of either prey type, the predator *S. velata* initially lost Cd rapidly, mainly in the form of unassimilated Cd in feces, and then the loss rate decreased as physiological Cd loss became the sole contributor to the decline in the predator's Cd content (Fig. 5). Cadmium loss curves for the predator were similar after consumption of prey exposed to this metal for different periods of time. Although there appeared to be a tendency for the predator to retain less Cd when it consumed *C. riparius* that had been exposed to Cd for shorter periods of time (Fig. 5), this trend was not significant ( $p > 0.05$ ).

Using our data for Cd loss from *S. velata* following a Cd-rich meal (Fig. 5), we estimated (see Methods) the efficiency with which this predator assimilated Cd. This predator retained approximately one-half to three-quarters of the Cd eaten (Fig. 6a), with the minimum (46% for *T. tubifex*) being close to that reported for *S. velata* feeding on the chironomid *Cryptochironomus* sp. (~50%; Roy and Hare, 1999). Assimilation efficiencies of Cd in *C. riparius* (~72%) were higher than those for *T. tubifex* (Fig. 6a). Values reported for Cd assimilation by several other predatory aquatic invertebrates fall within the range of those measured for *S. velata*, for example, larvae of the midge *Chaoborus americanus* feeding on copepods (58%; Croteau et al. 2001; Orvoine et al. 2006), a water mite feeding on *C. riparius* (61%; Timmermans et al. 1992), grass shrimp feeding on an amphipod (~62%; Seebaugh et al. 2006) and the crustacean *Mysis relicta* feeding on *Daphnia magna* (72%; Smokorowski et al. 1998).

For some prey-predator combinations, Cd assimilation efficiency is reported to depend on prey Cd concentrations, that is, the higher the Cd concentration in prey, the lower the percentage that is assimilated by its predator (Reinfelder et al. 1998; Xu et al. 2001; Guan and Wang, 2004; Seebaugh et al. 2005). Our data suggests that this is not the case for *S. velata* because, for a given prey type, Cd assimilation efficiency was not related to the duration of prey Cd-exposure (Fig. 6a), which is in turn directly related to prey Cd concentration (Fig. 2).

Cadmium assimilation efficiency is also reported to depend on the availability of Cd in prey. Indeed, our data suggests that there is a strong positive relationship ( $p < 0.001$ ) between the assimilation efficiency of Cd from a given prey type and the percentage of prey Cd that is in the sum of the organelles, HDP and HSP fractions (Fig. 6a). However, the relationship between these variables is somewhat less than 1:1 (Fig. 6a, circles), which suggests that one of these 3 prey fractions is not available in its entirety to this predator. As discussed above, the organelles fraction in *T. tubifex* is likely a mixture of chloragosomes and lysosomes that vary widely in structure and function and thus the ease with which they would lose their Cd in the

predator's gut should also vary. If we consider only Cd in the cytosol of prey (fig. 6a, triangles), our data points for *C. riparius* fall closer to the 1:1 line (organelles contained only 5% of its Cd) but those for *T. tubifex* now fall above the 1:1 line. This result suggests that part, but not all, of the Cd in the organelles fraction is available to be assimilated by the predator. The best fit to the 1:1 line is obtained when we assume that 45% of the Cd in the organelles fraction of *T. tubifex* is available to the predator (data not shown).

We can test the hypothesis that only a portion of the Cd in the organelles fraction is available for assimilation by the predator by comparing the proportions of Cd measured in the predator's feces with those of Cd in prey cell fractions likely to be resistant to digestion. As predicted, the % of Cd present in feces of *S. velata* was directly related ( $p < 0.001$ ) to the sum of the percentages present in prey subcellular fractions that are thought to be unavailable for assimilation (debris + granules fractions) by a predator (Fig. 6b). If we assume, as above, that 55% of the Cd in the organelles fraction is not assimilated, then the points for *T. tubifex* fall very close to the 1:1 line (Fig. 6b). Likewise, Wallace and Lopez (1997) fed the organelle fraction obtained from Cd-resistant oligochaetes (*Limnodrilus hoffmeisteri*) to a grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and found that this predator assimilated only ~70% of the Cd associated with this fraction. These data support the idea that the organelles fraction is a heterogeneous collection of particles varying in their digestibility by the predator.

## CONCLUSION

We measured the subcellular distributions of Cd at various times in the insect *C. riparius* and the worm *T. tubifex*. The proportional distribution of Cd differed between the two prey types. However, for a given prey type, these proportions changed little with time of exposure to Cd-contaminated sediments. The majority of the Cd in *C. riparius* was in the cytosolic fraction of its cells, and was readily assimilated by the predator. A substantial portion of Cd in the worm *T. tubifex* was bound to the organelle fraction, and part of this Cd was unavailable for assimilation by *S. velata* as shown by the lower assimilation efficiencies for Cd in this prey type. The sum of the organelle, HDP and HSP fractions over-predicted somewhat Cd assimilation efficiencies by *S. velata*, especially when feeding on the oligochaete. Overall, Cd assimilation differed between prey types and this difference was related to the subcellular fractionation of Cd in these prey. However, our results suggest that some prey fractions (granules and organelles) contain a mixture of particle types that vary in the ease with which their Cd can be disassociated in a predator's gut and subsequently assimilated. Predictions of Cd trophic transfer will be facilitated by a better understanding of Cd bioavailability in such prey fractions.



## REFERENCES

- Affar EB, Dufour M, Poirier GG, Nadeau D (1998) Isolation, purification and partial characterization of chloragocytes from the earthworm species *Lumbricus terrestris*. *Mol Cell Biochem* 185: 123-133.
- Andres S, Ribeyre F, Boudou A (1998) Effects of temperature and exposure duration on transfer of cadmium between naturally contaminated sediments and burrowing mayfly nymphs (*Hexagenia rigida*) *Arch Environ Contam Toxicol* 35: 295-301.
- Arafat NM (1985) The impact of mining and smelting on trace metal distribution in lake sediments around Rouyn-Noranda, Quebec. *Water Poll Res J Canada* 20: 1-8.
- Back H (1990) Epidermal uptake of Pb, Cd, and Zn in tubificid worms. *Oecologia* 85: 226-232.
- Borgmann U, Nowierski M, Grapentine LC, Dixon DG (2004) Assessing the cause of impacts on benthic organisms near Rouyn-Noranda, Quebec. *Environ Pollut* 129: 39-48.
- Cain DJ, Luoma SN, Wallace WG (2004) Linking metal bioaccumulation of aquatic insects to their distribution patterns in a mining-impacted river. *Environ Toxicol Chem* 23: 1463-1473.
- Campbell PGC (2006) Cadmium - a priority pollutant. *Environ Chem* 3: 387-388.
- Campbell PGC, Hontela A, Rasmussen JB, A. Giguère A, Gravel A, Kraemer L, Kovacs J, Lacroix A, Levesque H, Sherwood GD (2003) Differentiating between direct (physiological) and food-chain mediated (bioenergetic) effects on fish metal-impacted lakes. *Human Ecol Risk Assess* 9: 847-866.
- Cancio I, Gwynn I, Ireland MP, Cajaraville MP (1995) Lysosomal origin of the chloragosomes in the chloragogenous tissue of the earthworm *Eisenia foetida*: Cytochemical demonstration of acid phosphatase activity. *Histochem J* 27: 591-596.
- Cheung M, Wang WX (2005) Influence of subcellular metal compartmentalization in different prey on the transfer of metals to a predatory gastropod. *Mar Ecol Prog Ser* 286: 155-166.
- Croisetière L, Hare L, Tessier A (2006) A field experiment to determine the relative importance of prey and water as sources of As, Cd, Co, Cu, Pb, and Zn for the aquatic invertebrate *Sialis velata*. *Environ Sci Technol* 40: 873-879.
- Croteau M-N, Hare L, Tessier A (2001) Differences in Cd accumulation among species of the lake-dwelling biomonitor *Chaoborus*. *Can J Fish Aquat Sci* 58: 1737-1746.
- Giguère A, Campbell PGC, Hare L, Couture P (2006) Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquat Toxicol* 77: 178-189.
- Gillis PL, Dixon DG, Borgmann U, Reynoldson TB (2004) Uptake and depuration of cadmium, nickel, and lead in laboratory-exposed *Tubifex tubifex* and corresponding changes in the concentration of a metallothionein-like protein. *Environ Toxicol Chem* 23: 76-85.
- Guan R, Wang WX (2004) Dietary assimilation and elimination of Cd, Se, Zn by *Daphnia magna* at different metal concentrations. *Environ Toxicol Chem* 23: 2689-2698.
- Hare L (1992) Aquatic insects and trace metals: Bioavailability, bioaccumulation, and toxicity. *Crit Rev Toxicol* 22: 327-369.

- Hare L, Tessier A (1998) The aquatic insect *Chaoborus* as a biomonitor of trace elements in lakes. *Limnol Oceanogr* 43: 1850-1859.
- Hare L, Tessier A, Borgmann U (2003) Metal sources for freshwater invertebrates: pertinence for risk assessment. *Hum Ecol R Assess*. 9: 779-793.
- Hare L, Tessier A, Campbell PGC (1991) Trace element distributions in aquatic insects: variations among genera, elements, and lakes. *Can J Fish Aquat Sci*: 1481-1491.
- Locklin JL, Arsuffi TL, Bowles DE (2006) Life history of *Sialis* (Megaloptera: Sialidae) in a lentic and lotic ecosystem in central Texas. *Am Midl Nat* 155: 50-62.
- Meyer JS, Adams WJ, Brix KV, Luoma SN, Mount DR, Stubblefield WA, Wood CM (2005) Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms, SETAC press, Pensacola (FL), 329 p.
- Morgan AJ, Turner M (2005) Quantitative ultrastructure of metal sequestering cells reflects inter-site and inter-species differences in earthworm metal burdens. *Arch Environ Contam Toxicol* 49: 45-52.
- Nott JA, Nicolaidou A (1990) Transfer of detoxification along marine food chains. *J Mar Biol Assoc UK* 70: 905-912.
- Orvoine J, Hare L, Tessier A (2006) Competition between protons and cadmium ions in the planktonic food chain leading to the phantom midge *Chaoborus*. *Limnol Oceanogr* 51: 1013-1020.
- Peeters-Joris C (2000) The lysosomes of earthworm chloragocytes: Biochemical and morphological characterization. *Comp Biochem Physiol A* 126: 323-340.
- Reinfelder JR, Fisher NS (1991) The assimilation of elements ingested by marine copepods. *Science* 251: 794-796.
- Reinfelder JR, Fisher NS (1994) The assimilation of elements ingested by marine planktonic bivalve larvae. *Limnol Oceanogr* 39: 12-20.
- Reinfelder JR, Fisher NS, Luoma SN, Nichols JW, and Wang WX (1998) Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach. *Sci Tot Environ* 219: 117-135.
- Roy I, Hare L (1999) Relative importance of water and food as Cd sources to the predatory insect *Sialis velata* (Megaloptera). *Can J Fish Aquat Sci* 56: 1143-1149.
- Seebaugh DR, Estephan A, Wallace WG (2006) Relationship between dietary cadmium absorption by grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and trophically available cadmium in amphipod (*Gammarus lawrencianus*) prey. *Bull Environ Contam Toxicol* 76: 16-23.
- Seebaugh DR, Goto D, Wallace WG (2005) Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain. *Mar Environ Res* 59: 473-491.
- Seebaugh DR, Wallace WG (2004) Importance of metal-binding proteins in partitioning of Cd and Zn as trophically available metal (TAM) in the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Mar Ecol Prog Ser* 272: 215-230.

- Seidman LA, Bergtron G, Gingrich DJ, Remsen CC (1986) Accumulation of cadmium by the fourth instar larva of the fly *Chironomus thummi*. *Tiss Cell* 18: 395-405.
- Selck H, Forbes VE, Forbes TL (1998) The toxicity and toxicokinetics of cadmium in *Capitella* sp. I: relative importance of water and sediment as routes of cadmium uptake. *Mar Ecol Prog Ser* 164: 167-178.
- Smokorowski KE, Lasenby DC, Evans RD (1998) Quantifying the uptake and release of cadmium and copper by the opossum shrimp *Mysis relicta* preying upon the cladoceran *Daphnia magna* using stable isotope tracers. *Can J Fish Aquat Sci* 55: 909-916.
- Steen-Redeker E, Van Campenhout K, Bervoets L, Reijnders H, Blust R (2007) Subcellular distribution of Cd in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*, implications for trophic availability and toxicity. *Environ Poll* 148: 166-175.
- Timmermans KR, Spijkerman E, Tonkes M, Govers HAJ (1992) Cadmium and zinc uptake by two species of aquatic freshwater invertebrate predators from dietary and aqueous sources. *Can J Fish Aquat Sci* 49: 655-662.
- Wallace WG, Lee BG, Luoma SN (2003) Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fraction (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar Ecol Prog Ser* 249: 183-197.
- Wallace WG, Luoma SN (2003) Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Mar Ecol Prog Ser* 257: 125-137.
- Wallace WG, Lopez GR (1996) Relationship between subcellular cadmium distribution in prey and cadmium trophic transfer to predator. *Estuaries* 19: 923-930.
- Wallace WG, Lopez GR (1997) Bioavailability of biologically sequestered cadmium and the implications of metal detoxification. *Mar Ecol Prog Ser* 147: 149-157.
- Wallace WG, Lopez GR, Levinton JS (1998) Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. *Mar Ecol Prog Ser* 172: 225-237.
- Wang WX, Fisher NS (1999) Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: a synthesis. *Environ Toxicol Chem* 18: 2034-2045.
- Wang WX, Rainbow PS (2005) Influence of exposure history on trace metal uptake and bioaccumulation by marine invertebrates. *Ecotox Environ Saf* 61: 145-159.
- Xu Y, Wang WX, Hsieh DPH (2001) Influences of metal concentration in phytoplankton and seawater on metal assimilation and elimination in marine copepods. *Environ Toxicol Chem* 20: 1067-1077.
- Yamamura M, Suzuki KT, Hatakeyma S, Kubota K (1983) Tolerance to cadmium and cadmium-binding proteins induced in the midge larva *Chironomus yoshimatsui* (Diptera, Chironomidae). *Comp Biochem Physiol* 75C: 21-24.
- Zhang L, Wang WX (2006) Significance of internal metal speciation in prey in influencing the trophic transfer of metals in marine fish. *Limnol Oceanogr* 51: 2008-2017.

**FIGURE CAPTIONS**

**Figure 1.** Fractionation procedure designed to produce five operationally-defined subcellular fractions (in bold font).

**Figure 2.** Changes over time in the total Cd concentrations (means  $\pm$  SE, n = 4 pooled samples) of two prey taxa exposed to Cd-spiked sediment and its overlying water.

**Figure 3.** Total Cd concentrations in prey exposed to Cd for various lengths of time (see Fig. 2) compared to those in five operationally defined subcellular fractions in these prey, that is, debris, granules, organelles, Heat-Denatured Proteins (HDP), and Heat-Stable Proteins (HSP). Each data point represents a single pooled sample of prey. Dotted lines are fitted curves for each fraction.

**Figure 4.** Percentage of Cd (means  $\pm$  SE, n= 4) in five subcellular fractions (see caption of Fig. 3) that were isolated from prey exposed to Cd for varying lengths of time. Different letters indicate a significant difference between percentages. Gr = granules, Org = organelles.

**Figure 5.** Time course of Cd loss by the predator *S. velata* following the consumption (at time 0) of Cd-contaminated *T. tubifex* or *C. riparius* that had been exposed to this metal for various lengths of time.

**Figure 6.** a: Assimilation efficiency (% , mean  $\pm$  SE, n = 5) of Cd by *S. velata* when fed either *T. tubifex* or *C. riparius* compared to the percentage of Cd that is likely to be available as predicted by the subcellular fractionation of prey (means  $\pm$  SE, n = 4): the triangles represent the condition where metal available to the predator is in the cytosolic fraction (HDP + HSP) of prey, whereas circles consider available metal as the sum of the cytosolic and organelle fractions in prey. b: Percentage represented by feces of the total initial Cd in the predator *S.*



*velata* compared to the percentages of Cd in two prey types that are unlikely to be available for assimilation by this predator. Circles refer to the condition where unavailable Cd is in the debris + granules fraction of prey, whereas triangles consider a scenario where an additional 55% of the Cd in the organelle (Org) fraction is unavailable to the predator. Values beside data points represent the lengths of time (days) that prey were exposed to Cd. The dotted lines are 1:1 relationships.

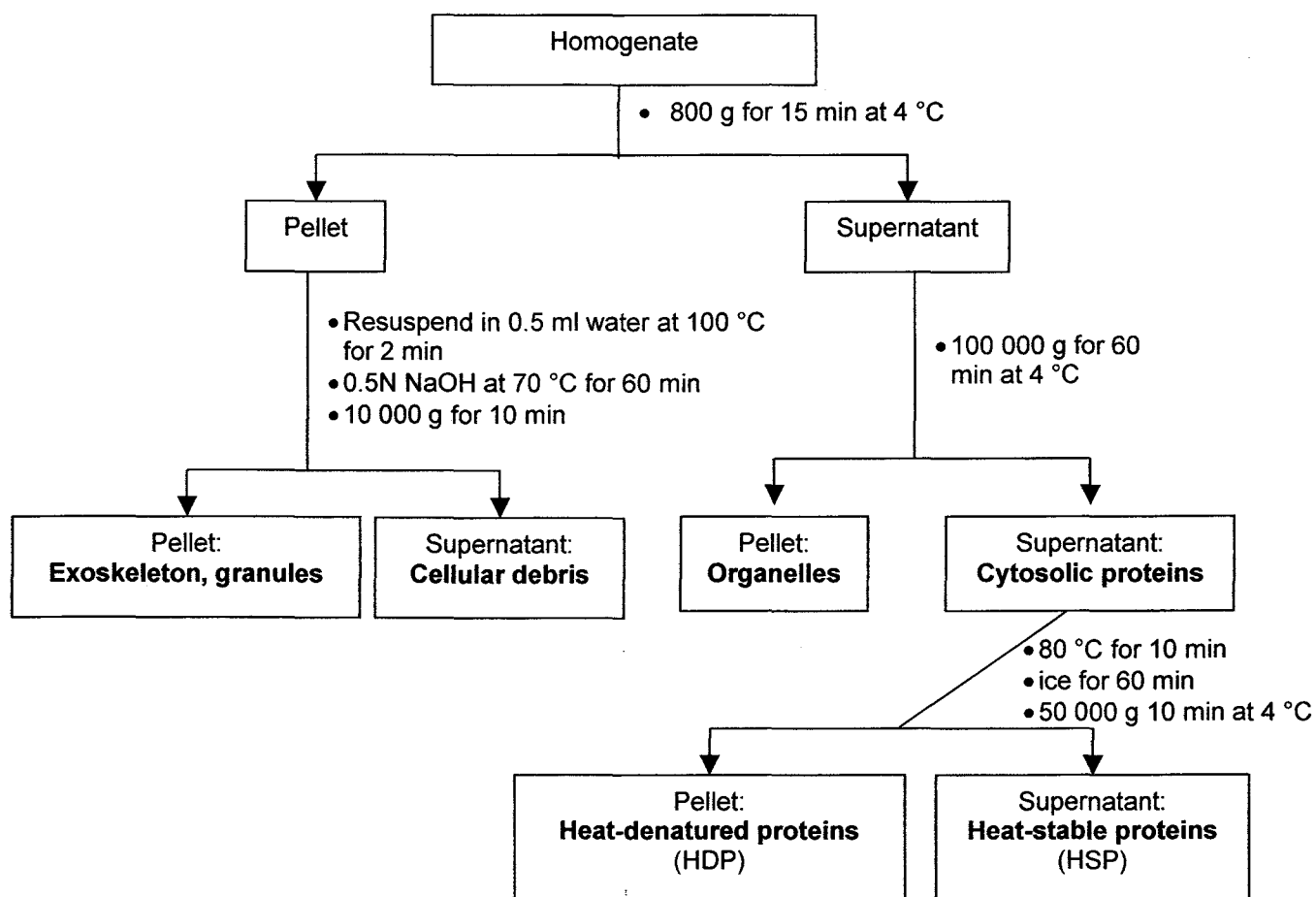


Fig. 1, Dubois & Hare

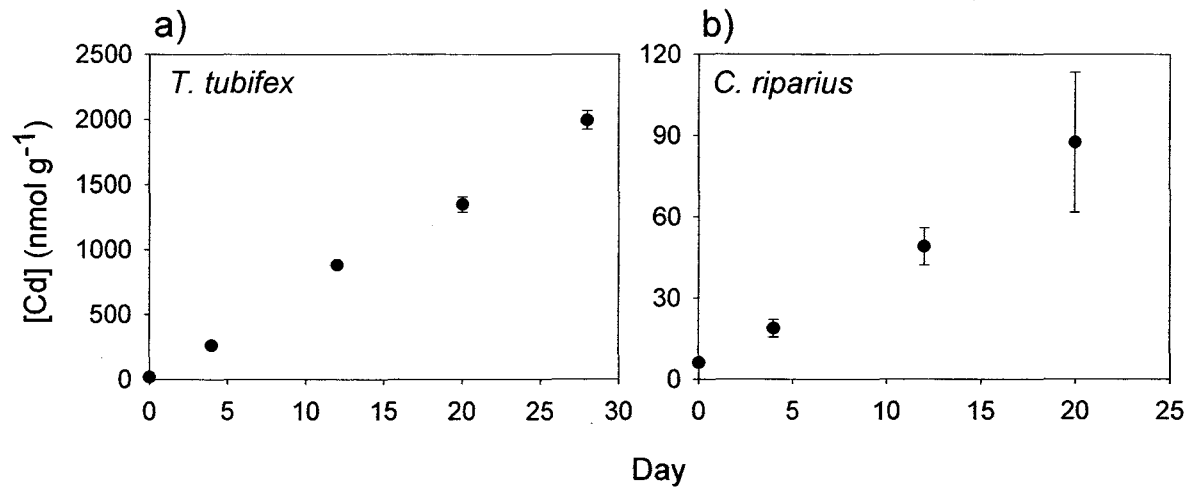


Fig. 2, Dubois &amp; Hare

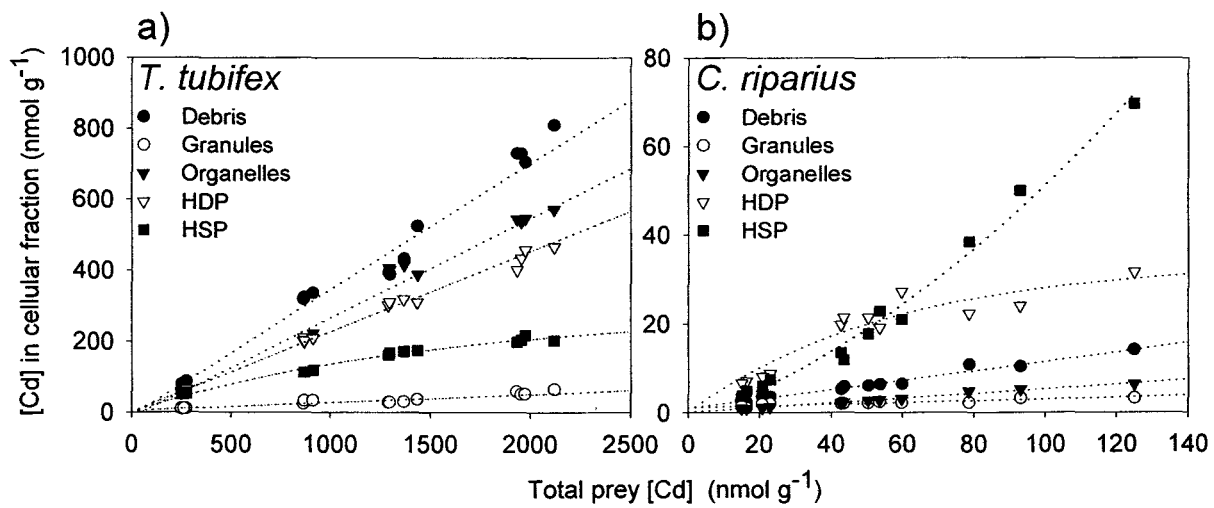


Fig. 3, Dubois &amp; Hare

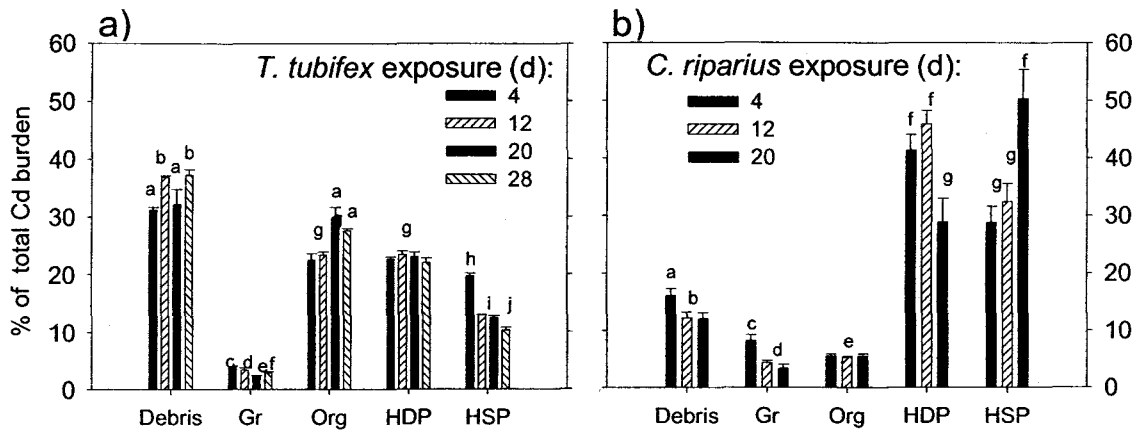


Fig. 4, Dubois & Hare

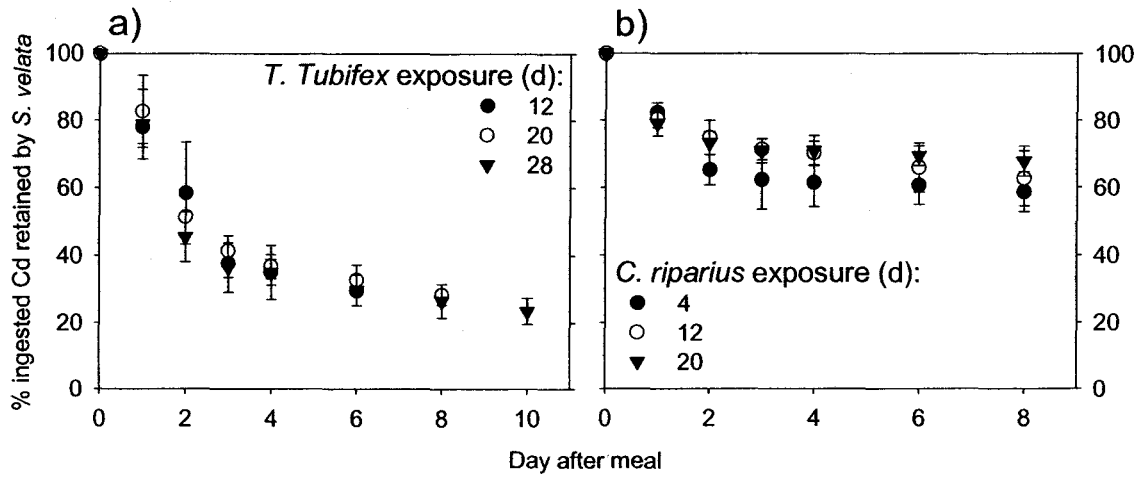


Fig. 5, Dubois & Hare

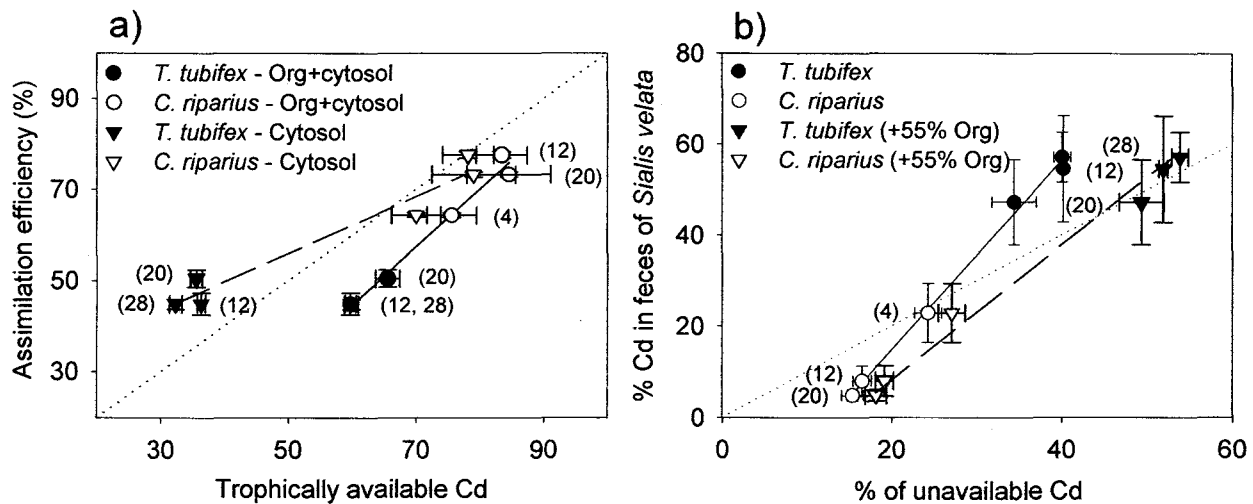
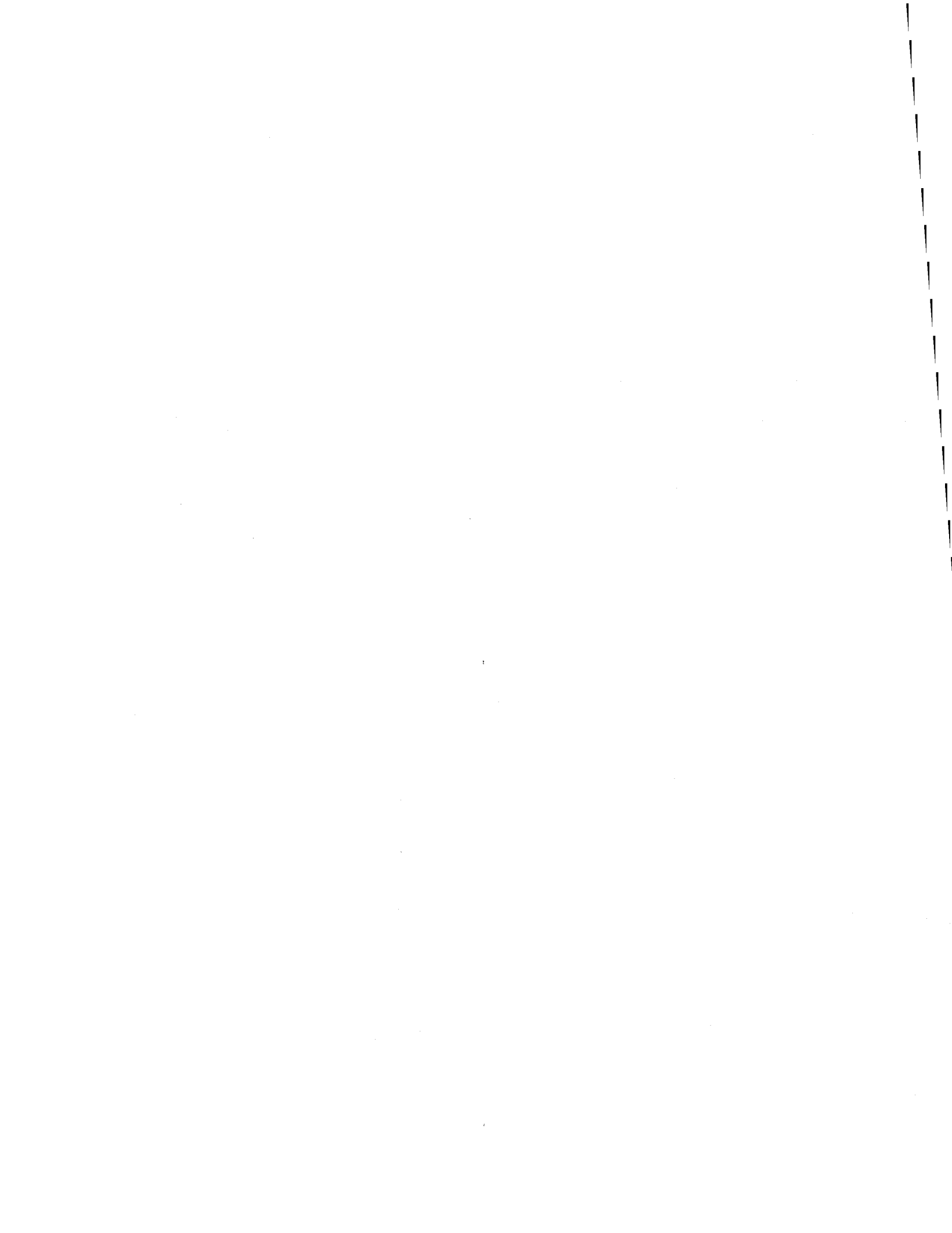


Fig. 6, Dubois & Hare





**3<sup>E</sup> PARTIE**  
**ARTICLE 2 - LE SÉLÉNIUM**

## ARTICLE 2

### Selenium assimilation by a freshwater insect and its relationship to Se subcellular partitioning in two prey types

*Maitée Dubois and Landis Hare\**

Institut national de la recherche scientifique - Eau, Terre et Environnement  
(INRS-ETE), Quebec City, Quebec, G1K 9A9, Canada

For submission as an article to Environmental Pollution

**Key words:** selenium, *Chironomus*, *Tubifex*, trophic transfer, subcellular partitioning

Running head: Se subcellular distribution and trophic transfer

---

\*Corresponding author (landis@ete.inrs.ca)

## ABSTRACT

We applied a fractionation protocol to estimate the proportion of selenium (Se) in prey cells that is potentially available for assimilation by an aquatic predator (the alderfly *Sialis velata*). Selenium in the oligochaete *Tubifex tubifex* was distributed as follows: debris (36%) ≈ heat stable proteins (HSP, 29%) > organelles (23%) > heat denatured proteins (HDP, 11%) > granules (1%); whereas Se in the insect *Chironomus riparius* declined in the order: debris (37%) > HDP (28%) > HSP (19%) > organelles (14%) > granules (2%). The predator assimilated more than half of the Se present in both types of prey, that is, ~70 % of that in the oligochaete and ~62 % of that in the insect. The results of the prey fractionation protocol successfully predicted that the majority of the Se would be taken up by a predator. Furthermore, the proportional distribution of Se among prey subcellular fractions varied little over time (up to 28 d), which was consistent with the observation that the duration of prey Se exposure had little influence on Se assimilation by the predator. The ease with which Se is transferred between trophic levels supports previous field observations that fish in Se-contaminated waters are at risk from exposure to Se via their diet.

## INTRODUCTION

Agricultural drainage, the combustion of fossil fuels and mining (phosphate, sulfidic ores) have greatly increased Se concentrations in some aquatic systems (Chapman and Wang, 2000), where this element is taken up by microorganisms and primary producers who use it as an essential cofactor for the biosynthesis of glutathione peroxydase (Ahmad et al. 1989; Allan et al. 1999; US EPA, 2004) and as a sulfur analog to produce seleno amino-acids such as seleno-methionine and seleno-cysteine (Maier and Knight, 1994; Fan et al. 2002; Simmons and Wallschläger, 2005). This biotransformation of Se into organo-Se compounds increases its availability to predators (Besser et al. 1993; Rosetta and Knight, 1995; Fan et al. 2002). In fact, dietborne exposure has been identified as the main entry route for Se into aquatic animals (Schlekat et al. 2002), and it is now considered in the derivation of criteria to protect aquatic life (Hamilton, 2002). Selenium is markedly different from most essential trace elements in that there is a very narrow gap between the concentrations of Se in animals that result in a Se deficiency and those that cause toxicity. In aquatic systems, Se is reported to cause reproductive and other effects on animals such as insects, fish and waterfowl (Luoma et al. 1992; Maier and Knight, 1994; Lemly, 1997; Hamilton, 1999; Linville et al. 2002).

Selenium transfer between trophic levels depends on several variables including the Se concentration in prey and the ease with which the Se in prey cells is assimilated by a predator (Wang, 2002; Meyer et al. 2005; Zhang and Wang, 2006). This latter variable can be quantified by fractionating homogenized prey tissues according to various operationally-defined protocols (Wallace and Lopez, 1996, 1997; Wallace et al. 2003; Wang and Rainbow, 2006; Giguère et al. 2006). Using such an approach, it has been shown that trace elements in the cytosol of prey cells tend to be more readily assimilated by predators than are those associated with particulate cellular fractions such as granules and cell membranes (Nott and Nicolaidou, 1990; Reinfelder and Fisher, 1991, 1994; Wallace and Lopez, 1996, 1997; Wallace et al. 2003; Seebaugh and Wallace, 2004; Cheung and Wang, 2005; Seebaugh et al. 2005, 2006; Zhang and Wang, 2006). Few such studies have been conducted on Se and, of these, none have measured either the subcellular partitioning of Se in freshwater invertebrates or how this variable might influence Se assimilation by their predators.

We set out to compare Se assimilation by the predatory alderfly *Sialis velata* (Megaloptera) from two prey types, the insect *Chironomus riparius* (Diptera) and the oligochaete *Tubifex tubifex*; both prey types are consumed by this predator in nature (Locklin et al. 2006) and are key components of the biota in freshwater sediments (Brinkhurst, 1974). *Sialis* is a widespread

insect that accumulates trace metals mainly from its prey (Roy and Hare, 1999; Croisetière et al. 2006).

## METHODS

### Invertebrate collection and culture

Larvae of the predator *S. velata* were collected in Lake St. Joseph (46°55'N, 71°40'W), Quebec, Canada at a depth of 4.5 m using an Ekman grab and a 1-mm mesh-aperture net to isolate larvae from sediment. In the laboratory, predators were held individually, in 40 ml plastic containers, in lake water, at 10 °C. *Chironomus riparius* was cultured in our laboratory on fine sand from egg masses obtained from the Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (Quebec, QC). *Tubifex tubifex* were purchased from Aquatic Research Organisms (Hampton, NH, USA) and kept in aquaria containing un-sieved sediment from Lake St. Joseph. Both prey types were exposed to a 16 to 8 light to dark photoperiod, maintained in reconstituted water at 20 °C, and fed Aquatox™ fish food (Aquatic Eco-systems Inc., Apopka, FL, USA). The predator was fed 1-2 uncontaminated prey per week (either *T. tubifex* or *C. riparius*).

### Exposure of prey to Se

Un-sieved sediments (uppermost 10 cm) from the *S. velata* collection site were spiked with stable Se and the radiotracer <sup>75</sup>Se (as selenite) at a nominal total Se concentration in sediment of 15 nmol g<sup>-1</sup> dry weight (dw; specific activity of 5.4 µCi nmol<sup>-1</sup> of total Se). This Se concentration is at the lower end of the sediment concentration range that is thought to represent a moderate hazard for aquatic life (12-50 nmol g<sup>-1</sup> dw (1-4 µg g<sup>-1</sup> dw); Lemly, 1997; Hamilton, 2004). Sediments were held at 10 °C and mixed 3 times per week for 1 month. To minimize the quantity of radioactive waste, contaminated sediment was reused for several experiments over an 8 month period for *T. tubifex* and for up to 4 months for *C. riparius*.

We poured 150 ml of contaminated sediment (5 ml individual prey<sup>-1</sup>) into 1 l high-density polyethylene (HDPE) bottles and then carefully added 600 ml of reconstituted water so as to not resuspend sediment. For *T. tubifex* we used reconstituted water having major ions at concentrations similar to those in the soft waters of Lake St. Joseph (82 µM Ca, 25 µM Mg, 62 µM Na, 5 µM K; hardness of 11 mg l<sup>-1</sup> as CaCO<sub>3</sub>), whereas for *C. riparius* we used harder water (28 mg l<sup>-1</sup> as CaCO<sub>3</sub>) because this insect grew faster under such conditions. Bottles were left for 1 week prior to the addition of prey and prey were acclimated at 10 °C for 1 d prior to exposure. All experiments were conducted at 10 °C to prevent insect emergence. The pH of

water during the Se exposures was 6.9. After exposure for 4, 12, 20 or 28 d, prey were removed from three containers then depurated for 5 h in non-radioactive sediment from Lake St. Joseph and transferred to clean water for another 18-20 h to evacuate all sediment from their gut. Approximately 80 individuals were frozen at -80 °C in micro-centrifuge tubes for later subcellular fractionation. In addition, contaminated prey were removed on days 12, 20, and 28 (*T. tubifex*) or on days 4, 12, and 20 (*C. riparius*), depurated as described above, weighed, gamma-counted and then offered live to *S. velata*. The mean ( $\pm$  SE) individual fresh weights of prey fed to *S. velata* were  $6.5 \pm 0.2$  mg for *T. tubifex* and  $4.3 \pm 0.4$  mg for *C. riparius*.

### Se assimilation by the predator

Prior to Se exposure, *S. velata* ( $84.7 \pm 8.4$  (SE) mg fresh weight) were fed one uncontaminated *C. riparius* daily for 4 d and then starved for 3 d. At each exposure time (given above) the predator consumed sufficient contaminated prey (2) to fill its gut. Prey were consumed whole within 15 min and there was no measurable loss of radioactivity from prey to water during this time. Predator <sup>75</sup>Se was measured daily over the following 8 d. During this period, water was changed daily and *S. velata* were fed one non-radioactive prey daily for the first 4 d and then starved for the next 3 d; feces and water were also collected daily and measured for radioactivity. This feeding procedure was repeated at the times mentioned above. Prior to <sup>75</sup>Se measurements, invertebrates were rinsed 12 times using 0.1 mM EDTA to remove any adsorbed radiotracer.

To calculate assimilation efficiency (AE, %), we fit the non-linear regression  $A = AE e^{-bt}$  (where A is the percentage of ingested radioactivity remaining in the predator at time t, and b is the depuration rate constant for physiological Se loss) to our data for trace element loss after all remaining radioactive matter was evacuated from the predator's gut, and used the corresponding y-intercept to estimate AE (Wallace et al. 1998; Wang and Fisher, 1999). Since each predator received more than one contaminated meal, we corrected for metal loss from previous meals by assuming that the loss of <sup>75</sup>Se following a *T. tubifex* or a *C. riparius* meal was negligible after 12 d.

### Subcellular distribution of Se in prey

Radioactivity was measured in samples of pooled prey (~85 mg ww for *C. riparius* and ~140 mg ww for *T. tubifex*) that were then homogenized manually (25 turns of a 2 ml Potter-Elvehjem glass homogenizer), on ice, in Tris buffer (25 mmol l<sup>-1</sup>, Omnipure 9210, 99.8% purity, adjusted

to pH 7.2 with 35% trace metal-grade HCl) at a tissue to buffer dilution of 1 to 4 for *T. tubifex* and 1 to 8 for *C. riparius*. Homogenized tissues were returned to their initial micro-centrifuge tubes and 30 µl aliquots were removed and deposited on pre-weighed pieces of Teflon sheeting for measurement of total and radioactive Cd (described below).

A fractionation procedure adapted from Wallace et al. (1998), Cain et al. (2004), and Giguère et al. (2006) was used to separate prey into the following operationally-defined fractions: 1) cellular debris and nuclei; 2) granules and exoskeleton; 3) organelles and lysosomes; 4) heat-denatured proteins such as enzymes (HDP); and 5) heat-stable proteins including metallothionein, glutathione, small peptides and amino acids (HSP). The fractionation procedure is shown in Figure 1 and can be summarized as follows. The homogenate was first centrifuged at 800 x g (centriSorvall RC 5C Plus with an HB-4 rotor) to give a pellet that was then resuspended in 0.5 ml of ultrapure water, heated at 100 °C for 2 min, and digested in 0.5-ml of 1N NaOH at 70 °C for 1 h. Centrifugation of this digestate at 10,000 x g for 10 min allowed a solubilized fraction, containing cellular debris and nuclei, to be separated from a residual fraction that included granules and exoskeleton. The supernatant of the 800 x g centrifugation was re-centrifuged at 100,000 x g (Beckman TL-100 with a TLA-100.3 fixed-angle rotor) to yield a pellet containing organelles and lysosomes. The resulting supernatant was held at 80 °C for 10 min and left on ice for 1 h. A final centrifugation at 50,000 x g (Beckman TL-100 with a TLA-100.3 fixed-angle rotor) yielded a supernatant containing peptides and heat-stable proteins and a pellet composed of heat-denatured proteins.

## Analyses

Radioactivity was measured using a Wallac NaI well-type gamma detector (1480 Wallac Wizard 3). Gamma emissions for <sup>75</sup>Se were determined at 60-365 KeV. Radioactive decay, counting efficiency, and sample geometry were considered; counting times were adjusted so that counting error was < 5 %. The mean sum (±SD) of radioactive Se in the subcellular fractions was close to the values measured for whole homogenate prior to fractionation, that is, 93.7% ± 2.1% for *T. tubifex* and 89.1% ± 2.8% for *C. riparius*, suggesting that there was little loss of Se during the fractionation procedure. To convert <sup>75</sup>Se counts to concentrations, we used the specific activities measured in the aliquots taken from the whole homogenates.

Before use, all labware used for total trace-element analyses was soaked in 15 % HNO<sub>3</sub> for at least 12 h, rinsed with ultrapure water and dried under a laminar-flow hood. Frozen aliquots of homogenized tissues were freeze-dried (FTS Systems™) in micro-centrifuge tubes, weighed, then digested in trace-metal grade HNO<sub>3</sub> (100 µl mg<sup>-1</sup> dry weight) for 5 d at room temperature.

Then 40  $\mu\text{l}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was added and digestion was allowed to continue for 1 d. Samples were diluted with 860  $\mu\text{l}$  of ultrapure water prior to measuring total Se by an Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometer equipped with a collision cell (Thermo Instrument, X7). Samples of a certified reference material (National Research Council of Canada TORT-2; lobster hepatopancreas) of comparable weight to that of our samples was submitted to the same digestion procedure. Mean ( $\pm$  SD) recovery of Se in samples of Tort-2 was  $100 \pm 4\%$ . Samples of 0.1 g of freeze-dried sediments were digested in 5 ml of  $\text{HNO}_3$  for 5 d at room temperature and then 2 ml of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was added and the digestion was continued at room temperature for another day followed by dilution to a final volume of 50 ml. Certified reference material (National Research Council of Canada MESS-3, marine sediment) was used to verify digestion efficacy; the mean recovery of Se was  $96 \pm 2\%$ . We did not measure Se speciation in sediment since our goal was to contaminate prey rather than to relate Se concentrations in prey to those in their surroundings.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Selenium in prey*

Selenium concentrations in the oligochaete *T. tubifex* increased by about 50% (to  $\sim 90 \text{ nmol g}^{-1}$  or  $\sim 7 \mu\text{g g}^{-1}$ ) following a 12 d exposure to Se-contaminated sediment and overlying water (fig. 2a). After this time, Se concentrations remained approximately constant (fig. 2a) as did Se concentrations in the various subcellular fractions (fig. 3a). We could find no other published measurements of Se in freshwater oligochaetes with which to compare our Se values. The proportional distribution of Se among cell fractions varied little between 12 and 28 d (fig. 3c) and the relative importance of the various fractions declined in the order ( $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis followed by Student-Newman-Keuls (SNK) multiple pairwise comparisons): debris (36%)  $\sim$  HSP (29%)  $>$  organelles (23%)  $>$  HDP (11%)  $>$  granules (1%). Less than half ( $\sim 40\%$ ) of the Se was located in the worm's cytosol (HDP + HSP). If we assume that only Se in the cytosolic and organelle fractions can be assimilated by a predator (Wallace et al. 2003), then the majority ( $\sim 63\%$ ) of the Se in *T. tubifex* should be available to *S. velata*.

Selenium accumulation by the insect *C. riparius* was linear during the 20-d exposure period (fig. 2b) and its maximum Se concentrations ( $\sim 17 \text{ nmol g}^{-1}$  or  $1.3 \mu\text{g g}^{-1}$ ) were  $\sim 5$  times lower than those of *T. tubifex*. Selenium concentrations far higher than the values we measured have been reported for *Chironomus decorus* ( $400 \text{ nmol g}^{-1}$  after a 4 d exposure; Alaimo et al. 1994). Selenium concentrations in *C. riparius* showed a gradual increase over time in all cell fractions (fig. 3b). In proportional terms (fig. 3d), fractions declined ( $p < 0.05$ , tested as above) in the order: debris ( $\sim 37\%$ )  $>$  HDP ( $\sim 28\%$ )  $>$  HSP ( $\sim 19\%$ )  $>$  organelles ( $\sim 14\%$ )  $>$  granules ( $\sim 2\%$ ). There was



a slight trend for the proportion of Se to decrease over time in the HDP fraction and to increase over time in the debris fraction (fig. 3d). Cytosolic Se accounted for ~47% of the total, whereas the proportion of Se that was potentially available for transfer from *C. riparius* to the predator was ~61%. This latter value is almost identical to the equivalent value for *T. tubifex* (63%). The relative importance of Se in the two protein fractions (HSP and HDP) was inverted between the two prey species.

Ours is the first published information on Se in the subcellular fractions of freshwater invertebrates. In marine invertebrates, the proportions of Se associated with granules are reported to be much larger (40-60%; Zhang and Wang, 2006) than those measured in our study (1-2%). Although these results could be due to differences among the taxa involved, they could also be explained in part by differences in the fractionation protocols used; that is, the duration of the NaOH digestion was only 10 min in the marine study as compared to 60 minutes in our study (fig. 1). A short digestion time would likely leave more Se in the granule fraction as opposed to being solubilized into the debris fraction.

#### ***Selenium transfer to the predator***

The predator *S. velata* showed a two-phase pattern of Se loss when it fed on either prey type, that is, loss was initially rapid as the predator expelled its Se-contaminated gut contents, and then slowed once physiological Se loss became dominant (fig. 4). Selenium loss by feces was somewhat more rapid following a meal of *C. riparius* (2 d) than of *T. tubifex* (3-4 d). The duration of prey exposure to Se had little influence on Se loss from the predator, with the apparent exception of the data for *T. tubifex* contaminated for 28 d (fig. 4a) for which Se activity in feces (data not shown) confirmed a rapid loss of <sup>75</sup>Se between days 2 and 3. We are not able to explain this loss except to conclude that it was not due to differences in the prey consumed because the subcellular distribution pattern of Se did not differ substantially between prey exposed to Se for 28 d and those exposed for 12 or 20 d (fig. 3). To rule out the possibility that differences in prey were the cause of the apparent anomaly, we fed an individual predator, that had not previously eaten Se-contaminated prey, a meal of prey that had been exposed to Se for 28 d; the Se loss pattern for this individual (data not shown) was very similar to that of predators that had consumed prey exposed to Se for 20 d (fig. 4a).

Using these Se-loss data, we estimated the efficiency of Se transfer between prey and predator. *Sialis velata* assimilated the majority of the Se that was present in the two prey types, that is, mean assimilation efficiencies for all prey exposure durations were ~70% for *T. tubifex* (excluding data for day 28 in Fig. 4a) and ~62% for *C. riparius*. Assimilation efficiencies

did not depend on prey exposure duration ( $p > 0.05$ ) for either of the prey species, which is consistent with the constancy over time in Se subcellular partitioning in both prey species. Although Se concentrations in *C. riparius* increased somewhat over time (Fig. 2), this did not reduce Se assimilation efficiency (fig. 4b) as has been reported for some invertebrate predators (Xu et al. 2001; Guan and Wang, 2004; Seebaugh et al. 2005).

The few available estimates for Se assimilation by predatory aquatic invertebrates suggest that most assimilate Se efficiently from their prey. Thus mysids and barnacles assimilate the majority of the Se present in copepods (61-73 % (Schlekat et al. 2004) and 74 % (Rainbow and Wang, 2001), respectively), which is similar to the results of our study for *S. velata* (62-70 %). *Sialis velata* is also reported to assimilate the majority of the Cd (~60 %; Dubois and Hare, 2007) as well as the Ni and Tl (~70 %; Dumas and Hare, 2007) present in the same prey species used in our study.

The mean proportion of Se in prey that was potentially available for uptake by the predator (~62 %) is very close to the mean AE for Se from our two prey species (~66 %), which suggests that one variable can be used to predict the other. However, individual values for the various exposure times and prey species do not fall exactly on a 1:1 line between the percentage of Se that is potentially available to the predator (HDP + HSP + organelles) and its assimilation efficiency (fig. 5), which suggests that prey Se subcellular partitioning can be used to approximate predator assimilation efficiency, but is not an exact predictor of it.

## REFERENCES

- Ahmad S, Michael A, Beilstein MA, Pardini RS (1989) Glutathione peroxidase activity in insects: A reassessment. *Arch Insect Bioch Physiol* 12: 31-49.
- Alaimo J, Ogle RS, Knight AW (1994) Selenium uptake by larval *Chironomus decorus* from a *Ruppia maritima*-based benthic/detrital substrate. *Arch Environ Contam Toxicol* 27: 441-448.
- Allan CB, Lacourciere GM, Stadtman TC (1999) Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Ann Rev Nutr* 19: 1-16.
- Besser JM, Canfield TJ, La Point TW (1993) Bioaccumulation of organic and inorganic selenium in a laboratory food chain. *Environ Toxicol Chem* 12: 57-72.
- Brinkhurst RO (1974) *The Benthos of Lakes*. St. Martin's Press, New York, NY. 190 pp.
- Cain DJ, Luoma SN, Wallace WG (2004) Linking metal bioaccumulation of aquatic insects to their distribution patterns in a mining-impacted river. *Environ Toxicol Chem* 23: 1463-1473.
- Chapman PM, Wang F (2000) Issues in ecological risk assessment of inorganic metals and metalloids. *Hum Ecol Risk Assess* 6: 965-988.
- Cheung M, Wang WX (2005) Influence of subcellular metal compartmentalization in different prey on the transfer of metals to a predatory gastropod. *Mar Ecol Prog Ser* 286: 155-166.
- Croisetière L, Hare L, Tessier A (2006) A field experiment to determine the relative importance of prey and water as sources of As, Cd, Co, Cu, Pb, and Zn for the aquatic invertebrate *Sialis velata*. *Environ Sci Technol* 40: 873-879.
- Dubois M, Hare L (2007) Subcellular distribution of cadmium in two aquatic invertebrates: change over time and relationship to Cd assimilation by a predatory insect. *Envir Pollut*: in preparation.
- Dumas J, Hare L (2007) Nickel and thallium transfer from prey to predator. *Envir Pollut*: in preparation.
- Fan TWM, Teh SJ, Hinton DE, Higashi RM (2002) Selenium biotransformations into proteinaceous forms by foodweb organisms of selenium-laden drainage waters in California. *Aquat Toxicol* 57: 65-84.
- Giguère A, Campbell PGC, Hare L, Couture P (2006) Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquat Toxicol* 77: 178-189.
- Guan R, Wang WX (2004) Dietary assimilation and elimination of Cd, Se, and Zn by *Daphnia magna* at different metal concentrations. *Environ Toxicol Chem* 23: 2689-2698.
- Hamilton SJ (1999) Hypothesis of historical effects from selenium on endangered fish in the Colorado River basin. *Hum Ecol Risk Assess* 5: 1153-1180.
- Hamilton SJ (2002) Rationale for a tissue-based selenium criterion for aquatic life. *Aquat Toxicol* 57: 85-100.

- Hamilton SJ (2004) Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Sci Total Environ* 326: 1-31.
- Lemly AL (1997) Ecosystem recovery following selenium contamination in a freshwater reservoir. *Ecotox Environ Saf* 36: 275-281.
- Linville RG, Luoma SN, Cutter L, Cutter GA (2002) Increased selenium threat as a result of invasion of the exotic bivalve *Potamocorbula amurensis* into San Francisco Bay-Delta. *Aquat Toxicol* 57: 51-64.
- Locklin JL, Arsuffi TL, Bowles DE (2006) Life history of *Sialis* (Megaloptera: Sialidae) in a lentic and lotic ecosystem in central Texas. *Am Midl Nat* 155: 50-62.
- Luoma SN, Johns C, Fisher NS, Steinberg NA, Oremland RS, Reinfelder JR (1992) Determination of selenium bioavailability to a benthic bivalve from particulate and solute pathways. *Environ Sci Technol* 26: 485-491.
- Maier KJ, Knight AW (1994) Ecotoxicology of selenium in freshwater systems. *Rev Environ Contam Toxicol* 134: 31-48.
- Meyer JS, Adams WJ, Brix KV, Luoma SN, Mount DR, Stubblefield WA, Wood CM (2005) Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms. SETAC press, Pensacola (FL), 329 p.
- Nott JA, Nicolaidou A (1990) Transfer of detoxification along marine food chains. *J Mar Biol Assoc UK* 70: 905-912.
- Rainbow PS, Wang WX (2001) Comparative assimilation of Cd, Cr, Se, and Zn by the barnacle *Elminius modestus* from phytoplankton and zooplankton diets. *Mar Ecol Prog Ser* 218: 239-248.
- Reinfelder JR, Fisher NS (1991) The assimilation of elements ingested by marine copepods. *Science* 251: 794-796.
- Reinfelder JR, Fisher NS (1994) The assimilation of elements ingested by marine planktonic bivalve larvae. *Limnol Oceanogr* 39: 12-20.
- Rosetta TN, Knight AW (1995) Bioaccumulation of selenate, selenite, and seleno-DL-methionine by the brine fly larvae *Ephydra cinerea* Jones. *Arch Environ Contam Toxicol* 29: 351-357.
- Roy I, Hare L (1999) Relative importance of water and food as Cd sources to the predatory insect *Sialis velata* (Megaloptera). *Can J Fish Aquat Sci* 56: 1143-1149.
- Schlekat CE, Lee BG, Luoma SN (2002) Assimilation of selenium from phytoplankton by three benthic invertebrates: Effect of phytoplankton species. *Mar Ecol Prog Ser* 237: 79-85.
- Schlekat CE, Pukerson DG, Luoma SN (2004) Modeling selenium bioaccumulation through arthropod food webs in San Francisco Bay, California, USA. *Environ Toxicol Chem* 23: 3003-3010.
- Seebaugh DR, Estephan A, Wallace WG (2006) Relationship between dietary cadmium absorption by grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and trophically available cadmium in amphipod (*Gammarus lawrencianus*) prey. *Bull Environ Contam Toxicol* 76: 16-23.
- Seebaugh DR, Goto D, Wallace WG (2005) Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain. *Mar Environ Res* 59: 473-491.

- Seebaugh DR, Wallace WG (2004) Importance of metal-binding proteins in partitioning of Cd and Zn as trophically available metal (TAM) in the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Mar Ecol Prog Ser* 272: 215-230.
- Simmons DBD, Wallschläger D (2005) A critical review of the biogeochemistry and ecotoxicology of selenium in lotic and lentic environments. *Environ Toxicol Chem* 24: 1331-1343.
- US EPA (2004) Draft aquatic life water quality criteria for selenium. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 334 p.
- Wallace WG, Lee BG, Luoma SN (2003) Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fraction (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar Ecol Prog Ser* 249: 183-197.
- Wallace WG, Lopez GR, Levinton JS (1998) Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. *Mar Ecol Prog Ser* 172: 225-237.
- Wallace WG, Lopez GR (1996) Relationship between the subcellular cadmium distribution in prey and cadmium trophic transfer to a predator. *Estuaries* 19: 923-930.
- Wallace WG, Lopez GR (1997) Bioavailability of biologically sequestered cadmium and the implications of metal detoxification. *Mar Ecol Prog Ser* 147: 149-157.
- Wang WX (2002) Interactions of trace metals and different marine food chains. *Mar Ecol Prog Ser* 243: 295-309.
- Wang WX, Fisher NS (1999) Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: a synthesis. *Environ Toxicol Chem* 18: 2034-2045.
- Wang WX, Rainbow PS (2006) Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms. *Environ Chem* 3: 395-399.
- Xu Y, Wang WX, Hsieh DPH (2001) Influences of metal concentration in phytoplankton and seawater on metal assimilation and elimination in marine copepods. *Environ Toxicol Chem* 20: 1067-1077.
- Zhang L, Wang WX (2006) Significance of internal metal speciation in prey in influencing the trophic transfer of metals in marine fish. *Limnol Oceanogr* 51: 2008-2017.

## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1.** Fractionation procedure designed to produce five operationally-defined cellular fractions (in bold font).

**Figure 2.** Changes over time in the total Se concentrations (means  $\pm$  SE, n = 4 pooled samples) of two prey taxa exposed to this element in Se-spiked sediment and its overlying water. a) *T. tubifex*; b) *C. riparius*.

**Figure 3.** Selenium concentrations (a, b) and percentages (c, d) in the 5 subcellular fractions of prey that had been exposed to Se for up to 28 d. Fractions: debris, granules (Gr), organelles (Org), HDP (Heat-Denatured Proteins), and HSP (Heat-Stable Proteins). Values are means + SE (n = 4 pooled samples). a and c) *T. tubifex*; b and d) *C. riparius*. Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) between values.

**Figure 4.** Time course of Se retention by the predator *S. velata* following the consumption (at time 0) of Se-contaminated prey that had been exposed to this metal for various lengths of time; a) *T. tubifex* b) *C. riparius*. Values are means  $\pm$  SE for various numbers of *S. velata* (for *T. tubifex* n = 7, whereas for *C. riparius* n = 8 (4 d), 4 (12 d) or 3 (20 d)).

**Figure 5.** Assimilation efficiency (% , means  $\pm$  SE) of Se by *S. velata* when fed either *T. tubifex* or *C. riparius* compared to the percentage of Se that is likely to be available as predicted by the subcellular fractionation of prey, that is, the sum of the organelles, HDP and HSP fractions (means  $\pm$  SE). Numbers in parentheses indicate prey exposure-duration in days. Dotted line is a 1:1 relationship. Two values are shown for *T. tubifex* exposed to Se for 28 d; predators that had eaten 2 previous Se-contaminated meals (28) and an individual that had eaten no previous Se-contaminated meals (28\*).

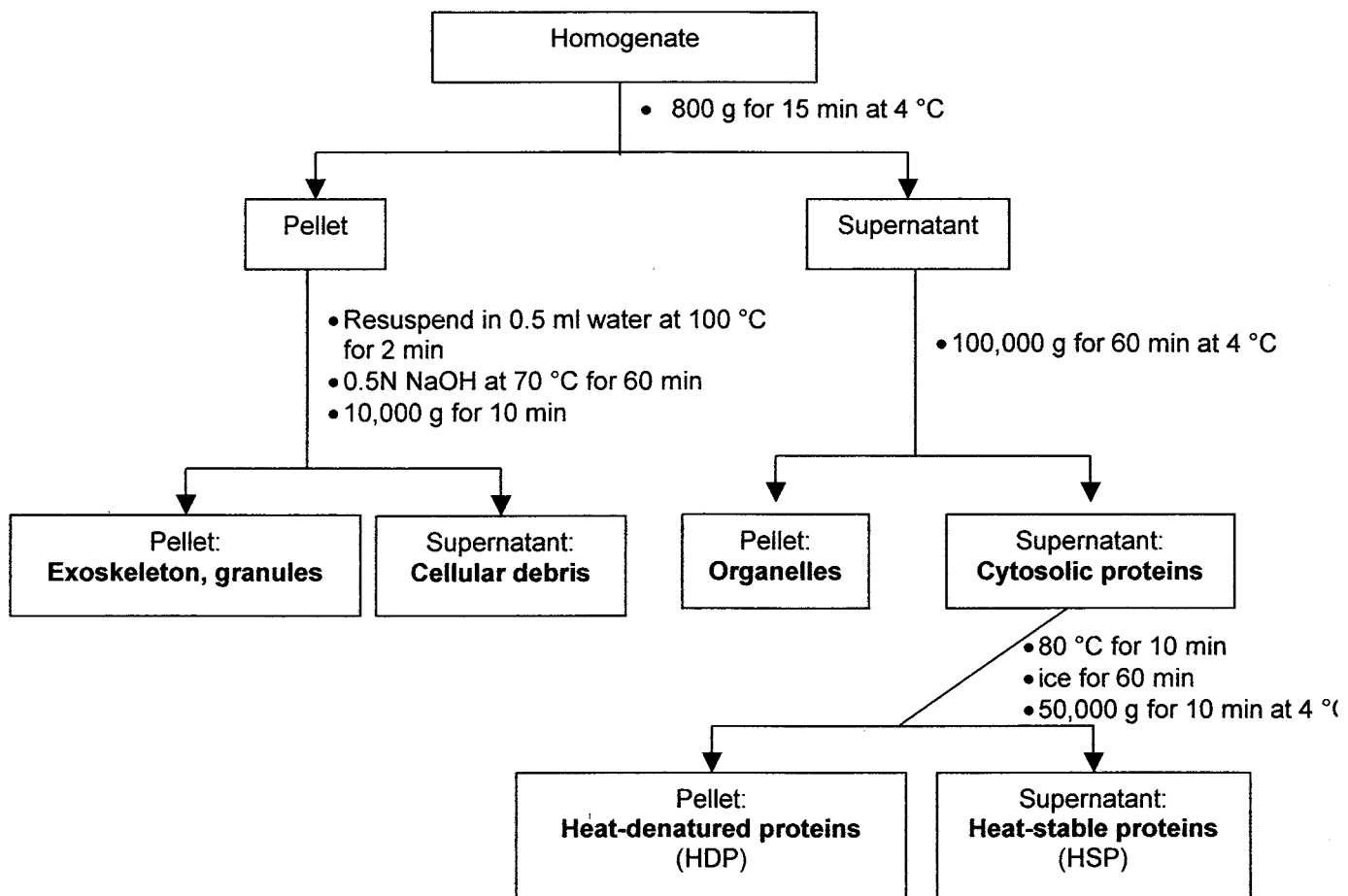


Fig. 1, Dubois & Hare

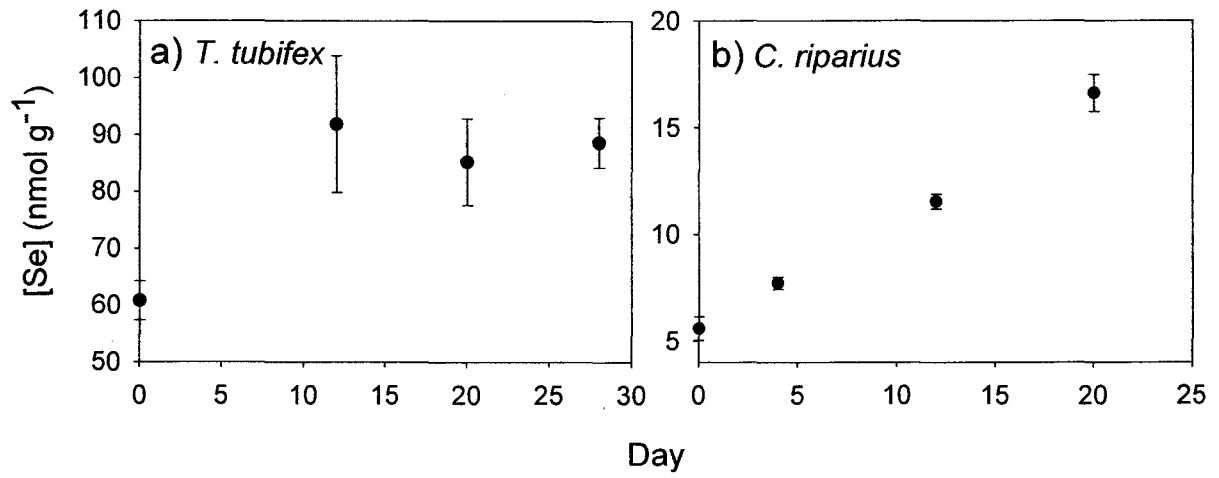


Fig. 2, Dubois & Hare



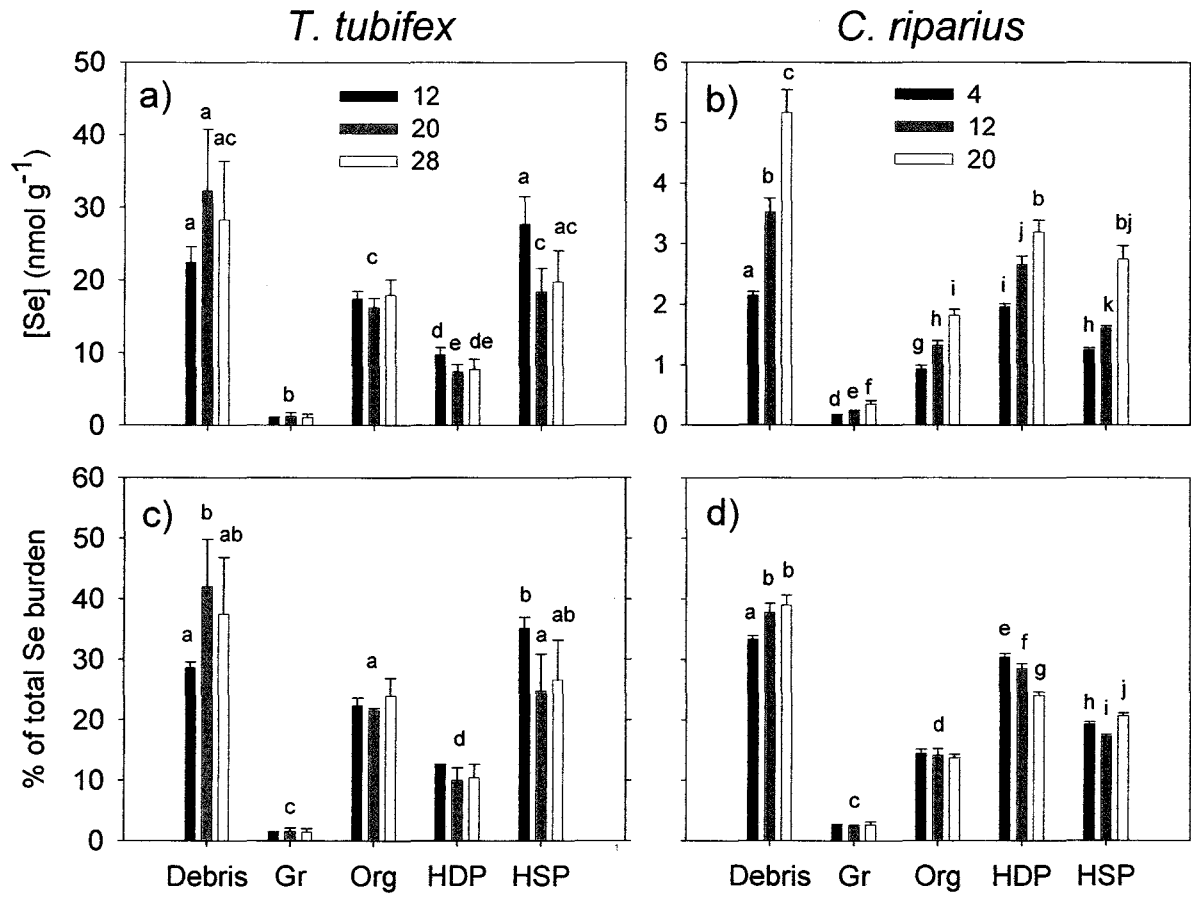


Fig. 3, Dubois & Hare

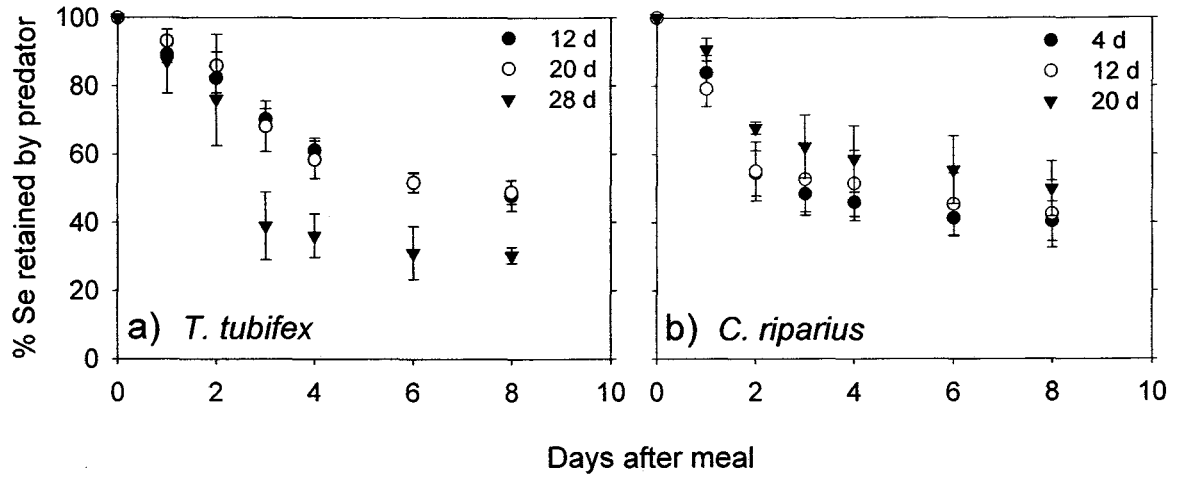


Fig. 4, Dubois & Hare

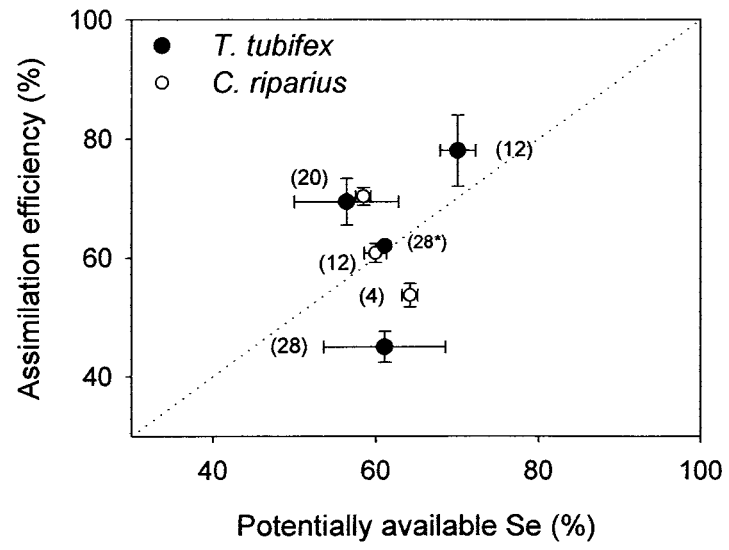


Fig. 5, Dubois & Hare



LA FIN - THE END

---

LA FIN - THE END

---

2

Occupe-toi du jour présent,  
car si hier n'est plus qu'un rêve, demain n'est qu'une vision.  
Le jour présent si tu le vis, fera de chaque hier, un rêve de bonheur  
et de ton avenir, une vision d'espoir.  
Occupe-toi du jour présent.  
(Proverbe Sanscrit)

Si, avec un mental pur, quelqu'un parle ou agit, alors  
le bonheur le suit comme l'ombre qui jamais ne le quitte. (Bouddha)

La pensée du néant des choses engendre la compassion. La compassion abolit l'espace entre soi et  
les autres. L'unité de soi et des autres réalise le bien d'autrui. (Milarepa)

The greatest achievement is selflessness.  
The greatest worth is self-mastery.  
The greatest quality is seeking to serve others.  
The greatest precept is continual awareness.  
The greatest medicine is the emptiness of everything.  
The greatest action is not conforming with the worlds ways.  
The greatest magic is transmuting the passions.  
The greatest generosity is non-attachment.  
The greatest goodness is a peaceful mind.  
The greatest patience is humility.  
The greatest effort is not concerned with results.  
The greatest meditation is a mind that lets go.  
The greatest wisdom is seeing through appearances.  
(Atisha)