TOXICITÉ ET BIOACCUMULATION DU CADMIUM CHEZ LE SAUMON ATLANTIQUE JUVÉNILE (Salmo salar) EN PRÉSENCE DE MATIÈRE ORGANIQUE DISSOUTE (MOD) SYNTHÉTIQUE OU NATURELLE.

Mémoire présenté comme exigence partielle du grade Maître ès Sciences (M. Sc.)

> par Joël Gauthier

Institut national de la recherche scientifique, INRS-Eau Sainte-Foy (Québec)

Décembre 1995

© Tous droits réservés, Joël Gauthier, 1995

À mes parents que je remercie de l'encouragement et du support apportés. La persévérance vient à bout de tout chez nous qui sommes des travailleurs acharnés...

REMERCIEMENTS

La réalisation de cette étude a nécessité la collaboration de plusieurs personnes de près ou de loin.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche M. Peter G.C. Campbell pour son professionnalisme, sa grande disponibilité ainsi que l'encadrement démontrés dans le cheminement qui mène à ce diplôme.

Un gros merci à Robert L. Roy qui m'a enseigné l'art de travailler avec des poissons en laboratoire. Un merci spécial à mon collègue de travail et ami Claude Fortin avec qui le dosage de l'ion métallique libre Cd²⁺ a été rendu possible grâce à la technique d'échange ionique qu'il a mise au point. Merci à Caroline Turcotte pour son assistance efficace durant l'été 94.

Merci aux techniciens et techniciennes du laboratoire qui ont aidé à résoudre les problèmes d'ordre technique (analyses, dosages, etc.). Je remercie plus particulièrement Michelle G.Bordeleau et Bernard Veilleux pour leur aide précieuse.

Merci au Ministère du Loisir, Chasse et Pêche du Québec (MLCP) qui a fourni une partie des saumons pour les bioessais.

Enfin, l'étude a été réalisée grâce au support financier de Pêche et Océans Canada, du Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) et du Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR).

RÉSUMÉ

L'acidification des eaux de surface provoque la mise en circulation de métaux traces (ex. Al, Cd, Mn, Zn) dans le milieu aquatique. En laboratoire, plusieurs de ces métaux (ex. Al, Cd) se révèlent toxiques envers les poissons dont le saumon Atlantique (*Salmo salar*). Il existe beaucoup d'évidence à l'effet que la réponse biologique d'un métal dissous (toxicité et bioaccumulation) soit proportionnelle à la concentration de l'aquo ion Mz+ ou ion libre. Un modèle simple d'interactions métal-organisme a alors été élaboré par Morel (1983): le modèle de l'ion libre (MIL). D'après celui-ci, l'influence de la matière organique dissoute (MOD), qu'elle soit naturelle ou synthétique, se limite à une complexation de l'ion libre du métal d'intérêt, donc à une diminution de toxicité et de bioaccumulation. Toutefois, il est également possible que la MOD atténue la toxicité du métal par un effet direct à la membrane biologique, contredisant ainsi le MIL.

La présente étude consistait principalement à valider le MIL en présence de cadmium et de MOD synthétique (EDTA) ou naturelle (un acide fulvique extrait d'un sol) dans des conditions se rapprochant de celles rencontrées dans les rivières de la Côte-Nord (pH= 5,50, eau très douce, dominance en anions organiques). Pour ce faire, des saumons Atlantique juvéniles (*Salmo salar*, âge 0+ ou 1+) ont été exposés à des concentrations constantes de l'ion libre Cd²+ en milieu inorganique ou organique dans des bioessais statiques ou dynamiques, i.e. à renouvellement continu. Le MIL prédit que la toxicité du métal et sa bioaccumulation au niveau des branchies devraient demeurer constantes dans de telles conditions. De plus, deux objectifs secondaires étaient visés: (i) déterminer la toxicité aiguë du cadmium en milieu inorganique, (ii) évaluer l'accumulation branchiale du Cd: en fonction de concentrations croissantes de Cd²+ d'un milieu à l'autre et en fonction du temps (cinétique).

La toxicité aiguë du Cd a été mesurée par la CL50 exprimée en terme de Cd²+. Les deux valeurs, calculées pour deux groupes de poissons de provenance différente, sont de 3 et 15±4 nM de Cd²+. Au-delà d'une certaine concentration d'ion libre Cd²+ dans le milieu d'exposition, un délai constant était visible avant le début de la mortalité étant donné la saturation des canaux calciques. Toutefois, le cumul de la mortalité n'est pas complètement indépendant de la concentration de l'ion libre en solution suggérant que d'autres mécanismes de prise en charge/toxicité entreraient en jeu à de fortes concentrations de Cd²+.

L'étude de la cinétique d'accumulation branchiale du Cd a, au début, mis en évidence une accumulation rapide, suivie d'un état stationnaire: cet état persiste à faible concentration d'ion libre Cd^{2+} (≈ 1 nM) mais à forte concentration d'ion libre (≈ 16 nM), on note une seconde augmentation des concentrations branchiales de Cd.

En présence d'EDTA, le MIL prédit relativement bien la biodisponibilité du Cd. Cependant, l'apparition d'un plateau de bioaccumulation branchiale en fonction de concentrations croissantes de Cd²⁺ limite l'applicabilité du modèle. Ce plateau pourrait

être dû à la saturation des canaux calciques. En présence d'acide fulvique, la prédiction du MIL n'a pas été respectée: la bioaccumulation branchiale du Cd était nettement moins importante qu'en milieu inorganique malgré le fait que la concentration de l'ion libre Cd²+ était la même. L'explication la plus probable de l'effet protecteur apparent de la MOD naturelle est son effet direct sur l'organisme. La MOD naturelle diminuerait la réponse biologique de deux façons: par complexation et par l'action directe à la surface membranaire. La nature de l'interaction MOD-cellule pourrait être hydrophobe ou encore, elle pourrait impliquer la formation de liaisons hydrogènes. L'ion libre Cd²+ ne semble donc pas pouvoir prédire adéquatement la biodisponibilité du cadmium en présence de MOD naturelle.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	v
RÉSUMÉ	
TABLE DES MATIÈRES	ix
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES FIGURES	xv
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	
1.1 Aspects géochimiques	
1.1.1 Processus d'acidification des eaux de surface	
1.1.2 Sensibilité de certaines régions	
1.1.3 Effets de la baisse de pH	
1.1.3.1 Libération de métaux traces	
1.1.3.2 Spéciation des éléments	
1.2 Effets généraux de l'acidification et des métaux sur l'environnement	
1.3 Organisme cible: le saumon Atlantique	5
1.3.1 Description	5
1.3.2 Distribution	5
1.3.3 Cycle biologique	5
1.3.4 Ressource économique	7
1.3.4.1 Pêche	7
1.3.4.2 Tourisme	7
1.3.5 Sensibilité de l'espèce	8
1.4 Le modèle de l'ion libre (MIL)	8
1.4.1 Description et application au poisson	8
1.4.2 Effets des ligands	
1.4.3 Exemples appuyant le modèle de l'ion libre	
1.4.4 Cas d'exceptions au modèle de l'ion libre	
1.5 La matière organique dissoute (MOD) naturelle	12
1.5.1 Description et provenance	
1.5.2 Importance dans le milieu aquatique	12
1.5.2.1 Pouvoir de complexation	13
1.5.2.2 Autres effets de la MOD naturelle	
1.5.3 Cas de la MOD naturelle envers le MIL	
1.6 Objectifs et hypothèses	
CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES	17
2.1 Généralités	17
2.2 Matériel biologique	18
2.2.1 Provenance et description	18
2.2.2 Acclimatation et exposition	18
2.2.3 Réponse biologique	
2.3 Fau synthétique reconstituée	

2.3.1 Préparation	19
2.3.2 Composition chimique	19
2.4 Mesure des paramètres d'exposition	20
2.4.1 Métaux	20
2.4.1.1 Échantillonnage de l'eau	20
2.4.1.2 Concentrations totales de Cd, Cu et Zn	20
2.4.1.3 Concentration des ions libres Cd ²⁺ et Ca ²⁺	20
2.4.1.4 Concentrations totales des cations majeurs	21
2.4.2 Autres paramètres	21
2.4.2.1 pH	21
2.4.2.2 Dureté	21
2.4.2.3 Oxygène dissous	21
2.4.2.4 Débits	21
2.5 Toxicité aiguë en milieu inorganique	22
2.5.1 Bioessai A	22
2.5.2 Bioessai B	23
2.6 Bioaccumulation branchiale	24
2.6.1 Accumulation branchiale du Cd en fonction de	
concentrations croissantes du métal: Bioessai A	24
2.6.2 Bioaccumulation branchiale en présence ou absence	
d'EDTA	
2.6.2.1 Bioessai C	24
2.6.2.2 Bioessais D et E	26
2.6.3 Accumulation du cadmium en présence d'acide fulvique:	
Bioessai F	30
2.7 Traitement des tissus	32
2.7.1 Branchies	32
2.7.2 Partie restante du poisson	32
2.8 Détermination du métal accumulé par digestions au four à	
micro-ondes	33
CHAPITRE 3: RÉSULTATS	
3.1 Toxicité aiguë en milieu inorganique	
3.2 Bioaccumulation branchiale	39
3.2.1 Accumulation en milieu inorganique et en présence d'EDTA:	
Bioessais: A, C, D et E	39
3.2.1.1 Accumulation branchiale du Cd en fonction de	
concentrations croissantes du métal: Bioessai A	39
3.2.1.2 Accumulation en présence ou absence d'EDTA:	
Bioessai C	
3.2.1.3 Cinétique d'accumulation: Bioessai D	42
3.2.1.4 Accumulation en présence ou absence d'EDTA:	
Bioessai E	44
3.2.2 Accumulation branchiale en présence d'acide fulvique:	
Bioessai F	46

3.2.2.1 Cadmium	46
3.2.2.2 Cuivre, calcium et zinc	
CHAPITRE 4: DISCUSSION	51
4.1 Toxicité aiguë en milieu inorganique	
4.1.1 Mesure par la CL50	
4.1.2 Facteurs affectant la réponse biologique	
4.1.2.1 Facteurs abiotiques	
4.1.2.2 Facteurs biotiques	
4.1.3 Mécanisme d'action létal du cadmium	
4.2 Toxicité chronique du cadmium	
4.3 Bioaccumulation branchiale	
4.3.1 Répartition du cadmium accumulé	
4.3.2 Accumulation en milieu inorganique et en présence d'EDTA:	
Bioessais A, C ,D et E	60
4.3.2.1 Accumulation branchiale du Cd en fonction de	
concentrations croissantes du métal: Bioessai A	60
4.3.2.2 Accumulation en présence ou absence d'EDTA:	
Bioessai C	64
4.3.2.3 Accumulation en présence ou absence d'EDTA:	
Bioessai E	65
4.3.2.4 Cinétique d'accumulation branchiale du Cd:	
Bioessai D	66
4.3.3 Accumulation du cadmium en présence d'acide fulvique:	
Bioessai F	67
CHAPITRE 5: CONCLUSION	73
5.1 Toxicité aiguë du cadmium	
5.2 Bioaccumulation branchiale	
5.2.1 Accumulation branchiale du Cd en fonction de concentrations	/ 4
croissantes du métal: Bioessai A	7/
5.2.2 Accumulation branchiale du Cd en présence /absence	/ 4
d'EDTA: Bioessais C, D et E	7/
5.2.3 Accumulation branchiale du Cd en présence d'acide fulvique:	/ 4
Bioessai F	75
5.3 Recommandations et avenues de recherche	
5.5 Necommandations et avenues de recherche	70
BIBLIOGRAPHIE	77
ANNEXES	87
A-1: Solution de sels concentrés	
A-2: A) Composition chimique détaillée de l'eau synthétique	265-172
reconstituée	88
A-2: B) Données d'entrée pour MINEQL+	

A-3:	Mesure du Cu et du Zn dans les milieux d'exposition	
	(Bioessais C et F)	.90
A-4:	Protocole de la technique d'échange ionique (TEI)	.91
A-5:	Mesure des cations majeurs Mg, Na et K (Bioessais C, D, E et F)	.93
A- 6:	Méthode de digestion des tissus au four à micro-ondes	. 94
A-7:	Pourcentages de récupération des métaux (Cd, Ca, Cu, et Zn)	
	dosés dans les digestions	. 96
A-8:	Concentrations branchiales de métaux	. 97
A-9:	Comportements des saumons en réponse à l'exposition au Cd	100
A-10:	Mortalité cumulative dans les bioessais C, D, E et F	101

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1:	Conditions particulières moyennes d'exposition du bioessai A	22
Tableau 2.2:	Conditions particulières moyennes d'exposition du bioessai B	23
Tableau 2.3:	Concentrations de cadmium pour chacun des bassins d'exposition: Bioessai C	25
Tableau 2.4:	Concentration totale d'EDTA et du complexe Cd-EDTA ²⁻ pour chacun des bassins d'exposition: Bioessai C	25
Tableau 2.5:	Concentrations de calcium, d'oxygène dissous et pH selon le milieu d'exposition: Bioessai C.	26
Tableau 2.6:	Concentrations de cadmium pour chacun des bassins d'exposition: Bioessai D	27
Tableau 2.7:	Concentration totale d'EDTA et du complexe Cd-EDTA ²⁻ pour chacun des bassins d'exposition: Bioessai D.	27
Tableau 2.8:	Concentrations de calcium, d'oxygène dissous et pH selon le milieu d'exposition: Bioessai D.	28
Tableau 2.9:	Concentrations de cadmium pour chacun des bassins d'exposition: Bioessai E	29
Tableau 2.10:	Concentration totale d'EDTA et du complexe Cd-EDTA ²⁻ pour chacun des bassins d'exposition: Bioessai E.	29
Tableau 2.11:	Concentrations de calcium, d'oxygène dissous et pH selon le milieu d'exposition: Bioessai E.	30
Tableau 2.12:	Concentrations de cadmium et de carbone organique pour chacun des bassins d'exposition: Bioessai F.	31
Tableau 2.13:	Concentrations de calcium, d'oxygène dissous et pH selon le milieu d'exposition: Bioessai F	31
Tableau 4.1:	Valeurs de CL50 96 heures exprimées en terme de Cd total chez différentes espèces de salmonidés juvéniles.	52
Tableau A1.1:	Composition résultante de l'eau synthétique après l'ajout des sels concentrés.	87
Tableau A2.1:	Composition chimique détaillée de l'eau synthétique reconstituée.	88
Tableau A3.1:	Concentrations totales de Cu et de Zn dans les bioessais C et F	90
Tableau A5.1:	Pourcentages de récupération du Cd, Ca, Cu et Zn selon le bioessai.	93
Tableau A7.1:	Pourcentages de récupération du Cd, Ca, Cu et Zn selon le bioessai.	96

Tableau A8.1:	Valeurs d'accumulation branchiale du cadmium selon la concentration de l'ion libre Cd ²⁺ du milieu après 96 heures d'exposition: Bioessai A	. 97
Tableau A8.2:	Valeurs d'accumulation branchiale du cadmium selon le milieu d'exposition: Bioessai C	. 97
Tableau A8.3:	Valeurs d'accumulation branchiale du cadmium selon le milieu d'exposition et le temps d'exposition: Bioessai D (cinétique d'accumulation).	98
Tableau A8.4:	Valeurs d'accumulation branchiale du cadmium selon le milieu d'exposition: Bioessai E	. 98
Tableau A8.5:	Concentrations branchiales de cadmium, de cuivre, de zinc et de calcium selon le milieu d'exposition: Bioessai F	99
Tableau A10.1:	Mortalité cumulative des saumons après 96 heures d'exposition (Bioessais C, D, E) et après 24 heures (Bioessai F)	101

LISTE DES FIGURES

Figure 3.1:	Évolution de la mortalité cumulative des saumons en fonction du temps et selon le bassin d'exposition: Bioessai A, bassins impairs 35
Figure 3.2:	Évolution de la mortalité cumulative des saumons en fonction du temps et selon le bassin d'exposition: Bioessai A, bassins pairs
Figure 3.3:	Évolution de la mortalité cumulative des saumons en fonction du temps et selon le bassin d'exposition: Bioessai B, bassins impairs 36
Figure 3.4:	Évolution de la mortalité cumulative des saumons en fonction du temps et selon le bassin d'exposition: Bioessai B, bassins pairs
Figure 3.5:	Accumulation branchiale du cadmium chez le saumon Atlantique juvénile (âge 0+) en fonction de la concentration de l'ion libre Cd ²⁺ du milieu (survivants après 96 heures d'exposition, Bioessai A)
Figure 3.6:	Accumulation branchiale du cadmium chez le saumon Atlantique juvénile (âge 0+) après 96 heures d'exposition (moyenne ± écart type; n varie de 4 à 6)
Figure 3.7:	Cinétique d'accumulation du cadmium en milieu inorganique: bassins # 3 et # 4, (moyenne \pm écart type; n=3 sauf pour les trois derniers points où n=1, [Cd ²⁺] \approx 16 nM)
Figure 3.8:	Cinétique d'accumulation du cadmium en présence d'EDTA: bassins # 1 et # 2, (moyenne \pm écart type; n= 3, [Cd ²⁺] \approx 1 nM)42
Figure 3.9:	Accumulation branchiale du cadmium chez le saumon Atlantique juvénile (âge 0+) après 96 heures d'exposition (moyenne ± écart type; n varie de 10 à 14)44
Figure 3.10:	Accumulation branchiale du cadmium chez le saumon Atlantique juvénile (âge 0+) après 24 heures d'exposition (moyenne ± écart type; n= 10)
Figure 3.11:	Concentrations branchiales de cuivre selon le milieu d'exposition (moyenne \pm écart type; n= 8)48
Figure 4.1:	 A) Accumulation branchiale du Cd chez le méné tête-de-boule (<i>Pimephales promelas</i>) en fonction de la concentration calculée de l'ion libre Cd²⁺ (données tirées de Playle et al., 1993b)
Figure 4.1:	B) Accumulation branchiale du cadmium chez le saumon Atlantique juvénile (âge 0+) en fonction de la concentration de l'ion libre Cd²+ du milieu (survivants après 96 heures d'exposition, Bioessai A)
Figure 4.2:	Courbe sigmoïdale hypothétique d'accumulation branchiale du Cd 68

1.1 Aspects géochimiques

1.1.1 Processus d'acidification des eaux de surface

Depuis l'avènement de l'ère industrielle, l'Homme n'a cessé de compromettre la qualité de son environnement. Les précipitations acides constituent l'un des nombreux problèmes environnementaux auxquels il doit faire face. Haines (1981) mentionne que le pH moyen des précipitations dans certaines régions du globe est de 4.6 ou moins, ce qui représente une acidité d'au moins 4 fois supérieure à celle d'une pluie "naturelle", cf. pH≈ 5,0 (Schindler, 1988). Certaines de ces régions sont reliées aux grands centres urbains par les vents dominants. Ce sont principalement les émissions d'anhydride sulfureux (SO₂) et d'oxydes d'azote (NO_x) provenant des centrales thermiques au charbon, des raffineries et des véhicules automobiles qui sont responsables de l'acidification des précipitations. Effectivement, dans l'atmosphère, ces substances réagissent chimiquement pour produire des acides forts tels l'acide sulfurique (H₂SO₄) et l'acide nitrique (HNO₃). Le nord-est des États-Unis ainsi que l'est du Canada sont des régions particulièrement touchées (Baker et Schofield, 1982). Par exemple, le pH moyen des précipitations au Québec se situe autour de 4,4 (Boulet et Jacques, 1993). On parle ici d'un processus anthropique pouvant mener à une acidification des eaux de surface. Il existe également un processus naturel d'acidification des eaux de surface. Les acides organiques naturels seraient à l'origine du bas pH des eaux de surface dans des régions ne recevant pas une contribution atmosphérique acide significative (Reuss et al., 1987; Campbell et al., 1992; Dupont, 1993).

L'étude de Dupont (1993), réalisée sur le Bouclier canadien du territoire québécois au sud du 51e parallèle, révèle que 3,4% des lacs échantillonnés sont très acides (pH \leq 5,0) et 15,9% sont acides (5,0 < pH \leq 5,5). L'origine de l'acidité est expliquée par la dominance anionique (Dupont, 1992b; Dupont, 1993). Les lacs où l'on observe une dominance en sulfates indique que c'est principalement l'acidification anthropique qui est responsable de la baisse de pH. Les régions de l'Outaouais et de la Mauricie renferment les plus fortes proportions de ce type de lac (Dupont, 1993). Par contre, la région de la Côte-Nord montre le plus fort pourcentage de lacs à dominance organique révélant que, dans cette région, l'acidité des plans d'eau est principalement d'origine naturelle (Dupont, 1993).

Le processus d'acidification peut se dérouler de façon graduelle, mais il existe des périodes transitoires d'acidification des eaux superficielles à l'automne lors de crues et surtout au printemps à la fonte des neiges. À cette période de l'année, il y a mise en solution des ions H+ contenus dans le couvert nival et surtout dans la couche superficielle des sols, produisant ainsi une diminution importante du pH des eaux de surface (Wilkinson, 1993): c'est le choc acide. De manière générale, dans les rivières, le pH est minimal lorsque le débit est maximal et cela se produit tout juste après la disparition du couvert nival (Johannessen et al., 1980; Borg, 1986; Campbell et al., 1992). D'après les derniers auteurs, les pH de certaines rivières de la Côte-Nord atteignent des valeurs variant entre 4,9 et 5,3 pendant cette période. Dans cette région, l'acidification épisodique résulterait principalement d'une hausse des apports d'acides organiques, plutôt que d'acides minéraux forts (Campbell et al., 1992).

1.1.2 Sensibilité de certaines régions

Géographiquement, certaines régions résistent mal à l'acidification. Par exemple, la plus grande partie du Bouclier canadien est associée à des tills glaciaires minces qui recouvrent la roche-mère fortement siliceuse (granites et gneiss) (Shilts, 1981). Ces roches sont extrêmement résistantes à l'altération. Cela implique que les eaux superficielles de ces régions ont une très faible concentration en ions provenant de ces roches. Ces eaux se caractérisent par un faible pouvoir tampon, i.e. une faible capacité à neutraliser les acides, d'où leur extrême sensibilité à l'acidification (Dupont, 1992a; Dupont, 1993). Brouard et al. (1982) ont d'ailleurs déterminé de faibles valeurs de conductivité, d'alcalinité et de concentrations de calcium dans certaines rivières de la Côte-Nord, rivières situées sur le Bouclier canadien. Dupont (1993) a obtenu des résultats similaires pour des lacs du Bouclier. Ces paramètres témoignent d'un pouvoir tampon restreint. De plus, les sols minces et souvent absents de cette région contribueraient à sa sensibilité (Dupont, 1992b). À cet effet, de toutes les régions étudiées par Dupont (1992a), la Côte-Nord est la plus sensible et la plus affectée par les niveaux d'acidité.

1.1.3 Effets de la baisse de pH

1.1.3.1 Libération de métaux traces

Une des conséquences directes de l'acidification du milieu aquatique est l'augmentation des concentrations de métaux traces (AI, Cd, Mn et Zn) dans les eaux de surface. La mobilisation peut être produite par l'altération accélérée des minéraux (Steinnes, 1990). D'après le même auteur, les métaux peuvent aussi provenir directement des apports atmosphériques. De plus, il peut y avoir mobilisation des métaux antérieurement déposés par voie atmosphérique et temporairement fixés dans les sols et les sédiments (Steinnes, 1990). L'aluminium et le manganèse sont parmi les métaux dont les concentrations dissoutes atteignent les valeurs les plus élevées lors des processus d'acidification épisodiques (van Coillie et al., 1983; Borg, 1986; Nelson et Campbell, 1991). D'après Steinnes (1990), ces deux métaux sont parmi les plus abondants dans la croûte terrestre. L'aluminium a, quant à lui, reçu la plus grande attention de la part des chercheurs étant donné sa forte mobilisation (Nelson et Campbell, 1991; Campbell et al., 1992) et le potentiel de toxicité qu'il peut exercer envers les organismes aquatiques (Baker et Schofield, 1982; Birchall et al., 1989; Parent et Campbell, 1994).

L'augmentation des concentrations de cadmium et de zinc en réponse à l'acidification environnementale est moins marquée. Toutefois, quelques études démontrent qu'il y aurait augmentation des concentrations de ces métaux lors du processus d'acidification (Nelson et Campbell, 1991).

1.1.3.2 Spéciation des éléments

Les baisses de pH provoquent non seulement des concentrations plus élevées de métaux dissous mais aussi une modification de la spéciation de ces éléments (Campbell et Tessier, 1987). La spéciation se définit comme étant l'identification et la quantification de l'abondance (distribution) des espèces ou formes d'un élément (Bernhard et George, 1986). Les proportions des différentes formes dissoutes du métal d'intérêt peuvent varier selon les conditions physico-chimiques ambiantes: pH, concentrations de ligands organiques, de cations, d'anions inorganiques et température. Certains métaux sont plus sensibles que d'autres: par exemple lors du choc printanier, les concentrations d'aluminium inorganique et organique monomériques augmentent (Campbell et al., 1992). Les concentrations des fluoro-hydroxo complexes (AlOH(F)_n) ainsi que certains hydroxo complexes (AlOH²⁺ et Al(OH)₂+) diminuent au détriment de deux formes de fluoro

complexes d'aluminium (AIF²⁺ et AIF₂+) et de l'ion libre Al³⁺ (Campbell et al., 1992). D'une manière générale, les baisses de pH vont provoquer l'augmentation de la proportion de l'aquo ion ou ion libre M^{z+} étant donné la diminution du degré de complexation. Par exemple, Campbell et Tessier (1987) ont démontré, à l'aide de simulations avec le modèle MINEQL+, que la baisse de pH de 7 vers 4, dans une eau typique du Bouclier canadien sans ligands organiques, produisait l'augmentation des proportions de Al³⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ et Pb²⁺. En milieu organique, le même effet était observé quoique seuls l'aluminium et le cuivre interagissaient significativement avec les ligands ajoutés. Le plomb aurait aussi réagi avec les ligands modèles mais il n'a pas été considéré dans l'étude étant donné l'absence de constantes pour cet élément dans la banque de données thermodynamiques du modèle (Peter G.C. Campbell, comm. pers.).

1.2 Effets généraux de l'acidification et des métaux sur l'environnement

L'acidification des eaux de surface, et les concentrations élevées de métaux qui en résultent, causent une dégradation plus ou moins importante de l'habitat aquatique. Plusieurs auteurs rapportent que dans les eaux acidifiées, la richesse des espèces, la productivité et la biomasse sont réduites (Baker et Schofield, 1982; Dillon et al., 1984; Stokes, 1986; Minns et al., 1990). Les observations de Langlois et al. (1983) vont dans le même sens. Ils rapportent que la diversité des poissons diminue à bas pH. On parle ici d'effets globaux sur les écosystèmes dont l'équilibre est parfois fragile.

Les métaux et/ou les conditions acides peuvent produire une multitude d'effets directs sur la faune aquatique. Ils peuvent affecter la morphologie, le comportement, la croissance, la reproduction et même la survie des individus des différents taxons: bactéries, algues, invertébrés, poissons et amphibiens...(Dillon et al., 1984; Ravera, 1986). Certains organismes sont affectés de façon indirecte. En effet, c'est le cas de poissons qui, en plus d'être affectés directement, peuvent être victimes d'une diminution de leurs ressources alimentaires: benthos, zooplancton ou autres (Schindler et al., 1988).

1.3 Organisme cible: le saumon Atlantique

1.3.1 Description

Le saumon Atlantique fait partie de la famille des salmonidés. Son nom scientifique (*Salmo salar*) veut dire le saumon qui saute. Il a le corps allongé, comprimé latéralement, il possède des écailles assez larges, une épaisse nageoire adipeuse sur le dos, juste avant la queue. À maturité, il peut peser de 2 à 10 kg, parfois plus de 15 kg. La couleur du poisson varie selon le stade de vie et dans une certaine mesure, en fonction de l'environnement dans lequel il vit. En mer, l'adulte est argenté sur les flancs, blanc sur le ventre, avec diverses teintes de brun, de vert ou de bleu-gris sur le dos. En eau douce, sa couleur varie du bronze au brun foncé, avec des marbrures rougeâtres sur les flancs (Smith, 1988).

1.3.2 Distribution

L'aire de répartition du saumon Atlantique couvre la plus grande partie de l'Atlantique nord et une large proportion des cours d'eau qui s'y jettent. En Amérique du nord, on rencontre le saumon Atlantique de la baie d'Ungava au nord du Québec, jusqu'à l'embouchure de quelques petits fleuves des États américains du nord. Au Canada, on le trouve dans de nombreux cours d'eau du Nouveau-Brunswick, de la Nouvelle-Écosse, de l'île-du-Prince-Édouard, de Terre-Neuve, du Labrador et du Québec (Smith, 1988).

1.3.3 Cycle biologique

Le saumon Atlantique est typiquement anadrome. On dit d'une espèce qu'elle est anadrome quand elle remonte de la mer jusqu'aux rivières pour se reproduire. Au Canada, le saumon Atlantique en montaison pénètre habituellement dans les rivières entre mai et novembre, quelquefois plus tôt, en mars ou avril. La période de frai se situe normalement entre les mois d'octobre et de novembre. C'est la femelle qui choisit l'emplacement du nid, habituellement une zone de gravier où l'eau est propre et bien oxygénée. C'est elle qui prépare le nid. Il s'agit d'un simple trou dans le gravier qu'elle prépare en agitant rapidement la queue. Les oeufs et le sperme, la laitance, y sont déposés; puis la femelle recouvre le tout de gravier. Pour une femelle de taille moyenne, entre 9 000 et 11 000 oeufs sont produits (Smith, 1988).

De manière générale, le saumon Atlantique ne meurt pas après le frai. Dans certains cas, le poisson qui a frayé redescend tout de suite vers la mer; d'autres restent en eau douce

jusqu'au printemps. Dans les deux cas, ils auront passé de quelques mois à près d'un an en eau douce sans s'alimenter. On les appelle charognards, saumons vides ou saumons noirs. Lorsqu'ils ont repris des forces en mer, certains saumons remontent frayer au moins une autre fois. D'autres pourront même frayer trois ou quatre fois, dans les saisons ultérieures (Smith, 1988).

Les oeufs (5 à 7 mm de diamètre) sont de couleur orange pâle ou ambre. Ils se développent dans le nid de gravier pendant les mois d'hiver; l'éclosion a habituellement lieu au début du mois de mai pour les rivières de la Côte-Nord (François Barnard, Min. Env. et Faune, comm. pers.). Les alevins mesurent 15 mm de long et sont dotés d'un gros sac vitellin, leur réserve alimentaire des premières semaines. À la fin du mois de mai, lorsqu'ils sortent du gravier et que le sac vitellin s'est résorbé, le jeune saumon peut alors nager librement et commencer à se nourrir activement (Smith, 1988).

Le tacon s'établira sur un territoire dont l'étendue peut varier de moins d'un mètre carré à plusieurs; il le défendra contre tout intrus. La grandeur du territoire dépend de la taille du poisson. En eau douce, le jeune saumon se nourrit de larves d'insectes aquatiques et d'insectes terrestres qui tombent à la surface de l'eau. Dans ce milieu, la croissance du jeune saumon est lente: il passe habituellement deux à trois ans à se nourrir avant d'atteindre le stade saumoneau de descente (smolt) et d'aller en mer pour la première fois (Smith, 1988).

À ce moment, la croissance s'accélère, la nourriture est plus abondante et la physiologie du poisson se modifie. Les saumoneaux de descente mesurent en moyenne 125 à 150 mm de long. Les jeunes saumons vont se nourrir jusqu'à la côte occidentale du Groenland. Au cours des dix dernières années, on a constaté que le saumon mangeait à peu près tout ce qui nageait dans les couches supérieures de l'océan et qui n'était pas trop gros pour lui. Le hareng, le capelan, le gaspareau, le lançon, le petit maquereau et l'éperlan font son ordinaire. Il ne dédaigne pas non plus les crustacés comme les crevettes, le calmar, les ptéropodes et les euphausiacés, quand l'occasion se présente. Même si le saumon parcourt de grandes distances en mer, la plupart n'en reviennent pas moins frayer dans les cours d'eau qui les ont vus naître (Smith, 1988).

1.3.4 Ressource économique

1.3.4.1 Pêche

Le saumon Atlantique est exploité dans le cadre de la pêche commerciale, de la pêche sportive et de la pêche de "subsistance" des autochtones. Près de 6 000 pêcheurs détiennent un permis de pêche commerciale du saumon dans l'est du Canada. Dans beaucoup d'endroits, la pêche du saumon fournit plus de 50% du revenu annuel des pêcheurs. Les prises de ces dernières années étaient en moyenne de 1 800 tonnes métriques et leur valeur au débarquement a été estimée à entre 4 et 6 millions de dollars (Smith, 1988).

Les pêcheurs sportifs considèrent le saumon Atlantique comme étant parmi les poissons procurant le plus de sensations lors de sa capture. Ceux-ci utilisent des cannes et des lignes à pêche appâtées de mouches artificielles pour tenter les saumons de remonte dans les rivières. La plupart des rivières de l'est du Canada sont peuplées de saumons, attrait des pêcheurs, mais le public n'a pas accès à tous ces cours d'eau. Au cours des cinq demières années, les prises totales de saumons par la pêche sportive seulement ont totalisé de 80 000 à 130 000 poissons (240 à 400 t). La valeur économique de ce stock est difficile à évaluer. Chaque année, au Canada, des sommes considérables sont investies pour l'achat et le maintien des droits de pêche, l'entretien des chalets de pêche, les salaires des guides et des gardiens, l'achat de permis et de matériel ainsi que les déplacements. On s'entend généralement pour dire qu'un saumon capturé par un pêcheur sportif vaut 3 à 20 fois plus cher qu'un saumon identique capturé commercialement en raison des investissements comparativement très élevés dans ce sport (Smith, 1988).

1.3.4.2 Tourisme

Les retombées économiques sont très importantes surtout dans le cas de la pêche sportive. De plus, de nombreux touristes viennent du monde entier, soit pour pêcher le saumon, pour l'observer ou simplement pour voir les pêcheurs à l'oeuvre. Cela représente un apport économique supplémentaire important pour les pourvoyeurs, les magasins de sports, les restaurateurs, etc.

1.3.5 Sensibilité de l'espèce

Le saumon Atlantique est très sensible aux changements pouvant survenir dans son environnement. L'acidification du milieu aquatique et la mise en circulation de fortes concentrations de métaux qui en résulte peuvent provoquer divers désordres physiologiques chez les poissons, la mortalité pouvant même survenir au sein des populations affectées. En Nouvelle Écosse, par exemple, les stocks de saumon Atlantique (*Salmo salar*) ont diminué et ont même été complètement détruits dans plusieurs rivières (Watt, 1986). L'auteur attribue essentiellement ces pertes aux niveaux d'acidité très élevés de ces rivières. Il semble que la mortalité des saumons en milieu naturel ait lieu principalement chez les jeunes stades de vie. Plusieurs auteurs s'entendent d'ailleurs pour dire que les jeunes stades du saumon sont particulièrement vulnérables (Chapman, 1978; Rombough et Garside, 1984; Lacroix et al., 1985; Parent et al., 1988). Il y a aussi d'autres facteurs en cause dans l'explication de la diminution des populations de saumons: la pêche, la construction de barrages qui nuisent à la reproduction, et les autres formes de pollution.

Étant donné l'importance économique du saumon Atlantique et sa sensibilité face à la dégradation de l'environnement, le MLCP et le ministère des Pêches et Océans travaillent dans le but de conserver cette espèce.

1.4 Le modèle de l'ion libre (MIL)

1.4.1 Description et application au poisson

Le degré de toxicité et/ou de bioaccumulation qu'exercera un métal envers un organisme n'est pas nécessairement proportionnel à la concentration totale de ce métal dans l'eau (Campbell et Stokes, 1985). En effet, la disponibilité biologique d'un métal donné dépendra, entre autres, des formes de métal présentes dans le milieu (c'est-à-dire de sa spéciation) et de la nature de la barrière membranaire entre le milieu abiotique et l'organisme cible. Pour plusieurs métaux bivalents comme le Cd, le Cu, le Pb et le Zn, et pour des milieux artificiels étudiés au laboratoire, il a été démontré que la réponse biologique provoquée par le métal dissous dépend de la concentration de l'aquo ion M²+ ou ion libre. D'après Morel (1983), l'ion libre possède une importance universelle dans la détermination de la prise en charge, de la nutrition et de la toxicité de tous les métaux traces présents sous forme cationique. Ces observations ont conduit à l'élaboration de

modèles simples d'interactions de métaux avec des organismes vivants (Morel, 1983). Dans le cas de poissons, de tels modèles d'équilibre s'expriment ainsi, d'après Pagenkopft (1983):

$$M^{Z+}$$
 + 'L-branchie <-> M-L-branchie

[M-L-branchie] = K_C • ['L-branchie] • [M^{Z+}]

réponse biologique α [M -L-branchie]

[M -L-branchie] α [M^{Z+}]

=> réponse biologique α [M^{Z+}]

où 'L est un ligand cellulaire se trouvant dans la branchie ou à sa surface. C'est le site sensible ou un site transporteur vers une cible intracellulaire. Cette approche suppose: a) que les branchies constituent le lieu d'action du métal; b) que les sites de liaison sur les branchies peuvent être considérés comme des ligands en solution avec des constantes de stabilité discrètes; c) que l'équilibre s'établit rapidement entre le métal en solution et la surface des branchies (on entend par rapidement, plus vite que l'expression de la réponse toxique chez le poisson); et d) que la réponse biologique est fonction du nombre de sites "sensibles" occupés par le métal M, i.e. la concentration du complexe [M-L-branchie], laquelle dépend de la concentration en M^{z+}. De plus, on suppose que les ligands branchiaux ('L-branchie) soient présents en excès et que leur concentration libre demeure ainsi constante. On s'applique aussi a exposer les poissons pendant de courtes périodes de temps afin qu'il n'y ait pas de variation physiologique induite dans la concentration de ces sites ('L-branchie).

1.4.2 Effets des ligands

D'après le MIL, toute réaction impliquant une baisse de la concentration de l'ion libre Mz+ dans le milieu abiotique, conduirait nécessairement à une diminution de la réponse biologique. Les ligands inorganiques et organiques agissent tous à ce niveau: ils réduisent la disponibilité biologique du métal par complexation. Plusieurs auteurs ont mis en évidence une réduction de toxicité et/ou de bioaccumulation des métaux chez divers organismes suivant l'ajout de ligands organiques synthétiques (EDTA, NTA,...) ou de

matière organique naturelle (Sunda et al., 1978; Giesy et al., 1983; Winner, 1985; Hutchinson et Sprague, 1987; Meador, 1991; Playle et al., 1993a). Toutefois, en présence de MOD naturelle, la plupart des observations sont demeurées de nature qualitative (Campbell, 1995). En effet, rares sont les études ménées en présence de MOD naturelle montrant quantitativement que la réduction de la réponse biologique suit les variations de concentration de M^{Z+}.

1.4.3 Exemples appuyant le modèle de l'ion libre

Plusieurs études réalisées en laboratoire avec des bactéries, des algues, des invertébrés et des poissons appuient le modèle. Le nombre d'études employant des algues est supérieur étant donné leur petite taille, leur croissance rapide et leur facilité de culture (Campbell, 1995). Les expériences utilisant des poissons comme cibles biologiques sont beaucoup plus rares, étant donné les difficultés reliées à l'obtention, l'entretien et à l'exposition adéquate de ce type d'organisme. De plus, la quantité d'eau nécessaire est énorme et par conséquent, cela exige un vaste espace pour réaliser les bioessais.

Pour les organismes inférieurs comme les algues et bactéries, les réponses biologiques étudiées comprennent la stimulation ou l'inhibition de la croissance, l'immobilisation des cellules, la prise en charge du métal (bioaccumulation) et l'incorporation du glucose ou de certains acides aminés (Campbell, 1995). Par exemple, chez l'algue verte d'eau douce *Scenedesmus quadricauda*, l'inhibition de la croissance en milieu inorganique est fonction des ions libres Cu²⁺ et Zn²⁺ (Petersen, 1982). Jonas (1989) a étudié l'incorporation d'acides aminés radioactifs en milieu organique synthétique chez une communauté microbienne estuarienne. Il a démontré que le temps de renouvellement des acides aminés suivait les variations de Cu²⁺. La concentration de l'ion libre a été contrôlée à l'aide d'un ligand organique synthétique, l'acide nitrilotriacétique (NTA).

En ce qui concerne les invertébrés et les poissons, la réponse biologique est définie, entre autres, par la prise en charge du métal et par la mortalité. Sunda et al. (1978) ont déterminé que le pourcentage de survie chez la crevette marine *Paleomonetes pugio* était très bien corrélé avec la concentration de l'ion libre Cd²⁺, que ce soit en milieu inorganique ou organique (en présence de NTA). Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*, anciennement: *Salmo gairdneri*), Howarth et Sprague (1978) ont réalisé une régression multiple en tenat compte de la mortalité, du pH ainsi que de la dureté. L'ion libre Cu²⁺ s'est avéré être le meilleur prédicteur des données de mortalité.

1.4.4 Cas d'exceptions au modèle de l'ion libre

Malgré le fait qu'un support considérable a été développé en faveur du modèle de l'ion libre (Campbell, 1995), il y a toutefois des exceptions à cette règle. Elles sont classées en quatre grandes catégories (Campbell, 1995) dont trois sont considérées ici. Le quatrième cas, celui impliquant la MOD naturelle, sera étudié à part à la section 1.5.3.

Le premier groupe d'exceptions traite des ligands organiques formant des complexes lipophiles avec le métal. À ce sujet, Block et Pärt (1986) ont étudié la prise en charge du cadmium au niveau des branchies de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) en présence de ligands organiques synthétiques: le diéthyl dithiocarbamate (DDC), l'éthyl xanthate et l'isopropyl xanthate. Leurs résultats démontrent clairement qu'il y a contradiction avec le MIL puisque les complexes formés (hydrophobes et lipophiles) sont plus disponibles que l'ion libre. Cette grande disponibilité vient du fait que ces complexes peuvent traverser directement la membrane cellulaire par diffusion simple, sans se dissocier.

Le second groupe renferme des ligands inorganiques formant des complexes neutres ou des complexes mixtes. Wilkinson et al. (1990) ont exposé le saumon Atlantique (*Salmo salar*) à l'aluminium seul et en présence de fluorures. Ils ont montré que la réponse biologique (mortalité) ne dépendait pas seulement de la concentration de l'ion libre Al³⁺ mais aussi d'une ou de plusieurs autres espèces de fluoro-complexes d'aluminium. Des analyses statistiques ont révélé que l'espèce AlF²⁺ en combinaison avec Al³⁺ expliquaient le mieux les données de mortalité. Les auteurs ont proposé qu'un complexe mixte (F-Al-L-branchie) formé à la surface branchiale contribuait ainsi à la réponse toxique. Des études ultérieures de microélectrophorèse et de spectrophotométrie de résonance magnétique nucléaire ont permis de mettre en évidence la formation de tels complexes à la surface de cellules branchiales (Wilkinson et al., 1993).

La troisième catégorie d'exceptions comporte des ligands organiques de faible poids moléculaire produisant des complexes hydrophiles. La plupart de ces exceptions au MIL impliquent des produits du métabolisme comme les acides aminés ou le citrate. Pärt et Wikmark (1984) ont évalué la prise en charge du cadmium en présence de citrate au niveau des branchies de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Ils ont observé que la prise en charge était 160 à 1000 fois supérieure à celle prédite sur la base de la concentration de l'ion libre Cd²⁺. Ils suggèrent que les cellules épithéliales des branchies

pourraient être perméables à la fois au citrate et au complexe Cd-H-citrate. Campbell (1995) appuie cette hypothèse et ajoute que ces résultats pourraient être explicables aussi par la formation de complexes mixtes Citrate-Cd-L-branchie.

1.5 La matière organique dissoute (MOD) naturelle

1.5.1 Description et provenance

La MOD présente dans les eaux naturelles est constituée jusqu'à 90% d'acides organiques dissous (McKnight et al., 1990). Ce sont ces substances qui donnent à l'eau sa coloration brune caractéristique. Environ 75% des acides organiques dissous sont récalcitrants, c'est-à-dire qu'ils sont difficilement biodégradables (McKnight et al., 1990). Ils sont appelés substances humiques et se divisent principalement en deux types: les acides humiques et fulviques. Ces derniers comptent pour 40 à 60% du "pool" d'acides organiques dissous. Une fois isolés, les acides fulviques ont un poids moléculaire variant habituellement entre 500 et 1000 daltons (McKnight et al., 1990).

Les substances humiques sont des polymères très complexes qui proviennent de la biodégradation partielle de composés biogéniques d'origine terrestre donc allochtone (Thurman, 1985; McKnight et al., 1990). D'après Petersen et al. (1987), une grande proportion de la MOD naturelle est constituée de composés phénoliques ou polyphénoliques. La structure moléculaire complexe des acides humiques et fulviques comporte plusieurs groupements fonctionnels acides. Les groupements carboxyliques dominent, mais il y a aussi les phénols, énols et quinones (Thurman, 1985).

1.5.2 Importance dans le milieu aquatique

Étant donné leur ubiquité et leurs différentes propriétés, les acides organiques sont impliqués dans plusieurs processus physiques, chimiques et biologiques dans l'environnement (Horth et al., 1988). Ils jouent un rôle important dans le cycle du carbone par la remise en disponibilité de cet élément aux différents organismes.

Les concentrations de MOD dans les eaux naturelles varient de 1 à 100 mg C/L quoiqu'elles soient en moyenne de 5 à 10 mg C/L (Thurman, 1985). En rivière, il existe souvent une variation saisonnière des concentrations. Dans le cas des rivières à saumon de la Côte-Nord, le maximum est atteint au printemps à la fonte des neiges lorsque le débit est maximal et le pH minimal (Campbell et al., 1992). Ces derniers auteurs

rapportent des maxima variant entre 9 et 12 mg C/L alors que pendant le reste de l'année les concentrations se situent entre 4 et 6 mg C/L.

1.5.2.1 Pouvoir de complexation

D'après Horth et al. (1988), les substances humiques produisent un effet stabilisant sur les processus environnementaux, par exemple, par l'assimilation et le relargage subséquent de composés chimiques. Elles agissent comme un réservoir de nutriments et de contaminants. Cette influence sur la spéciation chimique des nutriments et/ou des contaminants se produit essentiellement par des réactions de complexation (McKnight et al., 1990). Les espèces chimiques impliquées peuvent être des anions, des micropolluants organiques hydrophobes et des métaux (McKnight et al., 1990). C'est la complexation des métaux qui nous intéresse plus particulièrement ici.

Les substances humiques sont riches en ligands organiques qui forment des complexes avec les ions libres et les oxyhydroxydes (Petersen et al., 1987). La complexation est réalisée surtout via les groupements carboxyliques (Petersen et al., 1987; Weber, 1988; McKnight et al., 1990) ce qui identifie l'oxygène comme étant le principal atome donneur. Toutefois, les atomes d'azote et de soufre ont aussi été identifiés comme atomes donneurs de moindre importance (Petersen et al., 1987; Horth et al., 1988). Le degré de complexation varie selon plusieurs facteurs: le type de ligand organique, la charge et le rayon ionique du métal, le pH, la force ionique etc. (Morel, 1983).

Selon l'approche du MIL, la MOD naturelle se comporterait comme des ligands synthétiques en se limitant à la complexation du métal d'intérêt, ce qui aurait pour effet de faire baisser la concentration de l'ion libre M^{z+}. Cela se traduirait par la diminution de la réponse biologique chez l'organisme: la bioaccumulation et la toxicité seraient ainsi réduites.

1.5.2.2 Autres effets de la MOD naturelle

En plus du pouvoir de complexation de plusieurs composés chimiques, les substances humiques exercent plusieurs autres effets positifs ou négatifs dans le milieu aquatique. Petersen et al. (1987) énumèrent quelques processus causés par ces substances et susceptibles de se produire dans les eaux naturelles: (i) les substances humiques sont des tampons faibles prenant la relève du système tampon des carbonates à un pH d'environ 4-5; (ii) elles procurent une source de nourriture pour plusieurs microorganismes et invertébrés; (iii) elles peuvent stimuler ou réduire certains processus

métaboliques et (iv) elles peuvent être toxiques pour certains organismes comme il a été démontré pour *Gammarus pulex* et *Daphnia magna* (Petersen et al., 1987; Petersen et Persson, 1987). L'importance et la dynamique de ces processus énumérés croissent lors de l'acidification du milieu (Petersen et al., 1987).

Une autre propriété que les substances humiques possèdent est la possibilité de s'adsorber aux surfaces. Dans le cas d'une surface "biologique", cette tendance pourrait avoir des conséquences physiologiques possibles. Petersen et al. (1987) décrit le mécanisme comme étant une interaction non-spécifique entre le surfactant et les lipides de la membrane cellulaire. Wilkinson et al. (1993) ont mis en évidence une telle interaction entre des cellules de branchies isolées et un acide fulvique, à l'aide de mesures de la mobilité électrophorétique des cellules. Les auteurs suggèrent qu'il y aurait adsorption de la matière organique à la surface des cellules et que les forces d'attraction seraient de nature hydrophobes. Quelles seraient les conséquences de cette adsorption sur les cellules? D'après Petersen et al. (1987), il y aurait déstabilisation de la membrane, entraînant des changements de perméabilité de la cellule allant même jusqu'à sa destruction. Behmel (1986) et Münster et al. (1989) évoquent la possibilité d'un effet bénéfique où les molécules humiques pourraient protéger la paroi cellulaire d'une attaque enzymatique (phosphatases, glucosidases et aminopeptidases). De plus, il est aussi possible que cette action directe de la MOD sur l'organisme influence la sensibilité de ce dernier à des métaux toxiques.

1.5.3 Cas de la MOD naturelle envers le MIL

Certaines études montrent des résultats conformes au MIL en présence de MOD naturelle. Cependant, il existe des exceptions où la réponse biologique est supérieure ou inférieure à celle prédite en milieu inorganique (Campbell, 1995).

Giesy et al. (1983) ont comparé la toxicité et la bioaccumulation du cuivre chez le cladocère *Simocephalus serrulatus* dans deux types d'eau: celle d'un puits artésien contenant peu de carbone organique dissous (0,5 mg C/L) et celle provenant d'un étang riche en substances humiques (12-16 mg C/L). En résumé, leur résultats démontrent que tel qu'anticipé, pour une addition donnée de cuivre dans les deux types d'eau, la matière organique présente dans l'eau de l'étang a réduit la bioaccumulation et la toxicité. Cependant, pour des concentrations égales de l'ion libre Cu²⁺ dans les deux milieux, la toxicité et la bioaccumulation étaient supérieures dans l'eau de l'étang. Il y a contradiction avec le MIL puisque d'après ce dernier, la réponse biologique n'aurait pas dû varier d'un

milieu à l'autre. C'est donc dire que le cuivre était beaucoup plus toxique dans l'eau de l'étang que dans l'eau du puits. Les auteurs expliquent cela par le fait que la MOD naturelle pourrait faciliter ou accroître la biodisponibilité du Cu²⁺ résiduel.

L'étude réalisée par Daly et al. (1990b) montre la tendance inverse: la biodisponibilité du métal en présence de MOD naturelle est inférieure à celle obtenue à une concentration identique de l'ion libre en absence de MOD. Les chercheurs ont évalué la toxicité du cuivre chez la crevette d'eau douce *Paratya australiensis*, dans des eaux naturelles riches en MOD. Comme prévu, la matière organique a réduit la toxicité du cuivre ajouté. Toutefois, pour des concentrations équivalentes de Cu²⁺ dans chacun des milieux, la toxicité était inférieure dans les milieux contenant de la matière organique que dans le milieu inorganique. D'après le MIL, la toxicité aurait dû être la même partout. Selon Campbell (1995), il est possible qu'il y ait eu un effet direct bénéfique de la MOD sur l'organisme.

Étant donné le peu d'expériences quantitatives réalisées pour étudier les interactions MOD naturelle-organismes-métaux et la controverse qui existe dans la littérature concernant l'applicabilité du MIL en présence de MOD naturelle, la présente recherche a porté sur ces aspects.

1.6 Objectifs et hypothèses

L'objectif principal de la présente recherche consiste à valider le modèle de l'ion libre avec le saumon Atlantique juvénile (*Salmo salar*) en présence de cadmium et de MOD synthétique (EDTA) ou naturelle (un acide fulvique). Le choix du cadmium découle de trois raisons principales: (i) il est mobilisé en réponse à l'acidification environnementale i.e. sa concentration dissoute augmente; (ii) sa toxicité envers les poissons est reconnue (Sprague, 1987); (iii) et plusieurs exceptions au MIL documentées impliquent ce métal.

On parle d'un raffinement possible du MIL dans des conditions se rapprochant de celles rencontrées dans le milieu naturel. De plus, deux objectifs secondaires sont visés: (i) déterminer la toxicité aiguë du cadmium en milieu inorganique; (ii) évaluer l'accumulation branchiale du cadmium: a) en fonction de concentrations croissantes de Cd d'un milieu à l'autre et en absence de ligands organiques; b) en fonction du temps (cinétique) en milieu inorganique et en présence d'EDTA.

Il y a deux hypothèses à vérifier: (i) la réponse biologique, i.e. la toxicité et la bioaccumulation branchiale du métal, est proportionnelle à la concentration de l'ion libre Cd²⁺; (ii) les deux types de MOD diminuent la réponse biologique seulement par un mécanisme de complexation; ils n'ont pas d'effets directs à la membrane biologique.

Afin de tester l'applicabilité du MIL, les poissons ont été exposés à des concentrations constantes d'ion libre en milieu inorganique ou organique. Le modèle prédit que, dans ces conditions, la toxicité et la bioaccumulation branchiale devraient demeurer constantes.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Généralités

Des saumons Atlantique juvéniles (*Salmo salar*, âge 0+ ou 1+) ont été exposés pendant des périodes allant jusqu'à 96 heures, à des concentrations de cadmium inorganique seul ou en combinaison avec du cadmium organique (Cd lié à un ligand organique), dans des bioessais statiques ou dynamiques, i.e. à renouvellement continu. Le ligand organique synthétique employé est le sel disodique de l'acide éthylènediamine-tétraacétique (Na₂H₂EDTA). Il a été choisi comme ligand modèle étant donné qu'il a beaucoup été étudié dans la littérature et que sa conformité au modèle de l'ion libre était anticipée. Le ligand organique naturel est un acide fulvique extrait d'un sol Laurentien et purifié par la compagnie *Ecolinc inc.*, Roxboro, Québec, selon les procédures établies par Schnitzer et Khan (1978). Il a été choisi parce qu'il se retrouve dans les eaux des rivières de la Côte-Nord étant donné le lessivage des podzols Laurentiens. De plus, l'acide fulvique était disponible en quantités suffisantes pour réaliser les bioessais.

Les bioessais se sont déroulés en chambre environnementale à une température de 8°C avec une photopériode de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité par jour: crépuscule vers 20H00 et aube vers 8H00. L'eau utilisée était une eau reconstituée très douce maintenue à une température de 10°C (voir section 2.3).

Le pH de travail pour tous les bioessais a été fixé à 5,50. Il a été choisi pour deux raisons principales: i) être représentatif du pH de l'eau des rivières de la Côte-Nord lors de la fonte des neiges au printemps, ii) permettre une complexation significative du cadmium par l'acide fulvique.

Le volume d'eau dans les bassins ainsi que les débits ont été déterminés selon Sprague (1973) pour obtenir des conditions d'exposition adéquates. L'auteur recommande que la biomasse ne devrait pas dépasser 10 grammes de poisson par litre d'eau. De plus, dans le cas des bioessais dynamiques, l'arrivée d'eau devrait être de 2 à 3 litres par gramme de poisson par jour. Le respect de cette dernière condition, associée à un volume de 10 à 11 litres d'eau par bassin, a permis un renouvellement rapide de l'eau. On entend par rapide, un temps de remplacement de 90% de l'eau étant égal ou inférieur à 10 heures. D'après Sprague (1973), un temps de remplacement de 90% égal à 12 heures semble

raisonnable. Pour ce qui est des bioessais statiques, un volume de beaucoup supérieur aux recommandations a été utilisé. Il est à noter que des débits de précision et peu variables étaient obtenus grâce à des pompes péristaltiques de marque *Masterflex*. Le système de pompage a toujours été mis en marche de 12 à 24 heures avant la mise des poissons (jour 0) afin de permettre l'équilibre des solutions avec les parois des tubes, des bassins etc.

2.2 Matériel biologique

2.2.1 Provenance et description

La plupart des saumons ont été obtenus de la pisciculture Saukeb située à Nouvelle en Gaspésie, Qc. Cependant, un groupe de poissons d'âge 1+ nous a gracieusement été fourni par le MLCP (pisciculture gouvernementale de Gaspé, Qc). Les rivières de provenance des géniteurs avec lesquels on a produit les tacons sont les suivantes: bioessais A et C: Grande Cascapédia, bioessais B et D (MLCP): Grande Rivière, bioessais E et F: Pabos. Il est à noter que ces trois rivières sont situées en Gaspésie, Qc. La longueur à la fourche moyenne et le poids moyen des individus variaient respectivement de 5,51 à 7,81 cm et de 1,05 à 2,60 g.

2.2.2 Acclimatation et exposition

Les saumons ont été acclimatés au moins deux semaines à l'eau synthétique très douce de pH≈ 6,5 avant le début des expériences. Ils ont été nourris avec une préparation commerciale provenant de la pisciculture Saukeb. La quantité quotidienne utilisée variait entre 1 et 1,5% de la biomasse totale. Cela permettait de maintenir les poissons en bonne santé tout en minimisant leur croissance (Robert L. Roy, comm. pers.). Pour chacun des bioessais, les saumons ont été placés deux par deux dans chacun des bassins d'exposition jusqu'à l'atteinte du nombre visé. Cette disposition systématique permettait de bien répartir la population dans chacun des bassins. Les poissons n'ont pas été nourris 48 à 72 heures avant leur transfert du bassin "stock" aux bassins d'exposition. Il était nécessaire d'agir ainsi afin de réduire leur production de matière organique qui pouvait interférer avec la spéciation du métal en solution.

2.2.3 Réponse biologique

La réponse biologique a été évaluée par la mortalité et par la bioaccumulation du métal. La mortalité a été jugée par l'arrêt du mouvement operculaire ainsi que par l'absence de mouvement à une stimulation tactile. L'heure et le jour étaient alors notés. La mortalité cumulative a été calculée pour chacun des bassins en fin d'expérience. La bioaccumulation a, quant à elle, été mesurée principalement au niveau des branchies du saumon. Par ailleurs, les comportements du poisson ont été notés de manière la plus objective possible pendant les bioessais.

2.3 Eau synthétique reconstituée

2.3.1 Préparation

L'eau synthétique servant aux bioessais a été préparée à partir d'eau du robinet de la ville de Ste-Foy. Cette eau passait tout d'abord par un filtre à particules de 5 µm et ensuite par deux filtres au charbon activé. Le premier filtre retenait les particules grossières et les colloïdes pouvant contenir du fer tandis que les seconds avaient pour rôle de réduire le chlore et la matière organique. Une fois l'eau filtrée de cette façon (environ 300 litres), on y ajoutait entre 5 à 10 ml d'une solution de thiosulfate de sodium (Na₂S₂O₃•5H₂O) 200 g/L afin de détruire le chlore résiduel. Un test qualitatif était effectué par la suite afin de s'assurer que la concentration de cet élément ne soit pas détectable (< 0,1 ppm). Cela était nécessaire car le chlore est toxique pour le poisson et dommageable pour la membrane du système de désionisation par osmose inversée. Ensuite, l'eau était passée par le système d'osmose inversée proprement dit (équipements Lapierre, Beauce, Qc) qui utilisait une membrane Filmtec de type BW 30-4040. Sa dureté était réduite à environ 1 à 3 mg/L en CaCO₃. À la sortie du système, deux filtres supplémentaires étaient présents. Le premier, un filtre au charbon activé, nous assurait que l'on retirait le plus de matière organique possible de l'eau. Le second, un filtre à particules de 0,45 µm, bloquait les bactéries et les fines particules. A cette eau ainsi purifiée, on ajoutait un litre d'une solution concentrée de sels (voir annexe 1). On obtenait de cette façon une dureté comprise dans l'intervalle 10 à 13 mg/L en CaCO3. D'après les critères de l'US Environmental Protection Agency, l'eau est considérée comme étant très douce (van Coillie et al., 1983). De plus, elle est faiblement tamponnée comme en témoigne la valeur d'alcalinité calculée qui est de -1 μéq./L à un pH de 5,50.

2.3.2 Composition chimique

L'eau a été conçue de manière à simuler l'eau des rivières du bouclier Canadien au plan de son acidité, de son extrême douceur et de sa dominance en anions organiques. Sa composition chimique détaillée est présentée à l'annexe 2a.

2.4 Mesure des paramètres d'exposition

2.4.1 Métaux

2.4.1.1 Échantillonnage de l'eau

Lors des bioessais, un échantillon d'eau de 10 ml par jour a été prélevé dans chacun des bassins d'exposition. Ceux-ci ont été acidifiés à 0.1% v/v avec de l'acide nitrique concentré de grade métaux traces afin d'éliminer toute possibilité d'adsorption des métaux sur les parois. Noter que tout le matériel de plastique utilisé pour les manipulations a été préalablement trempé dans un bain d'acide nitrique (10 à 15% v/v) pendant au moins 24 heures. Par la suite, il a été rincé au moins sept fois à l'eau ultra-pure. Cette eau hautement purifiée pour l'usage analytique (désionisée: résistivité > 15 Mohms cm $^{-1}$) était générée à partir d'un système commercial pourvu de résines échangeuses d'ions, de colonnes d'adsorption au charbon actif et de membranes filtrantes (0,2 μ m). Le séchage du matériel a eu lieu sous une hotte à flux laminaire afin d'éviter toute contamination par la poussière.

2.4.1.2 Concentrations totales de Cd, Cu et Zn

Les concentrations totales de Cd ont été déterminées par calcul de dilution à partir des débits et en considérant la concentration de départ (nominale) comme exacte. Elles ont été mesurées par spectrophotométrie d'absorption atomique à la flamme et sans flamme (Varian Spectra AA-30 équipé d'un four au graphite, modèle GTA-96). Les concentrations totales de Cu et de Zn (voir annexe 3) ont aussi été mesurées de cette façon dans certains bioessais (Cu: bioessai F et Zn: bioessais C et F). Pour vérifier l'exactitude de la courbe d'étalonnage, des échantillons d'eau de référence (*Standard Reference Material* 1643b;1643c, *National Institute of Standards & Technology*) étaient utilisés.

2.4.1.3 Concentration des ions libres Cd²⁺ et Ca²⁺

Dans certains bioessais, la concentration de l'ion libre Cd²⁺ a été mesurée à l'aide d'une technique d'échange ionique (annexe 4). De plus, pour les milieux inorganiques et organiques définis, les concentrations de Cd²⁺ et de Ca²⁺ ont pu être calculées à l'aide de MINEQL+, un logiciel d'équilibres thermodynamiques. Cependant, le calcul était impossible pour les bioessais utilisant l'acide fulvique étant donné l'absence de constantes thermodynamiques appropriées pour ce ligand. La banque de données

thermodynamiques utilisée dans le logiciel est celle compilée par Fortin et Gauthier (1995).

2.4.1.4 Concentrations totales des cations majeurs

Les cations majeurs: Ca, Mg, Na et K ont été mesurés par spectrophotométrie d'émission atomique au plasma (*Thermo Jarrell Ash, Atom Scan 25*). Des échantillons d'eau de référence (*Standard Reference Material* SLRS-1;SLRS-2, Conseil National de Recherche du Canada) étaient utilisés pour vérifier l'exactitude des résultats. Les valeurs de Ca ont été incluses dans le présent chapitre alors que les valeurs de Mg, Na et K sont présentées à l'annexe 5.

2.4.2 Autres paramètres

2.4.2.1 pH

Le pH de tous les bassins a été mesuré deux fois par jour (matin et soir) à l'aide d'un pH-mètre de précision \pm 0,01 unités de marque *Fisher*, modèle *Accumet 915*. Il a été ajusté au besoin dans les bioessais à l'aide d'une solution de HNO $_3$ 2N ou de NaOH 2N. Les valeurs sont généralement demeurées très constantes tout au long des bioessais.

2.4.2.2 Dureté

La mesure de la dureté selon *Standards Methods* (APHA, 1985) a été faite afin de voir si les valeurs étaient situées dans l'intervalle désiré: soit entre10 et 13 mg/L en $CaCO_3$ (\approx 45 μ M Ca). De plus, les mesures ont permis de s'assurer du bon fonctionnement du système de désionisation par osmose inversée.

2.4.2.3 Oxygène dissous

La concentration en oxygène dissous a été mesurée une fois par jour à l'aide d'un oxymètre de marque *YSI* modèle *51B*. Le pourcentage de saturation était toujours supérieur à 85%. D'après Sprague (1973), il doit en être ainsi afin que ce paramètre n'affecte pas le poisson.

2.4.2.4 Débits

Dans les bioessais à renouvellement continu, les débits ont été mesurés de façon journalière, de manière à s'assurer qu'ils soient suffisants afin de maintenir des conditions optimales. Il est à noter qu'il y a eu peu de variation durant les bioessais.

2.5 Toxicité aiguë en milieu inorganique

Deux bioessais dynamiques ont été menés afin de déterminer la résistance des poissons au cadmium. Ces derniers ont été exposés à des concentrations croissantes de cadmium total d'un bassin à l'autre. Ces bioessais ont été réalisés en milieu inorganique pendant 96 heures. On calcule alors, à l'aide des pourcentages de mortalité cumulative et des différentes concentrations du métal, la CL50 96 heures d'après Hamilton et al. (1977). Elle se définit comme étant la concentration qui tue 50% de la population après 96 heures d'exposition. Évidemment, elle dépend des paramètres de l'expérience: pH, température, dureté, etc.

2.5.1 Bioessai A

La gamme de concentration totale de Cd utilisée dans ce bioessai variait de 0 à 200 nM répartie en cinq concentrations avec un témoin. Il y a eu réplication des milieux d'exposition pour un total de douze bassins. Dix poissons par bassin ont été utilisés dans l'expérience. Le tableau suivant montre les conditions spécifiques auxquelles les poissons ont été soumis.

Tableau 2.1: Conditions particulières moyennes d'exposition du bioessai A.

Bassin #	[Cd] totale	[Cd] totale	pHc	oxygène dissous ^d
	calculée ^a	mesurée ^b		
	(nM)	· (nM)		(% saturation)
1	178	202±9	5,47±0,05	92
2	178	198±7	5,47±0,05	92
3	94±1	104±9	5,47±0,05	91
4	94±1	110±4	5,47±0,05	93
5	71±1	81±3	5,48±0,04	91
6	71±1	80±4	5,47±0,05	92
7	40±1	43±2	5,49±0,04	90
8	40±1	44±2	5,49±0,03	90
9	17±1	16±1	5,49±0,03	88
10	17±1	16±2	5,49±0,03	87
11(tém.)	0	0,3±0,3	5,52±0,01	87
12(tém.)	0	0,3±0,3	5,51±0,04	88

a: à partir de la concentration nominale et par les débits, moyenne ± écart type, selon Δdébits, n=5 b: par spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme, moyenne ± écart type, n=5

c: - log₁₀(moyenne des [H+]) ± écart type, n=9; d: une seule mesure au jour 4

2.5.2 Bioessai B

Les conditions de ce bioessai sont identiques au précédent. Toutefois, la gamme de concentrations de Cd est supérieure. Elle varie de 0 à 419 nM. De plus, l'origine des poissons n'est pas la même. Le tableau 2.2 montre les conditions particulières de ce bioessai.

Tableau 2.2: Conditions particulières moyennes d'exposition du bioessai B.

Bassin #	[Cd] totale calculée ^a	[Cd] totale mesurée ^b	pH ^c	oxygène dissous ^d
	(nM)	(nM)		(% saturation)
1	445	412±16	5,51±0,07	91±2
2	445	419±6	5,50±0,06	87±1
3	210±1	200±8	5,52±0,08	92±1
4	210±1	193±7	5,49±0,07	87±1
5	168±2	165±2	5,51±0,07	91±1
6	168±2	167±4	5,50±0,06	87±1
7	121±1	116±5	5,52±0,07	92±2
8	121±1	111±3	5,50±0,06	87±1
9	44 <u>+</u> 2	45±2	5,48±0,08	90±1
10	44 <u>+2</u>	45±1	5,48±0,07	87±2
11(tém.)	0	0,2±0,3	5,52±0,07	94±1
12(tém.)	0	0,5±0,4	5,49±0,06	89±3

a: à partir de la concentration nominale et par les débits, moyenne ± écart type, selon ∆débits, n=5
 b: par spectrophotométrie d'absorption atomique avec flamme (bassin 1 à 4) et sans flamme (autres bassins), moyenne ± écart type, n=5

Il est à noter que pour les bioessais A et B, les bassins impairs alimentaient les bassins pairs. Par exemple, la solution d'exposition arrivait au bassin # 1 et était transférée au bassin # 2 par un mécanisme de siphon. L'évacuation vers les égouts était faite à partir du bassin # 2.

c: - log₁₀(moyenne des [H+]) ± écart type, n=9

d: moyenne ± écart type, n=4

2.6 Bioaccumulation branchiale

2.6.1 Accumulation branchiale du Cd en fonction de concentrations croissantes du métal: Bioessai A

Certains survivants du bioessai A ont été conservés pour fin d'analyse: un individu pour les bassins # 5 et 8, deux pour le bassin # 9 et six pour chacun des bassins # 10, # 11 et # 12. Il a alors été permis de voir la relation entre la concentration de cadmium en solution et la quantité de cadmium accumulée dans les branchies. Le traitement des tissus est expliqué plus loin (section 2.7).

2.6.2 Bioaccumulation branchiale en présence ou absence d'EDTA

2.6.2.1 Bioessai C

Premier d'une serie de trois, ce bioessai avait pour but de valider le modèle de l'ion libre en présence d'EDTA. Il comprenait cinq bassins d'exposition: un milieu contenant du cadmium inorganique, trois contenant du cadmium organique (complexes Cd-EDTA) avec une fraction de cadmium inorganique et un témoin sans cadmium. Chaque milieu a été préparé dans un grand bassin de 320 litres en laissant au moins 24 heures de temps d'équilibration afin d'assurer la formation des complexes. L'ajustement du pH a été fait durant ce laps de temps. Les pompes péristaltiques se chargeaient de pomper les solutions ainsi préparées vers de petits bassins où étaient exposés les poissons. Étant donné qu'il y avait un petit bassin pour chaque grand bassin de 320 litres, le bioessai comportait donc cinq grands bassins et autant de petits au total. Dix poissons par bassin ont été utilisés et la dissection des branchies a eu lieu après 96 heures d'exposition.

Les trois tableaux suivants présentent les conditions relatives à ce bioessai. Le tableau 2.3 montre les concentrations de cadmium, le tableau 2.4 fait apparaître les concentrations d'EDTA et le tableau 2.5 affiche les concentrations de calcium, d'oxygène dissous et le pH.

Tableau 2.3: Concentrations de cadmium pour chacun des bassins d'exposition: Bioessai C.

Bassin #	[Cd] totale	[Cd] totale	[Cd ²⁺]	[Cd ²⁺]
	nominale ^a	mesurée ^b	nominale ^a	calculée ^c
	(μ M)	(μ M)	(nM)	(nM)
1	12,00	11,95±0,16	15,5	0,13
2	8,00	8,03±0,13	15,6	0,14
3	4,00	4,05±0,07	15,7	0,14
4	16,0 n M	15,3±0,6 nM	15,6	14,9
5 (tém.)	0	0,1±0,1 nM	0	-

a: concentrations visées

Tableau 2.4: Concentration totale d'EDTA et du complexe Cd-EDTA²⁻ pour chacun des bassins d'exposition: Bioessai C.

Bassin #	[EDTA] totale	[Cd-EDTA ²⁻]
	nominale ^a	calculée ^b
	(μ M)	(μM)
1	17,10	11,90
2	11,50	7,98
3	5,8	4,02
4	0	-
5	0	-

a: concentrations visées

b: par spectrophotométrie d'absorption atomique avec flamme (bassins 1 à 3) et sans flamme (bassins 4 et 5), moyenne ± écart type, n=5

c: par MINEQL+, selon les modalités présentées à l'annexe 2b

b: par MINEQL+, voir annexe 2b

Tableau 2.5: Concentrations de calcium, d'oxygène dissous et pH selon le milieu d'exposition: Bioessai C.

Bassin #	[Ca] totale	[Ca ²⁺]	pHc	oxygène dissous ^d
	mesurée ^a	calculée ^b		
	(μ M)	(μ M)		(% saturation)
1	55,2±4,6	49,5	5,48±0,05	87±2
2	58,5±1,4	54,3	5,48±0,04	87±2
3	52,5±1,9	50,0	5,50±0,03	89±2
4	50,5±0,6	49,7	5,51±0,02	89±3
5 (tém.)	54,5±0,3	53,6	5,50±0,02	91±4

a: par spectrophotométrie d'émission atomique au plasma, moyenne ± écart type, n=5

2.6.2.2 Bioessais D et E

Pour chacune de ces expériences, deux milieux d'exposition ont été préparés en double: (i) un milieu contenant du cadmium inorganique et (ii) un milieu contenant du cadmium organique (complexes Cd-EDTA) avec une fraction plus ou moins grande de cadmium inorganique. Chaque milieu a été préparé dans un grand bassin de 320 litres tout comme lors du bioessai précédent. Ces bioessais comportaient quatre grands bassins et autant de petits au total.

Le bioessai D se voulait une étude de la cinétique d'accumulation branchiale. En effet, douze poissons par bassin ont été exposés et trois de ceux-ci ont été prélevés pour dissection des branchies aux temps suivants: 0, 6, 12, 24 et 96 heures. Au temps 0, huit poissons du bassin "stock" ont été disséqués afin d'obtenir une valeur de comparaison.

Étant donné le poids moyen assez élevé des poissons (2,5 g), un débit de 60 ml/min était nécessaire pour les premières 24 heures afin d'assurer un renouvellement adéquat (selon Sprague, 1973). Ensuite le débit a été diminué à environ 40 ml/min puisqu'il ne restait alors que trois poissons. Cela était nécessaire puisque seulement 320 litres étaient disponibles.

b: par MINEQL+, voir annexe 2b

c: - log₁₀(moyenne des [H+]) ± écart type, n=9

d: moyenne ± écart type, n=5

Les trois tableaux suivants montrent les conditions spécifiques d'exposition lors du bioessai D. Le tableau 2.6 affiche les concentrations de cadmium; le tableau 2.7 indique les concentrations d'EDTA alors que le tableau 2.8 expose les concentrations de calcium, d'oxygène dissous et le pH.

Tableau 2.6: Concentrations de cadmium pour chacun des bassins d'exposition: Bioessai D.

Bassin #	[Cd] totale	[Cd] totale	[Cd ²⁺]	[Cd ²⁺]	[Cd ²⁺]
	nominale ^a	mesurée ^b	nominale ^a	mesurée ^c	calculée ^d
- 20	(μM)	(μ M)	(nM)	(nM)	(nM)
1	8,00	8,10±0,04	15,6	1,2	0,12
2	8,00	8,13±0,08	15,6	1,4	0,13
3	16,0 nM	16,1±1,1 nM	15,6	17,3	15,6
4	16,0 nM	16,0±1,2 nM	15,6	17,7	15,5

a: concentrations visées

Tableau 2.7: Concentration totale d'EDTA et du complexe Cd-EDTA²⁻ pour chacun des bassins d'exposition: Bioessai D.

Bassin #	[EDTA] totale	[Cd-EDTA ²⁻]	
	nominale ^a	calculée ^b	
	(μ M)	(μM)	
1	11,50	8,05	
2	11,50	8,08	
3	0	-	
4	0	-	

a: concentrations visées

b: par spectrophotométrie d'absorption atomique avec flamme (bassins 1 et 2) et sans flamme (bassins 3 et 4), moyenne ± écart type, n=6 (bassins 1 et 2), n=14 (bassins 3 et 4)

c: par technique d'échange ionique, moyenne de deux données (jour 0 et jour 4)

d: par MINEQL+, voir annexe 2b

b: par MINEQL+, voir annexe 2b

Tableau 2.8: Concentrations de calcium, d'oxygène dissous et pH selon le milieu d'exposition: Bioessai D.

Bassin #	[Ca] totale	[Ca ²⁺]	pH ^c	oxygène dissous ^d
	mesurée ^a	calculée ^b		
	(μ M)	(μ M)		(% saturation)
1	48,5±0,5	44,5	5,51±0,02	84±6
2	50,3±1,0	46,4	5,49±0,04	90±5
3	51,2±1,0	50,3	5,51±0,04	90±5
4	47,6±0,9	46,8	5,49±0,04	91±4

a: par spectrophotométrie d'émission atomique au plasma, moyenne ± écart type, n=5

b: par MINEQL+, voir annexe 2b

c: - log₁₀(moyenne des [H+]) ± écart type, n=9

d: moyenne ± écart type, n=5

La banque de données originale de MINEQL+ étant erronée, il a été impossible d'obtenir des concentrations d'ion libre Cd²+ égales dans les milieux avec EDTA et sans EDTA lors des bioessais C et D. Le test du MIL étant impossible avec ces données, il fallait donc répéter le bioessai. Grâce à la banque de données thermodynamique compilée par Fortin et Gauthier (1995), et grâce à la technique de dosage par échange ionique (TEI), il a été possible de réaliser ce tour de force. Le résultat est le bioessai E.

Les milieux Cd-EDTA ont été préparés en premier lieu et en évitant le plus possible les biais volumétriques. Après 24 heures d'attente, on a procédé au dosage de Cd²⁺ par échange ionique en triplicata pour chacun des bassins de 320 litres. Par la suite, avec les valeurs de Cd²⁺ obtenues, on a pu préparer les bassins de Cd inorganique en les ajustant aux <u>mêmes</u> valeurs de l'ion libre Cd²⁺.

Quatorze poissons par bassin ont été exposés et la dissection des branchies a eu lieu après 96 heures. Quatorze poissons du bassin "stock" ont été disséqués afin de servir de point de comparaison avec les deux traitements.

Les trois tableaux suivants décrivent les conditions spécifiques d'exposition du bioessai E. Le tableau 2.9 donne les concentrations de cadmium; le tableau 2.10 indique les concentrations d'EDTA alors que le tableau 2.11 montre les concentrations de calcium, d'oxygène dissous et le pH.

Tableau 2.9: Concentrations de cadmium pour chacun des bassins d'exposition: Bioessai E.

Bassin #	[Cd] totale	[Cd] totale	[Cd ²⁺]	[Cd ²⁺]	[Cd ²⁺]
	nominale ^a	mesurée ^b	mesurée ^b nominale ^a		calculée ^d
	(μM)	(μ M)	(nM)	(nM)	(nM)
1	8,00	7,96±0,04	21,2	21,3±2,1	22,7±16,8
2	8,00	7,93±0,15	8,9	8,8±1,6	22,4±16,8
3	21,8 nM	24,0±0,5 nM	21,2		23,3
4	9,1 nM	9,6±0,3 nM	8,9		9,3

a: concentrations visées

Tableau 2.10: Concentration totale d'EDTA et du complexe Cd-EDTA²⁻ pour chacun des bassins d'exposition: Bioessai E.

Bassin #	[EDTA] totale	[Cd-EDTA ²⁻]
	nominalea	calculée ^b
	(μ M)	(μ M)
1	8,09	7,94
2	8,09	7,94
3	0	-
4	0	-

a: concentrations visées

b: par spectrophotométrie d'absorption atomique avec flamme (bassins 1 et 2) et sans flamme (bassins 3 et 4), moyenne ± écart type, n=6 (bassins 1 et 2), n=12 (bassins 3 et 4)

c: par technique d'échange ionique (TEI)(voir annexe 4), moyenne ± écart type, n=3

d: par MINEQL+, voir annexe 2b

b: par MINEQL+, voir annexe 2b

Bassin #	[Ca] totale	[Ca ²⁺]	pHc	oxygène dissous ^d
	mesurée ^a	calculée ^b		
	(μ M)	(μ M)		(% saturation)
1	51,1±1,5	50,2	5,51±0,05	87±1
2	49,3±1,2	48,4	5,52±0,06	87±1

5,50±0,04

5.49±0.04

88±1

88±1

Tableau 2.11: Concentrations de calcium, d'oxygène dissous et pH selon le milieu d'exposition: Bioessai E.

49,5

49.3

50,3±0,8

50,1±0,8

3

4

2.6.3 Accumulation du cadmium en présence d'acide fulvique: Bioessai F

Contrairement aux bioessais précédents, le bioessai F a été réalisé en milieu statique. Quatre bassins de 63 litres ont été utilisés: deux contenant du cadmium inorganique et deux contenant du cadmium organique (complexes Cd-acide fulvique) avec une fraction de cadmium inorganique équivalente à celle des deux premiers milieux. Tout comme pour le bioessai précédent (E), les milieux organiques ont été préparés en premier lieu et il y a eu dosage de Cd²+ par échange ionique en triplicata pour chaque bassin. À l'aide des valeurs obtenues, les bassins de Cd inorganique ont été préparés en visant des concentrations en Cd²+ équivalentes à celles des milieux organiques. Il y a aussi eu un dosage de Cd²+ dans les milieux organiques à la fin de l'expérience afin de s'assurer que la concentration de Cd²+ n'ait pas varié durant l'expérience. La concentration d'acide fulvique utilisée est celle que l'on retrouve typiquement dans les rivières de la Côte-Nord au printemps lors de la fonte des neiges, soit de 10 mg/L (Campbell et al., 1992).

Dix poissons par bassin ont été exposés et la dissection des branchies a eu lieu après 24 heures d'exposition seulement. Dix poissons du bassin "stock" ont été disséqués afin de servir de point de comparaison avec les deux traitements.

a: par spectrophotométrie d'émission atomique au plasma, moyenne ± écart type, n=5

b: par MINEQL+, voir annexe 2b

c: - log₁₀(moyenne des [H+]) ± écart type, n=9

d: moyenne ± écart type, n=5

Les deux tableaux suivants décrivent les conditions relatives à ce bioessai. Le tableau 2.12 affiche les concentrations de cadmium et de carbone organique alors que le tableau 2.13 expose la concentration totale de calcium, d'oxygène dissous et le pH.

Tableau 2.12: Concentrations de cadmium et de carbone organique pour chacun des bassins d'exposition: Bioessai F.

Bassin #	[Cd] totale	[Cd] totale	[Cd] totale [Cd ²⁺]		[C _{org} .]
	nominale ^a	mesurée ^b	nominale ^a		mesurée ^d
	(nM)	(nM)	(nM)	(n M)	(mg/L)
1	318	297	218	228±6	3,44
2	318	295	218	227±13	3,62
3	239	236	218	229	< l.d.e
4	246	238	218	231	< l.d.

a: concentrations visées

Tableau 2.13: Concentrations de calcium, d'oxygène dissous et pH selon le milieu d'exposition: Bioessai F.

Bassin #	[Ca] totale	рН ^b	oxygène dissous ^c
	mesurée ^a		
	(μ M)		(% saturation)
1	52,1	5,50±0,02	92±1
2	51,7	5,49±0,02	93±2
3	51,8	5,50±0,01	94 <u>±</u> 2
4	52,0	5,49±0,02	96±1

a: par spectrophotométrie d'émission atomique au plasma, moyenne de deux données

b: par spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme, moyenne de deux données

c: bassins 1 et 2: mesurée par technique d'échange ionique (TEI)(voir annexe 4), moyenne ± écart type, n=6, bassins 3 et 4: calculée par MINEQL+, voir annexe 2b

d: par méthode pour le carbone organique dissous, moyenne de deux données

e: sous la limite de détection

b: - log₁₀(moyenne des [H+]) ± écart type, n=5

c: moyenne ± écart type, n=5

2.7 Traitement des tissus

2.7.1 Branchies

Les poissons ont d'abord été décapités derrière l'opercule. Les branchies ont alors été disséquées, rincées dans l'eau ultra-pure pendant quelques secondes, trempées 15 minutes dans 2 à 10 ml d'une solution de Na₂H₂EDTA 10⁻³ M de pH 5,0 afin d'enlever le cadmium adsorbé (Wilkinson et al., 1990). Ensuite, elles ont été rincées dans l'eau ultra-pure une seconde fois et épongées délicatement à l'aide de papiers filtres GF-C afin de retirer le mucus adhérant à la surface branchiale. De cette façon, on obtient lors du dosage, la fraction du métal internalisé: c'est-à-dire le métal se retrouvant à l'intérieur des cellules. Les branchies ainsi traitées ont été conservées à -20°C en vue d'une analyse ultérieure. À leur sortie du congélateur, les branchies ont été pesées afin d'obtenir le poids humide. Le poids sec, quant à lui, a été obtenu après lyophilisation des tissus (-50°C, 80 à 100 Millitors) pendant une période de deux jours.

2.7.2 Partie restante du poisson

La partie restante de quelques poissons a subi un traitement semblable à celui des branchies. Il y a eu rinçage quelques secondes dans l'eau ultra-pure, trempage 15 minutes dans environ 50 ml de la solution de Na₂H₂EDTA 10⁻³ M, autre rinçage dans l'eau ultra-pure, enlèvement du mucus adhérant à la surface du poisson à l'aide d'un scalpel, autre rinçage et pour finir, le poisson a été épongé délicatement à l'aide de papiers filtres GF-C. Une mesure de poids humide a été effectuée par la suite.

Avant de pouvoir obtenir le poids sec, il fallait réaliser des homogénats de tissus car le poisson entier possèdait une masse trop importante pour être digéré avec le type de bombe à digestion disponible. Une quantité d'eau ultra-pure équilvalente à la masse des tissus a tout d'abord été incorporée à ceux-ci préalablement à l'homogénisation. Les homogénats ont été faits à l'aide d'un homogénisateur de tissus de marque *Brinkmann*, modèle *PT 10/35*. Ceux-ci ont été lyophilisés selon les mêmes conditions que pour les branchies, mais pour une période plus longue, soit de six jours. Le poids sec a pu être mesuré par la suite. Neuf poissons provenant du bioessai F ont subi ce traitement: trois poissons par milieu: témoin, bassin # 1 et bassin # 3.

2.8 Détermination du métal accumulé par digestion au four à micro-ondes

Les tissus ont été digérés selon la méthode décrite à l'annexe 6. Les bombes utilisées étaient de marque *Parr intrument*, modèle 4781. Le cadmium a été le principal métal analysé. Cependant, le cuivre (n= 8), le zinc (n= 5) ainsi que le calcium (n= 5) ont également été analysés pour le bioessai F. Pour vérifier la qualité des valeurs obtenues lors des digestions, des échantillons de référence composés d'hépatopancréas de homard (TORT-1, CNRC) de poids sec variant entre 8 et 40 mg ont été digérés. Le cadmium et le cuivre ont été mesurés par spectrophotométrie d'absorption atomique avec fournaise au graphite. Les concentrations de zinc ont été déterminées par spectrophotométrie d'absorption atomique avec flamme. Pour la mesure du calcium, la spectrophotométrie d'émission atomique au plasma a été employée. Les pourcentages de récupération des différents métaux dans les dosages de l'échantillon de référence sont présentés en détail à l'annexe 7.

3.1 Toxicité aiguë en milieu inorganique

Les figures 3.1 à 3.4 présentent l'évolution de la mortalité cumulative en fonction du temps et selon le milieu d'exposition pour les bioessais A et B. Les bassins pairs et impairs ont été regroupés sur chacune des figures.

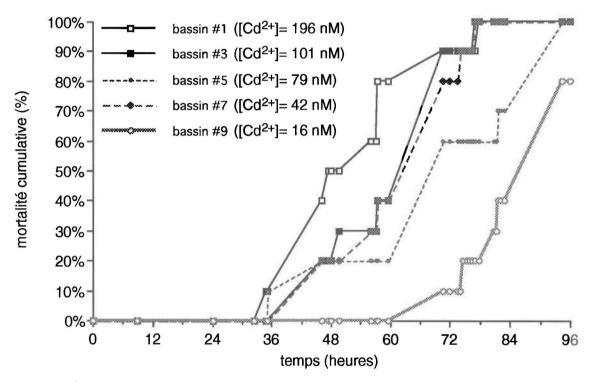


Figure 3.1: Évolution de la mortalité cumulative des saumons en fonction du temps et selon le bassin d'exposition: Bioessai A, bassins impairs.

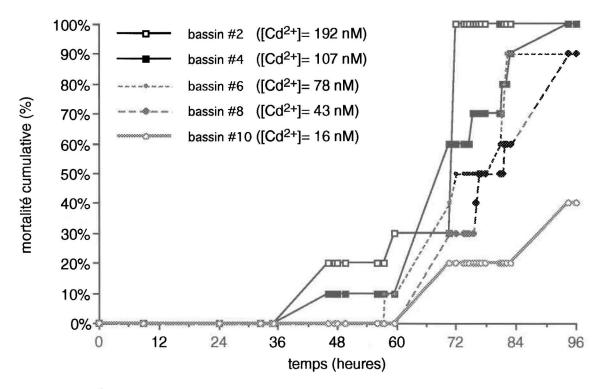


Figure 3.2: Évolution de la mortalité cumulative des saumons en fonction du temps et selon le bassin d'exposition: Bioessai A, bassins pairs.

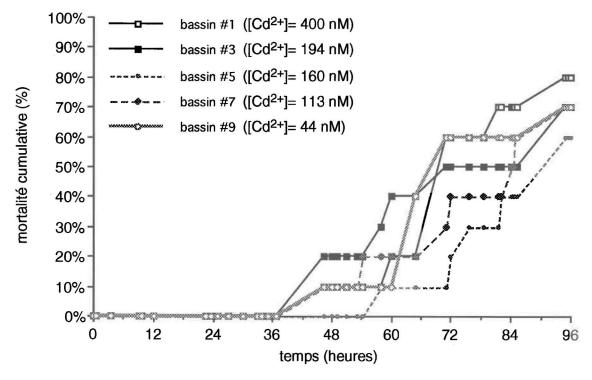


Figure 3.3: Évolution de la mortalité cumulative des saumons en fonction du temps et selon le bassin d'exposition: Bioessai B, bassins impairs.

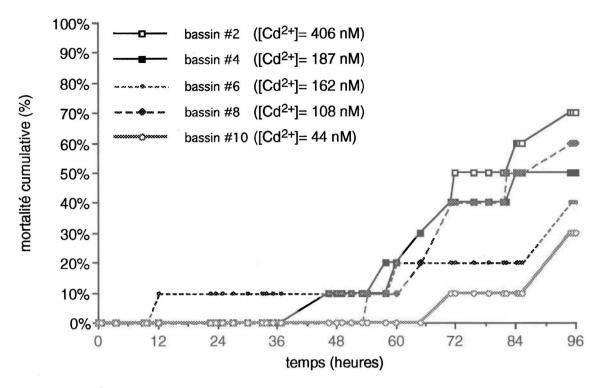


Figure 3.4: Évolution de la mortalité cumulative des saumons en fonction du temps et selon le bassin d'exposition: Bioessai B, bassins pairs.

Pour les deux bioessais, on remarque d'une manière générale que plus la concentration de cadmium libre est importante (plus le numéro du bassin est petit), plus les poissons meurent rapidement. La mortalité débute environ après 36 heures d'exposition sauf pour les concentrations les plus faibles où elle commence plus tard. De plus, on note que la mortalité se cumule plus rapidement dans les bassins impairs. Cela proviendrait du fait que l'eau "propre" arrivait au bassin impair et était transférée au bassin pair. Ainsi, il est possible que l'eau des bassins pairs ait pu contenir des concentrations appréciables de produits excrétés par les poissons. Ces substances peuvent complexer les métaux et diminuer la toxicité du cadmium.

La mortalité cumulative à la fin de la période de 96 heures se lit comme suit. Pour ce qui est du bioessai A, elle atteint 100% pour les bassins # 1, # 2, # 3, # 4, # 5 et # 7. Elle est de 90% pour les bassins # 6 et # 8, 80% pour le bassin # 9 et de 40% pour le bassin # 10. Pour le bioessai B, la mortalité cumulative à la fin de la période d'exposition de 96 heures se chiffre à 80% pour le bassin # 1, 70% dans les bassins # 2, # 3, # 7 et # 9, 60% dans les bassin # 5 et # 8, 40% dans le bassin # 6 et 30% dans le bassin # 10. Dans les bassins # 11 et # 12, témoins des deux bioessais, tous les saumons ont survécu.

Les CL50 96 heures, exprimées en terme d'ion libre Cd²⁺ et calculées d'après Hamilton et al. (1977), sont respectivement les suivantes: 3 et 15±4 nM pour les bioessais A et B. Elles ont été calculées à partir des données de mortalité des bassins impairs puisqu'elles sont plus représentatives étant donné la plus grande propreté de l'eau i.e. faibles concentrations de produits d'excrétion libérés par le poisson. Il a été impossible de calculer un intervalle de confiance pour la CL50 du bioessai A étant donné l'insuffisance des données. Celle-ci représente donc une approximation. Notons qu'il a été difficile d'obtenir une bonne gamme de valeurs de mortalité cumulatives dans les bioessais i.e entre 10 et 90% inclusivement. Un tel éventail est nécessaire afin de bien délimiter la valeur de CL50 et d'obtenir un intervalle de confiance minimal.

3.2 Bioaccumulation branchiale

3.2.1 Accumulation en milieu inorganique et en présence d'EDTA: Bioessais: A, C, D et E

3.2.1.1 Accumulation branchiale du Cd en fonction de concentrations croissantes du métal: Bioessai A

La figure 3.5 montre la relation entre l'accumulation branchiale du cadmium après 96 heures d'exposition et la concentration de Cd²⁺ dans le milieu. Aucun ligand organique n'a été employé dans cette expérience.

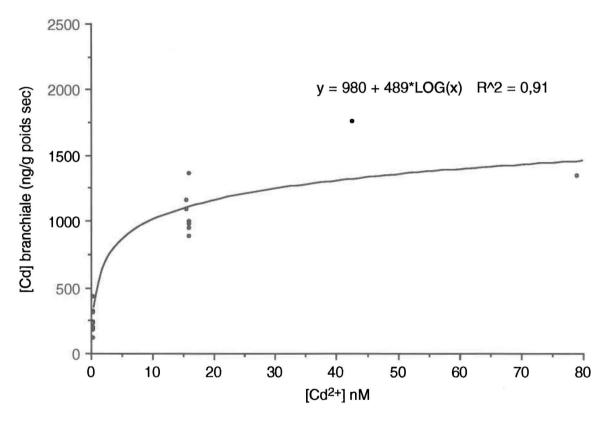


Figure 3.5: Accumulation branchiale du cadmium chez le saumon Atlantique juvénile (âge 0+) en fonction de la concentration de l'ion libre Cd²⁺ du milieu (survivants après 96 heures d'exposition, Bioessai A).

On remarque que l'accumulation branchiale du cadmium augmente en fonction de la concentration de l'ion libre Cd²⁺ jusqu'à environ 20 nM. Ensuite, pour des concentrations plus élevées de Cd²⁺, la relation semble plafonner et ce, aux environs de 1300 à 1400 ng

de Cd/g de poids sec. On ne peut toutefois dire avec certitude si il y a atteinte d'un plateau étant donné le faible nombre d'observations pour des concentrations de Cd²⁺ supérieures à 20 nM. De plus, les données sont mal distribuées sur l'axe des X. Les données brutes de ce graphique sont présentées à l'annexe 8.

3.2.1.2 Accumulation en présence ou absence d'EDTA: Bioessai C

La figure 3.6 montre, sous forme d'histogramme, les concentrations de cadmium accumulées dans les branchies des poissons après 96 heures d'exposition pour chacun des milieux.

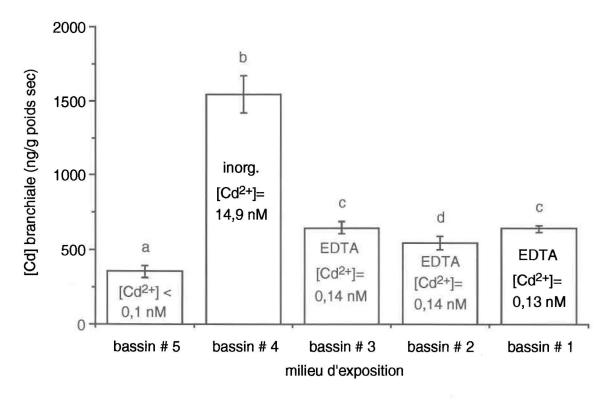


Figure 3.6: Accumulation branchiale du cadmium chez le saumon Atlantique juvénile (âge 0+) après 96 heures d'exposition (moyenne ± écart type; n varie de 4 à 6).

abc: Les lettres minuscules indiquent des différences significatives (test de Mann-Whitney, p < 0,025).

On note que les concentrations de Cd accumulées sont significativement supérieures chez les individus exposés en milieu inorganique (bassin # 4), milieu où la concentration calculée de l'ion libre Cd²⁺ est la plus élevée: 14,9 nM (tableau 2.3, chapitre 2). La concentration branchiale moyenne pour les poissons de ce milieu atteint 1540±125 ng de Cd/g de poids sec (annexe 8). Le bassin # 5 constituait le témoin de l'expérience, les

poissons ayant été exposés à l'eau reconstituée de pH 5,50 sans Cd, ni ligands. Les concentrations branchiales de Cd y sont les plus faibles mais elles ne sont toutefois pas négligeables (360±86 ng/g de poids sec).

En présence du ligand synthétique qu'est l'EDTA, les concentrations branchiales nettes de Cd accumulées sont significativement inférieures (≈ 4,5 fois) à celles du milieu inorganique (bassin # 4). Les concentrations branchiales moyennes dans ces milieux (bassins # 3, # 2 et # 1) sont respectivement de: 650±43, 550±47 et de 640±24 ng de Cd/g de tissus lyophilisés (annexe 8). Les concentrations calculées de l'ion libre Cd²+ sont environ 100 fois plus faibles que dans le milieu inorganique (bassin # 4). Elles sont de 0,14 nM pour les bassins # 3 et # 2 et de 0,13 nM pour le bassin # 1 (tableau 2.3, chapitre 2).

3.2.1.3 Cinétique d'accumulation: Bioessai D

Les figures 3.7 et 3.8 présentent les concentrations branchiales de cadmium accumulées en fonction du temps en milieu inorganique (bassins # 3 et # 4) et en présence d'EDTA (bassins # 1 et # 2).

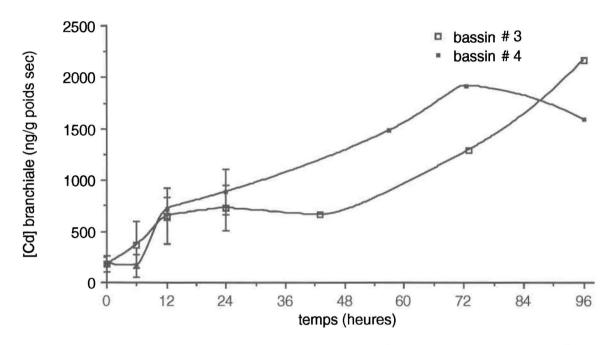


Figure 3.7: Cinétique d'accumulation du cadmium en milieu inorganique: bassins # 3 et # 4, (moyenne ± écart type; n=3 sauf pour les trois derniers points où n=1, [Cd²+]≈ 16 nM).

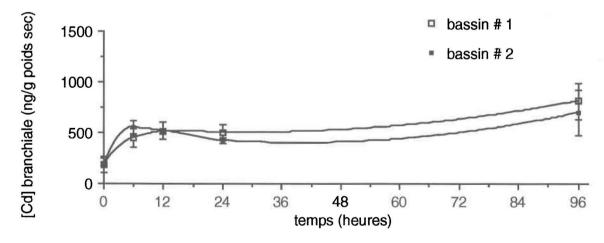


Figure 3.8: Cinétique d'accumulation du cadmium en présence d'EDTA: bassins # 1 et # 2, (moyenne ± écart type; n= 3, [Cd²+]≈ 1 nM).

On note tout d'abord que la concentration branchiale de Cd au temps t= 0 est de 180±78 ng/g de poids sec (annexe 8). On observe pour tous les milieux une accumulation rapide au début: de 0 à 12 heures. Ensuite, cette accumulation brusque est suivie par l'atteinte d'un plateau autour de 500 à 750 ng de Cd/g de poids sec (voir annexe 8). À faible concentration d'ion libre Cd²+ et en présence d'EDTA (bassins # 1 et # 2), ce plateau demeure. Toutefois, en milieu inorganique et dans les conditions de forte concentration d'ion libre Cd²+ (bassins # 3 et # 4), on note une seconde augmentation des concentrations branchiales après environ 48 heures d'exposition. Cette seconde augmentation correspond au début de la mortalité. Les concentrations branchiales atteintes dans ces milieux après 96 heures sont d'environ 2000 ng de Cd/g de tissus secs (voir annexe 8 pour les concentrations exactes). Il est à noter qu'un seul poisson a été analysé après 96 heures en milieu inorganique étant donné la mortalité survenue.

Les concentrations de l'ion libre Cd²⁺ sont de beaucoup supérieures dans les milieux inorganiques comparativement aux milieux où l'EDTA est présent. En effet, en se référant au tableau 2.6 du chapitre 2 et selon l'ordre des bassins # 1, # 2, # 3 et # 4, les concentrations de Cd²⁺ calculées sont respectivement de 0,12, 0,13, 15,6 et de 15,5 nM. Les concentrations mesurées sont un peu plus élevées: 1,2, 1,4, 17,3 et 17,7 nM.

3.2.1.4 Accumulation en présence ou absence d'EDTA: Bioessai E

La figure 3.9 présente les concentrations de cadmium accumulées dans les branchies des poissons après 96 heures d'exposition pour chacun des milieux.

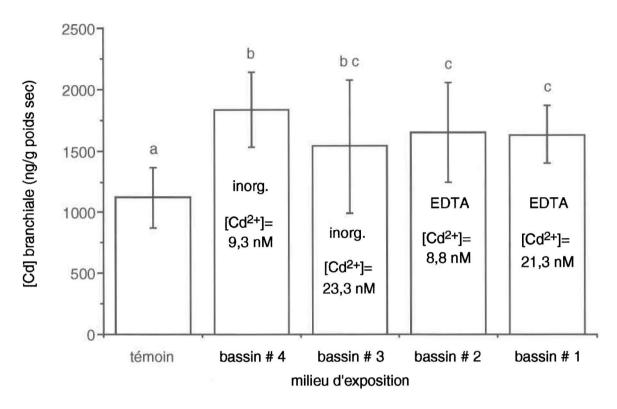


Figure 3.9: Accumulation branchiale du cadmium chez le saumon Atlantique juvénile (âge 0+) après 96 heures d'exposition (moyenne ± écart type; n varie de 10 à 14).

abc: Les lettres minuscules indiquent des différences significatives (test de Mann-Whitney, p < 0,025).

En premier lieu, bien que les écarts types soient importants, on constate que les concentrations branchiales de Cd chez les poissons exposés à ce métal (bassins # 1 à # 4) sont significativement supérieures à la valeur basale du groupe témoin. Cette dernière se chiffre à 1120±244 ng de Cd/g de poids sec (annexe 8). Il n'existe pas de différence significative dans les [Cd] branchiales entre les individus exposés en milieu inorganique (bassins # 3 et # 4). Ces concentrations sont respectivement de 1540±541 et de 1830±309 ng de Cd/g de poids sec (annexe 8). La valeur calculée de Cd²⁺ est supérieure pour le bassin # 3 (23,3 nM) comparativement au bassin # 4 (9,3 nM) (tableau 2.9, chapitre 2). En présence d'EDTA (bassins # 1 et # 2), il n'y a pas non plus de différences significatives dans les concentrations branchiales de Cd. Les valeurs sont respectivement de 1630±233 et de 1650±405 ng de Cd/g de tissus secs (annexe 8). Les

concentrations de Cd²⁺ mesurées sont équivalentes à celles des milieux inorganiques: elles sont de 21,3 nM pour le bassin # 1 et de 8,8 nM pour le bassin # 2 (tableau 2.9, chapitre 2).

Si on compare les valeurs de Cd branchiales pour des concentrations égales d'ions libres, c'est-à-dire en comparant les bassins pairs (# 2 et # 4) et impairs (# 1 et # 3), on constate qu'il y a une différence significative seulement entre les bassins pairs. En effet, les saumons exposés dans le bassin # 4 ont accumulé légèrement plus de cadmium que ceux exposés dans le bassin # 2.

3.2.2 Accumulation branchiale en présence d'acide fulvique: Bioessai F

3.2.2.1 Cadmium

La figure 3.10 présente les concentrations de cadmium accumulées dans les branchies des poissons après 24 heures d'exposition pour chacun des milieux. Il est à noter que les concentrations de Cd²⁺ utilisées sont élevées comparativement à celles des autres bioessais (voir chapitre 2). Il fallait agir ainsi afin d'obtenir des concentrations branchiales de Cd significativement supérieures à la valeur basale du groupe de poissons témoin qui était relativement élevée. Les poissons ont été exposés pendant 24 heures seulement pour éviter toute mortalité.

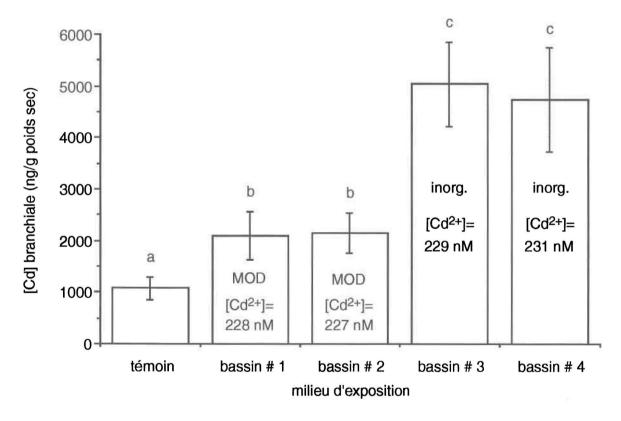


Figure 3.10: Accumulation branchiale du cadmium chez le saumon Atlantique juvénile (âge 0+) après 24 heures d'exposition (moyenne ± écart type; n= 10).

abc: Les lettres minuscules indiquent des différences significatives (test de Mann-Whitney, p < 0,025).

On voit que la bioaccumulation branchiale est nettement moins importante (\approx 4 fois) en présence d'acide fulvique (bassins # 1 et # 2) qu'en son absence (bassins # 3 et # 4) même si la concentration de l'ion libre Cd^{2+} est la même dans les quatre bassins (\approx 230

nM, tableau 2.12, chapitre 2). En effet, les concentrations branchiales moyennes de Cd des saumons exposés dans les bassins # 1 et # 2 sont respectivement de 2100±459 et de 2150±394 ng de Cd/g de poids sec comparativement à 5040±810 et 4740±1002 ng/g pour les saumons des bassins # 3 et # 4 (annexe 8). Notons ici qu'il n'y a pas de différences significatives dans l'accumulation du Cd entre les individus exposés dans les bassins # 1 et # 2 et entre ceux des bassins # 3 et # 4. Les concentrations branchiales de Cd du groupe témoin sont les plus faibles: 1080±229 ng/g de poids sec (annexe 8).

Le cadmium a aussi été mesuré dans la partie restante du corps de quelques individus de ce bioessai. Trois poissons par milieu ont été analysés: témoin, bassin # 1 et bassin # 3. Les résultats ne sont pas présentés ici puisqu'ils ne sont pas significatifs dans le sens où les valeurs sont inférieures à la limite de détection de la méthode employée. Toutefois, on peut en retirer une information importante: après 24 heures d'exposition, la majeure partie du Cd s'est accumulée dans les branchies et très peu de cadmium est passé dans le sang pour aller vers d'autres tissus. De même pour les poissons témoins, la majeure partie du Cd est associée aux branchies plutôt qu'au reste du corps. De plus, chez les poissons exposés en présence ou en absence d'acide fulvique, il ne semble pas y avoir eu accumulation de cadmium dans la partie restante du corps si on compare avec le témoin.

3.2.2.2 Cuivre, calcium et zinc

La figure 3.11 montre les concentrations branchiales de Cu des poissons exposés dans le bioessai F à la fin de la période de 24 heures.

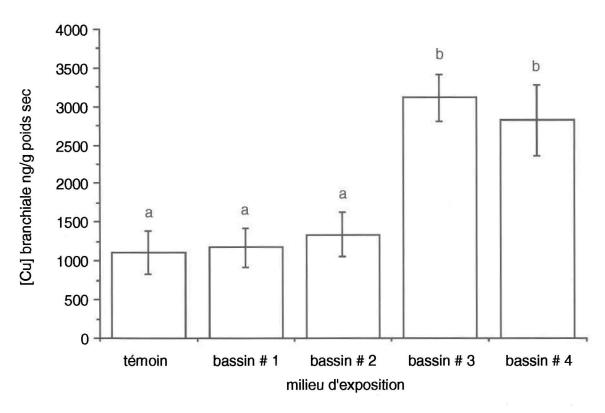


Figure 3.11: Concentrations branchiales de cuivre selon le milieu d'exposition (moyenne ± écart type; n= 8).

abc: Les lettres minuscules indiquent des différences significatives (test de Mann-Whitney, p < 0,025).

Les concentrations branchiales de cuivre des poissons exposés en absence d'acide fulvique (bassins # 3 et # 4) sont significativement supérieures à celles des poissons des autres milieux d'exposition y compris le témoin. On peut donc dire qu'il y a eu accumulation de cuivre chez ces individus. Les concentrations branchiales de cuivre des saumons exposés en présence d'acide fulvique (bassin # 1 et # 2) ne sont pas significativement différentes de celles du groupe de poissons témoin, ce qui démontre une absence d'accumulation. Les concentrations branchiales de ce métal sont les suivantes en ng de Cu/g de tissus lyophilisés (annexe 8): bassin # 4, 2810±455; bassin # 3, 3110±295; bassin # 2, 1340±294; bassin # 1, 1170±250 et témoin, 1110±274. Les concentrations totales de cuivre dissous sont présentées à l'annexe 3. Seule la valeur du

bassin # 1 (59 nM) semble être significativement supérieure aux valeurs des autres bassins qui se situent autour de 38 nM.

Deux explications peuvent être responsables de l'accumulation du cuivre chez les individus exposés en absence d'acide fulvique. L'exposition au cadmium en milieu inorganique a pu créer un stress chez le poisson entraînant une mobilisation du cuivre vers les branchies. Le cuivre serait nécessaire pour la synthèse accrue de protéines composant le mucus, de métallothionéines, etc. En présence d'acide fulvique, la protection apportée ferait en sorte que le stress causé par le Cd serait beaucoup moins important. Ce mécanisme physiologique est plutôt spéculatif. La deuxième explication est chimique: il y aurait eu contamination en cuivre dans les bassins d'exposition. La source de contamination pourrait être le plastique des bassins. La présence d'acide fulvique aurait empêché l'accumulation du Cu, comparativement au milieu inorganique, en complexant la majeure partie du cuivre originant du plastique. Pourtant, lorsque l'on compare les valeurs mesurées de cuivre total pour le bioessai F (tableau A3.1, annexe 3) à la valeur moyenne mesurée lors de la préparation de l'eau synthétique (tableau A2.1, annexe 2), on constate qu'elles ne sont pas beaucoup plus élevées (quelques nM de plus seulement).

Le tableau A8.5 de l'annexe 8 fait apparaître entre autres les concentrations branchiales de Ca et de Zn des poissons exposés dans le bioessai F à la fin de la période de 24 heures. On note aucune différence significative entre les différents traitements (test Mann-Whitney, p > 0,05). La concentration branchiale moyenne de Ca pour tous les milieux est de 31 \pm 1 mg/g de poids sec; celle de zinc est de 410 \pm 21 μ g/g de poids sec.

4.1 Toxicité aiguë en milieu inorganique

4.1.1 Mesure par la CL50

La CL50 est une méthode courante pour quantifier la toxicité aiguë lors de bioessais utilisant des organismes aquatiques. Elle se définit comme étant la **c**oncentration <u>l</u>étale pour <u>50</u>% de la population durant une période de temps donnée. D'après Sprague (1973), cette mesure représente un point de référence approprié exprimant la toxicité létale aiguë d'une substance toxique donnée envers le poisson moyen ou typique.

À notre connaissance, il n'existe pas de valeurs de CL50 pour le cadmium déterminées avec le saumon Atlantique (Salmo salar) dans la littérature. Toutefois, plusieurs autres espèces de salmonidés ont été utilisées comme organisme-test. La truite arc-en-ciel (Oncorhynchus mykiss) a été la plus utilisée. De plus, de façon générale, les CL50 de la littérature sont exprimées en terme de Cd total plutôt qu'en terme d'ion libre Cd²⁺. Cependant, étant donné que les études sélectionnées ont été réalisées en absence de ligands organiques et inorganiques maieurs, on peut présumer que la concentration de l'ion libre Cd2+ représentait la quasi totalité du cadmium présent. En effet, dans les milieux inorganiques de la présente étude, la proportion Cd²⁺/Cd total atteint 97% d'après les calculs réalisés sur MINEQL+. Donc, on peut faire la supposition que la CL50 exprimée en terme de Cd total est approximativement égale à celle exprimée en terme de Cd²⁺. Il est à noter que cet argument s'applique surtout lorsque l'eau est renouvelée fréquemment dans les bioessais. En effet, le poisson excrète diverses substances (mucus, excréments...) qui peuvent complexer les métaux dans la solution d'exposition et diminuer la toxicité. C'est pourquoi le choix des études a été fait, autant que possible, de manière à satisfaire les critères d'exposition établis par Sprague (1973). Voir la section 2.1 du chapitre 2 pour plus de détails à ce sujet. La plupart des études sélectionnées satisfont très bien les recommandations de l'auteur.

Le tableau 4.1 montre, en plus des valeurs de la présente étude, une revue des valeurs de CL50 96 heures trouvées dans la littérature pour diverses espèces de salmonidés juvéniles (âge 0+ à 1+). Les principaux paramètres physico-chimiques d'intérêt toxicologique accompagnent les valeurs.

Tableau 4.1: Valeurs de CL50 96 heures exprimées en terme de Cd total chez différentes espèces de salmonidés juvénilesa.

espèce	dureté ^b	рН	T	CL50 ^c	référence
			(°C)	(nM)	
saumon Atlantique	10-13	5,50	10	3 d	cette étude ^e
(Salmo salar)	***************************************			15(11-19) ^d	
truite arc-en-ciel	9,2	4,5	15-16	249	Cusimano et al.
(Oncorhynchus mykiss)				(329-196)	(1986)
		5,7		6(5-7)	
		7,0		< 4	
	23±1	7,1±0,1	12±2	9(7-10)	Chapman (1978)
	31	6,8	12,5	16	Davies (1976)
	39-48	7,0-7,9	12	20(14-29)	Spehar et Carlson
					(1984)
	50	6,8-7,0	12	27(24-30)	Davies et al. (1993)
	82	N.D. ^f	N.D.	53	Kumada et al. (1980)
truite brune	39-48	7,0-7,9	12	12(10-16)	Spehar et Carlson
(Salmo trutta)					(1984)
saumon Chinook	20-21	7,1-7,2	11-13	10(4-16)	Finlayson et Verrue
(Onco. tshawytscha)					(1982)
	23±1	7,1±0,1	12±2	31(25-50)	Chapman (1978)
saumon Coho	42	7,3	16	35(25-44) ^e	Buckley et al. (1985)
(Onco. kisutch)					
	90±3	7,3	10±1	93	Lorz et al. (1978)

a: références tirées en partie de Sprague (1987)

b: en mg/L en CaCO₃

c: estimée après une période de 96 heures et, à moins d'avis contraire, exprimée en terme de Cd total en milieu inorganique; les intervalles de confiance 95%, lorsque mentionnés dans la référence, sont indiqués entre parenthèses

d: valeurs exprimées en terme de Cd²⁺, bioessais A & B respectivement e: CL50 exprimée en terme de Cd échangeable ou labile (résine Chelex)

f: non disponible

On voit que pour environ la moitié des études (Davies, 1976; Chapman, 1978; Finlayson et Verrue, 1982; Spehar et Carlson, 1984; Cusimano et al., 1986), les CL50 se situent dans le même ordre de grandeur que les valeurs trouvées pour le saumon Atlantique (cette étude). Il faut toutefois demeurer prudent lors de comparaisons de ce genre puisqu'il existe des dissimilitudes entre les études au chapitre des conditions physicochimiques utilisées et des espèces employées. On sait que ces facteurs, abiotiques et biotiques, sont très importants à considérer d'un point de vue toxicologique. La prochaine section (4.1.2) abordera cette question. L'étude de Cusimano et al. (1986) impliquait les caractéristiques physico-chimiques les plus proches de celles employées dans la présente étude.

4.1.2 Facteurs affectant la réponse biologique

Plusieurs facteurs, qu'ils soient de nature abiotiques ou biotiques, peuvent agir sur la prise en charge des métaux chez les poissons et les autres organismes aquatiques et avoir un effet sur la réponse biologique résultante. De plus, d'autres facteurs peuvent aussi avoir un effet direct sur l'organisme, le rendant plus ou moins sensible aux métaux. Les variations de réponse biologique sont souvent mesurées par le biais des CL50. Elles peuvent aussi être détectées par la mesure de plusieurs paramètres sous-létaux, notamment, par la bioaccumulation.

4.1.2.1 Facteurs abiotiques

Il a souvent été démontré que la dureté de l'eau d'exposition, principalement par l'intermédiaire du calcium, diminue la prise en charge et/ou la toxicité des métaux chez les organismes aquatiques (Miller et Mackay, 1980; Pärt et al., 1985; Winner, 1986; Winner et Gauss, 1986; Wicklund et Runn, 1988; Centeno et al., 1993; Gundersen et al., 1994). Le magnésium aurait un rôle beaucoup moins important à jouer à ce niveau. Sprague (1987) a examiné cet aspect dans son chapitre de revue des effets du cadmium chez les poissons d'eau douce. L'auteur a observé une corrélation positive significative entre la CL50 et la dureté totale de l'eau d'exposition pour des bioessais réalisés avec des salmonidés. Si on regarde le tableau 4.1 dont plusieurs références sont tirées de Sprague (1987), on remarque de manière générale que, plus les valeurs de dureté sont importantes, plus les valeurs de CL50 sont élevées. L'action protectrice de Ca²⁺ et Mg²⁺ proviendrait soit d'un mécanisme de compétition entre ceux-ci et le métal toxique pour les sites de liaison sur les branchies (Pagenkopf, 1983; Davies et al., 1993) ou bien d'une diminution de perméabilité membranaire (Pärt et al., 1985; Wicklund et Runn, 1988). La compétition entre métaux peut aussi exister lors de mélanges de métaux. Par exemple,

Finlayson et Verrue (1982) ont étudié l'effet d'un mélange de trois métaux (Cd, Cu et Zn) sur la toxicité létale chez le saumon Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*). Pour causer 50% de mortalité chez le saumon en présence des trois métaux, il fallait 1,6 fois la CL50 du cadmium seul, 2,6 fois la CL50 du zinc et 0,56 fois celle du cuivre. Ainsi, plutôt que de voir une toxicité additive, ces résultats démontrent qu'il y avait antagonisme entre les métaux, du moins pour le Cd et le Zn.

Le pH exerce un effet sur la toxicité des métaux envers les organismes aquatiques. En effet, dans le cas des poissons, la baisse de pH provoque une diminution de la prise en charge de plusieurs métaux par un mécanisme de compétition entre l'ion hydrogène et le métal pour les sites de liaison sur les branchies (Campbell et Stokes, 1985; Hunt, 1987). Un exemple est donné par Cusimano et al. (1986) qui ont étudié l'effet du pH sur la toxicité du cadmium, du cuivre et du zinc envers la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Ils ont observé pour les trois métaux que plus le pH est bas, plus les valeurs de CL50 96 heures exprimées en terme de métal total sont élevées. Les auteurs évoquent le mécanisme d'interférence de l'ion hydrogène avec le métal au niveau des branchies comme principal responsable de la baisse de toxicité à bas pH. Dans la présente étude, les saumons ont été acclimatés à un pH d'environ 6,5 et les différents bioessais ont été réalisés à un pH de 5,5. Cette baisse de pH a pu causer un stress additionnel chez le poisson augmentant ainsi sa sensibilité au Cd. Signalons que de telles baisses se produisent naturellement, notamment pendant la fonte printanière (voir chapitre 1).

Un troisième facteur abiotique pouvant modifier la réponse biologique de l'organisme-test est la préacclimatation aux métaux toxiques. Quelques recherches ont clairement démontré que la préexposition des poissons à certains métaux augmente leur survie lors de tests ultérieurs (Dixon et Sprague, 1981; Duncan et Klaverkamp, 1983; Park et al., 1994). Dans l'étude de Duncan et Klaverkamp (1983), où on a testé la réponse du meunier noir (*Catostomus commersoni*) au cadmium, les CL50 96 heures exprimées en terme de Cd total des poissons préexposés au cadmium ou au mercure étaient significativement supérieures (jusqu'à 2,5 fois) à celle du groupe de poissons témoins. Les auteurs attribuent cette résistance à trois mécanismes possibles: (i) diminution de la prise en charge ou une augmentation de l'excrétion du métal; (ii) redistribution du métal vers des tissus moins sensibles; (iii) biosynthèse de molécules de faible poids moléculaire aptes à capter et stocker les métaux toxiques, les métallothionéines (MT). À cet effet, Roch et al. (1986) ont établi une relation linéaire entre le niveau de MT dans la truite arc-

en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et la sévérité de l'exposition sous-létale au zinc, au cuivre et au cadmium.

La température peut aussi avoir un effet sur la réponse biologique. Centeno et al. (1993) ont examiné l'effet de ce paramètre sur la réponse toxique du cuivre et du chrome envers la larve de la crevette *Streptocephalus proboscideus*. Par le biais des CL50 24 heures, ils ont observé, de façon générale, une aggravation de la réponse toxique en fonction de la température. Les métaux deviennent généralement plus toxiques à mesure que la température augmente, étant donné l'augmentation concomitante de l'activité chimique et du métabolisme des organismes aquatiques (Luoma, 1983; Davies, 1986).

Finalement, il est généralement accepté que la présence de ligands, qu'ils soient organiques ou inorganiques, diminuent la disponibilité des métaux (prise en charge, toxicité) chez les organismes aquatiques. Cependant, ces ligands doivent avoir un effet sur la spéciation des métaux. La section 1.4.2 du chapitre 1 et la section 4.3 de ce chapitre traitent de ces aspects.

4.1.2.2 Facteurs biotiques

Les différents groupes taxonomiques d'organismes ne montrent pas tous la même réponse aux métaux toxiques, i.e. leur sensibilité est très variable. Chez les poissons, Sprague (1987) a trouvé que les salmonidés étaient très sensibles au cadmium comparativement à d'autres espèces de poissons d'eau douce qui sont beaucoup plus résistants à ce métal. Pour les salmonidés, les CL50 présentées au tableau 4.1 sont de l'ordre du nM alors que celles d'autres espèces de poissons d'eau douce sont de l'ordre du μM (Sprague, 1987). Par exemple, Duncan et Klaverkamp (1983) ont évalué une CL50 96 heures exprimée en terme de Cd total de 9,9 μM chez le meunier noir (*Catostomus commersoni*). Benson et Birge (1985) ont, quant à eux, obtenu une valeur de CL50 96 heures de 14 μM de Cd total chez le méné tête-de-boule (*Pimephales promelas*).

Un autre facteur pouvant mener à des différences dans la tolérance des métaux chez les poissons est le stade de vie. Chapman (1978) a étudié la question en utilisant les CL50. Il a vérifié la résistance au cadmium, au cuivre et au zinc de quatre stades de vie du saumon Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) et de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Les quatre stades de vie sont les suivants: alevin nouvellement éclos, alevin, tacon et saumoneau. Les résultats de l'auteur démontrent que l'alevin nouvellement éclos

des deux espèces est le stade le plus résistant au cadmium, et au zinc dans une moindre mesure. De plus, pour les deux espèces et pour les trois métaux, il y a accentuation de la résistance avec les stades de vie subséquents, c'est-à-dire d'alevin à tacon et de tacon à saumoneau.

D'autres facteurs biotiques peuvent modifier la réponse biologique des poissons face aux métaux. Le stress, la condition physique et la présence de maladies sont parmi ces facteurs. Cependant, très peu d'études les ont évalués jusqu'à présent.

4.1.3 Mécanisme d'action létal du cadmium

Avant d'engendrer un effet toxique, le métal doit tout d'abord entrer en contact avec une membrane biologique. L'effet toxique peut être produit à l'extérieur de la barrière membranaire ou, dans la plupart des cas, à l'intérieur de celle-ci. Il existe plusieurs types de mécanismes d'entrée des métaux vers l'intérieur des cellules, i.e. internalisation du métal. Le métal peut être internalisé: par la perméation de complexes métalliques neutres et lipophiles; par l'intermédiaire d'un transporteur protéique ou de canaux protéiques; ou bien par endocytose (Simkiss et Taylor, 1989).

Lorsque l'on considère l'eau comme vecteur d'exposition chez les poissons, les branchies constituent le site majeur d'entrée des métaux (Pärt et Svanberg, 1981; Pärt et Lock, 1983; Reid et McDonald, 1991). En effet, la peau du poisson est très peu perméable à l'eau et aux substances dissoutes, ce qui rend l'entrée des métaux par cette voie négligeable (Pärt et Lock, 1983). Les branchies possèdent une très grande surface d'échange avec l'eau. D'après Reid (1989), chez une truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) adulte de 250 g, les branchies représentent 60% de la surface externe totale du poisson et elles sont exposées à 48 litres d'eau par heure. Cette vaste superficie est une adaptation nécessaire afin de réaliser les tâches physiologiques d'échanges gazeux et de régulation osmotique (Karlsson-Norrgren et al., 1985). Il est à noter que l'alimentation du poisson peut aussi constituer une voie importante d'entrée pour les métaux (Dallinger et al., 1987), surtout dans le cas d'expositions chroniques.

Le mécanisme par lequel le Cd entre dans les cellules branchiales commence à être élucidé. En premier lieu, le métal doit traverser la couche de mucus présente à la surface des branchies. Il y a une précision importante à apporter ici concernant le modèle de l'ion libre (MIL) et ses suppositions. Le premier scénario est que le mucus affecte les interactions entre le métal et la surface des cellules branchiales. D'après Pärt et Lock

(1983) et Rombough et Garside (1984), cette substance faciliterait la prise en charge des cations par sa capacité de liaison, augmentant ainsi leurs concentrations totales dans le micro-environnement immédiat des cellules réalisant le transport apical. Si c'était le cas, l'équilibre ne serait pas atteint entre la branchie et la solution: le MIL ne s'appliquerait pas. Le deuxième scénario est qu'il n'y aurait pas d'effets du mucus, i.e. concentration de métaux ou protection. Ainsi, dans ce cas, il existerait un pseudo-équilibre entre la solution d'exposition et la surface des branchies; la concentration de l'ion libre Cd²+ près des sites de transport serait la même que celle en solution et le MIL s'appliquerait. De plus, même si la diffusion du Cd dans la couche du mucus est un processus relativement lent (Pärt et Lock, 1983), la vitesse demeurerait quand même plus rapide que le transfert à travers la membrane. Le deuxième scénario est plus plausible et, pour la présente étude, on présume que c'est ce dernier qui entre en jeu.

Une fois la couche de mucus traversée, l'ion libre Cd²⁺ emprunterait la même voie d'entrée que le Ca²⁺, c'est-à-dire par passage dans les canaux protéigues de la membrane apicale des cellules à chlorures de l'épithélium branchial (Verbost et al., 1987, 1988, 1989). Ces canaux sont normalement réservés au calcium mais étant donné la similarité atomique entre les deux métaux au niveau de la charge et du rayon ionique (Verbost et al., 1989; Reid et McDonald, 1991), il serait possible pour le cadmium de "tromper" le canal protéique. Une fois à l'intérieur de la cellule, le Cd inhiberait la pompe ionique Ca²⁺ ATPase située dans la membrane basolatérale et responsable du transfert du calcium dans le sang (Verbost et al., 1988, 1989; Schoenmakers et al., 1992). Une hausse dans la concentration de calcium dans le cytosol suivrait et commanderait la fermeture des canaux protéiques par un mécanisme cellulaire de rétroaction négative (feed-back) (Verbost et al., 1989). L'inhibition de la pompe ionique Ca²⁺ ATPase par le cadmium produit une baisse du flux de calcium vers le sang et entraîne l'hypocalcémie (Verbost et al., 1987, 1988, 1989). La diminution du calcium plasmatique par l'effet du cadmium a été observée dans d'autres études où on a exposé des poissons au Cd (Reader et Morris, 1988; Reid et McDonald, 1988).

Le cadmium peut aussi produire des lésions tissulaires importantes au niveau des branchies. Ces lésions peuvent être à l'origine d'une réduction des échanges gazeux. Pratap et Wendelaar Bonga (1993) ont observé une dégénération des cellules épithéliales et des cellules à chlorures et une augmentation des espaces intercellulaires. Ils ont aussi noté une stimulation du système immunitaire. La concentration totale de Cd utilisée dans l'expérience était de 89 nM.

On a vu que le cadmium affecte principalement l'ionorégulation et les échanges gazeux au niveau branchial. Il peut aussi aller affecter d'autres tissus en passant dans le sang. D'après Verbost et al. (1989), ce passage s'effectue probablement par diffusion facilitée à travers la membrane basolatérale.

Lors de l'exposition des poissons au Cd, les comportements de ceux-ci sont importants à considérer d'un point de vue toxicologique. Plusieurs auteurs ont remarqué une hyperexcitabilité du poisson, des mouvements de nage désordonnés, incontrôlés, accompagnés de violentes agitations du corps (Benoit et al., 1976; Larsson, 1977; Peterson et al., 1983). Ces contractions tétaniques du corps du poisson sont si violentes qu'elles peuvent y induire des fractures vertébrales (Larsson, 1977), des scolioses et des lordoses (Rombough et Garside, 1984). Roch et Maly (1979) expliquent que l'hypocalcémie peut sévèrement détériorer le système neuro-musculaire et causer la mort. Ils ajoutent que l'hypersensibilité et les contractions tétaniques sont des symptômes communs d'hypocalcémie chez les humains. Selon Spehar (1976), ce type de comportement serait attribuable à l'inhibition de l'acétylcholinestérase, causant la mort du poisson par la paralysie des muscles respiratoires et/ou par la dépression du centre de la respiration. D'après Peterson et al. (1983), les symptômes seraient plutôt induits par la perturbation de la fonction du calcium dans la stimulation du muscle strié. Dans la présente étude, les comportements des saumons lors de leur exposition sont présentés à l'annexe 9 et correspondent bien à ceux retrouvés dans la littérature. Aussi, des fractures et/ou scolioses ont été observées chez certains saumons.

L'effet du cadmium sur le calcium plasmatique, suivi de l'arrêt de la prise en charge du calcium dans le milieu externe, n'est pas instantané puisque la concentration branchiale intracellulaire de Cd²+ doit être suffisante pour inhiber la pompe ionique Ca²+ ATPase (Verbost et al., 1989). Ce délai se reflète dans la mortalité observée des bioessais A et B (figures 3.1 à 3.4, chapitre 3) où elle débute seulement après environ 36 heures d'exposition. Même lorsque les poissons sont exposés à de beaucoup plus hautes concentrations, (0,75 et 1,50 µM de Cd²+; bioessai préliminaire, données non-présentées), la mortalité des saumons débute après environ la même période de temps. On peut donc supposer qu'à partir d'une certaine concentration de Cd²+ externe, le processus d'internalisation du Cd devient limitant pour l'effet létal du Cd. Les transporteurs de la membrane apicale des cellules branchiales seraient saturés et donc ne pourraient pas transporter davantage de Cd. Pour des concentrations plus basses que cette valeur critique, le début de la mortalité dépendrait de la concentration en Cd, comme

il a été observé pour les concentrations les plus faibles dans les bioessais A et B (figures 3.1 à 3.4). Selon ce modèle conceptuel simple, à des [Cd]_{eau} supérieures à la valeur critique, tous les poissons commenceraient à mourir après la même période d'exposition (36 heures) et ils mourraient tous à la même vitesse (mortalité cumulative indépendante de la [Cd]_{eau}). Le fait que la mortalité cumulative ne soit pas complètement indépendante de la [Cd]_{eau} dans cette gamme d'exposition suggère que le modèle est trop simple. À des [Cd]_{eau} élevées, il se peut que d'autres mécanismes de prise en charge/toxicité contribuent à la mortalité.

4.2 Toxicité chronique du cadmium

Quoique les bioessais de la présente étude n'aient pas porté sur les effets chroniques causés par de longues expositions à faibles concentrations de cadmium, il serait opportun de mentionner brièvement les principales conclusions retrouvées dans la littérature à ce sujet et ce, pour quelques espèces de salmonidés. Plusieurs des effets observés lors d'expositions aiguës au Cd le sont aussi lors d'expositions chroniques. Cependant, plusieurs nouveaux effets résultent de ce type d'exposition sous-létal au métal.

Peterson et al. (1983) ont constaté des retards de croissance et des enflures crâniennes chez le saumon Atlantique juvénile (*Salmo salar*). Les saumons présentant ces symptômes étaient exposés à 16 nM de Cd total pour des périodes allant jusqu'à 67 jours. Benoit et al. (1976) ont aussi observé une diminution de croissance à une concentration de Cd deux fois plus élevée: 30 nM. Ils ont utilisé l'Omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) dans les bioessais. Les poissons de trois générations consécutives ont été exposés. Rombough et Garside (1984) ont remarqué un retard dans la calcification des éléments squelettiques chez des alevins du saumon Atlantique (*Salmo salar*) exposés pendant 92 jours. L'effet, chez ces derniers, était noté pour des concentrations de Cd égales ou supérieures à 7 nM et il serait directement relié à la baisse de prise en charge du calcium.

D'autres auteurs ont axé leurs recherches sur des aspects plutôt biochimiques. De l'anémie et des troubles dans le métabolisme du glucose ont été diagnostiqué chez des truites arc-en-ciel. (*Oncorhynchus mykiss*) exposées pendant des périodes de 18 et 30 semaines à des doses de Cd de 89 et 890 nM (Haux et Larsson, 1984).

Le cadmium peut aussi affecter la reproduction des poissons. Brown et al. (1994) ont exposé des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et des truites brunes (*Salmo trutta*) adultes pour des périodes allant jusqu'à 90 semaines. La production des oeufs chez les femelles des deux espèces de truites a été ralentie: à partir de 16 nM de Cd chez la truite arc-en-ciel et à partir de 83 nM pour la truite brune. De plus, les oeufs produits par la truite arc-en-ciel mère exposée à 30 nM de Cd n'ont pas survécu plus d'une semaine.

4.3 Bioaccumulation branchiale

4.3.1 Répartition du cadmium accumulé

Lorsqu'un poisson a été exposé au cadmium pour une certaine période de temps, le métal peut se répartir selon différents compartiments au niveau branchial. Une partie se lie au mucus, une autre portion pourrait s'adsorber à la surface des cellules et une dernière fraction du métal est internalisée. Aucune étude, à notre connaissance, a quantifié l'importance de ces différents compartiments lors de la prise en charge du Cd par le poisson. Cependant, Wilkinson et Campbell (1993) ont évalué la répartition branchiale de l'aluminium chez le saumon Atlantique juvénile (Salmo salar) après des périodes d'exposition allant jusqu'à 72 heures. La fraction d'Al fortement associée aux branchies, i.e. internalisée, ne comptait jamais pour plus de 10% de l'Al total branchial. Dans la présente étude, les branchies ont été traitées de façon à ne mesurer que la fraction de métal internalisée (voir section 2.7.1, chapitre 2). L'importance du mucus comme compartiment lors de la prise en charge du Cd demeure donc inconnue. Intuitivement, on pourrait penser que le mucus renferme aussi un pourcentage important du Cd accumulé. Toutefois, l'affinité de l'Al pour le mucus est certainement beaucoup plus grande que celle du Cd (KAI3+ >> KCd2+) étant donné son rapport {charge/rayon} supérieur. Donc, ce compartiment pourrait contenir un pourcentage inférieur à celui de l'Al dans la distribution du métal accumulé.

4.3.2 Accumulation en milieu inorganique et en présence d'EDTA: Bioessais A, C ,D et E

4.3.2.1 Accumulation branchiale du Cd en fonction de concentrations croissantes du métal: Bioessai A

L'analyse de certains survivants du bioessai A avait pour but de déterminer l'accumulation branchiale du Cd en fonction de concentrations croissantes en Cd²⁺ dans le milieu

inorganique externe. Les données suggèrent l'atteinte d'un plateau (figure 3.5, chapitre 3). C'est donc dire qu'à partir d'une certaine concentration d'ion libre Cd²+ dans le milieu externe, la concentration de cadmium accumulée au niveau des branchies après 96 heures d'exposition atteindrait un maximum. Pour des concentrations d'ion libre supérieures à cette valeur critique, les concentrations accumulées seraient similaires. Il faut rappeler, cependant, qu'il n'y a que deux points pour des [Cd²+] supérieures à 20 nM menant ainsi à un faible poids statistique.

Il y a une précision importante à apporter ici. Deux types de "plateaux" sont possibles et il faut bien les distinguer afin de bien comprendre les mécanismes d'accumulation du métal. Le plateau dont on parle ici se définit comme étant le maximum atteint dans l'accumulation branchiale du Cd en fonction de la <u>concentration en Cd</u>²⁺ du milieu externe. Le second type de plateau concerne aussi le plafond atteint dans l'accumulation du Cd mais en fonction du <u>temps</u>; il en sera question à la section 4.3.2.4 qui traite de la cinétique d'accumulation.

Qu'est-ce qui détermine l'atteinte du plateau en fonction de concentrations croissantes de Cd²⁺? Trois explications sont possibles. Premièrement, il pourrait y avoir saturation des sites transporteurs: les canaux protéigues. Pour des [Cd²⁺] externes supérieures à la [Cd²⁺] critique, les transporteurs ne pourraient pas "prendre" plus de Cd. Cela mènerait à une concentration de cadmium intracellulaire constante peu importe la [Cd²⁺] externe. Ce mécanisme a déjà été invoqué pour expliquer les données de mortalité (section 4.1.3). En second lieu, l'atteinte du plateau pourrait être produite par la fermeture des canaux protéiques par le mécanisme de rétroaction négative ou "feed-back". En effet, on a vu précédemment (section 4.1.3) que le cadmium dans les cellules branchiales avait pour effet d'inhiber la Ca2+ ATPase à la membrane basolatérale, enzyme responsable du transfert du calcium dans le sang. Une hausse de calcium intracellulaire suivrait et commanderait la fermeture des canaux protéigues de la membrane apicale empêchant ainsi l'entrée de calcium du milieu externe. Il serait aussi possible que les canaux ne laissent plus passer de cadmium menant ainsi à des concentrations de cadmium internalisées équivalentes et indépendantes de la [Cd2+] externe. Comme dernière alternative, l'atteinte du plateau pourrait être due à la saturation des sites intracellulaires.

À notre connaissance, seulement trois études ont examiné l'accumulation branchiale du Cd en fonction de concentrations croissantes en Cd²⁺, et les résultats diffèrent des nôtres. Pärt et Wikmark (1984) et Pärt et al. (1985) ont étudié cet aspect chez la truite arc-en-ciel

(*Oncorhynchus mykiss*) à l'aide de la perfusion céphalique. Pärt et Wikmark (1984) ont tracé la relation entre l'accumulation branchiale du Cd et la concentration de Cd²⁺ (gamme 10 à 10000 nM). On remarque une augmentation dans les concentrations branchiales jusqu'à une concentration externe en Cd²⁺ d'environ 2500 nM où on note un plafonnement. Sans avoir présenté une relation graphique, Pärt et al. (1985) mentionnent textuellement: "La rétention du Cd dans les branchies perfusées était proportionnelle à l'activité de Cd²⁺ dans toutes les eaux testées". La recherche ne mentionne pas l'atteinte d'un plateau.

Playle et al. (1993b) ont, quant à eux, employé des ménés tête-de-boule (*Pimephales promelas*) comme organisme-test. Leurs résultats ont été reproduits à partir de leurs données brutes et sont présentés à la figure 4.1A. Elle décrit l'accumulation branchiale nette du Cd en fonction de la [Cd²⁺] calculée.

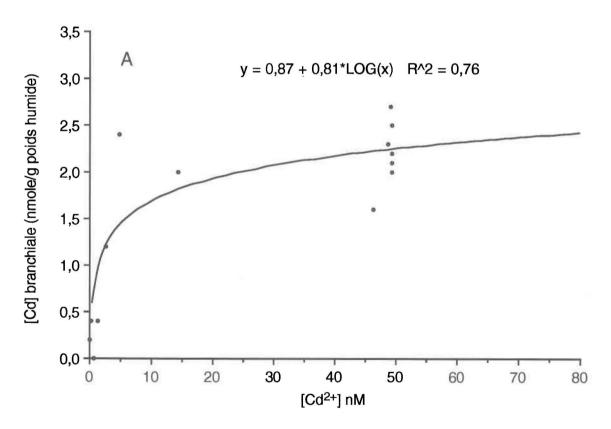


Figure 4.1: A) Accumulation branchiale du Cd chez le méné tête-de-boule (*Pimephales promelas*) en fonction de la concentration calculée de l'ion libre Cd²⁺ (données tirées de Playle et al., 1993b).

La figure 4.1B est une reproduction de la figure 3.5 du chapitre 3. Elle montre l'accumulation branchiale du Cd chez le saumon Atlantique juvénile en fonction de concentrations croissantes en Cd²⁺. L'axe des Y a toutefois été modifié de façon à présenter les résultats en nmole de Cd/g de poids humide afin de les comparer avec les résultats de la figure 4.1A.

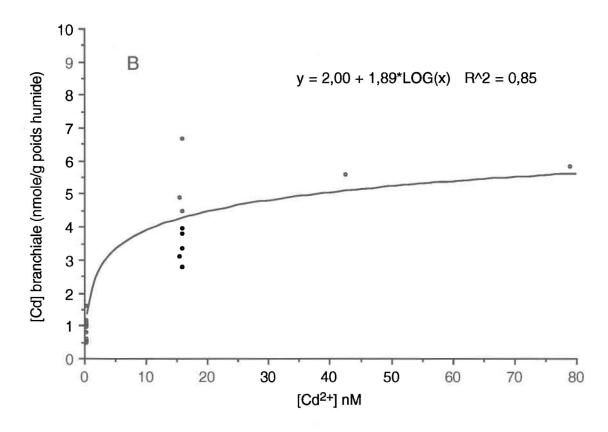


Figure 4.1: B) Accumulation branchiale du cadmium chez le saumon Atlantique juvénile (âge 0+) en fonction de la concentration de l'ion libre Cd²⁺ du milieu (survivants après 96 heures d'exposition, Bioessai A).

Les données de la figure 4.1A suggèrent l'atteinte d'un plateau semblable à celui de la figure 4.1B de la présente étude sauf que les concentrations branchiales de Cd atteintes sont inférieures. Plutôt que de parler d'un plateau, les auteurs Playle et al. (1993b), s'entendent pour dire qu'il existe une relation linéaire significative. Par ailleurs, l'étude montre aussi qu'il existe une relation en présence de cuivre. Les concentrations branchiales de cuivre augmentaient linéairement en fonction de la [Cu²+] calculée sans atteindre un plateau, du moins aux concentrations testées. Il faut cependant demeurer prudent dans l'interprétation de ces données puisque les concentrations de métal libre ont

été calculées par Playle et al. (1993b) avec les constantes non-corrigées du modèle MINEQL+.

Une autre étude, celle de Giles (1988), traite de l'accumulation du cadmium par la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) pendant de longues périodes d'exposition, i.e. jusqu'à 178 jours. Après 3 jours d'exposition, il n'existait pas de différence significative dans la bioaccumulation branchiale entre les poissons exposés à 32 nM et ceux exposés à 57 nM de Cd total. Plusieurs autres concentrations d'exposition auraient été nécessaires afin de déterminer si il y avait atteinte d'un plateau ici.

4.3.2.2 Accumulation en présence ou absence d'EDTA: Bioessai C

Le bioessai C avait pour but de valider quantitativement le modèle de l'ion libre (MIL). Toutefois, les résultats sont demeurés de nature qualitative puisqu'il s'est avéré impossible d'obtenir des concentrations d'ion libre Cd²⁺ égales dans les milieux avec EDTA et sans EDTA. La banque de données originale de MINEQL+ erronée en a été la cause (voir section 2.6.2, chapitre 2). Les rapports [EDTA]/[Cd] à utiliser ont été surestimés menant ainsi à une complexation supérieure du Cd: les concentrations d'ion libre Cd²⁺ étaient beaucoup plus faibles que prévu (voir tableau 2.3, chapitre 2).

Les résultats obtenus se conforment qualitativement au MIL (figure 3.6, chapitre 3). En absence d'EDTA (bassin # 4), la concentration de Cd²+ est la plus élevée et l'accumulation branchiale est la plus élevée; en présence d'EDTA (bassins # 1, # 2 et # 3), la concentration de l'ion libre Cd²+ est environ 100 fois plus faible et l'accumulation nette du métal est considérablement réduite en ces conditions (≈ 4,5 fois). Quelques auteurs ont aussi noté une diminution de la prise en charge des métaux au niveau branchial lors de l'ajout d'EDTA (Cd: Muramoto, 1980; Al: Muramoto, 1981; Cd: Pärt et Wikmark, 1984; Cd et Cu: Playle et al., 1993a).

Chez d'autres types d'organismes aquatiques, les résultats mettant en évidence une diminution de réponse biologique en présence de ligands synthétiques abondent dans la littérature (Campbell, 1995). Plusieurs de ces études ont réussi à démontrer clairement que la réponse biologique suivait rigoureusement les variations de l'ion métallique libre.

4.3.2.3 Accumulation en présence ou absence d'EDTA: Bioessai E

Les résultats de ce bioessai nous ont permis de tester quantitativement le MIL puisque les concentrations de Cd²⁺ des milieux d'exposition étaient <u>les mêmes</u> en présence ou absence d'EDTA (tableau 2.9, chapitre 2).

La figure 3.9 du chapitre 3 montre ces résultats sous forme d'histogramme. Il faut d'abord mentionner que la concentration branchiale de Cd moyenne du groupe de poissons témoin de ce bioessai est particulièrement élevée (≈ 1100 ng/g), c'est-à-dire environ 3 fois plus élevée que celle du bioessai C (≈ 350 ng/g). De plus, la variabilité des concentrations branchiales est importante dans chacun des bassins. Cette variabilité est représentée par de larges barres d'écart type sur le graphique.

Les comparaisons des valeurs de Cd branchiales pour des concentrations égales d'ion libre, c'est-à-dire les comparaisons des bassins pairs entre eux et des bassins impairs entre eux, montrent qu'il existe peu de différences. Signalons ici que la [Cd] totale était beaucoup plus grande en présence d'EDTA (≈ 8 μM) qu'en milieu inorganique (≈ 9 et 21 nM) (tableau 9, chapitre 2). On peut donc dire que Cd²⁺ en solution prédit, dans une certaine mesure, l'accumulation branchiale du Cd en présence d'EDTA. Autrement dit, les complexes anioniques Cd-EDTA ne traversent pas la barrière branchiale. Pärt et Wikmark (1984) en arrivent à une conclusion semblable: la rétention branchiale du Cd en présence de 8 μM d'EDTA correspond à celle prédite par l'activité de l'ion libre Cd²⁺. Ces derniers résultat mettent en lumière la très faible biodisponibilité des complexes Cd-EDTA envers les branchies. D'après Playle et al. (1993a), les complexes Cd-(14C-EDTA) ne traversent pas les cellules branchiales. D'autres auteurs cités par ces derniers révèlent que les ligands EDTA et NTA ne passent pas facilement à travers les membranes cellulaires étant donné leurs charges négatives et leurs tailles relativement élevées (Pärt et Wikmark, 1984; Nor et Cheng, 1986; Daly et al., 1990a). Il est aussi possible d'analyser les derniers résultats par la toxicité. Si tout le Cd des bassins # 1 et # 2 avait été disponible, la mortalité aurait été de 100% si on se fie aux résultats des bioessais A et B. Or, les mortalités sont demeurées partielles (voir annexe 10), ce qui démontre d'une autre façon la très faible biodisponibilité des complexes Cd-EDTA.

D'autre part, en milieu inorganique (bassins # 3 et # 4), il n'existe pas de différence significative dans l'accumulation branchiale du Cd même si la [Cd²⁺] était plus élevée dans le bassin # 3 comparativement à celle du bassin # 4 (23 nM vs 9 nM). De même, en

milieu organique, bassins # 1 et # 2, il n'existe pas de différence significative. L'explication proviendrait du fait qu'à 8,8 ou 9 nM de Cd²+ (bassins # 2 et # 4), le maximum dans l'accumulation serait déjà atteint (plateau). C'est pourquoi l'accumulation branchiale des poissons exposés à 21 ou 23 nM d'ion libre (bassins # 1 et # 3) ne serait pas supérieure à celle des poissons exposés à 9 nM d'ion libre. La section 4.3.2.1 a traité de l'atteinte du plateau en fonction de [Cd²+] et des raisons possiblement responsables de ce phénomène.

Les résultats du bioessai E sont donc conformes au MIL, sauf pour l'apparition d'un "plateau" de bioaccumulation à des [Cd²+]_{eau} supérieures à environ 20 nM. En effet, une des hypothèses qui sous-tendent le MIL n'est pas respectée. Pour que la réponse biologique suive les variations de concentration de l'ion métallique libre, il faut que les sites de liaison à la surface cellulaire soient présents <u>en excès</u> (Campbell, 1995). Vraisemblablement, cette condition n'est pas respectée ici où on parle de saturation des canaux calciques.

4.3.2.4 Cinétique d'accumulation branchiale du Cd: Bioessai D

La cinétique d'accumulation branchiale du cadmium a été évaluée pour une période de temps allant jusqu'à 96 heures en absence ou en présence d'EDTA (figures 3.7 et 3.8, chapitre 3). Rappelons ici que l'on mesurait le Cd internalisé dans les cellules branchiales. En effet, les branchies ont trempé dans une solution d'EDTA et on a épongé l'excédent de mucus (voir section 2.7.1, chapitre 2). L'accumulation rapide au début (0 à 12 heures), suivie de l'atteinte d'un plateau, pourrait s'expliquer par la saturation des sites intracellulaires. Ainsi, l'accumulation rapide initiale (0 à 12 heures) pourrait être le résultat du comblement des sites de liaison par le Cd à l'intérieur des cellules. L'internalisation du Cd se stabiliserait ensuite puisqu'un état stationnaire (plateau) serait atteint où l'entrée du Cd dans les cellules égalerait la sortie vers le sang. Ensuite, en présence d'EDTA et à faible concentration d'ion libre Cd²⁺ (≈ 1 nM), ce plateau demeure jusqu'à la fin de la période d'exposition. À cette faible concentration d'ion libre, les saumons seraient aptes à maintenir la concentration intracellulaire du Cd à un niveau sous-létal et toléreraient ainsi la présence du métal puisqu'aucune mortalité n'a été signalée. En milieu inorganique et à forte concentration d'ion libre (~ 16 nM), une seconde augmentation des concentrations branchiales survient et cela correspond au début de la mortalité. Le poisson ne peut plus "s'occuper" du Cd: les mécanismes de détoxification ne suffisent plus. Les concentrations intracellulaires atteignent alors des valeurs létales.

La littérature ne renferme que quelques cas où on a étudié la cinétique d'accumulation branchiale du Cd et ils sont contradictoires. D'après Giles (1988), les concentrations branchiales de cadmium chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) atteignent un plateau après 52 jours d'exposition aux concentrations de 32 et de 57 nM en Cd total. Playle et al. (1993a) rapportent que l'atteinte de ce plateau, dans les branchies du méné tête-de-boule (*Pimephales promelas*), se produit après 2 à 3 heures d'exposition seulement! La concentration totale de Cd employée lors du bioessai était de 53 nM.

Il existe aussi quelques études cinétiques pour des métaux autres que le Cd. Wilkinson (1993) a examiné cet aspect chez le saumon Atlantique (*Salmo salar*) en présence d'aluminium et pour une période de temps allant jusqu'à 64 heures. La prise en charge s'est avérée être un processus lent et linéaire sans atteinte d'un état stationnaire ou plateau. Anderson et Spear (1980) ont étudié le phénomène en exposant le Crapet soleil (*Lepomis gibbosus*) au cuivre pour une durée allant jusqu'à 32 heures. Il ont trouvé que l'accumulation branchiale de ce métal se déroulait selon deux phases: (i) une phase initiale rapide, tout comme il a été observé pour la présente étude; (ii) une phase d'accumulation subséquente plus lente. Il est à noter que les concentrations mesurées dans leur étude représentaient les concentrations totales branchiales. Ainsi, le cuivre associé au mucus a aussi été mesuré.

4.3.3 Accumulation du cadmium en présence d'acide fulvique: Bioessai F

Le but de ce bioessai était de valider le MIL en présence de matière organique dissoute naturelle. On a vu précédemment que le MIL prédit assez bien la biodisponibilité du Cd lorsque testé en présence de ligands synthétiques (sections 1.4.2 et 1.4.3, chapitre 1; sections 4.3.2.2 et 4.3.2.3, ce chapitre). Le cas de la MOD naturelle est cependant plus problématique étant donné les difficultés reliées à la mesure de la spéciation du Cd en sa présence et des autres effets possibles qu'elle peut causer (voir section 1.5.2.2, chapitre 1). D'après le MIL, la MOD naturelle se comporte comme des ligands synthétiques: elle se limite à la complexation du métal d'intérêt. La diminution de réponse biologique résultante suivrait la baisse de M^{z+}. Pour ce bioessai, les concentrations de Cd²⁺ utilisées étaient supérieures à celles des autres bioessais (tableau 2.12, chapitre 2). Il fallait agir ainsi afin d'être certain d'avoir une accumulation branchiale de Cd significative étant donné les concentrations branchiales élevées des poissons témoins (1100 ng/g).

La figure 3.10 du chapitre 3 montre que les concentrations branchiales de Cd en milieu inorganique (bassins # 3 et # 4: ≈ 4900 ng/g) sont beaucoup plus élevées que la valeur du plateau dont il a été question à la section 4.3.2.1 (≈ 1400 ng/g) même si la durée de l'expérience était moindre (24 plutôt que 96 heures). Ces résultats suggèrent qu'un second mécanisme d'accumulation a lieu lorsque les poissons sont exposés à de fortes concentrations de Cd. Donc, l'allure de la courbe d'accumulation branchiale en fonction de concentrations croissantes de Cd²+ pourrait donc être sigmoïdale. La figure 4.2 présente cette courbe hypothétique.

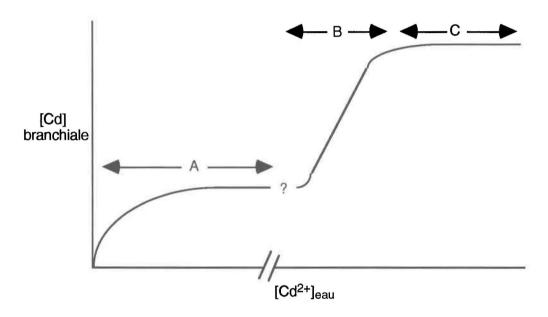


Figure 4.2: Courbe sigmoïdale hypothétique d'accumulation branchiale du Cd.

La partie A de la courbe montre le plateau atteint à de faibles concentrations de Cd^{2+} dans l'eau d'exposition gamme 0-80 nM (voir figure 3.5). La partie B représente l'effet du second mécanisme d'accumulation qui aurait lieu à de fortes concentrations de Cd^{2+} (\approx 230 nM) et qui mènerait à des concentrations branchiales plus élevées; le Cd continuerait à s'accumuler même si les canaux calciques étaient fermés ou saturés. Enfin, la partie C représente l'atteinte d'un second plateau puisqu'à une concentration encore plus élevée de Cd^{2+} (\approx 430 nM), l'accumulation branchiale n'est pas significativement supérieure à celle à \approx 230 nM (données non-présentées et préliminaires au bioessai F).

Revenons à la figure 3.10. Elle révèle également que l'accumulation branchiale du Cd en présence d'acide fulvique (bassins # 1 et # 2) était <u>clairement moins importante</u> qu'en

milieu inorganique (bassins # 3 et # 4) <u>même si la concentration de l'ion libre était équivalente</u> dans tous les bassins (tableau 2.12, chapitre 2). De plus, la reproductibilité des bassins des deux traitements est bonne, i.e. bassin # 1 vs # 2 et bassin # 3 vs # 4. D'après le MIL et la méthodologie employée, nous aurions dû obtenir la même réponse biologique dans tous les milieux, en l'occurrence, la bioaccumulation branchiale du Cd. Toutefois, ce n'est visiblement pas le cas: la prédiction du MIL n'est pas respectée. En d'autres termes, la bioaccumulation en présence d'acide fulvique est moins importante que celle prédite par la [Cd²⁺].

La littérature renferme plusieurs exemples de réduction de toxicité et/ou de bioaccumulation des métaux en présence de la MOD naturelle. Malheureusement, la spéciation des métaux y est rarement définie. Cet effet protecteur de la MOD naturelle a été observé chez les poissons pour plusieurs métaux: Cu chez le saumon Atlantique (Salmo salar) (Zitko et al., 1973); mélange Al, Zn, Cu chez le poisson flagellé (Jordanella floridae) (Hutchinson et Sprague, 1987); Al chez la truite arc-en-ciel (Oncorhynchus mykiss) (Witters et al., 1990; Gundersen et al., 1994); Fe chez la truite brune (Salmo trutta) (Peuranen et al., 1994).

Deux études ont examiné l'effet de la MOD naturelle sur la toxicité et/ou la prise en charge du Cd par le saumon Atlantique (*Salmo salar*). Gjessing (1981) a exposé les poissons à une concentration de Cd très élevée (≈ 9000 nM) par rapport à celles utilisées dans le bioessai F. Il a observé que la MOD naturelle diminuait la toxicité létale du saumon en augmentant son temps de survie. L'effet était dépendant de la concentration de MOD employée. Ces demières étaient de 0, 3,9, 6,5 et 39 mg de C/L. La seconde étude, réalisée par le même groupe de recherche (John et al., 1987), montre des résultats contradictoires. Les auteurs ont mesuré la prise en charge totale du Cd chez des poissons juvéniles d'âge 0+ après 5 jours d'exposition et selon trois pH: 5, 6 et 7. Ils ont utilisé le ¹⁰⁹Cd. La concentration de Cd employée était de 2,7 nM et celles de MOD étaient les suivantes (en mg C/L): 0, 2,7, 6,8, 13,6. Aux trois pH, l'accumulation du Cd chez le saumon était plus grande à une concentration de MOD naturelle de 2,7 mg C/L qu'en milieu inorganique. Pour des concentrations plus élevées de MOD (6,8 et 13,6 mg C/L), l'accumulation était réduite.

Les résultats des études précédentes demeurent cependant de nature qualitative puisque la spéciation des métaux n'y a pas été évaluée. Deux recherches ont tenu partiellement compte de cet aspect fort important. On y a étudié l'effet de la MOD naturelle sur la prise

en charge de l'Al chez des alevins de saumon Atlantique (*Salmo salar*). Peterson et al. (1989) ont montré que la mortalité et l'accumulation de l'Al étaient corrélées avec le résultat de la différence entre l'Al total et les anions organiques. Cette différence donne une estimation de l'Al inorganique. Les résultats de Lydersen et al. (1990) démontrent que l'Al complexé aux substances humiques ne semble pas contribuer à la toxicité chez le poisson car l'enlèvement de ces complexes n'a pas affecté le taux de mortalité. Dans les deux études, la mortalité a été quantifiée en terme de TL50 (TL50 signifiant <u>t</u>emps <u>l</u>étal pour <u>50</u>% de la population).

La littérature démontre clairement qu'il y a diminution de prise en charge des métaux chez les poissons en présence de MOD naturelle. Les deux dernières études citées ont l'avantage, par rapport aux autres, d'avoir examiné de plus près la spéciation du métal. La toxicité et la bioaccumulation de l'Al semblent être associées principalement à la fraction inorganique du métal, ce qui est en conformité avec le MIL. En d'autres termes, la diminution de la toxicité/prise en charge d'un métal, en présence de MOD naturelle, s'expliquerait par sa complexation avec la MOD, qui entraînerait la diminution de la proportion du métal présent sous forme inorganique.

Selon cette interprétation, si on exposait un organisme à une concentration donnée du métal inorganique, en présence ou en absence de MOD naturelle, on devrait observer la même réponse biologique. Or, pour quelle(s) raison(s), dans la présente étude, y a-t-il eu moins d'accumulation en présence d'acide fulvique malgré le fait que la concentration de l'ion libre Cd²⁺ soit la même? L'effet direct de la MOD sur l'organisme cible pourrait bien en être la cause. Cependant, avant de conclure trop rapidement, il faut examiner d'autres facteurs qui auraient pu occasionner cette accumulation inférieure.

On a vu à la section 4.1.2 de ce chapitre que plusieurs facteurs pouvaient affecter la réponse biologique de l'organisme. La dureté est un de ces facteurs. La présence d'acide fulvique (bassins # 1 et # 2) aurait pu être une source de calcium et/ou de magnésium et ainsi produire une baisse de prise en charge de Cd par les saumons. Toutefois, les concentrations totales mesurées de Ca (tableau 2.13, chapitre 2) et de Mg (tableau A5.1, annexe 5) ne sont pas différentes d'un milieu à l'autre. Puisque les concentrations totales de Ca et de Mg n'ont pas varié, il est fort probable que les concentrations des ions libres Ca²⁺ et Mg²⁺ en solution aient été légèrement plus faibles en milieu organique, étant donné la complexation avec l'acide fulvique. Toutefois, une telle diminution des concentrations libres de ces métaux serait allée dans le sens inverse:

accumulation supérieure en milieu organique. On doit donc éliminer cette explication dans la recherche de la réponse à notre question.

La compétition avec d'autres métaux, en supposant que l'acide fulvique ait été la source de ceux-ci, aurait pu être la cause d'une accumulation inférieure en milieu organique. Cependant, la mesure des concentrations totales de cuivre et de zinc dans l'eau d'exposition du bioessai (tableau A3.1, annexe 3) ne montre pas de différences notables ayant pu causer une compétition. De plus, des solutions concentrées d'acide fulvique ont été dosées par spectrophotométrie d'absorption atomique avec flamme pour la détermination du Cu, du Fe et du Zn. Selon les calculs de dilution pour en arriver à une solution d'acide fulvique de 10 mg/L, les concentrations de Zn et de Cu résultantes sont très négligeables ([Cu] < 0,9 nM, [Zn] < 0,5 nM) et faibles dans le cas du Fe (≈ 42 nM). Signalons aussi qu'en présence d'acide fulvique (bassins # 1 et # 2), les concentrations branchiales de cuivre, de calcium et de zinc ne sont pas significativement différentes de celles des poissons témoins (tableau A8.5, annexe 8). Il n'y a donc pas d'évidence de compétition entre le Cd et d'autres métaux dans les milieux contenant l'acide fulvique. Cet argument peut donc être rejeté.

L'explication la plus plausible demeure l'effet direct de la MOD sur l'organisme. L'atténuation de l'accumulation branchiale du métal ne serait pas seulement causée par la complexation, mais aussi par une interaction directe de la MOD avec la membrane biologique. Quelques auteurs ont déjà obtenu des résultats suggérant que la MOD naturelle agisse directement sur les organismes aquatiques (Prakash et Rashid, 1968; Hargeby et Petersen, 1988; Twiss et al., 1993; Wilkinson et al., 1993).

L'étude de Wilkinson et al. (1993) démontre clairement la possibilité d'adsorption de la MOD sur des cellules de branchies désagrégées. L'organisme employé était l'achigan à petite bouche (*Micropterus salmoides*) et le type de MOD était un acide fulvique extrait d'un sol: le même que celui utilisé pour cette étude (Bioessai F). La mobilité des cellules a été suivie grâce à la microélectrophorèse au laser, principe selon lequel le déplacement des cellules, dans un gradient électrique, est proportionnel à leur charge de surface. Cette charge est influencée par l'adsorption spécifique d'ions. À pH 4,5, l'addition de concentrations croissantes de MOD (0 à 20 mg/L) a causé un accroissement de la charge négative des cellules. À des pH plus élevés, l'effet est moins marqué, ce qui suggère que l'interaction MOD-cellule est de nature hydrophobe, ou encore qu'elle implique la formation de liaisons hydrogènes. En effet, à ces pH élevés, les groupements

carboxyliques de la surface de la cellule et des molécules complexes de MOD sont davantage ionisés qu'à pH 4,5 au détriment des interactions hydrophobes (Wilkinson et al., 1993). En présence de cadmium, l'acide fulvique aurait un effet semblable: l'adsorption de la MOD affecterait les interactions du métal à la surface branchiale, diminuant ainsi l'internalisation du métal.

Dans la littérature où on a tenu compte de la spéciation des métaux en solution, deux cas de protection accrue en présence de MOD naturelle ont été retrouvés (Campbell, 1995). On entend par protection accrue, une protection supérieure à celle prédite par la complexation du métal, c'est-à-dire une réponse biologique inférieure à celle anticipée en fonction de la concentration du métal libre M^{z+}. Le premier cas est l'étude de Daly et al. (1990b), qui a été mentionnée à la section 5.3.1 du chapitre 1. Pour des concentrations équivalentes de l'ion libre Cu²⁺, la toxicité du cuivre chez la crevette (*Paratya australiensis*) était inférieure en présence de MOD naturelle qu'en milieu inorganique.

Le second cas concerne la toxicité de l'Al chez l'algue verte (*Chlorella pyrenoidosa*) en présence d'un acide fulvique (Twiss et al., 1993). Dans le design expérimental, on a fait covarier les concentrations totales d'Al et d'acide fulvique tout en gardant la concentration d'Al inorganique constante. On a aussi exposé les algues à des témoins de MOD et d'Al inorganique. La toxicité de l'Al, mesurée par l'inhibition de croissance, a été réduite en présence d'acide fulvique, i. e. la croissance était supérieure. Toutefois, la réduction de toxicité a été supérieure à celle prédite par la concentration d'Al inorganique. De plus, la réduction était proportionnelle à la concentration d'acide fulvique. À une concentration de 11 mg/L, la croissance était comparable au témoin contenant la MOD seule, même si la concentration résiduelle en Al³⁺ était théoriquement suffisante pour inhiber la croissance de 30%. Les auteurs ont démontré qu'il y avait adsorption de la MOD à la surface des cellules, par des liens possiblement hydrophobes, et que ces molécules pouvaient fournir une source de phosphore pour l'algue.

La biodisponibilité des métaux traces en présence de MOD naturelle ne semble donc pas suivre rigoureusement les variations de la concentration de l'ion métallique libre MZ+. Les propriétés surfactives de la MOD peuvent modifier significativement les interactions organismes-métaux dans les eaux naturelles (Campbell, 1995). Les applications du MIL en présence d'acides humiques et/ou fulviques devraient considérer les effets biologiques possibles de la matière organique sur l'organisme d'intérêt.

5 CONCLUSION

Cette recherche visait principalement la validation du modèle de l'ion libre (MIL) avec le saumon Atlantique juvénile (*Salmo salar*) en présence de cadmium et de matière organique dissoute (MOD) synthétique (EDTA) ou naturelle (un acide fulvique). On cherchait à raffiner le MIL dans des conditions se rapprochant de celles prévalant dans le milieu naturel, i.e. les rivières à saumons de la Côte-Nord. Il y avait deux hypothèses à vérifier: (i) la réponse biologique, i.e. la toxicité et la bioaccumulation branchiale du métal, est proportionnelle à la concentration de l'ion libre Cd²⁺; (ii) les deux types de MOD diminuent la réponse biologique seulement par un mécanisme de complexation; ils n'ont pas d'effets directs à la membrane biologique. Pour atteindre l'objectif principal et vérifier les hypothèses, il fallait d'abord caractériser les interactions du Cd avec le saumon en milieu inorganique. Cette partie du travail impliquait: (i) la détermination des CL50 (Cd²⁺) en milieu inorganique; (ii) l'évaluation de la bioaccumulation branchiale en fonction de concentrations croissantes de Cd²⁺ et en fonction du temps (cinétique).

5.1 Toxicité aiguë du cadmium

La toxicité aiguë a été quantifiée par le biais des CL50. Les deux valeurs, calculées pour deux groupes de poissons de provenance différente (voir chapitre 2), sont de 3 et 15±4 nM de Cd²⁺. Environ la moitié des valeurs trouvées dans la littérature pour différents salmonidés se situaient dans le même ordre de grandeur que les valeurs de cette étude (tableau 4.1, chapitre 4). Les CL50 étant assez variables et relativement difficiles à obtenir, elles auraient pu poser des problèmes pour les tests concernant l'influence de la matière organique. Nous avons donc décidé de suivre la bioaccumulation du Cd.

Lorsque l'on considère l'eau comme vecteur d'exposition chez les poissons, les branchies constituent le site majeur d'entrée des métaux. Un pseudo-équilibre serait préalablement établi entre la solution d'exposition et la surface des branchies: la concentration de l'ion libre Cd²⁺ près des sites de transport serait la même que celle en solution et le MIL s'appliquerait.

Au-delà d'une certaine concentration de Cd dans l'eau d'exposition, la mortalité débutait après environ 36 heures d'exposition dans les bioessais. La saturation des canaux

calciques expliquerait cette observation. Toutefois, le cumul de la mortalité n'est pas complètement indépendant de la [Cd]_{eau} suggérant ainsi que d'autres mécanismes de prise en charge/toxicité contribuent à la mortalité.

5.2 Bioaccumulation branchiale

Dans la présente étude, il faut rappeler qu'on ne mesurait que la fraction de métal internalisée dans les cellules branchiales, c'est-à-dire la fraction non-extractible à l'EDTA. En plus d'être internalisé, le métal peut s'adsorber à la surface des cellules et une autre partie se lie au mucus.

5.2.1 Accumulation branchiale du Cd en fonction de concentrations croissantes du métal: Bioessai A

L'accumulation branchiale du Cd en fonction de concentrations croissantes en Cd²⁺ dans le milieu inorganique externe a été évaluée. À partir d'une certaine concentration d'ion libre Cd²⁺ dans le milieu externe, la concentration de cadmium accumulée dans les branchies après 96 heures d'exposition atteignait un maximum. Trois explications possibles ont été données: (i) saturation des sites transporteurs, les canaux protéiques; (ii) fermeture des canaux protéiques par feed-back; (iii) saturation des sites intracellulaires. Dans la littérature, les travaux de Playle et al. (1993b) réalisés avec le méné tête-de-boule (*Pimephales promelas*), montraient des résultats similaires.

Ayant décrit les résultats obtenus en milieu inorganique, considérons maintenant les résultats en présence de MOD synthétique ou naturelle.

5.2.2 Accumulation branchiale du Cd en présence /absence d'EDTA: Bioessais C, D et E

Les résultats du bioessai C se conforment qualitativement au MIL: en présence d'EDTA, la concentration de l'ion libre Cd²⁺ était plus faible qu'en milieu inorganique et l'accumulation branchiale du métal était réduite. Rappelons que pour ce bioessai, il a été impossible de tester quantitativement le MIL étant donné que plusieurs constantes de stabilité chimique étaient erronées dans la banque originale de MINEQL+.

Dans le bioessai E, un test quantitatif du MIL a été possible, car les concentrations d'ion libre Cd²⁺ étaient les mêmes en présence ou absence d'EDTA. Il en est ressorti que Cd²⁺ en solution a prédit, dans une certaine mesure, l'accumulation du Cd en présence

d'EDTA. Les complexes anioniques Cd-EDTA ne traverseraient pas la barrière branchiale et seraient ainsi très peu biodisponibles. Les résultats du bioessai E se sont révélés conformes avec le MIL sauf pour l'apparition d'un plateau de bioaccumulation à des concentrations d'ion libre Cd²⁺ supérieures à environ 20 nM. Pour que la réponse biologique suive les variations de concentration de l'ion métallique libre, il faut que les sites de liaison à la surface cellulaire soient présents <u>en excès</u> (Campbell, 1995). C'est une des conditions à l'applicabilité du MIL. Vraisemblablement, cette condition n'est pas respectée ici où on parle de saturation des canaux calciques.

Le bioessai D concernait la cinétique d'accumulation branchiale du Cd. Rappelons que l'expérience a été réalisée en milieu inorganique et en présence d'EDTA. Il y avait accumulation rapide au début, suivie de l'atteinte d'un état stationnaire où les sites intracellulaires seraient saturés. L'entrée de Cd dans les cellules égalerait alors la sortie vers le sang. Ensuite, en présence d'EDTA et à faible concentration d'ion libre Cd²+ (≈ 1 nM), ce plateau deumeurait jusqu'à la fin de la période d'exposition de 96 heures. En revanche, en milieu inorganique et à forte concentration de Cd²+ (≈ 16 nM), on notait une seconde augmentation des concentrations branchiales en Cd qui correspondait au début de la mortalité. Les saumons ne seraient alors plus en mesure de détoxifier le Cd.

5.2.3 Accumulation branchiale du Cd en présence d'acide fulvique: Bioessai F

Le MIL prédit relativement bien la biodisponibilité du Cd en présence d'EDTA. Toutefois, les tests avec la MOD naturelle sont beaucoup plus problématiques étant donné sa structure beaucoup plus complexe qui lui confère des propriétés physico-chimiques très différentes de celles d'un simple ligand synthétique comme l'EDTA. En plus de complexer les métaux, la MOD naturelle peut causer plusieurs autres effets (voir section 1.5.2.2, chapitre 1). De plus, en présence de ce polyélectrolyte, la détermination de la spéciation est difficile.

En présence de l'acide fulvique et à pH 5,50, l'accumulation du Cd au niveau des branchies des saumons était nettement moins importante qu'en milieu inorganique malgré le fait que la concentration de l'ion libre Cd²⁺ était la même dans tous les milieux. D'après le MIL, la réponse biologique suivie, ici la bioaccumulation branchiale du Cd, aurait dû être la même partout. La prédiction du modèle n'est donc pas respectée: la bioaccumulation en présence d'acide fulvique est beaucoup moins importante (≈ 4 fois) que celle prédite par [Cd²⁺]. L'explication la plus plausible de l'effet protecteur apparent

de l'acide fulvique est son effet direct sur l'organisme. L'accumulation branchiale inférieure du métal serait causée à la fois par la complexation et par une interaction directe avec la membrane biologique. Des expériences de microélectrophorèse de cellules de branchies isloées en présence d'acide fulvique et à différents pH suggèrent que l'interaction MOD-cellule est de nature hydrophobe, ou encore qu'elle implique la formations de liaisons hydrogènes (Wilkinson et al., 1993). L'ion libre Cd²⁺ ne semble donc pas pouvoir prédire adéquatement la biodisponibilité branchiale du Cd chez le saumon en présence d'acide fulvique à pH 5,50.

5.3 Recommandations et avenues de recherche

Afin de généraliser l'effet de la MOD naturelle sur la réponse biologique du métal envers l'organisme cible, plusieurs autres recherches sont nécessaires. Les variables (pH, type de MOD, métal), devraient être testées de manière indépendante. De plus, les tests devraient être effectués avec d'autres espèces de poissons voire même en présence d'algues, d'invertébrés... Ainsi, il serait possible d'évaluer si l'effet protecteur de la MOD naturelle se manifeste chez d'autres types d'organismes aquatiques.

La variable pH est la plus importante à tester à court terme et elle pourrait bien révéler des informations supplémentaires sur la nature des interactions métal-MOD-cellule. Les résultats de Wilkinson et al. (1993) suggèrent que l'adsorption de la MOD sur les cellules branchiales est maximale à pH 4,5 et négligeable à pH 7,0. Dans la présente étude, l'expérience avec la MOD naturelle a été réalisée à pH 5,50. Pour apporter une preuve supplémentaire que l'effet protecteur de la MOD est dû à l'interaction directe (adsorption) de le MOD à la surface des cellules, il serait nécessaire de répéter l'expérience à tout le moins aux pH 4,5 et 7,0. L'effet protecteur de la MOD devrait décroître avec l'augmentation de pH.

Les applications du MIL en présence de MOD naturelle se doivent de tenir compte des effets directs de la MOD naturelle sur l'organisme cible. Également, il est primordial de déterminer précisément la spéciation du métal dans la solution d'exposition. De plus, les caractéristiques physico-chimiques du milieu d'exposition se doivent d'être les plus représentatives possible du milieu aquatique naturel.

BIBLIOGRAPHIE

- Anderson, P.D. et P.A. Spear (1980). Copper pharmacokinetics in fish gills I. Kinetics in pumpkinseed sunfish, *Lepomis gibbosus*, of different body sizes. *Water Res.* 14: 1101-1105.
- APHA (1985). Standards Methods. Sixteenth edition, American Public Health Association, Washington, 1268 p.
- Baker, J.P. et C.L. Schofield (1982). Aluminium toxicity to fish in acidic waters. *Water Air Soil Pollut*. 18: 289-309.
- Bastille, C, S. St-Pierre et B. Dubreuil (1989). Digestion de matière biologique par four à micro-ondes, méthode DIG 050.1. Manuel des méthodes de laboratoire, INRS-Eau, Sainte-Foy.
- Behmel, P. (1986). Die Sorption von Huminsäiren durch Bakterienzellwände. Analyse der Bindungsverhältnisse und Schutz gegen enzymatische Auflösung. Dans: Festschrift zum 65. Geburtstag vo. Prof. Dr. W. Ziechmann.
- Benoit, D.A., E.N. Leonard, G.M. Christensen et J.T. Fiandt (1976). Toxic effects of cadmium on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Trans.Am.Fish.Soc.* 105: 550-560.
- Benson, W.H. et W.J. Birge (1985). Heavy metal tolerance and metallothionein induction in fathead minnows: Results from field and laboratory investigations. *Environ.Toxicol.Chem.* 4: 209-217.
- Bernhard, M. et S.G. George (1986). Importance of chemical species in uptake, loss, and toxicity of elements for marine organisms. Dans: *The Importance of Chemical "Speciation" in Environmental Processes*, édité par Bernhard, M., F.E. Brinckman et P.J. Sadler. Berlin: Springer-Verlag, p. 385-422.
- Birchall, J.D., C. Exley, J.S. Chappell et M.J. Phillips (1989). Acute toxicity of aluminium to fish eliminated in silicon-rich acid waters. *Nature* 338(6211): 146-148.
- Block, M. et P. Pärt (1986). Increased availability of cadmium to perfused rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Rich.) gills in the presence of the complexing agents diethyldithiocarbamate, ethyl xanthate and isopropyl xanthate. *Aquat.Toxicol.* 8: 295-302.
- Borg, H. (1986). Metal speciation in acidified mountain streams in central Sweden. *Water Air Soil Pollut*. 30: 1007-1014.
- Boulet, G. et G. Jacques (1993). Programme d'échantillonnage des précipitations du Québec: Sommaire des données de la qualité des eaux de précipitations 1991, ministère de l'Environnement du Québec, Direction des réseaux atmosphériques, rapport N° QEN/PA-50, 101 p.
- Brouard, D., M. Lachance, G. Shooner et R. van Coillie (1982). Sensibilité à l'acidification de quatre rivières à saumons de la Côte-nord du Saint-Laurent (Québec). Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 1109F: v-56 p.

- Brown, V., D. Shurben, W. Miller et M. Crane (1994). Cadmium toxicity to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum and brown trout *Salmo trutta* L. over extended exposure periods. *Ecotoxicol.Environ.Safety* 29: 38-46.
- Buckley, J.A., G.A. Yoshida, N.R. Wells et R.T. Aquino (1985). Toxicities of total and Chelex-labile cadmium to salmon in solutions of natural water and diluted sewage with potentially different cadmium complexing capacities. *Water Res.* 19: 1549-1554.
- Campbell, P.G.C (1995). Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. Dans: *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, édité par Tumer, D.R. et A. Tessier. Boca Raton, FL, Lewis, p. 45-104.
- Campbell, P.G.C., H.J. Hansen, B. Dubreuil et W.O. Nelson (1992). Geochemistry of Quebec North Shore salmon rivers during snowmelt: organic acid pulse and aluminum mobilization. *Can.J.Fish.Aguat.Sci.* 49: 1938-1952.
- Campbell, P.G.C. et P.M. Stokes (1985). Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 42: 2034-2049.
- Campbell, P.G.C. et A. Tessier (1987). Metal speciation in natural waters: influence of environmental acidification. Dans: *Sources and Fates of Aquatic Pollutants, Advances in Chemistry Series* N° 216, édité par Hites, R.A. et S.J. Eisenreich. American Chemical Society . Washington, DC, p. 185-207.
- Centeno, M.D.F., L. Brendonck et G. Persoone (1993). Acute toxicity tests with *Streptocephalus proboscideus* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca): Influence of selected environmental conditions. *Chemosphere* 27: 2213-2224.
- Chapman, G.A. (1978). Toxicities of cadmium, copper, and zinc to four juvenile stages of chinook salmon and steelhead. *Trans.Am.Fish.Soc.* 107: 841-847.
- Cusimano, R.F., D.F. Brakke et G.A. Chapman (1986). Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 43: 1497-1503.
- Dallinger, R., F. Prosi, H. Segner et H. Back (1987). Contaminated food and uptake of heavy metals by fish: a review and a proposal for further research. *Oecologia* 73: 91-98.
- Daly, H.R., I.C. Campbell et B.T. Hart (1990a). Copper toxicity to *Paratya australiensis*: I. Influence of nitrilotriacetic acid and glycine. *Environ.Toxicol.Chem.* 9: 997-1006.
- Daly, H.R., M.J. Jones, B.T. Hart, et I.C. Campbell (1990b). Copper toxicity to *Paratya australiensis*: III. Influence of dissolved organic matter. *Environ.Toxicol.Chem.* 9: 1013-1018.
- Davies, P.H. (1976). The need to establish heavy metals standards on the basis of dissolved metals. Dans: *Toxicity to Biota of Metal Forms in Natural Waters. Proceedings of workshop held in Duluth, Minnesota,* 7-8 Octobre, édité par Andrew, R.W., P.V. Hodson et D.E.Konasewich. International Joint Comission. Windsor, Ont., p. 245-256.
- Davies, P.H. (1986). Toxicity and chemistry of metals in urban runoff. Dans: *Urban Runoff Quality-Impact and Quality Enhancement Technology. Proceedings of Engineering Fondation Conference, Hennifker*, 23-27 Octobre, édité par Urbonas, B. et L.A. Roesner. Society of Civil Engineers. New York, p. 60-78.

- Davies, P.H., W.C. Gorman, C.A. Carlson et S.F. Brinkman (1993). Effect of hardness on bioavailability and toxicity of cadmium to rainbow trout. *Chemical Speciation and Bioavailability* 5: 67-77.
- Dillon, P.J., N.D. Yan et H.H. Harvey (1984). Acidic deposition: effects on aquatic ecosystems. *Crit.Rev.Environ.Control* 13: 167-194.
- Dixon, D.G. et J.B. Sprague (1981). Acclimation to copper by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) a modifying factor in toxicity. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 38: 880-888.
- Duncan, D.A. et J.F. Klavercamp (1983). Tolerance and resistance to cadmium in white suckers (*Catostomus commersoni*) previously exposed to cadmium, mercury, zinc, or selenium. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 40: 128-138.
- Dupont, J. (1992a). Québec lake survey: I. Statistical assessment of surface water quality. Water Air Soil Pollut. 61: 107-124.
- Dupont, J. (1992b). Québec lake survey: II. Origin and extent of acidification. Water Air Soil Pollut. 61: 125-137.
- Dupont, J. (1993). Réseau spatial de surveillance de l'acidité des lacs du Québec: Bilan de l'acidité des lacs du Québec méridional, Ministère de l'Environnement du Québec, Direction de la qualité des cours d'eau, rapport N° QEN/PA-47/1, 129 p.
- Finlayson, B.J. et K.M. Verrue (1982). Toxicities of copper, zinc and cadmium mixtures to juvenile Chinook salmon. *Trans.Am.Fish.Soc.* 111: 645-650.
- Fortin, C. et J. Gauthier (1995). Constantes de formation et différences d'enthalpie pour divers complexes métalliques: comparaison de différentes bases de données. Rapport interne N° RI-136, INRS-Eau, Ste-Foy, 29 p.
- Giesy, J.P., A. Newell et G.J. Leversee (1983). Copper speciation in soft, acid, humic waters: effects on copper bioaccumulation by and toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Daphnidae). *Sci.Total Environ.* 28: 23-36.
- Giles, M.A. (1988). Accumulation of cadmium by rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during extended exposure. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 45: 1045-1053.
- Gjessing, E.T. (1981). The effect of aquatic humus on the biological availability of cadmium. *Arch.Hydrobiol.* 91: 144-149.
- Gundersen, D.T., S. Bustaman, W.K. Seim et L.R. Curtis (1994). pH, hardness, and humic acid influence aluminium toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in weakly alkaline waters. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 51: 1345-1355.
- Haines, T.A. (1981). Introduction to the symposium. Dans: Acid Rain/Fisheries, Proceedings of an International Symposium on Acidic Precipitation and Fishery Impacts in Northeastern North America, 2-5 Août. Cornell University, Ithaca, New York, p. 3-4.
- Hamilton, M.A., R.C. Russo et R.V. Thurston (1977). Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ.Sci.Technol.* 11: 714-719.
- Hargerby, A. et R.C. Petersen (1988). Effects of low pH and humus on the survivorship, growth and feeding of *Gammarus pulex* (L.) (Amphipoda), *Freshwat.Biol.* 19: 235-247.

- Haux, C. et A. Larsson (1984). Long-term sublethal physiological effects on rainbow trout, Salmo gairdneri, during exposure to cadmium and after subsequent recovery. Aguat. Toxicol. 5: 129-142.
- Hickie, B.E., N.J. Hutchinson, D.G. Dixon et P.V. Hodson (1993). Toxicity of trace metal mixtures to alevin rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and larval fathead minnow (*Pimephales promelas*) in soft, acidic water. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 50: 1348-1355.
- Horth, H., F.H. Frimmel, L. Hargitai, E.-C. Hennes, A.Y. Huc, U. Müller-Wegener, J. Niemeyer, A. Nissenbaum, I. Sekoulov, E. Tipping, J.H. Weber et R.G. Zepp (1988). Environmental reactions and functions group report. Dans: *Humic Substances and their Role in the Environment*, édité par Frimmel, F.H. et R.F. Christman. New York: John Wiley & Sons, p. 245-256.
- Howarth, R.S. et J.B. Sprague (1978). Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. *Water Res.* 12: 455-462.
- Hunt, D.T.E (1987). *Trace Metal Speciation and Toxicity to Aquatic Organisms a review*. Water Research Centre, Marlow, Bucks, U.K., Environmental Report Tr 247, 51 p.
- Hutchinson, N.J. et J.B. Sprague (1987). Reduced lethality of Al, Zn and Cu mixtures to American flagfish by complexation with humic substances in acidified soft waters. *Environ.Toxicol.Chem.* 6: 755-765.
- Johannessen, M., A. Skartveit et R.F. Wright (1980). Streamwater chemistry before, during and after snowmelt. Dans: *Ecological Impact of Acid Precipitation, Proceedings of an International Symposium, Sandefjord, Norway,* édité par Drabløs, D. et A. Tollan. Oslo, Norvège:SNSF Project p. 224-225.
- John, J., E.T. Gjessing, M. Grande et B. Salbu (1987). Influence of aquatic humus and pH on the uptake and depuration of cadmium by the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Sci.Total Environ.* 62: 253-265.
- Jonas, R.B. (1989). Acute copper and cupric ion toxicity in an estuarine microbial community. *Appl.Environ.Microbiol.* 55: 43-49.
- Karlsson-Norrgren, L., P. Runn, C. Haux et L. Förlin (1985). Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan), and rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 27: 81-95.
- Kumada, H., S. Kimura et M. Yokote (1980). Accumulation and biological effects of cadmium in rainbow trout. *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.* 46: 97-103.
- Lacroix, G.L., J.D. Gordon et D.J. Johnston (1985). Effects of low pH on the survival, growth, and ionic composition of postemergent Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 42: 768-775.
- Langlois, C., Y. Vigneault, L. Désilets, A. Nadeau et M. Lachance (1983). Évaluation des effets de l'acidification sur la physico-chimie et la biologie des lacs du Bouclier canadien (Québec). *Rapp.Tech.Can.Sci.Halieut.Aquat.* 1233: xii-129 p.
- Larsson, A. (1977). Some experimentally induced biochemical effects of cadmium on fish from the Baltic sea. *3rd Soviet Swedish Symposium on the Pollution of the Baltic.* Stockholm, Rosenon, 15-21 Septembre. Ambio Spec.Rep. No 5, p. 67-68.
- Lorz, H.W., R.H. Williams et C.A. Fustich (1978). Effects of several metals on smolting of Coho salmon. U.S. Environmental Protection Agency, Ecological Research Series, EPA-600/3-78-090.

- Luoma, S.N. (1983). Bioavailability of trace metals to aquatic organisms a review. *Sci. Total Environ*. 28: 1-22.
- Lydersen, E., A.B.S. Poléo, I.P. Muniz, B. Salbu et H.E. Bjorntad (1990). The effects of naturally occurring high and low molecular weight inorganic and organic species on the yolk-sack larvae of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) exposed to acidic aluminium-rich lake water. *Aquat.Toxicol.* 18: 219-230.
- McKnight, D.M., P. Behmel, D.A. Francko, E.T. Gjessing, U. Münster, R.C. Petersen, O.M. Skulberg, C.E.W. Steinberg, E. Tipping, S.A. Visser, P.W. Werner et R.G. Wetzel (1990). Group report: How do organic acids interact with solutes, surfaces, and organisms?. Dans: *Organic Acids in Aquatic Ecosystems*, édité par Perdue, E.M. et E.T. Gjessing. New York: John Wiley & Sons, p. 223-243.
- Meador, J.P. (1991). The interaction of pH, dissolved organic carbon, and total copper in the determination of ionic copper and toxicity. *Aquat.Toxicol.* 19: 13-32.
- Miller, T.G. et W.C. Mackay (1980). The effects of hardness, alkalinity and pH of test water on the toxicity of copper to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Res.* 14: 129-133.
- Minns, C.K., J.E. Moore, D.W. Schindler et M.L. Jones (1990). Assessing the potential extent of damage to inland lakes in eastern Canada due to acidic deposition. III. Predicted impacts on species richness in seven groups of aquatic biota. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 47: 821-830.
- Morel, F.M.M. (1983). *Principles of Aquatic Chemistry*. Wiley-Interscience, New-York, NY, 301 p.
- Münster, U., P. Einio et J. Nurminen (1989). Evaluation of the measurements of extracellular enzyme activities in a polyhumic lake by means of studies with 4-methylumbelliferyl-substrates. *Arch. Hydrobiol.* 115: 321-337.
- Muramoto, S. (1980). Effects of complexants (EDTA, NTA and DPTA) on the exposure to high concentrations of cadmium, copper, zinc and lead. *Bull.Environ.Contamin.Toxicol.* 25: 941-946.
- Muramoto, S. (1981). Influence of complexants (NTA, EDTA) on the toxicity of aluminium chloride and sulfate to fish at high concentrations. *Bull.Environ.Contam.Toxicol.* 27: 221-225.
- Nelson, W.O. et P.G.C. Campbell (1991). The effects of acidification on the geochemistry of Al, Cd, Pb and Hg in freshwater environments: a literature review. *Environ.Pollut.* 71: 91-130.
- Nor, Y.M. et H.H. Cheng (1986). Chemical speciation and bioavailability of copper: uptake and accumulation by *Eichornia*. *Environ*. *Toxicol*. *Chem.* 5: 941-947.
- Pagenkopf, G.K. (1983). Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH and water hardness. *Environ.Sci.Technol.* 17: 342-347.
- Parent, L. et P.G.C. Campbell (1994). Aluminium bioavailability to the green alga *Chlorella pyrenoïdosa* in acidified synthetic soft water. *Environ.Toxicol.Chem.* 13: 587-598.
- Parent, L., P. Couture, P.G.C. Campbell et B. Dubreuil (1988). Sensibilité des alevins vésiculés du saumon Atlantique à l'acidité en présence et en absence d'aluminium inorganique. *Water Poll.Res.J.Canada* 23: 227-242.

- Park, E.H., H.-H. Chang, W.N. Joo, H.-S. Chung et H.-S. Kwak (1994). Assessment of the estuarine hermaphroditic fish *Rivulus marmotus* as a useful euryhaline species for acute toxicity tests as shown using cadmium. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 51: 280-285.
- Pärt, P. et R.A.C. Lock (1983). Diffusion of calcium, cadmium and mercury in a mucous solution from rainbow trout. *Comp.Biochem.Physiol.* 76C: 259-263.
- Pärt, P. et O. Svanberg (1981). Uptake of cadmium in perfused rainbow trout (*Salmo gairdneri*) gills. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 38: 917-924.
- Pärt, P., O. Svanberg et A. Kiessling (1985). The availability of cadmium to perfused rainbow trout gills in different water qualities. *Water Res.* 19: 427-434.
- Pärt, P. et G. Wikmark (1984). The influence of some complexing agents (EDTA and citrate) on the uptake of cadmium in perfused rainbow trout gills. *Aquat.Toxicol.* 5: 277-289.
- Petersen, R. (1982). Influence of copper and zinc on the growth of a freshwater alga *Scenedesmus quadricauda* the significance of chemical speciation. *Environ.Sci.Technol.* 16: 443-447.
- Petersen, R.C., A. Hargeby et A. Kullberg (1987). The biological importance of humic material in acidified waters. *National Swedish Environmental Protection Board*, report N° 3388, 147 p.
- Petersen, R.C. et U. Persson (1987). Comparison of the biological effects of humic materials under acidified conditions. *Sci.Total Environ*. 62: 387-398.
- Peterson, R.H., R.A. Bourbonnière, G.L. Lacroix, D.J. Martin-Robichaux, P. Takats et G. Brun (1989). Responses of Atlantic salmon (*Salmo salar*) alevins to dissolved organic carbon and dissolved aluminium at low pH. *Water Air Soil Pollut.* 46: 399-413.
- Peterson, R.H., J.L. Metcalfe et S. Ray (1983). Effects of cadmium on yolk utilisation, growth, and survival of Atlantic salmon alevins and newly feeding fry. *Arch.Environ.Contamin.Toxicol.* 12: 37-44.
- Peuranen, S., P.J. Vuorinen, M. Vuorinen et A. Hollender (1994). The effects of iron, humic acids and low pH on the gills and physiology of brown trout (*Salmo trutta*). *Ann.Zool.Fennici* 31:389-396.
- Playle, R.C., D.G. Dixon et K. Burnison (1993a). Copper and cadmium binding to fish gills: modification by dissolved organic carbon and by synthetic ligands. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 50: 2667-2677.
- Playle, R.C., D.G. Dixon et K. Burnison (1993b). Copper and cadmium binding to fish gills: estimates of metal-gill stability constants and modelling of metal accumulation. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 50: 2678-2687.
- Prakash, A. et M.A. Rashid (1968). Influence of humic substances on the growth of marine phytoplancton, Dinoflagellates. *Limnol.Oceanogr.* 13: 598-606.
- Pratap, H.B. et S.E. Wendelaar Bonga (1993). Effect of ambient and dietary cadmium on pavement cells, chloride cells, and Na⁺/K⁺-ATPase activity in the gills of the freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* at normal and high calcium levels in the ambient water. *Aquat.Toxicol.* 26: 133-150.
- Ravera, O. (1986). Effects of experimental acidification on freshwater environments. *Experientia* 42: 507-516.

- Reader, J.P. et R. Morris (1988). Effects of aluminium and pH on calcium fluxes, and effects of cadmium and manganese on calcium and sodium fluxes in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Comp.Biochem.Physiol.* 91C: 449-457.
- Reid, S.D. (1989). Metal-gill surface interactions in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Thèse de doctorat, McMaster University, Hamilton, (Ont.).
- Reid, S.D. et D.G. McDonald (1988). Effects of cadmium, copper, and low pH on ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 45: 244-253.
- Reid, S.D. et D.G. McDonald (1991). Metal binding activity of the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can.J.Fish.Aguat.Sci.* 48: 1061-1068.
- Reuss, J.O., B.J. Cosby et R.F. Wright (1987). Chemical processes governing soil and water acidification. *Nature* 329: 27-31.
- Roch, M. et E.J. Maly (1979). Relationship of cadmium-induced hypocalcemia with mortality in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and the influence of temperature on toxicity. *J.Fish.Res.Board Can.* 36: 1297-1303.
- Roch, M., P. Noonan et J.A. McCarter (1986). Determination of no-effect levels of heavy metals for rainbow trout using hepatic metallothionein. *Water Res.* 20: 771-774.
- Rombough, P.J. et E.T. Garside (1984). Disturbed ion balance in alevins of Atlantic salmon *Salmo salar* chronically exposed to sublethal concentrations of cadmium. *Can.J.Zool.* 62: 1443-1450.
- Schindler, D.W. (1988). Effects of acid rain on freshwater ecosystems. *Science* 239: 149-157.
- Schnitzer, M. et S.U. Khan (1978). Soil organic matter. Elsevier, Amsterdam, Pays-Bas, 319 p.
- Schecher, W.D. (1991). MINEQL+: A chemical equilibrium program for personal computers. Holowell (Me), Environmental Research Software, v.2.23.
- Schoenmakers, T.J.M., P.H.M. Klaren, G. Flik, R.A.C. Lock, P.K.T. Pang et S.E. Wendelaar Bonga (1992). Actions of cadmium on basolateral plasma membrane proteins involved in calcium uptake by fish intestine. *J.Membrane Biol.* 127: 161-172.
- Shilts, W.W. (1981). Sensitivity of bedrock to acid precipitation: modification by glacial processes. Canadian Geological Comission, paper 81-14, 7 p.
- Simkiss, K. et M.G. Taylor (1989). Metal fluxes across the membranes of aquatic organisms. *Reviews in Aquatic Sciences* 1: 173-188.
- Smith, K.E.H. (1988). Le monde sous-marin: Le saumon de l'Atlantique. Direction générale des communications, Ministère des Pêches et des Océans, Ottawa, 8 p.
- Spehar, R.L. (1976). Cadmium and zinc toxicity to flagfish *Jordanella floridae*. *J.Fish.Res.Board Can.* 33: 1939-1945.
- Spehar, R.L. et A.R. Carlson (1984). Derivation of site-specific water quality criteria for cadmium and the St-Louis river basin, Duluth, Minnesota. *Environ.Toxicol.Chem.* 3: 651-665.
- Sprague, J.B. (1973). The ABC's of pollutant bioassay using fish. *Biological Methods for the Assessment of Water Quality, ASTM STP, American Society for Testing and Materials* 528: 6-30.

- Sprague, J.B (1987). Effects of cadmium on freshwater fish. Dans: *Cadmium in the Aquatic Environment*, édité par Nriagu, J.O. et J.B. Sprague, p. 139-170.
- Steinnes, E. (1990). Lead, cadmium and other metals in Scandinavian surface waters, with emphasis on acidification and atmospheric deposition. *Environ.Toxicol.Chem.* 9: 825-831.
- Stokes, P.M. (1986). Ecological effects of acidification on primary producers in aquatic systems. *Water Air Soil Pollut*. 30: 421-438.
- Sunda, W.G., D.W. Engel et R.M. Thuotte (1978). Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass shrimp, *Palaemonetes pugio*: importance of free cadmium ion. *Environ.Sci.Technol.* 12: 409-413.
- Thurman, E.M. (1985). *Organic Geochemistry of Natural Waters*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, 497 p.
- Twiss, M.R., L. Parent et P.G.C. Campbell (1993). Interactions among algae, aluminium and fulvic acid: an exception to the free-ion model of metal toxicity. *Proc.Inter.Conf.Heavy Metals Env.*, Toronto, Comptes rendus, 2: 41-44.
- van Coillie, R., C. Thellen, P.G.C. Campbell et Y. Vigneault (1983). Effets toxiques de l'aluminium chez les salmonidés en relation avec des conditions physico-chimiques acides. *Rapp.Tech.Can.Sci.Halieut.Aquat.* 1237: ix-88 p.
- Verbost, P.M., G. Flik et R.A.C. Lock (1988). Cadmium inhibits plasma membrane calcium transport. *J.Membrane Biol.* 102: 97-104.
- Verbost, P.M., G. Flik, R.A.C. Lock et S.E. Wendelaar Bonga (1987). Cadmium inhibition of Ca²⁺ uptake in rainbow trout gills. *Am.J.Physiol.* 253: R216-R221.
- Verbost, P.M., J. van Rooij, G. Flik, R.A.C. Lock et S.E. Wendelaar Bonga (1989). The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *J.Exp.Biol.* 145: 185-197.
- Watt, W.D. (1986). The case for liming some Nova Scotia salmon rivers. *Water Air Soil Pollut*. 31: 775-789.
- Weber, J.H (1988). Binding and transport of metals by humic materials. Dans: *Humic Substances and their Role in the Environment*, édité par Frimmel, F.H. et R.F. Christman. New York: John Wiley & Sons, p. 165-178.
- Wicklund, A. et P. Runn (1988). Calcium effects on cadmium uptake, redistribution, and elimination in minnows, *Phoxinus phoxinus*, acclimated to different calcium concentrations. *Aguat.Toxicol.* 13: 109-122.
- Wilkinson, K.J. (1993). Bioaccumulation de l'aluminium inorganique (Al³⁺, Al(OH)_x(^{3-x)+}, Al(F)_y(^{3-y)+}) chez le saumon Atlantique en relation avec l'acidification du milieu aquatique. Thèse de doctorat, INRS-Eau, Sainte-Foy (Qc), 201 p.
- Wilkinson, K.J., P.M. Bertsch, C.H. Jagoe et P.G.C. Campbell (1993). Surface complexation of aluminium on isolated fish gill cells. *Environ.Sci.Technol.* 27: 1132-1138.
- Wilkinson, K.J. et P.G.C. Campbell (1993). Aluminium bioconcentration at the gill surface of juvenile Atlantic salmon in acidic media. *Environ.Toxicol.Chem.* 12: 2083-2095.

- Wilkinson, K.J., P.G.C. Campbell et P. Couture (1990). Effect of fluoride complexation on aluminium toxicity towards juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 47: 1446-1452.
- Winner, R.W. (1985). Bioaccumulation and toxicity of copper as affected by interactions between humic acid and water hardness. *Water Res.* 19: 449-455.
- Winner, R.W. (1986). Interactive effects of water hardness and humic acid on the chronic toxicity of cadmium to *Daphnia pulex*. *Aquat.Toxicol.* 8: 281-293.
- Winner, R.W. et J.D. Gauss (1986). Relationship between chronic toxicity and bioaccumulation of copper, cadmium and zinc as affected by water hardness and humic acid. *Aguat.Toxicol.* 8: 149-161.
- Witters, H.E., S. Van Puymbroeck, J.H.D. Vangenechten et O.L.J. Vanderborght (1990). The effect of humic substances on the toxicity of aluminium to adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J.Fish Biol.* 37: 43-53.
- Zitko, P., W.V. Carson et W.G. Carson (1973). Prediction of incipient lethal levels of copper to juvenile Atlantic salmon in the presence of humic acid by cupric electrode. *Bull.Environ.Contam.Toxicol.* 10: 265-271.

ANNEXES

A-1: Solution de sels concentrés

Tableau A1.1: Composition résultante de l'eau synthétique après l'ajout des sels concentrés^a.

Sel	concentration	concentration
	(mg/L)	(μ M)
NaHCO ₃	12,0	143
CaSO ₄ •2H ₂ O	7,5	44
MgSO ₄	7,5	62
KCI	0,5	7

a: concentrations approximatives car l'eau produite par osmose inverse contient déjà de ces ions (sa dureté varie entre 1 et 3 mg/L en CaCO₃)

A-2: A) Composition chimique détaillée de l'eau synthétique reconstituée

Tableau A2.1: Composition chimique détaillée de l'eau synthétique reconstituée.

ion	concentration	concentration
	nominale	mesurée
	(μ M)	(M)
Ca	44	voir chapitre 2
Mg	62	voir annexe 5
Na	143	idem
K	7	idem
Cd		< lim. détec.ª
Cu	-	3,3E-08 ^a
Pb	2	5,7E-09 ^a
Zn	*	3,1E-08 ^a
Fe	E.	< lim. détec.ª
Cl-	7	36E-06 ^b
C inorg.c	-	37E-06 ^d
NO ₃ -	112	123E-06 ^b
SO ₄ 2-	106	121E-06 ^b
PO ₄ 3-	_	< lim. détec.b

a: mesures par spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme (Varian Spectra AA-30 équipé d'un four au graphite, modèle GTA-96)

B) Données d'entrée pour MINEQL+ (Schecher, 1991)

Les données d'entrée utilisées pour les simulations à l'aide du logiciel MINEQL+ sont les suivantes. Pour tous les ions considérés, les valeurs des concentrations totales mesurées plutôt que les concentrations totales nominales ont été insérées dans le logiciel: Ca et Cd: (voir chapitre 2); Mg, Na et K: (voir annexe 5); Cu, Fe, Pb, Zn Cl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻ et PO₄³⁻: (voir annexe 2). Pour ce qui est de l'EDTA, les valeurs des concentrations totales nominales ont été incluses dans le modèle. De plus, pour chacun des milieux, le pH mesuré a été introduit dans le logiciel. Enfin, les simulations ont été

b: mesurées par chromatographie ionique (Dionex)

c: carbone inorganique total

d: concentration calculée par MINEQL+

Annexes 89

effectuées en système ouvert pour une température de 10°C et avec le correcteur de force ionique à la position *ON*. Rappelons que la banque de constantes utilisée est celle corrigée et compilée par Fortin et Gauthier (1995).

Il faut noter que pour les bassins # 1 et # 2 du bioessai E (chapitre 2, tableau 2.9), les écarts dans la concentration calculée de Cd²⁺ proviennent de la manipulation des données d'entrée du Cd et de l'EDTA. En effet, selon les erreurs volumétriques et de pesée qu'il avait été possible de produire, des simulations ont été effectuées où l'on a entré les valeurs extrêmes de Cd et d'EDTA. Avec les valeurs de Cd²⁺ obtenues, il a été possible de calculer les écarts présentés au tableau 2.9.

Les prochaines lignes montrent un exemple concret (bassin # 2). La valeur de Cd²⁺ calculée dans le tableau 2.9 est de 22,4±16,8 nM. Les bornes sont donc de 5,6 nM et 39,2 nM. La première borne est la valeur obtenue de la simulation sur le logiciel MINEQL+ lorsque les valeurs de concentrations minimale de Cd et maximale d'EDTA sont entrées dans le modèle. Pour la deuxième borne, c'est l'inverse: elle est obtenue lorsque les valeurs de concentrations maximale de Cd et minimale d'EDTA sont insérées dans le logiciel. Comment ces valeurs extrêmes sont-elles calculées? Par la propagation des erreurs volumétriques et de pesée. Pour la préparation de la solution d'EDTA, on a considéré la somme des erreurs suivantes: l'erreur sur la pesée du solide, l'erreur causée par le ballon volumétrique ainsi que les erreurs de pipettage de la solution. Cette somme donne une erreur totale de ±0,02 µM sur la concentration finale d'EDTA dans le bassin de La concentration nominale (visée) d'EDTA était de 8,09 µM. Les concentrations maximale et minimale sont donc respectivement de 8,11 et 8,07 µM. Pour la préparation de la solution de Cd, on a considéré les mêmes erreurs. L'erreur totale sur la concentration totale de Cd dans le bassin est de ±0,03 μM. La concentration nominale de Cd étant de 8,00 µM, les concentrations maximale et minimale de ce métal sont respectivement de 8,03 et 7,97 μM.

A-3: Mesure du Cu et du Zn dans les milieux d'exposition (Bioessais C et F)

Tableau A3.1: Concentrations totales de Cu et de Zn dans les bioessais C et F.

Bioessai #	Bassin #	[Cu] ^a	[Zn] ^a
		(n M)	(nM)
С	1	-	38±11
С	2	-	21±5
С	3	=	27 ±9
С	4	=	41±29
С	5	-	29±12
F	1	59	30
F	2	37	27
F	3	38	27
F	4	40	26

a: mesures par spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme (Varian Spectra AA-30 équipé d'un four au graphite, modèle GTA-96); moyenne ± écart type, n=5 sauf bioessai F, moyenne de deux données

A-4: Protocole de la technique d'échange ionique (TEI) (d'après Claude Fortin, comm. pers.)

Préparation de la résine:

- 1- Peser 25,0 g de résine (*DOWEX 50WX8* , grosseur: 100 à 200 mesh) à \approx 50% humidité (tel que reçu de *Sigma*)
- 2- Faire tremper dans l'eau ultra-pure et laisser sédimenter, puis décanter afin d'enlever les particules et les poussières indésirables. Répéter 10 fois.
- 3- Transférer la résine avec de l'eau ultra-pure dans la colonne (50 cm de hauteur et 2,5 cm de diamètre).
- 4- Ajouter immédiatement 200 ml de la solution de 4,0 mol/L de HCI. S'assurer que l'effluent soit incolore à la fin du volume.
- 5- Faire circuler 2,5 litres d'eau ultra-pure afin de rétablir le pH. Vérifier le pH, si < 5,7, continuer à purger la résine avec l'eau.
- 6- Convertir la résine à la forme Na+ en ajoutant 500 ml de 3,0 M NaOH et vérifier si le pH est stable dans les derniers 200 ml.
- 7- Purger une fois de plus la résine avec de l'eau ultra-pure. Après 3 litres, vérifier le pH après chaque litre. 7 litres devraient suffir pour diminuer le pH jusqu'à 6,1.
- 8- Laver la résine avec 250 ml de méthanol afin de se débarrasser de toute impureté d'origine organique, suivi de 250 ml d'eau ultra-pure.
- 9- Transférer la résine dans un bocal de plastique (HDPE) et faire sécher au four à 45°C pour 48 heures (il est important de réserver l'étuve à l'avance afin de la monopoliser pour éviter toute contamination). Toujours transporter la résine dans un dessicateur afin d'éviter toute contamination par la poussière ou l'humidité.
- 10- Peser 0,300±0,002 g (noter précisément) de résine dans des contenants de polystyrène (Dilu-Vial) lavés à l'acide et conserver à l'abri de l'humidité.

expérience typique:

1- Insérer la résine (0,300 g) sous forme sodique telle que préparée et mettre dans une colonne (30 cm de long et 1 cm de diamètre) avec une solution 0,20 M NaNO₃ au pH désiré. Bien s'assurer qu'il ne reste plus de résine dans le contenant.

A-4 (suite)

- 2- Ajouter suffisamment de solution électrolyte pour stabiliser le pH de la résine et ajuster la valve afin d'obtenir un débit de 6 ml/min.
- 3- Une fois que le pH de la résine est ajusté, ajouter 500 ml de solution 0,20 M NaNO₃ (toujours au même pH) contenant les concentrations désirées de M^{z+} et de ligand (conserver quelques ml de la solution originale pour fin de vérification et acidifier à 0,1% v/v HNO₃, grade métaux traces) et noter l'heure de départ. Le niveau de liquide dans la colonne doit rester le plus constant possible afin de conserver la même pression hydrostatique. Prendre 3 lectures de pH au cours de l'expérience et conserver les derniers ≈ 50 ml (acidifié à 0,1%) à passer à travers la résine pour comparer la concentration avec la solution originale. Si [M] init. = [M] final, alors il y a équilibre entre la résine et la solution (affirmation non-valide dans le cas où de grandes concentrations de ligands sont utilisées). Noter l'heure finale et calculer le débit réel.
- 4- Ajouter 10 ml d'eau ultra-pure une fois que toute la solution s'est écoulée afin d'éliminer toute traces de solution dans les espaces interstitiels. Appliquer une pression d'air zéro suffisante pour évacuer tout le liquide.
- 5- Procéder à l'élution de la résine avec 50 ml de 1,5 M HNO₃ (Aristar de BDH) afin de récupérer le métal lié à la résine (à conserver dans un contenant de polyéthylène). Encore une fois, appliquer une pression d'air zéro suffisante pour évacuer complètement la solution acide.
- 6- Déterminer les concentrations de chaque métal des échantillons recueillis (par absorption atomique avec des étalons de la même matrice).
- 7- Évaluer la concentration de Mz+ à l'aide de l'équation suivante:

$$[M^{z+}]=[M]_{mes} \cdot V / (k \cdot m)$$

où: k= coefficient de distribution (L/g)

kZn= 0,404 (±6,9%) L/g

kCd= 0,518 (±3,6%) L/g V= volume de l'élution (50 ml)

m= masse de la résine (g)

N.B.: Le matériel de plastique utilisé doit avoir été lavé selon le protocole établi.

A-5: Mesure des cations majeurs Mg, Na et K (Bioessais C, D, E et F)

Tableau A5.1: Concentration des cations Mg, Na et K selon le bioessai et le bassin d'exposition.

Bioessai #	Bassin #	[Mg]a	[Na] ^a	[K] ^a
		(μ M)	(μ M)	(μM)
С	2&3	57±2	205±17	9±2
D	1	62±1	211±2	9±2
D	2	63±1	211±2	9±2
D	3	63±1	175±2	8±2
D	4	62±1	172±3	9±1
E	1	64±2	200±7	10±1
E	2	63±1	198±6	9±2
E	3	63±1	185±4	9±2
E	4	63±1	188±5	9±1
F	1	61	180	6
F	2	61	179	4
F	3	61	176	5
F	4	61	177	4

a: mesures par spectrophotométrie d'émission atomique au plasma; moyenne ± écart type, n=5 sauf bioessai C où n=10 ; bioessai F, moyenne de deux données

A-6: Méthode de digestion des tissus au four à micro-ondes (adapté de Bastille et al., 1989)

Des tests ont révélé que certains métaux ne peuvent être dissociés de la matière organique qu'à très haute température. Cela signifie aussi une pression de vapeur plus élevée pour atteindre cette température. Il faut donc être prudent lors de l'utilisation de cet équipement et bien lire les instructions ci-jointes et celles du fabricant. Afin de mieux se protéger, le manipulateur doit porter un sarrau, des lunettes, une visière, des gants propres et des chaussures fermées. L'acide est un puissant corrosif lorsque chauffé.

Procédure de digestion:

- 1- Nettoyer la table de travail et y déposer du papier propre. Prendre toutes les précautions nécessaires afin d'éviter la contamination.
- 2- Placer l'échantillon séché dans le contenant de Téflon propre et sec.
- 3- Ajouter les volumes d'acide nitrique concentré (grade métaux traces) et d'eau, le cas échéant (voir tableau A6.1). Laisser la digestion prendre emprise à la température de la pièce pendant une guinzaine de minutes.
- 4- Placer le couvercle et transférer le contenant de Téflon dans la bombe. Fermer ensuite le couvercle de la bombe de 1/8 de tour après un contact ferme.
- 5- Déposer la bombe au centre du plateau du four à micro-ondes.
- Digérer ensuite à 360 Watts (med-low) pendant 30 secondes et vérifier la pression interne (1/64 de pouce (0,015 po.) équivaut à 250 psi). Il ne faut pas dépasser 1000 psi. Si la pression n'est pas assez haute, on peut ajouter des séquences de 20 secondes supplémentaires tout en vérifiant la pression après chacune d'elles. Ne pas chauffer plus de 2 minutes consécutives puisqu'une déformation du Téflon pourrait s'ensuivre.
- 7- Sortir avec précaution la bombe et la déposer sur la table une dizaine de minutes puis environ 15 à 30 minutes dans l'eau froide afin d'abaisser rapidement la température du liquide.
- 8- Ouvrir sous la hotte et manipuler avec précaution la bombe. Sortir le Téflon en poussant en dessous de la bombe avec un doigt. Ouvrir ensuite le Téflon et vérifier la digestion par la présence d'une couleur allant de jaune pâle à limpide. Si elle n'est pas complète, passer à l'étape 10.

A-6 (suite)

- 9- Diluer l'acide avec de l'eau ultra-pure de façon à obtenir une matrice de 10% v/v et transférer la solution dans une bouteille de plastique.
- 10- Si le fond du Téflon n'est pas recouvert de liquide et que l'on peut apercevoir de petites particules, on pourra ajouter les quantités d'acide et d'eau ultra-pure requises au départ. L'eau n'est pas toujours nécessaire (voir tableau A6.1). Bien mélanger et recommencer à l'étape 4.

Tableau A6.1: Quantités requises d'acide nitrique et d'eau pour effectuer une digestion^a selon la masse de tissus lyophilisés.

Masse	Volume	Volume	Facteur
	HNO ₃	H ₂ O	de dilution
(mg)	(μl)	(μl)	(ml/mg)
0,03-0,29	50	50	16,7-1,7
0,3-0,9	100	100	3,3-1,1
1,0-1,9	150	100	1,5-0,8
2,0-2,9	200	-	1,0-0,7
3,0-4,9	400	-	1,3-0,8
5,0-7,9	600	=	1,2-0,8
8,0-9,9	800	-	1,0-0,6
10,0-19,9	1000	-	1,0-0,5
20,0-29,9	1500		0,8-0,5
30,0-39,9	2000	=	0,7-0,5
40,0-49,9	2500	-	0,6-0,5
50,0-59,9	3000	-	0,6-0,5

a: exemple de digestion: pour des tissus ayant une masse de 22 mg (poids sec), on ajoute 1,5 ml d'acide nitrique concentré, on effectue la digestion et on dilue avec 13,5 ml d'eau ultra-pure pour un volume final de 15 ml. On obtient alors une matrice d'acide nitrique 10% v/v.

A-7: Pourcentages de récupération des métaux (Cd, Ca, Cu, et Zn) dosés dans les digestions

Tableau A7.1: Pourcentages de récupération du Cd, Ca, Cu et Zn selon le bioessai.

Bioessai #		% de récupération ^a			
	Cd	Ca	Cu	Zn	
Α	83±4 (3)	-		-	
С	94±9 (14)	12	-	-	
D	85±4 (4)			(m)	
E	99±6 (7)	-	-	-	
F	97±4 (4)	89 (2)	95±1 (4)	89±1 (4)	

a: par rapport à l'échantillon de référence composé d'hépatopancréas de homard (TORT-1, CNRC); moyenne ± écart type (n entre parenthèses)

Les pourcentages de récupération du cadmium de l'échantillon de référence variaient entre 82 et 105%. D'une manière générale, les valeurs obtenues étaient contenues dans l'intervalle de la valeur certifiée: 26,3±2,1µg de Cd/g de TORT-1 (poids sec). Pour ce qui est du cuivre, le pourcentage de récupération se situait autour de 95% et les valeurs étaient comprises dans l'incertitude de la valeur certifiée qui est de 439±22 µg de Cu/g de TORT-1 (poids sec). Le zinc et le calcium ont été retrouvés à 89% dans chacun des cas. Que ce soit le zinc ou le calcium, les valeurs étaient légèrement moindres que la borne inférieure de l'incertitude de la valeur certifiée. Ces dernières sont respectivement de:177±10 µg de Zn/g de TORT-1 (poids sec) et de 0,895±0,058% ppm de Ca.

A-8: Concentrations branchiales de métaux

Tableau A8.1: Concentrations branchiales de cadmium selon la concentration de l'ion libre Cd²⁺ du milieu après 96 heures d'exposition: Bioessai A.

[Cd] branchialea	[Cd ²⁺]	[Cd] branchialea
(ng/g poids sec)	(nM)	(ng/g poids sec)
202	0,26	235
319	15,8	1003
185	15,8	1364
327	15,8	997
431	15,8	894
242	15,8	955
315	15,8	980
192	15,4	1098
126	15,4	1169
118	42,5	1757
188	78,9	1344
	(ng/g poids sec) 202 319 185 327 431 242 315 192 126 118	(ng/g poids sec) (nM) 202 0,26 319 15,8 185 15,8 327 15,8 431 15,8 242 15,8 315 15,8 192 15,4 126 15,4 118 42,5

a: 1 individu par mesure

Tableau A8.2: Concentrations branchiales de cadmium selon le milieu d'exposition: Bioessai C.

[Cd] branchiale ^a	effectif
(ng/g poids sec)	(n)
644±24	5
546±47	6
650±43	6
1543±125	4
355±86	5
	(ng/g poids sec) 644±24 546±47 650±43 1543±125

a: moyenne ± écart type

A-8: Concentrations branchiales de métaux (suite)

Tableau A8.3: Concentrations branchiales de cadmium selon le milieu d'exposition et le temps d'exposition: Bioessai D (cinétique d'accumulation).

condition	[Cd] branchialea	effectif	condition	[Cd] branchialea	effectif
	(ng/g poids sec)	(n)		(ng/g poids sec)	(n)
témoin	179±78	3	T24B3	726±221	3
T6B1b	444±92	3	T24B4	884±225	3
T6B2	552±71	3	T96B1	810±177	3
T6B3	371±226	3	T96B2	694±225	3
T6B4	168±111	3	T43B3 ^C	660	1
T12B1	514±85	3	T73B3 ^C	1290	1
T12B2	520±18	3	T96B3	2163	1
T12B3	651±277	3	T57B4 ^C	1480	1
T12B4	719±111	3	T72,5B4 ^C	1918	1
T24B1	504±78	3	T96B4	1590	1
T24B2	422±26	3			

a: moyenne ± écart type; valeur unique lorsque n= 1

Tableau A8.4: Concentrations branchiales de cadmium selon le milieu d'exposition: Bioessai E.

cd] branchiale ^a	effectif
ng/g poids sec)	(n)
1629±233	10
1651±405	12
1537±541	11
1834±309	14
1121±244	14
	1121±244

a: moyenne ± écart type

b: (exemple de nomenclature), bassin #1 après 6 heures d'exposition

c: analyse de l'individu mort après la période de temps indiquée (heures)

A-8: Concentrations branchiales de métaux (suite)

Tableau A8.5: Concentrations branchiales de cadmium, de cuivre, de zinc et de calcium selon le milieu d'exposition: Bioessai F.

bassin #	[Cd] branchialea	[Cu] ^a	[Zn] ^a	[Ca] ^a
	(ng/g poids sec)	(ng/g poids sec)	(μg/g poids sec)	(mg/g poids sec)
1	2096±459	1172±250	396±81	31,37±4,43
2	2152±394	1342±294	391±52	32,08±3,52
3	5038±810	3108±295	408±55	31,47±2,47
4	4735±1002	2814±455	400±35	30,35±3,15
témoin	1075±229	1112±274	443±92	30,90±2,37

a: moyenne ± écart type, Cd: n= 10, Cu: n= 8, Zn et Ca: n= 5

A-9: Comportements des saumons en réponse à l'exposition au Cd

L'effet de l'exposition au cadmium n'était pas seulement visible lors de la mesure du métal accumulé ou bien lors de la constatation de la mort du poisson. Plusieurs signes de stress avant-coureurs étaient visibles: battements operculaires rapides, toux, nage rapide désordonnée, incohérente, nage sur le dos et sur le côté, spasmes musculaires parfois violents, tremblements. La mort se produit très rapidement contrairement aux bioessais réalisés avec l'Al où le battement operculaire persiste pour un bon moment (≈ 1 heure) lorsque le poisson est sur le dos dans le fond du bassin. Certains poissons morts présentaient des déformations du corps.

A-10: Mortalité cumulative dans les bioessais C, D, E et F

Tableau A10.1: Mortalité cumulative des saumons après 96 heures d'exposition (Bioessais C, D, E) et après 24 heures (Bioessai F).

Bioessai #	Bassin #	mortalité cum. (%)	Bioessai #	Bassin #	mortalité cum. (%)
С	1	0	E	1	29
С	2	0	E	2	14
С	3	0	E	3	21
С	4	20	E	4	0
С	5 (tém.)	20	F	1	0
D	1	0	F	2	0
D	2	0	F	3	0
D	3	67 ^a	F	4	0
D	4	67 ^a			

a: 2 poissons sur les 3 restants; les autres (9)ont été prélevés pour dissection à différents temps (cinétique d'accumulation branchiale)