

Université du Québec
INRS-Eau

**La bioaccumulation du cadmium chez la larve de
l'insecte aquatique *Chironomus staegeri* Lundbeck
: Distribution interne et mécanisme d'entrée.**

Par
Albert Craig
M.Sc

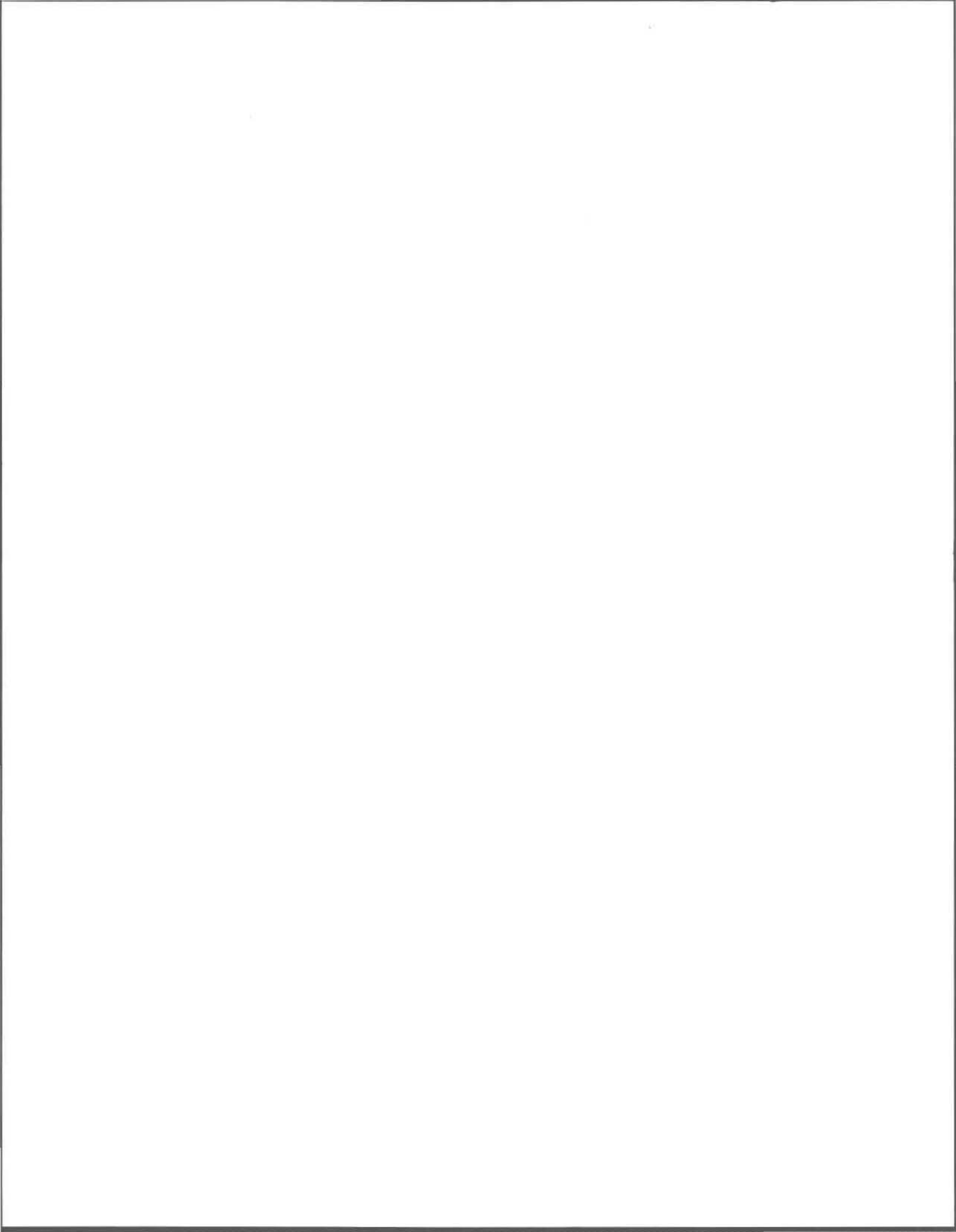
Thèse présentée
pour l'obtention
Du grade de Philosophiae doctorat (Ph.D.)
En Sciences de l'eau

Jury d'évaluation

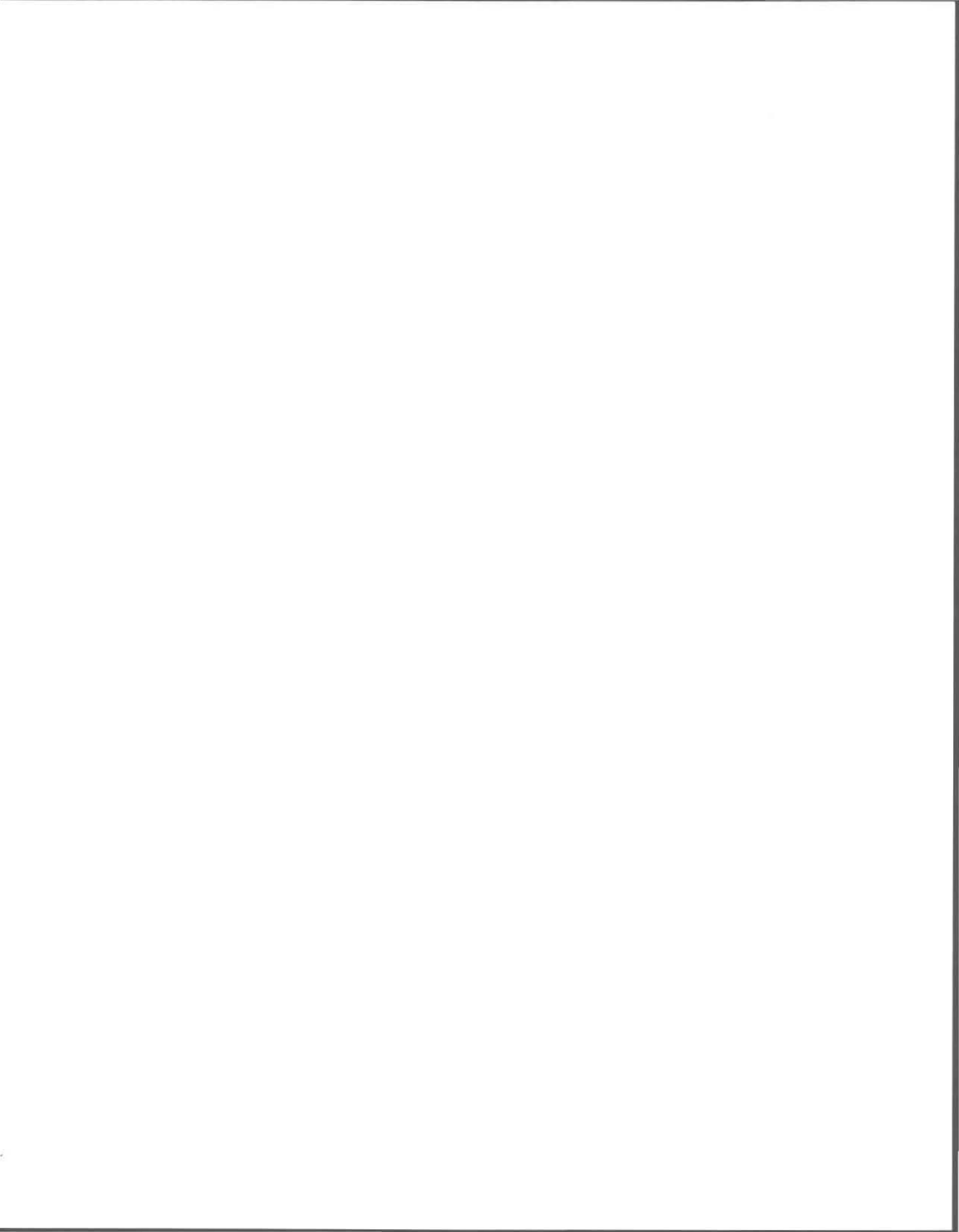
Examineur externe	Dr. Eric Bauce Département de Foresterie Université Laval
Examineur externe	Dr. Uwe Borgmann National Water Research Institute Environment Canada
Examineur interne	Dr. Jean-Christian Auclair INRS-Eau Université du Québec
Examineur interne et Codirecteur de recherche	Dr. André Tessier INRS-Eau Université du Québec
Directeur de recherche	Dr. Landis Hare INRS-Eau Université du Québec

19 décembre, 1997

© droits réservés de Albert Craig, 1997



To Nathalie, Shaun
and
my grandfather, Edward McKeown



AVANT-PROPOS

Cette thèse comprend 3 publications auxquelles ont participé Albert Craig, Landis Hare, André Tessier, Pierre-Mathieu Charest et Catherine Munger. La contribution des auteurs se répartit comme suit :

Section 2 :

1. Craig, A., L. Hare, P.-M. Charest et A. Tessier. Effect of exposure regime on the internal distribution of cadmium in *Chironomus staegeri* larvae (Insecta, Diptera), *Aquatic Toxicology* 41 (1998) 265-275

A. Craig : Conception du projet, montage du système expérimental, analyse des données, rédaction initiale et finale.
L. Hare : Conception du projet, rédaction finale.
P.-M. Charest : Conception du projet, montage du système expérimental, analyse des données.
A. Tessier : Conception du projet, rédaction finale.
2. Craig, A., L. Hare et A. Tessier. Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in the aquatic insect *Chironomus staegeri*. Soumis à *Aquatic Toxicology*.

A. Craig : Conception du projet, montage du système expérimental, analyse des données, rédaction initiale et finale.
L. Hare : Conception du projet, rédaction finale.
A. Tessier : Conception du projet, rédaction finale.

Annexe :

3. Munger, C., L. Hare, A. Craig et P.-M. Charest. Influence of exposure time on the distribution of cadmium within the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*.

A. Craig : Conception du projet, montage du système expérimental, analyse des données.



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Landis Hare et mon codirecteur, André Tessier qui m'ont initié au monde merveilleux des sciences environnementales et ont su diriger un étudiant difficile tout en encourageant la créativité et l'analyse de ce dernier.

Je remercie en particulier mon comité d'encadrement, messieurs Eric Bauce et Pierre-Mathieu Charest pour le temps et l'effort dévoués à cette responsabilité car sans leur aide, je n'aurais pas pu réussir. Les discussions avec M. J.C. Auclair ont contribué à mon évolution comme chercheur et être humain. La camaraderie ainsi que la complicité scientifique de mes collègues et amis, Robert Roy, Michael Twiss et Kevin Wilkinson resteront irremplaçables.

J'aimerais remercier les professionnels de recherche de l'équipe Hare-Tessier, particulièrement Marie-René Doyon, Lise Rancourt et René Rodrigue ainsi que les étudiants Sylvain Martin, Catherine Munger et Patick Charbonneau pour toute leur aide.

Je veux remercier tous les gens du laboratoire de l'INRS-Eau, Stéphane Prémont, Paul Boisvert, Michelle Bordeleau, Pauline Fournier, Sylvie St-Pierre, et Bernard Veilleux, qui m'ont aidé à chaque fois que j'en avais besoin.

Jean-Daniel Bourgault et Éleine Parent m'ont aidé plus de fois que je ne peux compter. Merci.

J'aimerais remercier Alain Goulet et Gabrielle Audet pour leur aide sans laquelle je n'aurais jamais pu faire de l'autoradiographie ainsi que les Drs Jean-Jacques Soghomonian et Pierre-Mathieu Charest pour m'avoir si bien reçu dans leurs laboratoires.

Finalement, j'aimerais remercier ma très chère épouse, Nathalie Cordeau, pour sa patience, son aide avec la langue de Molière, et surtout son amour qui était souvent la seule chose sur laquelle je pouvais compter.



RÉSUMÉ

Les arthropodes tels que l'insecte *Chironomus* sp. sont souvent employés pour tester la toxicité aiguë des polluants présent dans l'eau. Cependant, ces insectes benthiques peuvent aussi accumuler des contaminants des sédiments qu'ils habitent. Il existe peu d'information sur l'influence du vecteur du polluant ni de la durée d'exposition sur l'accumulation et la distribution des contaminants chez les insectes. Nous avons employé l'autoradiographie à corps entier (« whole-body autoradiography ») pour déterminer la localisation détaillée du cadmium (Cd) dans l'animal. Nous avons exposé des larves de quatrième stade larvaire de *Chironomus staegeri* Lundbeck à 10 nM de Cd dans des microcosmes sous deux régimes d'exposition : (i) à court terme dans l'eau seulement (5 jours) ou (ii) à long terme dans l'eau et le sédiment (140 jours). La microautoradiographie d'animaux entiers a démontré que le tractus digestif était l'organe principal d'accumulation du Cd sous les deux régimes d'exposition. La majorité du Cd était confinée à une petite section de l'intestin moyen, suggérant que la prise en charge du Cd se fait là.

La localisation du Cd dans les larves nous a amené à étudier le mécanisme de la prise en charge du cadmium (Cd) chez les larves de *C. staegeri*. Nous avons exposé pendant trois jours les larves à 50 nM de Cd dans l'eau seulement. Nous avons mesuré l'effet de la concentration de Ca (0.1-10 mM Ca) ainsi que l'effet des bloqueurs de canaux calciques, le lanthane (La) (10 μ M et 100 μ M) et le verapamil (100 μ M et 300 μ M), sur l'accumulation du Cd. Des concentrations de Ca élevées ont inhibé significativement l'accumulation du Cd par les larves (de 46% à 88%). Un modèle théorique simple des interactions Cd-Ca au site de prise en charge concorde bien avec nos observations. L'accumulation du Cd était inhibée significativement et en fonction des concentrations de La (73% et 92%) et de verapamil (59% et 85%). Nos résultats suggèrent que le Cd entre dans ces insectes par des canaux calciques.

Albert Craig

Étudiant

Landis Hare

Directeur de thèse

André Tessier

Codirecteur de thèse



TABLE DES MATIÈRES :

AVANT-PROPOS.....	iii
REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ.....	v
1. Objectifs et structure de la thèse.....	1
2. La problématique des métaux en milieu d'eau douce	2
2.1 Le choix du métal.....	3
2.2 Le choix de l'organisme	4
2.3 La bioaccumulation du Cd.....	6
2.3.1 La distribution du Cd dans les organismes aquatiques	6
2.3.2 Mécanisme d'assimilation du Cd.....	8
3. Les objectifs de recherche	12
3.1 Volet 1 : Distribution du Cd :	12
3.2 Volet 2 : Mécanisme de l'assimilation du Cd :	14
4. Méthodologies.....	15
4.1 Volet 1 : localisation du Cd par autoradiographie	15
4.1.1 Échantillonnage et traitement des insectes.....	15
4.1.2 Autoradiographie.....	16
4.1.3 Élimination du Cd non-assimilé.....	17
4.1.4 Comptage de la radioactivité.....	17
4.2 Volet 2 : Mécanisme d'assimilation du Cd.....	17
5. Résultats.....	19
5.1 Volet 1 : Localisation du Cd par autoradiographie.....	19
5.2 Volet 2 : Mécanisme d'assimilation du Cd	20
5.2.1 L'effet de l'exposition au Ca sur l'accumulation du Cd	20
5.2.2 Effet des bloqueurs de canaux calciques sur l'accumulation du Cd	20
6. Discussion.....	21
6.1 Le patron de localisation du Cd.....	21
6.2 La prise en charge du Cd.....	23

6.3 Discussion générale	28
7. Conclusions.....	35
7.1 Conclusions générales.....	35
7.2 Sommaire des contributions à la connaissance.....	36
7.3 Avenues de recherche.....	37
8. Bibliographie.....	38

SECTION 2

Article 1 : Effect of exposure regime on the internal distribution of cadmium in <i>Chironomus staegeri</i> larvae (Insecta, Diptera).....	50
Article 2 : Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in the aquatic insect <i>Chironomus staegeri</i> (Insecta, Diptera)	75

ANNEXE 1

Article 3 : Influence of exposure time on the distribution of cadmium within the cladoceran <i>Ceriodaphnia dubia</i>	96
--	----

ANNEXE 2

Données d'expérience préliminaires de "Pulse and chase".	115
--	-----

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Un adulte de <i>Chironomus</i> sp.	5
Figure 2. Une larve de quatrième stade de <i>Chironomus</i> sp.....	5
Figure 3. Schéma d'une section du tractus digestif d'un chironomide.	9
Figure 4. Schéma d'un modèle généralisé de canal ionique,	10
Tableau 1. Traitements expérimentaux dans le volet 2.	18
Figure 5. Schéma du mouvement du Ca et du Cd dans une cellule épithéliale.....	29



1. Objectifs et structure de la thèse

L'objectif de ce document est de démontrer que l'auteur a fait une contribution originale et significative à la science dans le but de satisfaire une partie des exigences pour l'obtention du doctorat en sciences de l'eau de l'INRS-Eau.

Les scientifiques sont évalués en grande partie par la quantité et la qualité de leurs publications dans des revues scientifiques avec jury. Pour rencontrer cette réalité et pour tenter d'éviter un dédoublement d'information et de travail, cette thèse est de forme thèse par article. Par contre, contrairement à bien d'autres institutions qui exigent une thèse par article qui est composée d'une introduction générale et d'une conclusion générale en plus des manuscrits, l'INRS exige une première section dite « synthèse » de quarante à soixante pages (à double interligne). Selon les règlements de l'INRS, cette synthèse doit inclure, en forme abrégée, les méthodes et les résultats. Un certain chevauchement entre les articles et la synthèse est donc inévitable. Cette thèse est donc divisée en deux parties distinctes. La première partie est la synthèse et la deuxième partie comprend les publications scientifiques admissibles selon les règlements de l'INRS.

Cette thèse traite de deux questions :

1. Quelle est la distribution du cadmium (Cd) à l'intérieur des larves de l'insecte *Chironomus staegeri* (Diptera) et quel est l'effet du régime d'exposition au métal sur ce patron de distribution?
2. Quel est le mécanisme d'entrée du Cd dans l'organisme?

Cette thèse fait la preuve que le Cd est accumulé surtout dans une région restreinte du tractus digestif du quatrième stade larvaire de l'insecte *Chironomus staegeri*. Elle démontre que la distribution du Cd dans l'insecte est la même pour une exposition au métal de courte durée, tel que dans un essai de toxicité, ainsi que pour une exposition au Cd de longue durée, semblable à celle rencontrée dans la nature. De plus, il est proposé

que le mécanisme d'entrée du métal dans l'organisme est l'assimilation du Cd via les voies d'entrée du Ca. Cette conclusion est appuyée par l'influence de bloqueurs de canaux calciques sur l'accumulation du Cd par les larves de *C. staegeri*. Cette conclusion est aussi supportée par l'effet du Ca sur la bioaccumulation du Cd chez les larves et enfin, cet effet est conforme à un modèle théorique simple.

La deuxième section est composée de deux publications. La première publication, acceptée pour fin de publication dans Aquatic Toxicology, détermine le site principal de l'accumulation du Cd chez *Chironomus staegeri* et l'influence du régime d'exposition sur le patron de distribution du Cd parmi les organes et tissus de la larve. Le deuxième article scientifique, soumis à Aquatic Toxicology, teste l'hypothèse que le Cd entre dans l'animal par les voies d'assimilation du Ca.

Finalement, en annexe, je présente un article auquel j'ai participé et qui utilise la technique d'autoradiographie que j'ai mise au point dans ce travail.

2. La problématique des métaux en milieu d'eau douce

L'homme est devenu le facteur le plus important dans les cycles biogéochimiques globaux de plusieurs métaux traces. Par exemple, la mobilisation du cadmium (Cd) vers la biosphère qui est causée par les activités humaines est environ 30 fois plus grande que l'émission naturelle de cet élément (Nriagu et Pacyna, 1988). Des niveaux élevés de métaux sont souvent retrouvés dans les écosystèmes aquatiques exposés directement aux effluents des mines, des raffineries et des industries (Dillon et al., 1986; Cain et al., 1992). Les métaux peuvent aussi faire l'objet d'un transport atmosphérique (Nriagu et Pacyna, 1988) affectant alors des sites loin de leur source (Verta et al., 1986). Les précipitations acides ainsi que l'inondation dues à la création des réservoirs, favorisent le mouvement de certains métaux traces des sols jusqu'aux systèmes aquatiques (Jackson, 1988).

Les sédiments des lacs et rivières sont le lieu de destination finale de la plupart des métaux contaminant les écosystèmes aquatiques (Förstner, 1980). Les métaux traces dans les écosystèmes aquatiques peuvent avoir des effets néfastes directs sur les organismes benthiques habitant ces sédiments, car dans certains cas, ces contaminants sont accumulés par les animaux à partir de l'eau et/ou de la nourriture qu'ils consomment (Luoma, 1983; Luoma, 1989; Timmermans et al., 1992). Cette bioaccumulation peut engendrer des coûts de régulation des métaux et affecter la machinerie métabolique de l'organisme (Roch et Maly, 1979; Larsson et al., 1981; Fu et al., 1989; Mason et Jenkins, 1995). Ces perturbations peuvent se manifester à des niveaux d'organisation biologique supérieurs, p.e., la mortalité individuelle (McCahon et Pascoe, 1989; Merrett et al., 1991) ou une croissance réduite (Kosalwat et Knight, 1987). Ces effets sur les individus peuvent, à leur tour, causer des changements dans les populations (Luoma et Carter, 1991) et même dans la structure biologique d'un écosystème (Kimball et Levin, 1985; Clements, 1994).

2.1 Le choix du métal

Cette thèse se restreint à l'étude de la bioaccumulation d'un contaminant, le cadmium (Cd). Le Cd a été choisi pour plusieurs raisons, entre autres :

- Le Cd est un contaminant retrouvé dans de nombreux systèmes aquatiques, incluant ceux du bouclier canadien (Stephenson et Mackie, 1988; Tessier et al., 1993; Hare et Tessier, 1996);
- il est accumulé par de nombreux organismes aquatiques tels que les invertébrés benthiques (Ray, 1984; Bryan et Langston, 1992; Hare, 1992) ; et
- il est relativement toxique, causant des pathologies chez les organismes aquatiques incluant les poissons (Roch et Maly, 1979; Larsson et al., 1981; Fu et al., 1989), les crustacés (Campbell et Stokes, 1985; Borgman, 1989; Mackie, 1989), les mollusques (Hemelraad et al., 1990; Marigomez et al., 1990) ainsi que les insectes (Timmermans et al., 1992; Hare, 1992).

2.2 Le choix de l'organisme

Les insectes ont été choisis comme sujet d'étude parce qu'ils sont souvent le groupe d'organismes benthiques le plus abondant et diversifié dans les écosystèmes d'eau douce (Ward, 1992). En plus d'accumuler le Cd (van Hattum et al., 1991; Hare, 1992; Hare et Campbell, 1992), certaines espèces de larves d'insectes rencontrent bien d'autres critères souhaités pour les bioindicateurs d'exposition (Phillips et Rainbow, 1993) par exemple :

- elles accumulent le Cd en milieu naturel sans démontrer une mortalité accrue (Warren et al., 1998);
- elles sont sédentaires et donc représentatives de leur site;
- elles sont faciles à échantillonner;
- elles sont suffisamment robustes pour survivre en laboratoire;
- leur concentration en Cd est représentative de leur milieu (Hare et Tessier, 1998; Warren et al., 1998);
- elles sont présentes sur une grande gamme de profondeurs et de conditions physico-chimiques (Ward, 1992).

Des larves du genre *Chironomus* (Insecta, Diptera, Chironomidae) ont été choisies pour cette étude parce que :

- elles sont une composante importante de la faune benthique d'un bon nombre de lacs (Butler et Anderson, 1990);
- elles peuvent être une source importante de nourriture pour les poissons (Bay et Anderson, 1966);
- elles ont une longue histoire comme animaux test pour les contaminants dans l'eau et le sédiment (Wentzel et al., 1977; Havas et Likens, 1985; Pascoe et al., 1989; Timmermans et al., 1992; Sibley et al., 1996) ; et
- il existe une base de connaissances considérable sur l'accumulation du Cd par ces insectes (e.g., Sumi et al., 1984; Seidman et al., 1986b; Krantzberg et Stokes, 1989; Hare et al., 1991a).

Chironomus staegeri a un cycle de vie constitué de quatre stades larvaires, d'un stade pupaire et d'un stade adulte (Figures 1 et 2). Tous les stades pré-adultes sont aquatiques et benthiques sauf le premier stade qui est planctonique. Les organismes de stade larvaire benthique habitent des tubes qu'ils creusent dans le sédiment et se nourrissent de détritus. Au lac St-Joseph ils se retrouvent à une densité maximale d'environ 170 individus m^{-2} surtout dans les zones de profondeur de 8-9 mètres. Les larves sont de couleur rouge dues à leur pigment respiratoire, l'hémoglobine. Au quatrième stade larvaire (Figure 2), elles ont une longueur de 7 à 24 mm.

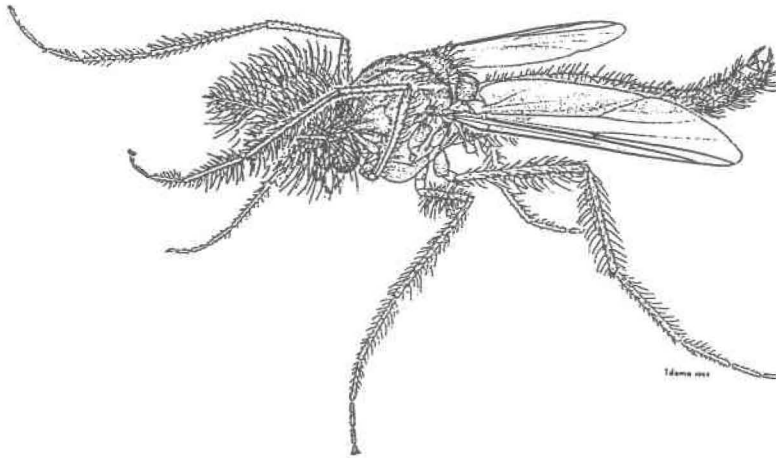


Figure 1. Un adulte de *Chironomus* sp.

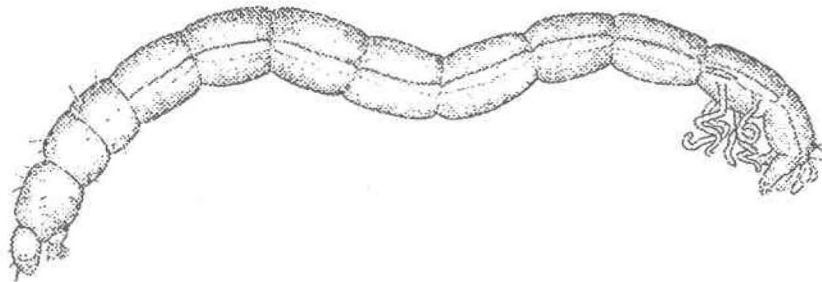


Figure 2. Une larve de quatrième stade de *Chironomus* sp.

2.3 La bioaccumulation du Cd

Le métal associé aux insectes peut se retrouver soit localisé à l'intérieur, soit lié à l'exosquelette de l'animal (Hare et al., 1991b). Pour les insectes aquatiques, l'accumulation (interne) du Cd est beaucoup plus importante que l'accumulation externe (Krantzberg et Stokes, 1988; Hare et al., 1991b; Timmermans et Walker, 1989; Timmermans et al., 1992).

Le Cd est retenu dans le corps de plusieurs types d'animaux d'eau douce dont les crustacés (Anderson et Bower, 1978; Madigosky et al., 1991; Munger et al., 1997), les bivalves (Anderson et Bower, 1978; Madigosky et al., 1991) et les insectes (Everard et Swain, 1983; Cain et al., 1992; Hare et al., 1991a; Hare et al., 1991b; Hare, 1992) incluant les chironomides (Timmermans et Walker, 1989; Krantzberg et Stokes, 1990; Hare et al., 1991a; Hare et Campbell, 1992). Cette bioaccumulation est définie comme étant une rétention nette de métal par l'organisme. La bioaccumulation implique généralement que le métal entre dans l'organisme en franchissant une membrane, et que l'influx (le taux de prise en charge) de métal excède l'efflux (le taux d'élimination). Ceci n'est pas nécessairement associé à une augmentation de concentration du contaminant dans l'organisme entier en fonction du temps car, car le taux de croissance de l'animal dépasser généralement le taux d'accumulation du métal, menant à une dilution du métal par rapport au poids total de l'animal.

2.3.1 La distribution du Cd dans les organismes aquatiques

Les concentrations de Cd tendent à varier beaucoup parmi les organes internes des invertébrés d'eau douce incluant les bivalves (Tessier et al., 1984), les crustacés décapodes (Anderson et Bower, 1978; Madigosky et al., 1991) et les insectes (Krantzberg et Stokes, 1990; Hare et al., 1991a; Hare et al., 1991b). Les patrons de distribution de métal à l'intérieur des animaux peuvent donner de l'information critique sur les mécanismes d'échange entre l'animal et son environnement (Luoma, 1983; Hare, 1992). La localisation du métal peut aussi être un moyen utile de déterminer dans quels organes

des effets patho-physiologique pourraient être observés (Verbost et al., 1987; Reid et McDonald, 1988; Lowe et Clarke, 1989; Hemelraad et al., 1990; Marigomez et al., 1990; Ghosh et Chakrabarti, 1993). Par exemple, des études avec les poissons ont démontré que l'exposition au Cd mène à l'accumulation dans les branchies et, à des concentrations élevées, à un dérèglement de leur fonction d'ionorégulation (Roch et Maly, 1979; Larsson et al., 1981; Fu et al., 1989).

Les patrons de distribution interne du Cd dans les animaux peuvent varier selon que le Cd provient de leur nourriture ou de l'eau (Glynn et al., 1992). Par exemple, chez les crustacés marins, l'exposition au Cd aqueux (dissous) favorise l'accumulation dans les structures respiratoires pendant que l'exposition alimentaire favorise l'accumulation du métal dans le tractus digestif (Davies et al., 1981; Canli et Furness, 1995). Bien qu'aucune étude comparable n'existe pour le Cd chez les invertébrés d'eau douce, on a démontré que la distribution interne du mercure (Hg) total dépend de la source de Hg chez l'éphémère *Hexagenia rigida* (Saouter et al., 1993). Lorsque le Hg était ajouté à l'eau (soit en forme de HgCl_2 ou CH_3HgCl), les branchies de l'insecte étaient un site plus important d'accumulation du Hg que le tractus de l'animal. Par contre, lorsque l'une ou l'autre des formes de Hg était ajoutée au sédiment, l'accumulation du Hg dans les branchies était beaucoup moins importante que l'accumulation dans l'intestin. On a rapporté que les patrons de distribution du Cd varient selon la durée de l'exposition au Cd dans certaines espèces de bivalves (Patel et Anthony, 1991), tandis que dans d'autres espèces, elle ne change pas (Malley et al., 1989). Aucune information semblable n'existe pour les effets temporels sur le partitionnement du Cd dans les arthropodes d'eau douce.

Chez les chironomides, on retrouve la majorité du Cd bioaccumulé dans le tractus digestif (Sumi et al., 1984; Seidman et al., 1986b; Hare et al., 1991a; Craig et al., 1998). Le tractus digestif des insectes, qui est composé d'une seule épaisseur de cellules (Dow, 1986), peut être subdivisé en régions basées sur des différences d'anatomie grossières (Chapman, 1985) (Section 2 Article No. 1, Figure 1), la présence ou l'absence de doublure cuticulaire (Chapman, 1985; Martoja et Ballan-Dufrançais, 1984), la proportion

de divers types de cellules retrouvées (Pierson, 1956), la présence et le type d'enzymes digestifs (Terra, 1990) et le pH du lumen intestinal (Phillips et al., 1986). L'intestin antérieur (le stomodeum) des insectes aquatiques est simplement constituée d'un œsophage revêtu d'une cuticule et son rôle est limité au transport de la nourriture (Pierson, 1956; House, 1974). L'intestin moyen, le mésenteron, a comme le rôle de sécréter les enzymes digestifs et d'absorber les nutriments (Chapman, 1985; Dow, 1986). L'intestin postérieur, le proctodeum, est impliqué dans la résorption des sels et d'autres substances retrouvées dans les fèces et l'urine (Chapman, 1985; Dow, 1986; Phillips et al., 1986). Chez les chironomides, il a été démontré que le Cd s'accumule plus dans certaines régions du tube digestif (le mésenteron) que dans d'autres (Sumi et al., 1984; Seidman et al., 1986b; Hare et al., 1991a). Cependant, il n'existe aucune étude de la distribution fine du Cd le long du gradient structural et fonctionnel qui caractérise le système digestif des insectes (House, 1974; Chapman, 1985).

2.3.2 Mécanisme d'assimilation du Cd

Quoiqu'il existe des études sur la bioaccumulation du Cd par les insectes, aucune n'a abordé la question des mécanismes impliqués dans l'entrée du Cd dans l'organisme. Les insectes, comme tous les organismes, doivent posséder des surfaces perméables pour permettre l'assimilation des nutriments requis pour leur survie. L'assimilation des métaux essentiels, tels que le Ca, Cu, Fe et Zn, fait appel généralement à des voies d'entrée spécifiques permettant de rencontrer les besoins métaboliques. La première étape de la prise en charge d'un métal est son entrée par l'interface avec l'environnement, soit la surface apicale des cellules épithéliales (Figure 3). La bi-couche lipidique qui constitue la membrane cellulaire est intrinsèquement peu perméable aux métaux dissous (Simkiss et Taylor, 1995). L'entrée de la plupart des cations hydrophiles dans les cellules épithéliales est donc considérée comme étant par la diffusion facilitée à travers des ionophores protéiques dans la membrane cellulaire apicale (Simkiss et Taylor, 1995). La présence de ces canaux ou pores ioniques a été démontrée dans l'assimilation de cations essentiels incluant le Ca dans de nombreux organismes (Alberts et al., 1983).

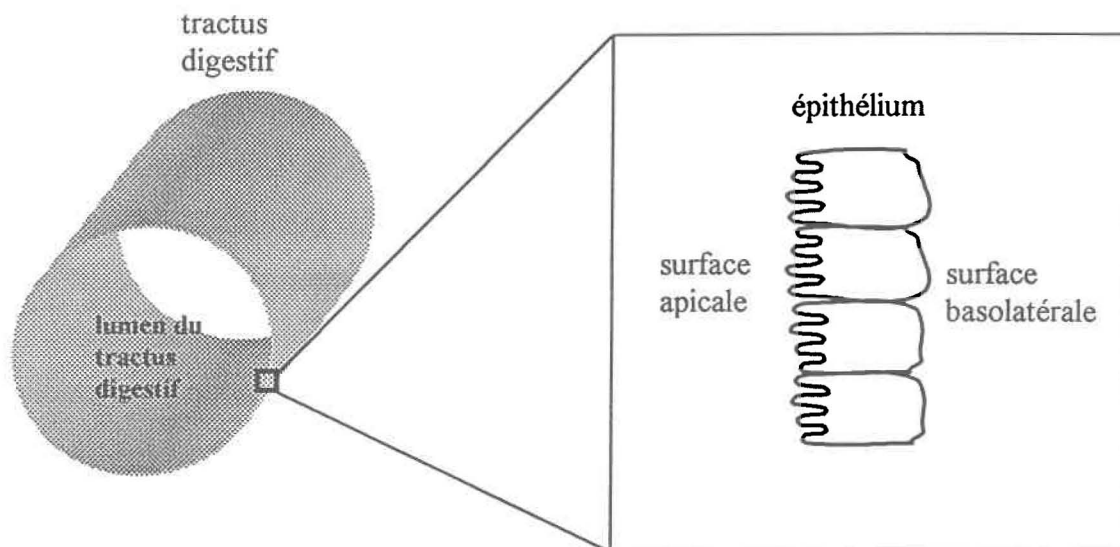


Figure 3. Schéma d'une section du tractus digestif d'un chironomide.

Selon un modèle conceptuel simplifié, ces canaux sont des cylindres composés de protéines bouclées intégrées dans la membrane et ayant des surfaces hydrophobes face à la membrane et des surfaces hydrophiles créant le pore aqueux (Figure 4) (Simkiss, 1996). La sélectivité des canaux est basée sur l'interaction entre la déshydratation et l'hydratation de l'ion métallique et sur sa liaison et sa libération des groupes hydrophiles sur la paroi du canal (Eisenman et Dani, 1987). On considère que l'entrée et la sortie des canaux ont une forme d'entonnoir (Green et Andersen, 1991) pour permettre des débits plus élevés par la réduction du nombre de liaisons faites lors du passage d'un ion. Une région plus étroite joue le rôle de filtre de sélectivité (Simkiss et Taylor, 1995). La surface de l'entrée du canal est chargée négativement et dirige les cations vers le centre du canal où ils sont déshydratés pour passer par le filtre de sélectivité (la partie la plus étroite) (Green et Andersen, 1991). Les ions sont ensuite hydratés et poursuivent leur diffusion vers l'intérieur de la cellule. Les cations monovalents, tels que le Na^+ , subissent une répulsion du canal par les cations divalents s'y retrouvant (Simkiss et Taylor, 1995). Les ions

divalents plus petits ne passent pas parce que lorsqu'ils sont hydratés ils sont trop gros et leur déshydratation est trop coûteuse énergiquement (Rainbow, 1997). Les ions plus gros sont intrinsèquement trop gros même lorsqu'ils sont déshydratés. Il y a aussi souvent un contrôle sur l'entrée des ions qui s'exerce au niveau des canaux ioniques via la fermeture des « portes » (« gate ») (Hosey et Lazdunski, 1988).

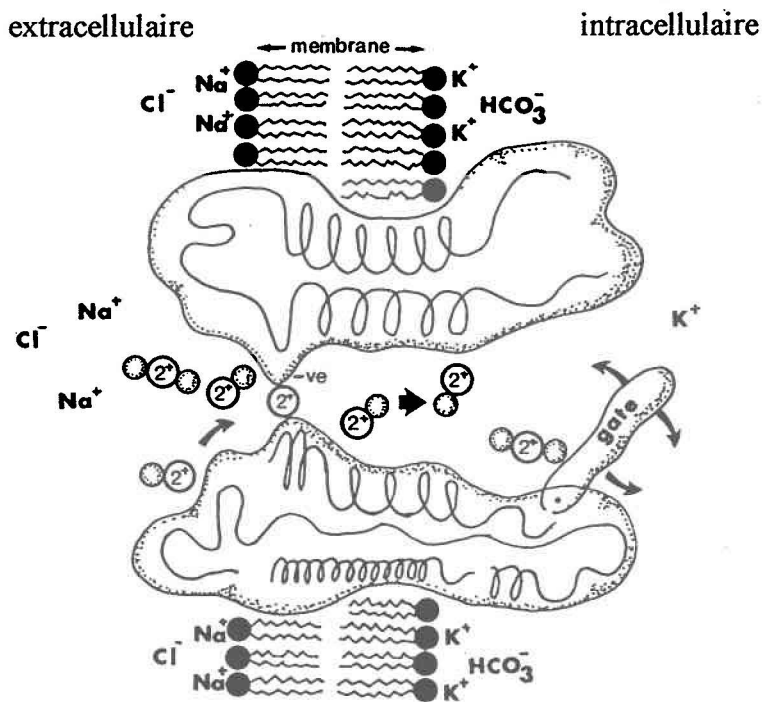


Figure 4. Schéma d'un modèle généralisé de canal ionique, les molécules d'eau sont indiquées en pointillé (adapté de Simkiss 1996).

Il y a, par contre, des exceptions à ces principes. Certaines espèces chimiques non polaires de métaux telles que le Hg^0 et des complexes neutres de Hg peuvent diffuser passivement

à travers la membrane cellulaire (Boudou et al., 1983; Boudou et al., 1991). Dans le milieu marin, le Cd et Mn peuvent se complexer à des anions tels que le Cl⁻, pour former des complexes neutres plus solubles dans les lipides, facilitant alors leur entrée par diffusion à travers la membrane (Simkiss, 1983). Par contre, en milieu d'eau douce, les concentrations de Cl⁻ sont beaucoup moins importantes et ce phénomène n'y est pas important.

Généralement, on considère que les métaux non-essentiels toxiques, tels que le Pb et le Cd, empruntent les voies d'entrée des éléments essentiels (Roesijadi et Robinson, 1994; Simkiss et Taylor, 1995). Le Cd²⁺, ayant la même charge que le Ca²⁺ et ayant un rayon ionique similaire (0.97 Å et 0.99 Å, respectivement : Pauling, 1960) est un candidat idéal pour ce genre de substitution. Plusieurs études ont démontré une homologie entre le transfert du Ca et celui du Cd. Par exemple, le Cd est assimilé via des canaux calciques dans les cellules pituitaires (Hinkle et al., 1987) et les hépatocytes (Blazka et Shaikh, 1991) des mammifères. La prise en charge du Cd à travers des canaux calciques a aussi été rapportée chez les poissons d'eau douce (Verbost et al., 1987; Verbost et al., 1989; Wicklund Glynn, et al., 1994). D'autres études ont démontré que l'assimilation du Cd est inhibée par des concentrations de Ca élevées (Pärt et al., 1985; Davies et al., 1993). De plus, un effet d'inhibition du Cd sur l'absorption du Ca est observé chez les poissons (Reid et McDonald, 1988; Reader et Morris, 1988).

Des homologies Cd-Ca ont aussi été rapportées chez plusieurs invertébrés aquatiques. La concentration de Ca dissous a un effet sur l'accumulation de Cd dans des mollusques marins (Bjerregaard et Depledge, 1994) et d'eau douce (Wang et Evans, 1993). L'inhibition de l'assimilation du Cd par des bloqueurs de canaux calciques a été rapportée dans des branchies excisées de *Anodonta anatina* (Holwerda et al., 1989) et *Crassostrea virginica* (Roesijadi et Unger, 1993). Chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus pulex*, le taux de prise en charge du Cd est une fonction du taux de prise en charge du Ca (Wright, 1980). Une augmentation de la concentration de Ca dans l'eau inhibe la prise en charge du Cd chez le crabe *Carcinus maenas* (Wright, 1977) et l'amphipode *Hyaella*

azteca (Stephenson et Mackie, 1989). Il n'existe aucune étude traitant de ces phénomènes chez les insectes.

3. Les objectifs de recherche

Cette étude visait à valider l'hypothèse générale que le Cd est accumulé dans une région restreinte de l'intestin moyen et que cette distribution pourrait être due à l'entrée du Cd dans l'insecte par les mêmes voies que les éléments nutritifs essentiels. Les deux objectifs principaux étaient; 1) de déterminer le patron de distribution interne du Cd chez les larves de *Chironomus staegeri* ainsi que l'effet du régime d'exposition au Cd sur ce patron et 2) d'élucider le ou les mécanismes d'entrée du Cd dans ces larves.

3.1 Volet 1 : Distribution du Cd :

Même si la distribution interne du Cd a été étudiée dans quelques espèces de *Chironomus* (Sumi et al., 1984; Seidman et al., 1986b; Hare et al., 1991a), ni le patron détaillé de distribution du Cd le long du tractus, l'organe accumulateur principal, ni les effets du régime d'exposition n'ont été étudiés. De plus, toutes les études antérieures souffrent de limites ou faiblesses méthodologiques. L'étude de Sumi et collaborateurs (1984) utilisait des techniques histochimiques pour révéler le Cd chez *Chironomus yoshimatsui*, mais cette coloration histochimique souffre de plusieurs désavantages. Cette méthode révèle seulement le Cd qui est encore suffisamment réactif pour interagir avec le colorant. Le Cd qui est fortement lié, par exemple, qui est en forme inerte dans des lysosomes ou granules, n'est pas coloré. Le patron de distribution ainsi constaté est donc pour le moins incomplet. L'étude de Seidman et collaborateurs (1986b) sur *Chironomus thummi* a résolu le problème de la révélation du Cd en utilisant une méthode autoradiographique. Cette technique permet de révéler tout le Cd qui est de forme radioactive tel que le ^{109}Cd , qu'il soit lié dans l'animal ou non. Cependant, dans cette étude, le contenu de l'intestin (nourriture et eau) contenant de fortes concentrations de ^{109}Cd non-assimilé par l'insecte n'a pas été éliminé avant de sectionner les organismes. Ceci a probablement causé une

contamination des sections et met donc en doute les résultats. Seidman et al. (1986a) ont sectionné les larves de façon transverse, comme le veut la tradition, empêchant ainsi les auteurs de bien comparer la distribution du Cd le long du tractus digestif. L'étude de la bioaccumulation de Cd chez *Chironomus sp.* par Hare et al. (1991a) était la première à étudier la distribution interne du Cd chez des larves d'insectes exposées au métal en milieu naturel. Ils ont déterminé les proportions du Cd total et les concentrations du métal parmi les organes par dissection. Malheureusement ils ont été limités dans la précision du patron de distribution par la résolution des méthodes de dissection qui sont de beaucoup inférieures à celles des méthodes histologiques.

Dans l'étude actuelle nous avons déterminé le patron de distribution du Cd à l'intérieur des larves des *C. staegeri* exposées au ^{109}Cd sous deux régimes d'exposition : (i) Une exposition au Cd dans l'eau seulement de courte durée (5 jours) et (ii) une exposition au Cd dans l'eau et la nourriture (sédiment) de longue durée (140 jours). Le premier régime d'exposition simule celui utilisé dans les bioessais de toxicité en laboratoire tandis que le deuxième ressemble à l'exposition au Cd en milieu naturel.

Nous avons utilisé une technique microautoradiographique du corps entier (whole-body microautoradiography), n'ayant jamais été utilisée auparavant en toxicologie des invertébrés, afin de localiser le ^{109}Cd dans les larves de *C. staegeri*. Cette technique, telle que nous l'avons appliquée, comprend plusieurs avantages.

- Elle permet une résolution plus fine que celle obtenue par la dissection (Hare et al., 1991a).
- Contrairement à la coloration histochimique (Sumi et al., 1984) et à l'autométallographie (Danscher et al., 1987), l'autoradiographie n'est pas sensible à la manière dont le Cd est lié dans les cellules, e.g., à une métallothionéine ou sous forme de granule.
- L'utilisation de sections sagittales complètes (« whole-body »), plutôt que de sections transverses (Seidman et al., 1986b), permet la comparaison visuelle simultanée des distributions de métal dans la plupart des organes d'un individu (Tjalve et Gottofrey,

1986; Rouleau et al., 1993) ainsi que le long des organes différenciés morphologiquement tels que le tractus digestif.

- L'application d'une émulsion photographique liquide à des lames de microscope (la microautoradiographie) permet des observations directement sur les sections de tissus plutôt que des observations sur des négatifs tels qu'avec des autoradiographies de type « whole-body » traditionnelles (Ullberg, 1977; Tjalve et Gottofrey, 1986).

3.2 Volet 2 : Mécanisme de l'assimilation du Cd :

Malgré l'importance écologique des insectes dans les écosystèmes d'eau douce (Ward, 1992), ni le mécanisme d'assimilation du Cd, ni la compétition entre le Cd et le Ca pour l'assimilation n'ont été étudiés. On rapporte que le Cd est accumulé surtout dans le tractus digestif de plusieurs types d'insectes aquatiques (Hare et al., 1991a). Des études du tractus des larves de *Chironomus* suggèrent que la région d'accumulation du Cd est aussi celle de l'assimilation d'éléments essentiels (Pierson, 1956; Seidman et al., 1986a). De plus, on a démontré que le mésenteron (intestin moyen) est la région responsable de l'assimilation du Ca dans les insectes terrestres (Taylor, 1985; Taylor, 1986). Étant donné ces évidences concernant les insectes, ainsi que celles pour les autres types d'organismes énumérés ci-haut, il est plausible de poser l'hypothèse que le Cd entre dans les insectes surtout par les sites d'assimilation du Ca dans l'intestin.

Pour tester l'hypothèse que le Cd qui se trouve dans les larves de *C. staegeri* est assimilé par les voies du Ca, deux approches complémentaires ont été utilisées :

1. Des larves ont été exposées au cadmium et à plusieurs concentrations de Ca pour évaluer l'effet du Ca sur l'accumulation du Cd;
2. Des larves ont été exposées au cadmium et à deux bloqueurs de canaux calciques pour déterminer si cela causerait une inhibition de l'accumulation du Cd.

4. Méthodologies

Cette section est un résumé des méthodologies des deux articles scientifiques présentés dans la deuxième section de la thèse.

4.1 Volet 1 : localisation du Cd par autoradiographie

Pour les détails, voir « Section 2, Article No. 1, Methods ».

4.1.1 Échantillonnage et traitement des insectes

Pour l'ensemble de la thèse, les méthodes d'échantillonnage d'insectes étaient sensiblement les mêmes (voir Section 2, Article No. 1, methods, insect collection). Des larves de chironomides ont été recueillies au lac St-Joseph et triées au laboratoire. Les larves de quatrième stade de l'espèce *C. staegeri* Lundbeck ont été retenues pour l'expérimentation. Elles ont été maintenues dans des aquariums comprenant du sédiment provenant du lac St-Joseph. Les larves ont alors été gardées à la noirceur à 10°C dans l'attente du début de l'expérimentation. Certaines larves ont été maintenues à 4°C pour ainsi ralentir leur développement afin d'assurer une « source » continue d'insectes.

Le sédiment pour les expériences de longue durée a été recueilli au lac Duprat, un site dans la région minière de Rouyn-Noranda (48°20' N, 79°08' W). La concentration de Cd total dans le sédiment oxique de surface des lacs St-Joseph et Duprat était de 47 et 66 nmol g⁻¹ poids sec, respectivement.

Une eau reconstituée de pH (6.0) et de concentrations de Ca (100 µM) et de Mg (20 µM) similaires à celles du lac St-Joseph a été employée pour le maintien des larves en laboratoire et dans toutes les expériences (avec les ajouts nécessaires pour chacun des traitements).

Lors de l'expérience d'exposition de courte durée, 5 replicats de 25 larves ont été exposés à 10 nM de ¹⁰⁹CdCl₂ dans l'eau reconstituée seulement (les insectes étaient exposés à une

activité de Cd^{2+} équivalente à celle du contrôle tel que calculée avec le logiciel HYDRAQL; Papelis et al., 1988). Les animaux témoins ont été exposés de la même façon, sauf que la solution de 10 nM Cd^{2+} était sans radiotracteur. Des concentrations de Cd^{2+} proches de 10 nM ont été rapportées dans les lacs des régions affectées par des activités minières (moyenne de 1.4 ± 1.7 (moyenne \pm écart type) Hare et Tessier, 1996; Croteau et al., 1997).

Dans les expériences d'exposition au Cd à long terme (140 jours), 30 larves ont été maintenues dans 1.0 L d'eau reconstituée et 0.5 L de sédiment du lac Duprat dans chacun de 2 contenants. Un ajout de 18.5×10^6 Beq de $^{109}\text{CdCl}_2$ (activité spécifique de 3.9×10^6 Beq μg^{-1} Cd) a été fait au sédiment, résultant en une concentration totale nominale de 90 nM Cd g^{-1} poids sec de sédiment. Le pH de l'eau a été maintenu à 6.0 et le Cd total dans l'eau surnageante, mesuré à 4 reprises, ne variait pas de plus de 2% de la concentration nominale de 10 nM. Les animaux témoins ont été exposés de la même façon mais en utilisant du Cd non-radioactif.

4.1.2 Autoradiographie

Les détails de la méthodologie se retrouvent à la « Section 2, Article No. 1, methods, autoradiography et counting ».

L'autoradiographie est une technique permettant de révéler tout radio-isotope retrouvé dans des sections de tissus. En microautoradiographie, une section histologique est placée sur une lame de microscope et trempée dans une émulsion photographique. Les émissions radioactives des isotopes exposent graduellement cette émulsion. Lorsque l'exposition est jugée suffisante, les lames sont développées et fixées en chambre noire tout comme un film noir et blanc le serait.

Les larves soumises aux deux types d'expositions ont été fixées avec de la glutaraldehyde-cacodylate 0.1 M pendant 3 heures. De l'acide tannique (0.5%) a été incluse dans le fixateur pour minimiser la perte de métal lors des étapes subséquentes (Murakami et al.,

1975). Les organismes ont été enrobés dans de la paraffine, sectionnés sagittalement et les coupes de 15 µm ont été placées sur des lames de verre. Suite à la déparaffinisation, les lames ont été trempées dans l'émulsion autoradiographique et placées au réfrigérateur pendant 1 à 3 semaines d'exposition. Lorsque les lames étaient suffisamment exposées par la radioactivité dans les tissus, elles ont été développées, fixées et colorées avec l'haemotoxylin de Harris et eosin-Y.

Pour évaluer la perte de métal lors de la fixation, la radioactivité contenue dans plusieurs larves a été mesurée au compteur gamma avant et après la fixation des organismes.

Dans le but de quantifier l'importance relative du tractus digestif dans l'accumulation du Cd, le ^{109}Cd a été mesuré dans le tractus et le reste du corps, suite à la dissection de plusieurs larves ayant subi l'exposition à court terme dans l'eau seulement.

4.1.3 Élimination du Cd non-assimilé

Pour purger tout le Cd radioactif non-assimilé du tractus digestif des insectes suite à leur exposition au Cd, les larves ont été rincées avec de l'eau reconstituée et placées ensuite dans du sédiment sans radiotracer pour 48 heures. Elles ont ensuite été rincées pendant 10 à 30 minutes dans 10 µM EDTA pour enlever tout ^{109}Cd restant à la surface des organismes.

4.1.4 Comptage de la radioactivité

Tout le comptage du ^{109}Cd a été effectué à l'aide d'un compteur gamma "LKB Wallac 1282 Compugamma" muni d'un puits de comptage possédant un détecteur au cristal d'iode de sodium. Les corrections ont été effectuées pour la radioactivité de fond et pour l'efficacité du comptage (60%).

4.2 Volet 2 : Mécanisme d'assimilation du Cd

Les traitements expérimentaux incluaient un contrôle de mortalité (pas de Cd), un

contrôle, 4 concentrations expérimentales de Ca^{2+} et 2 concentrations de chacun des bloqueurs de canal calcique lanthane (La) et verapamil (Tableau 1). Chaque traitement consistait en 3 replicats de 15 larves de *C. staegeri* (10 larves pour le témoin de mortalité) qui étaient gardées dans la noirceur à 10°C dans 150 mL d'eau reconstituée dans des bouteilles de polyéthylène de haute densité (HDPE; 250 mL pendant 36 heures.

Tableau 1. Traitements expérimentaux dans le volet 2.

Toutes les solutions contenaient $[\text{Cd}^{2+}]$ de 50 nM.

TRAITEMENT	CONCENTRATION (mM)
Compétiteur : Calcium	0.1 (contrôle), 1, 2.5, 5, 10
Bloqueurs de canal : Lanthane	0 (contrôle), 10, 100
Verapamil	0 (contrôle), 100, 300

Les larves dans tous les traitements, à l'exception du témoin de mortalité, étaient exposées à 50 nM Cd par l'addition de $^{109+112}\text{CdCl}_2$ à l'eau reconstituée. Dans les traitements au Ca, les larves étaient exposées à des concentrations de Ca^{2+} de soit 1, 2.5, 5 ou 10 mM Ca^{2+} créées par l'addition de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ à l'eau reconstituée ; les activités de Cd^{2+} étaient maintenues à 50 nM pour tous les niveaux de traitement au Ca. Les activités étaient estimées avec le logiciel d'équilibre chimique HYDRAQL (Papelis et al., 1988). Dans les traitements aux bloqueurs de canal calcique, les larves étaient exposées à 50 nM Cd conjointement avec une concentration de l'un ou l'autre des deux bloqueurs : La (10 μM et 100 μM) et verapamil (100 μM et 300 μM).

Suite à l'exposition des insectes au métal, le ^{109}Cd non assimilé a été purgé des organismes comme décrit à la section 4.1.3.

Chaque insecte a ensuite été placé dans un vial prépesé et son contenu en ^{109}Cd a été compté. Ces résultats ont été transformés en Cd total en utilisant les valeurs d'activité spécifique ainsi que la concentration des ajouts de solutions radioactives. Les insectes ont été séchés pendant 48 heures à 60°C et ensuite pesés. L'accumulation de Cd a été exprimée en Cd par gramme de poids sec.

5. Résultats

5.1 Volet 1 : Localisation du Cd par autoradiographie

La perte de métal lors de la fixation et la déshydratation des échantillons, en moyenne 5%, n'était pas significative (test païré de Wilcoxon, $n = 10$, $P = 0.54$) suggérant ainsi que les patrons de distribution de Cd observés dans nos expériences ne sont probablement pas des artefacts des techniques histologiques utilisées.

Le Cd dans le tractus digestif comprenait $94 \pm 5\%$ (moyenne \pm s.d., $n = 31$) du ^{109}Cd présent dans les larves après une exposition de 5 jours dans l'eau seulement. Les organismes témoins ne démontraient pas de marquage autoradiographique (Section 2, Article No. 1, Figs. 2a et 2b). Le marquage dans les larves exposées au ^{109}Cd a été observé seulement dans les tissus de l'intestin (Section 2, Article No. 1, Figs. 2c et 2e).

Le tractus digestif des larves *Chironomus* peut être divisé en quatre régions basées sur la structure (Seidman et al., 1986a) et la fonction (Pierson, 1956) de chacune de ces régions : l'œsophage (ou stomodeum), la portion antérieure dilatée du mésenteron, le mésenteron postérieur et le proctodeum (Section 2, Article No. 1, Fig. 1).

Les larves ayant subi une exposition au Cd pour une courte période (Section 2, Article No. 1, Figs. 2c et 2d) et pour une longue période (Section 2, Article No. 1, Fig. 2e et Fig. 2f) ont démontré un marquage autoradiographique seulement dans la portion antérieure du mésenteron postérieur. Au moins 12 larves de chaque traitement expérimental ont été

examinées au microscope et elles ont toutes démontré un marquage de la même région de l'intestin, à l'intérieur de chaque groupe.

5.2 Volet 2 : Mécanisme d'assimilation du Cd

La survie des organismes sous les conditions expérimentales n'était pas significativement différente de celle des animaux du témoin de mortalité ($p > 0.05$, z-test) à l'exception de l'exposition au verapamil à 300 μM , suggérant que les résultats de ce niveau de traitement doivent être interprétés avec prudence.

5.2.1 L'effet de l'exposition au Ca sur l'accumulation du Cd

L'accumulation du ^{109}Cd par les larves de *C. staegeri* était inversement proportionnelle à la concentration de Ca dans l'eau (Section 2, Article No. 2, Fig. 1). L'accumulation du Cd différait significativement à toutes les concentrations de Ca (normalisation log, ANOVA à un sens (facteur), Tukey honest significant difference (HSD), $p < 0.05$). Des augmentations en concentration de Ca de 10, 25, 50, ou 100 fois relatives au contrôle ont causé une réduction d'accumulation de Cd par *C. staegeri* variant de 46% à 88%.

Le Cd situé dans le tractus digestif comprenait $94 \pm 5\%$ (moyenne \pm s.d., $n = 31$) du ^{109}Cd présent dans les larves après une exposition de courte durée à l'eau seulement telle que déterminée par la dissection et le comptage.

5.2.2 Effet des bloqueurs de canaux calciques sur l'accumulation du Cd

Les bloqueurs de canaux calciques, La et verapamil, ont inhibé significativement (normalisation log, $p < 0.05$, test-t de Student) l'accumulation du Cd par les larves de *C. staegeri* à toutes les concentrations employées (Section 2, Article No. 2, Fig. 2). L'effet des deux bloqueurs était significativement (normalisation log, $p < 0.05$, t-test) plus important à des concentrations plus élevées d'inhibiteur de canaux calciques (Section 2, Article No. 2, Fig. 2). L'inhibition relative de la bioaccumulation du Cd par le La était de

73% et 92% aux concentrations de 10 et 100 μM , respectivement. Pour le verapamil, l'inhibition de l'accumulation du Cd était de 59% et 85% aux concentrations de 100 et 300 μM , respectivement.

6. Discussion

6.1 Le patron de localisation du Cd

La similarité des patrons de localisation du Cd dans les larves provenant des deux régimes d'exposition indique que la région antérieure du mésenteron postérieur est le site principal de l'accumulation du Cd, peu importe la durée de l'exposition au Cd ou la présence ou l'absence du Cd dans la nourriture.

Dans notre expérience, le Cd situé dans le tractus digestif comprenait $94 \pm 5\%$ (moyenne \pm s.d., $n = 31$) du ^{109}Cd présent dans les larves après une exposition de courte durée à l'eau seulement. Cette distribution est similaire à celle observée chez les individus de la même population exposés au métal sur le terrain, i.e., $96 \pm 2\%$ (moyenne, s.d., $n = 7$) du Cd total est rapporté comme étant localisé dans le tractus (Martin, 1992). Ces résultats concordent aussi avec les données pour des larves de *Chironomus* spp. recueillies sur le terrain dans d'autres lacs; dans ces larves environ 75% du Cd bioaccumulé total était associé avec le mésenteron postérieur (tel que déterminé par dissection; Hare et al., 1991a)

On a aussi démontré que le tractus digestif est le site principal de l'accumulation du Cd pour les larves de *Chironomus yoshimatsui* (Sumi et al., 1984) et *Chironomus thummi* (Seidman et al., 1986b) dans des expériences de courte durée en laboratoire. Le tractus semble être l'organe principal d'accumulation du Cd dans plusieurs autres ordres d'insectes aquatiques tels que les Éphémères et les Mégaloptères (Hare et al., 1991a).

Des résultats contraires, i.e., des différences dans la localisation du métal entre les expositions pour de courtes ou de longues périodes d'exposition ou entre nos résultats et

les données du terrain, auraient suggéré que les études de bioaccumulation en laboratoire ne sont pas représentatives de la bioaccumulation en milieu naturel. Parce que l'on pense que l'accumulation du Cd est étroitement liée à sa toxicité (Hemelraad et al., 1990; Marigomez et al., 1990; Ghosh et Chakrabarti, 1993), des résultats contraires auraient aussi généré de sérieuses appréhensions au sujet de la validité des tests de toxicité en laboratoire ainsi que l'extrapolation des résultats de ces tests vers les effets biologiques sur le terrain.

La localisation de la grande majorité du Cd accumulé dans le tractus des larves de *C. staegeri* exposées au Cd dans de l'eau seulement indique que le Cd accumulé dans l'organe digestif ne provient pas nécessairement de la nourriture (sédiment), contrairement aux déductions antérieures (Hare, 1992). C'est-à-dire que les tissus du tractus sont le site principal de stockage de Cd peu importe la source apparente du Cd. En contrepartie, les résultats actuels suggèrent qu'il n'est pas possible d'identifier la source du Cd accumulé par les larves en se basant uniquement sur la distribution du Cd dans le corps de l'insecte.

On rapporte que le Cd, suite à son assimilation, peut être redistribué parmi les parties du corps avec le temps (Wright, 1980; Marigomez et Ireland, 1989). Par contre, dans nos expériences, nous n'avons vu aucune évidence de la translocation du Cd, car il n'y avait pas de différence décelable dans la distribution du ^{109}Cd parmi les organes entre les expositions de 5 et 140 jours. De plus, les autoradiogrammes des expositions pour une courte période ne démontraient aucun Cd dans les organes autres que le tractus digestif, suggérant que le tractus est le site principal de l'entrée du métal. L'absence de ^{109}Cd détectable dans les organes autres que le tractus chez les larves exposées pour 140 jours suggère aussi que peu du métal se rend aux autres organes. Ces conclusions sont tirées en prenant en considération la nature semi-quantitative de l'autoradiographie. Parce que les autoradiogrammes sont obtenus de façon à éviter la surexposition des tissus les plus marqués, dans notre cas le tractus digestif, la quantité relativement petite de ^{109}Cd pouvant se retrouver dans les autres organes (estimée à moins de 5% du Cd total dans l'animal) ne serait pas révélée.

L'explication la plus probable pour le confinement du Cd à une petite section du mésenteron (l'intestin moyen) est que l'accumulation du métal est liée à la structure physique et à la fonction physiologique de l'intestin. La section antérieure du mésenteron postérieur, le site principal de l'accumulation du Cd par les chironomides dans ces expériences, a été caractérisée dans plusieurs études. Des études histochimiques et cytologiques du tractus digestif de *Chironomus plumosus* ont démontré que cette section du mésenteron est riche en mitochondries et en phosphatase alcaline, suggérant qu'une absorption active s'effectue dans cette région de l'intestin (Pierson, 1956). Chez *C. thummi*, l'épithélium du mésenteron postérieur a de longs microvillis et de nombreuses mitochondries apicales suggérant, une fois de plus, que de l'absorption s'effectue dans cette section du mésenteron (Seidman et al., 1986a). Ces études supportent l'hypothèse que le Cd est assimilé dans la région antérieure du mésenteron postérieur. Le mésenteron est aussi rapporté comme étant le site principal d'absorption de l'élément essentiel Ca dans les insectes terrestres (Taylor, 1985). Le Cd assimilé par les larves de *Chironomus* pourrait entrer par les voies utilisées par le Ca. Les résultats du deuxième volet de la thèse supportent cette hypothèse.

6.2 La prise en charge du Cd

Dans nos expériences, lorsque les concentrations de Ca^{2+} étaient augmentées en gardant une activité de Cd^{2+} fixe, l'accumulation du Cd était inhibée, supportant l'hypothèse que le Cd entre dans *C. staegeri* par une voie calcique. Selon le modèle de l'ion libre (Free Ion Activity Model; FIAM) (Campbell, 1995), l'accumulation du Cd par *C. staegeri* devrait être proportionnelle à l'activité de l'ion Cd^{2+} plutôt qu'à la concentration de Cd total dissous. Ce modèle (FIAM) présume que le taux de réaction du Cd avec les sites critiques à la surface biologique est rapide comparé au taux de transfert à travers la membrane. Pour cette raison, l'interaction du Ca et du Cd avec les sites de prise en charge retrouvés chez *C. staegeri* peut être décrite de façon simplifiée par les réactions de pseudo-équilibre suivantes :



Où $\equiv\text{SCd}$, $\equiv\text{SCa}$ représentent les sites occupés par Cd ou Ca et $\equiv\text{S}$ représente les sites qui sont libres de Cd ou de Ca; K_{Cd} et K_{Ca} sont des constantes de pseudo-équilibre. Pour simplifier la notation, on ne tient pas compte des charges sur les sites. La concentration totale des sites de prise en charge est donnée par :

$$[\text{S}_T] = [\equiv\text{S}] + [\equiv\text{SCd}] + [\equiv\text{SCa}] \quad (3)$$

Si nous supposons que seulement une petite fraction des sites est occupée par le Cd (i.e., $[\equiv\text{SCd}] \ll \text{S}_T$), l'équation (3) devient

$$[\text{S}_T] = [\equiv\text{S}] + [\equiv\text{SCa}] \quad (4)$$

L'équation (1) peut s'exprimer comme

$$[\equiv\text{S}] = [\equiv\text{SCd}] / K_{\text{Cd}} [\text{Cd}^{2+}] \quad (5)$$

et l'équation (2) peut être transformée en

$$[\equiv\text{SCa}] = K_{\text{Ca}} [\equiv\text{S}] [\text{Ca}^{2+}] \quad (6)$$

La substitution des équations (5) et (6) dans l'équation (4) donne

$$[\text{S}_T] = [\equiv\text{SCd}] / K_{\text{Cd}} [\text{Cd}^{2+}] + K_{\text{Ca}} [\equiv\text{S}] [\text{Ca}^{2+}] \quad (7)$$

La substitution de l'équation (5) dans le deuxième élément de l'équation (7) nous donne

$$[\text{S}_T] = \frac{[\equiv\text{SCd}]}{K_{\text{Cd}} [\text{Cd}^{2+}]} + \frac{K_{\text{Ca}} [\equiv\text{SCd}] [\text{Ca}^{2+}]}{K_{\text{Cd}} [\text{Cd}^{2+}]} \quad (8)$$

L'extraction du terme commun, $[\equiv\text{SCd}] / K_{\text{Cd}} [\text{Cd}^{2+}]$, donne

$$[\text{S}_T] = \frac{[\equiv\text{SCd}]}{K_{\text{Cd}} [\text{Cd}^{2+}]} \{1 + K_{\text{Ca}} [\text{Ca}^{2+}]\} \quad (9)$$

Si nous exprimons l'équation (9) en fonction de $[\equiv\text{SCd}]$, nous avons

$$[\equiv\text{SCd}] = \frac{S_T K_{\text{Cd}} [\text{Cd}^{2+}]}{1 + K_{\text{Ca}} [\text{Ca}^{2+}]} \quad (10)$$

Si nous supposons que le Cd accumulé pendant un certain temps par *C. staegeri* est proportionnel à $[\equiv\text{SCd}]$, c'est à dire que

$$[\text{Cd}]_{C. \text{staegeri}} = k [\equiv\text{SCd}] \quad (11)$$

où k est une constante de proportionnalité. La combinaison des équations (10) et (11) donne

$$[\text{Cd}]_{C. \text{staegeri}} = k [\equiv\text{SCd}] = \frac{k [S_T] K_{\text{Cd}} [\text{Cd}^{2+}]}{1 + K_{\text{Ca}} [\text{Ca}^{2+}]} \quad (12)$$

Parce que ces expériences ont été effectuées à une concentration (activité) de Cd^{2+} constant, le numérateur est une constante si nous supposons que S_T est constant parmi les organismes. $[\text{Cd}]_{C. \text{staegeri}}$ peut être exprimé en fonction de $[\text{Ca}^{2+}]$ par régression non-linéaire. Nos estimés pour kS_TK_{Cd} et K_{Ca} (obtenus avec l'algorithme Marquardt-Levenberg) sont $0.226 \pm 0.018 \text{ L g}^{-1}$ et $975 \pm 28 \text{ L mol}^{-1}$, respectivement (valeurs \pm écart type). L'estimé de K_{Ca} est proche de la valeur rapportée pour les sites de liaison sur les branchies de poisson (1100 L mol^{-1} : Reid et McDonald, 1991). Utilisant les valeurs estimées pour ces constantes, nous pouvons exprimer l'accumulation du Cd par *C. staegeri* en fonction de la concentration de Ca dans leur milieu (courbe dans Section 2,

Article No. 2, Figure 1). La correspondance entre la courbe théorique et nos observations est frappante.

Nous pouvons employer notre modèle, testé en laboratoire, pour prédire à quel point la concentration de Ca pourrait influencer l'accumulation du Cd dissous par *C. staegeri* dans le milieu naturel. Si la concentration de Ca dissous ($[Ca]$) dans trois lacs hypothétiques, A, B et C est de 0.05, 0.5 et 5.0 mM, alors on prédit que les concentrations de Cd dans des larves de *C. staegeri* de ces lacs seront dans le rapport 5.6 : 4 : 1, pour une concentration de Cd ($[Cd]$) dissous donné. C'est-à-dire que l'effet présumé de la compétition du Ca sur l'accumulation du Cd est non-linéaire ; la réduction de la bioaccumulation du Cd est seulement de 30% lors d'une augmentation d'un ordre de grandeur de $[Ca]$ entre 0.05 et 0.5 mM $[Ca]$ (lac A vs. lac B) tandis que la réduction est plus importante pour la même augmentation de 10 fois de $[Ca]$ entre 0.5 et 5 mM (lac B vs. lac C). Ceci peut aussi s'expliquer de façon plus conceptuelle : lorsque la concentration du Ca est faible, la compétition parmi les ions Ca^{2+} , et donc aussi entre le Cd et le Ca, n'est pas forte car les sites de prise en charge ne sont pas saturés. Par contre, lorsque la concentration de Ca est élevée et que les sites d'entrée du Ca approchent la saturation, la compétition pour passer dans le canal calcique est plus forte. Ce phénomène est similaire à celui décrit en enzymologie par l'équation de cinétique Michaelis-Menten (Simkiss, 1996). Ces prédictions d'interaction Cd-Ca chez *C. staegeri* sont basés sur la supposition que le nombre de sites de prise en charge du Ca est le même pour toutes les larves sans égard à la $[Ca]$ de leur milieu respectif. Ceci est plausible, car il est connu que les insectes terrestres (Taylor, 1986) et aquatiques (Barkai et Williams, 1983) font la régulation du Ca non en modulant le prise en charge mais plutôt en excréant le Ca excédentaire.

Un exemple de l'influence de la $[Ca]$ dissous sur $[Cd]$ dans les animaux sur le terrain provient des données pour l'amphipode *Hyalella azteca* pour laquelle on rapporte que ses concentrations de Cd sont plus basses dans les lacs ayant des $[Ca]$ plus élevées (Stephenson et Mackie, 1988). Dans une autre étude de terrain sur des lacs similaires, on a rapporté que $[Cd]$ dans l'insecte *Chaoborus punctipennis* n'était pas influencé par $[Ca]$

dans son milieu (Hare et Tessier, 1996). Il y a deux explications possibles pour la différence dans les conclusions de ces études. Premièrement, parce que des lacs de forte acidité étaient inclus dans la deuxième étude, la forte compétition H^+ - Cd^{2+} pour le site de prise en charge du Cd a pu masquer l'influence du [Ca] dissous sur le [Cd] de l'insecte. Deuxièmement, les concentrations et les besoins en Ca des crustacés sont supérieurs à ceux des insectes (Taylor, 1986) et la compétition Cd-Ca est alors probablement plus importante.

L'inhibition de l'accumulation du Cd par les bloqueurs de canaux calciques dans nos expériences est un deuxième appui à l'hypothèse que le Cd entre dans les insectes par les canaux calciques. Le verapamil, un bloqueur spécifique aux canaux calciques, agit sur les canaux calciques du type qui dépend du potentiel (L-type) (Hosey et Lazdunski, 1988) et du type contrôlé par des récepteurs (Hughes et al., 1986). Il désactive le canal calcique en se liant avec un domaine récepteur spécifique se trouvant sur une grande protéine transmembranaire constituant une bonne portion du canal calcique (Triggle, 1991; Triggle, 1992). Le lanthane (La), l'autre antagoniste calcique employé dans ces expériences, forme un lien très fort avec le site de liaison, empêchant le passage du Ca à travers les canaux calciques (Weiss, 1974).

Dans nos expériences, nous avons supposé que l'assimilation du Cd était équivalente à l'accumulation de Cd. Ceci est basé sur la probabilité que l'élimination du Cd par les insectes était insignifiante pour la durée de l'expérience (dans des expériences préliminaires, données non-publiées, la perte de Cd n'était pas significative (test U de Mann-Whitney, $p < 0.05$, voir annexe 2) après 14 jours sans exposition au Cd dans une expérience « pulse et chase »). Advenant le cas où l'élimination du Cd était plus importante qu'estimée, l'inhibition de l'assimilation du Cd aurait été surestimée dans nos expériences. Il faut aussi noter que l'utilisation d'organismes vivants dans nos expériences réduit la probabilité d'effets physiologiques anormaux mais l'utilisation d'organismes entiers a réduit le contrôle que nous pouvions exercer sur les conditions expérimentales. Par exemple, nous ne pouvions pas écarter la possibilité que les concentrations de Ca^{2+} , La^{2+} , Cd^{2+} et verapamil aient été influencées par la sorption sur les fèces des larves.

On a rapporté que le verapamil et le La inhibent la prise en charge du Cd par les branchies excisées des bivalves marins d'environ 50% (250 μM verapamil pour 3 heures: Roesijadi et Unger, 1993) et d'environ 40% (0.1-10 μM La pour 1 heure: Holwerda et al., 1989), respectivement. Nos résultats avec des concentrations similaires de verapamil (300 μM) et de La (10 μM) ont donné des taux d'inhibition plus élevés; 85% et 73% respectivement. Ces différences peuvent probablement être associées à des différences physiologiques entre les mollusques et les insectes. Contrairement aux insectes, les mollusques et crustacés utilisent de grandes quantités de Ca pour la construction des parties dures de leur corps, telles que des coquilles ou des exosquelettes. Par exemple, les mollusques bivalves construisent un coquillage dur composé de plusieurs couches de carbonate de calcium. Parmi les arthropodes, les crustacés décapodes, tels que les crabes et homards, la cuticule basée sur la chitine est durcie par la calcification, i.e., la déposition du carbonate de calcium. Chez les insectes, le durcissement de la cuticule est fait par la sclérotisation par laquelle des protéines forment des "cross-linkages" (Hepburn, 1985). Les besoins en Ca sont donc considérablement moindres chez les insectes que chez de nombreux crustacés. Roesijadi et Unger (1993) ont rapporté que les antagonistes de canaux calciques inhibaient seulement partiellement (22%) la prise en charge du Ca dans les branchies de *Crassostrea virginica* et ils ont suggéré l'existence d'autres voies majeures d'entrée du Ca. Il n'y a pas encore d'évidence qui confirme ni infirme cette hypothèse, par contre, il est possible de spéculer que l'absence de telles voies calciques chez les insectes pourrait expliquer la plus grande inhibition observée dans notre étude.

6.3 Discussion générale

D'après nos résultats, il est possible de proposer le scénario suivant : Le Cd entre dans *C. staegeri* dans la région antérieure du mésenteron postérieur par les voies d'entrée du Ca, qui sont probablement des canaux calciques. Le Cd est retenu dans l'épithélium, ne traversant pas cette barrière, du moins pas en grande quantité.

Il est intéressant de comparer ce scénario basé sur nos résultats avec ce que nous connaissons des autres organismes aquatiques. Présentement, le modèle le plus développé

pour la prise en charge du Cd par les organismes aquatiques est celui pour les branchies de poissons. L'on pense que l'assimilation du Cd^{2+} par l'épithélium branchial se fait par diffusion du Cd^{2+} à travers des canaux de Ca^{2+} , tel que supporté par des expériences employant des concentrations élevées de Ca^{2+} et des bloqueurs de canaux calciques (Verbost et al., 1987; Verbost et al., 1989; Wicklund Glynn, et al., 1994). Il a été rapporté que l'exposition préalable au Cd pour 6 heures ou plus a réduit ensuite la prise en charge du Ca ainsi que le Cd chez des truites (Verbost et al., 1989). Verbost et al. (1989) ont rapporté que le Cd^{2+} n'interfère pas directement avec l'entrée du Ca^{2+} à travers la membrane apicale de la cellule épithéliale, mais plutôt qu'il inhibe l'extrusion du Ca par la membrane basolatérale, l'interface avec le système circulatoire de l'animal. Ils suggèrent que ceci cause une augmentation dans la concentration de Ca^{2+} cytosolique dans la cellule épithéliale, qui, à son tour, cause la fermeture des canaux calciques. Étant donné la durée de nos expériences, il est possible que l'accumulation du Cd ait causé une diminution des taux de prise en charge du Ca et du Cd. Ceci aurait pour effet de causer une sous-estimation des effets du Ca^{2+} et des bloqueurs dans nos expériences, car le témoin (ayant la plus forte accumulation de Cd) serait le plus affecté par ce mécanisme de rétroaction.

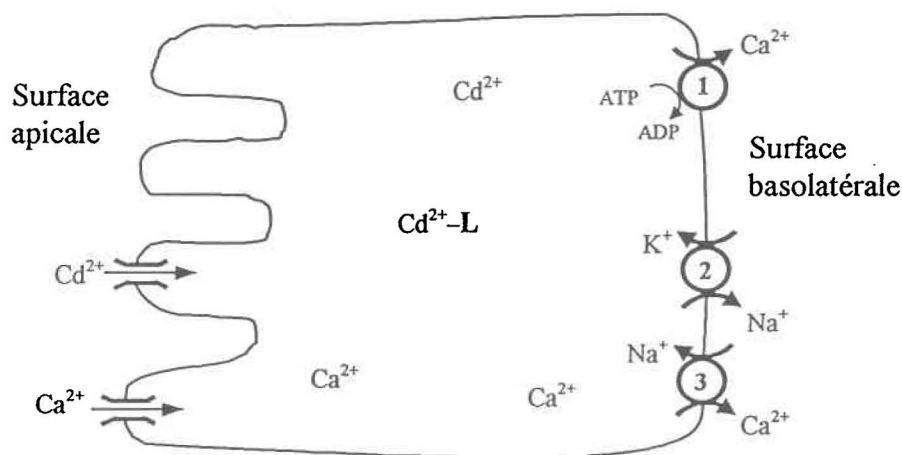


Figure 5. Schéma du mouvement du Ca et du Cd dans une cellule épithéliale

(adapté de Taylor, 1984). ① : Ca-ATPase, l'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie pour l'extrusion active du Ca. ② : Na⁺-K⁺-ATPase hydrolyse le l'ATP pour extruder 3Na⁺ en échange de l'entrée de 2K⁺. ③ : Échangeur Na⁺-Ca⁺ qui lie la sortie du Ca²⁺ avec l'entrée du Na⁺. Les molécules qui complexent le Cd sont représentées par « L »

Chez *C. staegeri*, le sujet de notre étude, la majorité du Cd ne traverse pas la première couche de cellules dans l'intestin mais plutôt il s'y accumule (Section 2, article 1, results). Ceci indique que le Cd entre dans ces cellules par la membrane apicale mais ne traverse pas la membrane basolatérale pour atteindre l'hémolymphe de l'insecte. Ceci est contraire à ce qui est observé chez les crustacés, où une proportion significative du Cd accumulé se retrouve dans l'hémolymphe (Wright, 1980; Bjerregaard, 1990) ainsi que dans les organes autres que les sites de prise en charge tels que les gonades (Davies et al., 1981) et les muscles (White and Rainbow, 1986). Le Cd traverse aussi la barrière épithéliale chez les mollusques; e.g. le rein est un site majeur d'accumulation du Cd (Davies et al., 1981; Everaarts, 1990; Streit et Winter, 1993). Même si le Cd entre dans le système circulatoire des crustacés, une grande proportion du Cd accumulé par l'animal est retenue dans les organes responsables pour la prise en charge du Cd. En fait, les concentrations de Cd accumulé sont souvent les plus élevées dans les branchies (Davies et al., 1981; White et Rainbow, 1986; Bjerregaard et Depledge, 1994) et l'hépatopancréas (Ray et al., 1980; Wright, 1980; White et Rainbow, 1986; Munger et al., 1997). La localisation de telles grandes quantités de Cd dans l'hépatopancréas peut être liée à la fonction d'absorption de cet organe qui est un analogue du mésenteron des insectes.

Deux mécanismes possiblement complémentaires pourraient expliquer la rétention du Cd dans l'épithélium du tractus digestif de *C. staegeri* (Fig. 5). Le premier mécanisme implique la perméabilité de la membrane basolatérale de l'épithélium du tractus. Présentement, il y a peu de connaissances sur les mécanismes du transport du Cd à travers l'épithélium des invertébrés, particulièrement le transfert du Cd dans ces cellules vers le

système circulatoire. Chez les branchies de poisson, la Ca-ATPase qui pompe le Ca vers l'extérieur des cellules à travers la membrane basolatérale est bloquée par le Cd, empêchant ainsi l'extrusion du Cd par cette voie (Verbost et al., 1989). Il est très possible que ceci arrive chez les insectes aussi. Si le blocage des Ca-ATPases de la membrane basolatérale est un phénomène généralisé, l'explication la plus probable pour le passage du Cd à travers l'épithélium des autres organismes est que le Cd emploie d'autres routes. Le Cd pourrait suivre des voies paracellulaires comme le Ca chez l'intestin des mammifères (Nellans et Kimberg, 1978) ou il pourrait être extrudé à travers la membrane basolatérale par d'autres pompes ou ionophores. Par exemple, dans l'intestin des poissons, le Ca-ATPase basolatérale est bloquée par le Cd, mais l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ reste partiellement fonctionnel, probablement extrudant le Cd^{2+} à travers la membrane basolatérale (Schoenmakers et al., 1992). Il est donc possible de poser l'hypothèse que la rétention du Cd par le mésenteron de *C. staegeri* est au moins en partie due au blocage du Ca-ATPase basolatérale par le Cd. Cette pompe ionique peut être un mécanisme important d'extrusion du Ca tel qu'observé dans les branchies de poisson (Verbost, 1989). Par contre, dans le mésenteron de l'insecte terrestre *Calliphora vicina* (« blowfly »), 65% du transport du Ca vers l'hémolymphe est réalisé par l'échangeur $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$, l'autre 35% de l'extrusion basolatérale du Ca est attribuée à l'activité du Ca-ATPase (Taylor, 1984). Ceci nous amène à suggérer que le blocage de l'extrusion du Cd par la membrane basolatérale n'est probablement pas le mécanisme le plus important dans la rétention du Cd chez *C. staegeri*.

La deuxième explication pour la rétention du Cd dans l'épithélium du mésenteron est que le Cd cytosolique serait séquestré par des protéines de détoxification, telles que les métallothionéines, dès son entrée dans la cellule épithéliale. Ces ligands ont été rapportés chez *Chironomus yoshimatsui* (Yamamura et al., 1983) et *Chironomus thummi* (Seidman et al., 1986a) ainsi que chez d'autres ordres d'insectes aquatiques tels que Ephemeroptera (Suzuki et al., 1984; Aoki et al., 1989; Suzuki et al., 1989) et Plecoptera (Everard et Swain, 1983). Des protéines-ligands de Cd ont aussi été rapportés chez *Drosophila melanogaster*, où, comme *C. staegeri*, plus de 95% du Cd bioaccumulé se retrouve dans le mésenteron (Maroni et al., 1986). Chez ces insectes, suffisamment de ce ligand

protéique est induit dans quelques heures pour lier 90-95% du Cd ingéré (Maroni et Watson, 1985). La vaste majorité du précurseur ARN de la protéine-ligand se retrouve dans le tractus digestif suggérant que cet organe est le site de prise en charge ainsi que de stockage du Cd chez *D. melanogaster*. Il est plausible de proposer que le même scénario d'assimilation et de détoxification ait lieu dans le mésenteron de *C. staegeri*.

Le rôle de l'intestin comme site d'assimilation du Cd chez *Chironomus* est aussi supporté par des études qui démontrent que le Cd accumulé par les larves est limité à l'intestin après aussi peu que 6 heures (Seidman et al., 1986b) ou 2 jours (Sumi et al., 1984) d'exposition au métal. De plus, il n'y a pas d'autres organes qui sont susceptibles de jouer un rôle dans l'assimilation du Cd parce que les chironomides n'ont pas de branchies et l'on croit que les papilles anales (Fig. 2) absorbent seulement les ions monovalents (Taylor, 1986). L'hypothèse du tractus comme site de prise en charge du Cd est aussi appuyée par les observations chez les insectes terrestres où la vaste majorité du Cd bioaccumulé se trouve dans le tractus (Aoki et al., 1984; Suzuki et al., 1984) qui est aussi la principale surface d'échange de ces animaux (Chapman, 1985; Dow, 1986).

L'accumulation du Cd dans le tractus est observée chez d'autres types d'organismes tels que les crustacés (Canli et Furness, 1995; Munger et al., 1997) et les poissons (Brown, et al., 1990; Glynn et al., 1992) mais dans ces types d'animaux, les branchies sont généralement aussi un site important d'accumulation du Cd (White et Rainbow, 1986; Wicklund et al., 1988;). Chez la grande majorité des animaux aquatiques, les branchies servent non seulement à l'échange des gaz, mais aussi à une bonne partie de ionorégulation de l'animal (Schmidt-Neilsen, 1983). Ce rôle d'assimilation d'ions essentiels explique l'accumulation du Cd dans les branchies. Il est possible que l'héritage terrestre des insectes aquatiques explique le fait que bien des insectes aquatiques ne possèdent pas de branchies et ceux qui en possèdent, tels que l'éphémère *Hexagenia rigida*, n'y accumulent pas de quantités significatives de Cd (Hare et al., 1991b).

Si le Cd est assimilé et stocké dans la partie antérieure du mésenteron postérieur, il est nécessaire pour l'animal d'y détoxifier le métal aussi. Comme il a déjà été indiqué, la

présence de protéines ayant la fonction de lier le Cd a été démontrée dans les insectes aquatiques (Everard et Swain, 1983; Yamamura et al., 1983; Suzuki et al., 1984; Seidman et al., 1986a; Aoki et al., 1989; Suzuki et al., 1989) mais le destin du Cd ainsi lié n'est pas encore connu. Plusieurs auteurs (Jeantet et al., 1974; Hare, 1992; Krantzberg et Stokes, 1990) ont suggéré que le Cd est stocké dans des formes plus permanentes telles que des granules, mais ce mécanisme n'a jamais été démontré de façon concluante chez les insectes. Les seuls granules contenant du Cd qui ont été rapportées étaient certainement des artefacts expérimentaux, car le Cd avait été injecté directement dans l'hémolymphe de l'insecte (Martoja et al., 1983) contournant ainsi la barrière très efficace de l'épithélium digestif (Martoja et al., 1983; Hopkins, 1989). Chez *Chironomus thummi*, des lysosomes hétérogènes, des granules entourés de membranes et des corps résiduels ont été observés dans le mésenteron postérieur, suggérant fortement que le Cd y est détoxifié en forme inerte telle que des granules, suite à sa liaison avec les protéines-ligands (Seidman et al., 1986a).

Étant donné qu'au moins la grande majorité du Cd bioaccumulé est retenu dans le mésenteron, il est fort probable que l'élimination du métal observée chez les chironomides (Timmermans et al., 1992; Martin, 1992) est due à la perte de cellules épithéliales. Chez *C. thummi*, des cellules dégénérées contenant du ^{109}Cd ont été observées dans le lumen du tractus digestif (Seidman et al., 1986b). Il est aussi possible que la mort de certaines cellules épithéliales soit accélérée par l'accumulation de Cd, car la désorganisation cytoplasmique a été observée dans des cellules où l'accumulation du Cd était la plus forte chez *C. thummi* (Seidman et al., 1986b).

Plusieurs effets toxiques du Cd ont été observés chez les chironomides, tels que la réduction de croissance (Anderson et al., 1980; Timmermans et al., 1992), des effets sur l'émergence (Wentzel et al., 1977; Pascoe et al., 1989; McCahon et Pascoe, 1991) et la mortalité (Rao et Saxena, 1981; McCahon et Pascoe, 1991; Timmermans et al., 1992). Pour l'instant, les mécanismes impliqués dans la toxicité du Cd ne sont pas connus, mais

d'après nos résultats, ils sont probablement reliés à une pathologie au site d'accumulation du Cd pouvant causer, à son tour, des manifestations telles que :

- Des coûts métaboliques supplémentaires occasionnés par la production des protéines qui lient le Cd pour le détoxifier;
- Le dérangement de l'homéostasie calcique et même de l'ionorégulation générale;
- L'endommagement de l'épithélium de la région antérieure du mésenteron postérieur et donc de son assimilation de nutriments et d'éléments essentiels; et
- Des coûts métaboliques additionnels occasionnés par le taux de renouvellement plus élevé des cellules épithéliales du mésenteron.

7. Conclusions

7.1 Conclusions générales

Une petite région du tractus digestif est le site d'accumulation de la vaste majorité du Cd retrouvé chez les larves de quatrième stade de *Chironomus staegeri*. Le régime d'exposition, dans l'eau seulement pour une courte période ou avec du sédiment pour une longue période, n'affecte pas le patron de distribution du Cd parmi les tissus de l'insecte. Le Cd ne semble pas traverser l'épithélium de l'intestin. Parce que l'organe où l'accumulation du Cd est restreinte ne change pas avec le régime d'exposition, nous proposons que l'organe où le Cd aurait son effet toxique ne changerait pas non plus.

Nous croyons que le fait que l'accumulation du Cd soit restreinte à la section antérieure du mésenteron postérieur s'explique par la différenciation fonctionnelle et morphologique de cette partie du tractus digestif (Seidman et al., 1986b; Pierson, 1956). Nos résultats suggèrent fortement que le Cd entre dans les organismes par des voies d'entrée du Ca : les deux bloqueurs de canaux calciques employés, le verapamil et le lanthane, ont inhibé l'accumulation du Cd significativement. De plus, l'accumulation du Cd est inversement proportionnelle à la concentration de Ca dans le milieu et cet effet calcique suit un modèle théorique simple basé sur des principes fondamentaux de chimie et de biologie. Il est possible, avec ce modèle, d'estimer que l'effet de la concentration en Ca du milieu naturel sur l'accumulation du Cd dissous peut être considérable, surtout dans les eaux ayant une dureté élevée.

Il semble donc, que le Cd entre dans *C. staegeri* par la région antérieure du mésenteron postérieur par les mêmes voies que le Ca. L'épithélium de cette région du tractus digestif est une barrière très efficace au Cd, protégeant probablement ainsi les autres organes de l'insecte contre les effets néfastes possibles du Cd.

Parce que nous savons que le Cd s'accumule dans la section antérieure du mésenteron postérieur et que la prise en charge du Cd semble être par des voies calciques, nous pouvons poser l'hypothèse corollaire que l'accumulation du Cd dans cette section du tractus est due à sa fonction de prise en charge du Ca.

7.2 Sommaire des contributions à la connaissance

Pour résumer les contributions originales de cette étude à la science, il faut noter que cette étude est la première à :

- démontrer la distribution du Cd dans un invertébré aquatique entier plutôt que dans des parties disséquées ;
- plus particulièrement, employer une approche de microautoradiographie de corps entiers («whole-body microautoradiography») chez un invertébré aquatique;
- examiner la distribution fine du Cd le long du gradient fonctionnel et morphologique du tractus digestif de l'insecte *Chironomus*;
- étudier l'effet du régime d'exposition au Cd sur le patron de distribution du Cd dans un insecte aquatique;
- étudier le mécanisme de la prise en charge du Cd chez les insectes;
- employer un modèle théorique pour évaluer l'effet en milieu contrôlé de la compétition entre le Cd et le Ca sur l'accumulation du Cd par un invertébré.

Les nouvelles connaissances scientifiques apportées par cette étude sont que :

- l'accumulation du Cd est confinée, au moins pour la plus grande partie, à la partie antérieure du mésenteron postérieur chez *Chironomus staegeri*;
- le régime d'exposition, a) pour une courte période dans l'eau seulement ou b) pour une longue période avec du sédiment, n'affecte pas le patron de distribution du Cd parmi les tissus de l'insecte;

- l'accumulation du Cd par l'intestin de l'animal ne signifie pas nécessairement que le vecteur du Cd est la nourriture;
- le Cd est très probablement assimilé par des voies calciques chez les insectes.

7.3 Avenues de recherche

Les perspectives de recherches que ce travail suscite sont :

- L'étude des mécanismes de transfert du Cd à travers la membrane basolatérale de la cellule épithéliale.
- L'effet du Cd sur la prise en charge du Ca et l'homéostasie calcique des insectes.
- L'élucidation des mécanismes de détoxification prenant place dans le mésenteron de l'insecte tels que l'induction des métalloprotéines.
- La mesure de ces mécanismes en fonction des régimes d'exposition et des effets toxiques observés.
- Examiner ces mécanismes de détoxification en milieu naturel.

8. Bibliographie

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et J.D. Watson (1983) Molecular biology of the cell. Garland, New York, 1146 pp.
- Anderson, R.L., C.T. Walbridge et J.T. Fiandt (1980) Survival and growth of *Tanytarsus dissimilis* (Chironomidae) exposed to copper, cadmium, zinc, and lead. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 9, 329-335.
- Anderson, R.V. et J.E. Brower (1978) Patterns of trace metal accumulation in crayfish populations. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 20, 120-127.
- Aoki, Y., K. T. Suzuki et K. Kubota (1984) Accumulation of cadmium and induction of its binding protein in the digestive tract of fleshfly (*Sarcophaga peregrina*) larvae. Comp. Biochem. Physiol., 77C, 279-282.
- Aoki, Y., S. Hatakeyama, N. Kobayashi, Y. Sumi, T. Suzuki et K.T. Suzuki (1989) Comparison of cadmium-binding protein induction among mayfly larvae of heavy metal resistant (*Baetis thermicus*) and susceptible species (*B. yoshinensis* and *B. sahoensis*). Comp. Biochem. Physiol. 93C, 345-347.
- Barkai, A.I. et R.W. Williams (1983) The exchange of calcium in larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. J. Exp. Biol. 104, 139-148.
- Bay, E.C. et L.D. Anderson (1966) Studies with the mosquitofish, *Gambusia affinis*, as a *Chironomus* control. Ann. Entomol. Soc. Amer. 59, 150-153.
- Bjerregaard, P. et M.H. Depledge (1994) Cadmium accumulation in *Littorina littorea*, *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas*: the influence of salinity and calcium ion concentrations. Mar. Biol. 119, 385-395.
- Blazka, M.E. et Z.A. Shaikh (1991) Differences in cadmium and mercury uptakes by hepatocytes: Role of calcium channels. Toxicol. Appl. Pharmacol. 110, 355-363.
- Borgman, U., K.M. Ralph et W.P. Norwood (1989) Toxicity test procedures for *Hyalella azteca*, and chronic toxicity of cadmium and pentachlorophenol to *H. azteca*, *Gammarus fasciatus* and *Daphnia magna*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 18, 756-764.
- Boudou, A., D. Georgescauld, et J.P. Desmazes (1983) Ecotoxicological role of the membrane barriers in transport and bioaccumulation of mercury compounds. Dans Aquatic Toxicology, Edité par J.O. Nriagu, J. Wiley and Sons, New York, pp. 117-136.
- Boudou, A., M. Delnomdedieu, D. Georgescauld, F. Ribeyre et E. Saouter (1991) Fundamental roles of biological barriers in mercury accumulation and transfer in freshwater ecosystems (analysis at organism, organ, cell and molecular levels). Water, Air, Soil Pollut. 56, 807-821.

- Brown, D.A., S.M. Bay et G.P. Hershelman (1990) Exposure of scorpionfish (*Scorpaena guttata*) to cadmium: effects of acute and chronic exposure on the cytosolic distribution of cadmium, copper and zinc. *Aquat. Toxicol.* 16, 295-310.
- Bryan, G.W. et W.J. Langston (1992) Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environ. Pollut.* 76, 89-131.
- Butler, M.G. et D.H. Anderson (1990) Cohort structure, biomass, and production of a merovoltine *Chironomus* population in a Wisconsin lake. *J. N. Amer. Benthological Soc.* 9, 180-192.
- Cain, D.J., S.N. Luoma, J.L. Carter et S.V Fend (1992) Aquatic insects as bioindicators of trace element contamination in cobble bottom rivers and streams. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, 2141-2154.
- 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 A. Tessier et D.R. Turner, John Wiley and Sons, New York, pp. 45-102.
- 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.
- Canli, M. et R.W. Furness (1995) Mercury and cadmium uptake from seawater and from food by the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 819-828
- Chapman, R.F. (1985). Structure of the digestive system. Dans: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, édité par G.A. Kerkut et L.I. Gilbert, Pergamon Press, New York, vol. 4, pp. 165-211
- Clements, W.H. (1994) Benthic invertebrate community responses to heavy metals in the Upper Arkansas River Basin, Colorado. *J. N. Am. Benthological Soc.* 13, 30-44.
- Craig, A., L. Hare, A. Tessier et P.-M. Charest (1998) Effect of exposure regime on the internal distribution of cadmium in *Chironomus staegeri* larvae (Insecta, Diptera). *Aquat. Toxicol.* In press.
- Croteau, M.-N., L. Hare et A. Tessier (1997) Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. *Environ. Sci. Technol.*, in review.
- Danscher, G., J.O.R. Norgaard and E. Baatrup (1987) Autometalography: Tissue metals demonstrated by a silver enhancement kit. *Histochemistry* 86, 465-469.
- Davies, I.M., G. Topping, W.C. Graham, C.R. Falconer, A.D. McIntosh and D. Saward (1981) Field and experimental studies on cadmium in the edible crab *Cancer pagarus*. *Mar. Biol.* 64, 291-297.

- Davies, P.H., W.C. Gorman, C.A. Carlson et S. P. Brinkman (1993) Effect of hardness on bioavailability and toxicity of cadmium to rainbow trout. *Chem. Speciation and Bioavailability* 5, 67-77.
- Dillon, P.J., R.A. Reid et R. Girard (1986) Changes in the chemistry of lakes near Sudbury, Ontario following reductions of SO₂ emissions. *Water, Air, Soil Pollut.* 31, 59-65.
- Dow, J.A.T. (1986) Insect midgut function. Dans *Advances in Insect Physiology*, édité par P.D. Evans et V.B. Wigglesworth, Academic Press, Toronto, pp. 187-328.
- Eisenman, G. and J.A. Dani (1987) An introduction to molecular architecture and permeability of ion channels. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 16, 205-226.
- Everaarts, J.M. (1990) Uptake and release of cadmium in various organs of the common mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 560-567.
- Everard, L.B. et R. Swain (1983) Isolation, characterization and induction of metallothionein in the stonefly *Eusthenia spectabilis* following exposure to cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.* 75C, 275-280.
- Förstner, U. (1980) Inorganic pollutants, particularly heavy Metals in estuaries. Dans *Chemistry and biogeochemistry of estuaries*, Édité by E. Olausson et I. Cato, Wiley, New York, pp. 307-348
- Foulkes, E.C. (1988) On the mechanism of transfer of heavy metals across cell membranes. *Toxicol.* 52, 263-272.
- Fu, H., R.A.C. Lock et S.E. Wendelaar Bonga (1989) Effect of cadmium on prolactin cell activity and plasma electrolytes in the freshwater teleost *Oreochromis mossambicus*. *Aquat. Toxicol.* 14, 295-306.
- Ghosh, A.R. et P. Chakrabarti (1993) Histopathological and histochemical changes in liver, pancreas and kidney of the freshwater fish *Heteropneustes fossilis* (Bloch) exposed to cadmium. *Environ. Ecol.* 11, 185-188.
- Glynn, A.W., L. Andersson, S. Gabring et P. Runn (1992) Cadmium turnover in minnows, *Phoxinus phoxinus*, fed ¹⁰⁹Cd-labeled *Daphnia magna*. *Chemosphere* 24, 359-368.
- Green, W.N. et O.S. Andersen (1991) Surface charges and ion channel function. *Annu. Rev. Physiol.* 53, 341-359
- Hare, L. (1992) Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation, and toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 327-369.
- Hare, L. et A. Tessier (1996) Predicting animal cadmium concentrations in lakes. *Nature* 380, 430-432.
- Hare, L. et P.G.C. Campbell (1992) Temporal variations of trace metals in aquatic insects. *Freshwater. Biol.* 27, 13-27.

- Hare, L., A. Tessier et P.G.C. Campbell (1991a) Trace element distribution in aquatic insects: variations among genera, elements and lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 1481-1491.
- Hare, L., E. Saouter, P.G.C. Campbell, A. Tessier et R. Ribeyre (1991b) Dynamics of cadmium, lead, and zinc exchange between nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* (Ephemeroptera) and the environment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 39-47.
- Hare, L., et A. Tessier (1998) The aquatic insect *Chaoborus* as a biomonitor of trace metals in lakes. *Limnol. & Oceanogr.*, in press.
- Havas, M. et G.E. Likens (1985) Toxicity of aluminum and hydrogen ions to *Daphnia catawba*, *Holopedium gibberum*, *Chaoborus punctipennis*, and *Chironomus anthracinus* from Mirror Lake, New Hampshire. *Can. J. Zool.* 63, 1114-1119.
- Hemelraad, J., H.J. Herwig, E.G. van Donselaar, D.A. Holwerda et D.I. Zandee (1990) Effects of cadmium in freshwater clams. II. Ultrastructural changes in the renal system of *Anodonta cygnea*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 691-698.
- Hepburn, H.R. (1985) The integument. Dans *Fundamentals of insect physiology*, édité by M.S. Blum, New York, John Wiley and Sons, pp. 139-184.
- Hinkle, P.M., P.A. Kinsella et K.C. Osterhoudt (1987) Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *J. Biol. Chem.* 262, 16333-16337.
- Holwerda, D.A., J.A. de Knecht, J. Hemelraad et P.R. Veenhof (1989) Cadmium kinetics in freshwater clams. Uptake of cadmium by the excised gill of *Anodonta anatina*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 382-388.
- Hopkin, S.P. (1989) *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. London, U.K.: Elsevier, 366 pp.
- Hosey, M.M. et M. Lazdunski (1988) Calcium channels: Molecular pharmacology, structure and regulation. *J. Membrane Biol.* 104, 81-105.
- House, H.L. (1974) Digestion. Dans *The physiology of insecta*, 2 ed., édité par M. Rockstein. Academic Press, New York, pp 63-117.
- Hughes, B.P., S.E. Milton. G.J. Barritt et A.M. Auld (1986) Studies with verapamil and nifedipine provide evidence for the presence in the liver cell plasma membrane of two types of Ca²⁺ inflow transporters which are dissimilar to potential-operated Ca²⁺ channels. *Biochem. Pharmac.* 35, 3045-3052.
- Jackson, T.A. (1988) Accumulation of mercury by plankton and benthic invertebrates in riverine lakes of northern Manitoba (Canada): importance of regionally and seasonally varying environmental factors. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45, 1744-1757.

- Jeantet, A.-Y., R. Martoja et M. Truchet (1974) Rôle des sphérocristaux de l'épithélium intestinal dans la résistance d'un insecte aux pollutions minérales: données expérimentales obtenues par utilisation de la microsonde électronique et du micro-analyseur par émission ionique secondaire. C. R. Acad. Sc. Paris 278, 1441-1444.
- Kimball, K.D. et S.A. Levin (1985) Limitations of laboratory bioassays: the need for ecosystem-level testing. *BioSci.* 35, 165-171.
- Kosalwat, P. et A.W. Knight (1987) Chronic toxicity of copper to a partial life cycle of the midge, *Chironomus decorus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 16, 283-290.
- Krantzberg, G. et P.M. Stokes (1988) The importance of surface adsorption and pH in metal accumulation by chironomids. *Environ. Toxicol. Chem.* 7, 653-670.
- Krantzberg, G. et P.M. Stokes (1989) Metal regulation, tolerance, and body burdens in the larvae of the genus *Chironomus*. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 46, 389-398.
- Krantzberg, G. et P.M. Stokes (1990) Metal concentrations and tissues distribution in larvae of *Chironomus* with reference to X-ray microprobe analysis. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19, 84-93.
- Larsson, A., B.E. Bengtsson et C. Haux (1981) Disturbed ion balance in flounder, *Platichthys flesus* L. exposed to sublethal levels of cadmium. *Aquat. Toxicol.* 1, 19-35.
- Lowe, D.M. et K.R. Clarke (1989) Contaminant-induced changes in the structure of the digestive epithelium of *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 15, 345-358.
- Luoma, S.N. (1983) Bioavailability of trace metals to aquatic organisms - a review. *Sci. Total Environ.* 28, 1-22.
- Luoma, S.N. (1989) Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements. *Hydrobiologia* 176/177, 379-396.
- Luoma, S.N. et J.L. Carter (1991) Effects of trace metals on aquatic benthos. Dans Metal ecotoxicology: concepts and applications, Edité par M.C. Newman et A.W. McIntosh, Lewis Publ., Chelsea, Michigan, pp. 261-300
- Mackie, G.L. (1989) Tolerances of five benthic invertebrates to hydrogen ions and metals (Cd, Pb, Al). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 215-223.
- Madigosky, S.R., X. Alvarez-Hernandez et J. Glass (1991) Lead, cadmium, and aluminum accumulation in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* G. collected from roadside drainage ditches in Louisiana. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 253-258.
- Malley, D. F., P.S.S. Chang et R.H. Hesslein (1989) Whole lake addition of cadmium-109: radiotracer accumulation in the mussel population in the first season. *Sci. Total Environ.* 87-88, 397-417.
- Malley, D.F. (1996) Cadmium whole-lake experiment at the Experimental Lakes Area: an anachronism? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 1862-1870.

- Marigomez, J.A. et M.P. Ireland (1989) Accumulation, distribution and loss of cadmium in the marine prosobranch *Littorina littorea* (L.). *Sci. Total Environ.* 78, 1-12.
- Marigomez, J.A., M.P. Cajaraville, E. Angulo et J. Moya (1990) Ultrastructural alterations in the renal epithelium of cadmium-treated *Littorina littorea* (L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19, 863-871.
- Maroni, G. et D. Watson (1985) Uptake and binding of cadmium, copper and zinc by *Drosophila melanogaster* larvae. *Insect Biochem.* 15, 55-63.
- Maroni, G., D. Lastowski-Perry, E. Otto et D. Watson (1986) Effects of heavy metals on *Drosophila* larvae and a metallothionein cDNA. *Environ. Health Perspectives* 65, 107-116.
- Martin, S. (1992) Étude des facteurs influençant l'accumulation de métaux traces (Cadmium, cuivre et zinc) chez deux espèces sympatriques d'insectes aquatiques (*Chironomus* Gr. *Plumosus*, spp) mémoire de maîtrise.
- Martoja, R. et C. Ballan-Dufrançais., 1984. The ultrastructure of the digestive and excretory organs. Dans The Ultrastructure of Developing Cells, Edité par R.C. King and H. Akai, Vol. 2. Insect Ultrastructure. Plenum, New York, pp., 199-268.
- Martoja, R., J.M. Bouquegneau et C. Verthe (1983) Toxicological effects and storage of cadmium and mercury in an insect *Locusta migratoria* (Orthoptera). *J. Invert. Path.* 42, 17-32.
- Mason, A.Z., et K.D. Jenkins (1995) Metal detoxification in aquatic organisms. Dans Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems, edité par A. Tessier et D.R. Turner, John Wiley and Sons, New York, pp. 479-608.
- McCahon, C.P. et D. Pascoe (1989) Short-term experimental acidification of a Welsh stream: toxicity of different forms of aluminium at low pH to fish and invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 233-242.
- McCahon, C.P. et D. Pascoe (1991) Brief-exposure of first and fourth instar *Chironomus riparius* larvae to equivalent assumed doses of cadmium: effects on adult emergence. *Water, Air, Soil Pollut.* 60, 395-403.
- Merrett, W.J., G.P. Rutt, N.S. Weatherley, S.P. Thomas et S.J. Ormerod (1991) The response of macroinvertebrates to low pH and increased aluminium concentrations in Welsh streams: multiple episodes and chronic exposure. *Arch. Hydrobiol.* 121, 115-125.
- Munger, C. and L. Hare (1997) Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): Implications for predicting Cd bioaccumulation in nature. *Environ. Sci. Technol.* 31, 891-895.
- Munger, C., L. Hare, A. Craig et P.-M. Charest (1997) Influence of exposure time on the distribution of cadmium within the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. Soumis à Aquatic Toxicology.

- Murakami, M., K. Hirosawa, S. Suzuki et H. Katsumuma (1975) On the betterment of fixation method of accumulated cadmium in kidney. *Ind. Health* 13, 123-127.
- Nellans, H.N. et Kimberg, D.V. (1978) Cellular and paracellular calcium transport in rat ileum; effects of dietary calcium. *Am. J. Physiol.* 235, E726-E737.
- Nriagu, J.O. et J.M. Pacyna (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333, 134-139.
- Papelis, C., K.F. Hayes et J.O. Leckie (1988) Hydraql: a program for the computation of chemical equilibrium composition of aqueous batch systems including surface-complexation modeling of ion adsorption at the oxide-solution interface. Dept. of Civil Engineering Technical report No. 306, Stanford University, Stanford, CA, 130 pp.
- 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.
- Pascoe, D., K.A. Williams et D.W.J. Green (1989) Chronic toxicity of cadmium to *Chironomus riparius* Meigen - effects upon larval development and adult emergence. *Hydrobiol.* 175, 109-115.
- Patel, B. et K. Anthony (1991) Uptake of cadmium in tropical marine lamellibranchs, and effects on physiological behavior. *Mar. Biol.* 108, 457-470.
- Pauling, L. (1960) *The nature of the Chemical Bond*, 3rd edition, Cornell University Press, Ithaca, N.Y., 644pp.
- Phillips, D.J.H. et P.S. Rainbow (1993) *Biomonitoring of trace aquatic contaminants*. Elsevier
- Phillips, J.E., J. Hanrahan, M. Chamberlin, et B. Thomson (1986) Mechanisms and control of reabsorption in insect hindgut. *Advances in Insect Physiology*, édité par P. D. Evans et V. B. Wigglesworth, Academic Press, Toronto, pp. 329-422.
- Pierson, M. (1956) Contribution a l'histologie de l'appareil digestif de *Chironomus plumosus* L. *Ann. Sci. Nat., Zool.* 11, 107-122.
- Rainbow, P.S. (1997) Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. *Estuarine Coastal and Shelf Sci.* 44, 169-175.
- Rainbow, P.S. et R. Dallinger (1991) Metal uptake, regulation, and excretion in freshwater invertebrates. Dans *Ecotoxicology of metals in invertebrates*, édité par R. Dallinger et P.S. Rainbow, pp.119-132.
- Rao, D.S. et A.B. Saxena (1981) Acute toxicity of mercury, zinc, lead, cadmium, manganese to the *Chironomus* sp. *International J. Environmental Studies* 16, 225-226.
- Ray, S. (1984) Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. *Experientia* 40, 14-23.
- Ray, S., D.W. McLeese, B.A. Waiwood et D. Pezzack (1980) The disposition of cadmium and zinc in *Pandalus montagui*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 9, 675-681.

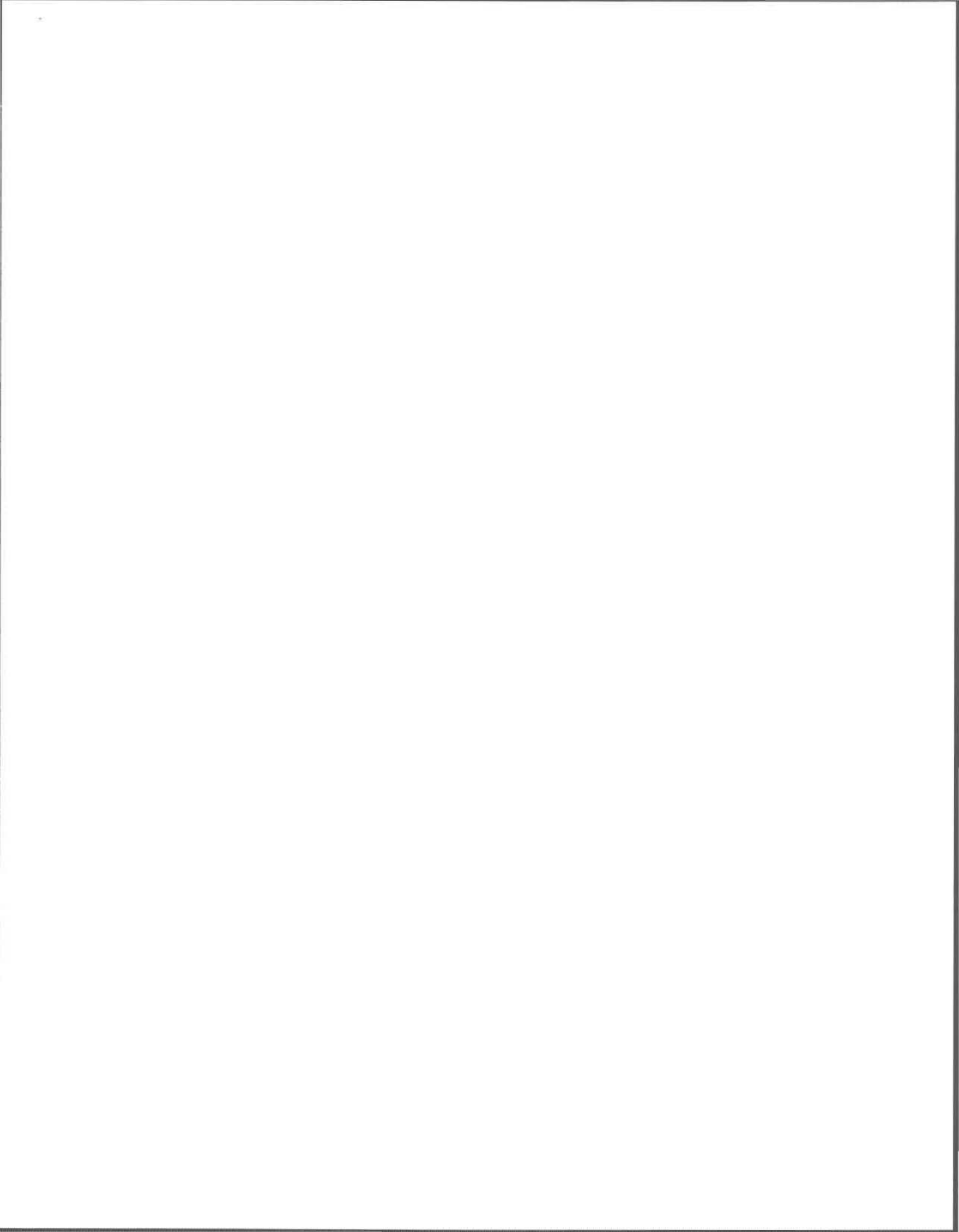
- Reader, J.P. et R. Morris (1988) Effects of aluminium and pH on calcium fluxes, and effects of cadmium and manganese on calcium and sodium fluxes in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 91C, 449-457.
- Reid, S.D. et D.G. McDonald (1988) Effects of cadmium, copper, and low pH on 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. Aquat. Sci.* 48, 1061-1068.
- 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.
- Roesijadi, G. et M.E. Unger (1993) Cadmium uptake in gills of the mollusc *Crassostrea virginica* and inhibition by calcium channel blockers. *Aquat. Toxicol.* 24, 195-206.
- Roesijadi, G. et W.E. Robinson. (1994) Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation, and release. Dans Aquatic Toxicology: Molecular, biochemical, and cellular perspectives, edité par D.C. Malins et G.K. Ostrander. Boca Raton, FL, Lewis, pp. 387-420.
- Rouleau, C., E. Pelletier et H. Tjalve (1993) The uptake and distribution of (HgCl₂)-Hg-203. and (CH₃HgCl)-Hg-203 in the starfish *Asterias rubens* After 24-H exposure studied by impulse counting and whole body autoradiography. *Aquat. Toxicol.* 26, 103-115.
- Saouter, E., L. Hare, P.G.C. Campbell, A. Boudou et F. Ribeyre (1993) Mercury accumulation in the burrowing mayfly (*Hexagenia rigida*; Ephemeroptera) exposed to CH₃HgCl or HgCl₂ in water and sediment. *Water Res.* 27, 1041-1048.
- Schmidt-Neilsen, K. (1983) *Animal physiology*. Cambridge University Press, New York, 619 pp.
- 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. Membr. Biol.* 127, 161-172.
- Seidman, L.A., G. Bergtrom et C.C. Remsen (1986a) Structure of the midgut of the fly *Chironomus thummi* and its relationship to sites of cadmium sequestration. *Tissue and Cell* 18, 407-18.
- Seidman, L.A., G. Bergtrom, D. J. Gingrich et C.C. Remsen (1986b) Accumulation of cadmium by the fourth instar larva of the fly *Chironomus thummi*. *Tissue and Cell* 18, 395-405.

- Sibley, P.K., G.T. Ankley, A.E. Cotter et E.N. Leonard (1996) Predicting chronic toxicity of sediments spiked with zinc: an evaluation of the acid-volatile sulfide model using a life-cycle test with the midge *Chironomus tentans*. Environ. Toxicol. Chem. 15, 2102-2112.
- Simkiss, K. (1983) Lipid solubility of heavy metals. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 63, 1-7.
- Simkiss, K. (1996) Ecotoxicants at the cell-membrane barrier. Dans Ecotoxicology : A hierarchical treatment, Edité par M.C. Newman et C.H. Jago, New York, Lewis, pp. 59-83.
- Simkiss, K. et M.G. Taylor, (1995) Transport of metals across membranes. Dans Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems, edité par A. Tessier et D. R. Turner, John Wiley and Sons, New York, pp. 1-44.
- Stephenson, M. et G.L. Mackie (1988) Multivariate analysis of correlations between environmental parameters and cadmium concentrations in *Hyalella azteca* (Crustacea: Amphipoda) from central Ontario lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45, 1705-1710.
- Stephenson, M. et G.L. Mackie (1989) A laboratory study of the effects of waterborne cadmium, calcium, and carbonate concentrations on cadmium concentrations in *Hyalella azteca* (Crustacea: Amphipoda). Aquat. Toxicol. 15, 53-62.
- Streit, B. et S. Winter (1993) Cadmium uptake and compartmental time characteristics in the freshwater mussel *Anodonta anatina*. Chemosphere 26, 1479-1490.
- Sumi, Y., T. Suzuki, M. Yamamura, S. Hatakeyama, Y. Sugaya et K.T. Suzuki (1984) Histochemical staining of cadmium taken up by the midge larva, *Chironomus yoshimatsui* (Diptera, Chironomidae). Comp. Biochem. Physiol. 79A, 353-357.
- Suzuki, K. T., Y. Aoki, M. Nishikawa, H. Masui et F. Matsubara (1984) Effect of cadmium-feeding on tissue concentrations of elements in grem-free silkworm (*bombyx mori*) larvae and distribution of cadmium in the alimentary canal. Comp. Biochem. Physiol, 79C(2), 249-253.
- Suzuki, K.T., H. Sunaga, S. Hatakeyama, Y. Sumi et T. Suzuki (1989) Differential binding of cadmium and copper to the same protein in a heavy metal tolerant species of mayfly (*Baetis thermicus*) larvae. Comp. Biochem. Physiol. 94C, 99-103.
- Taylor, C.W. (1984) Transcellular calcium transport by the midgut of the blowfly, *Calliphora vicina*. Cell Calcium 5, 377-390.
- Taylor, C.W. (1985) Calcium absorption by the midgut of the blowfly, *Calliphora vicina*. J. Exper. Biol. 114, 551-561.
- Taylor, C.W. (1986) Calcium regulation in insects. Dans Advances in Insect Physiology, edité par P.D. Evans et V.B. Wigglesworth, Academic Press, London, pp 155-186.

- Terra, W.R. (1990) Evolution of digestive systems of insects. *Ann. Rev. Entomol.* 35, 181-200.
- Tessier, A., P.G.C. Campbell, J.-C. Auclair et M. Bisson (1984) Relationships between the partitioning of trace metals in sediments and their accumulation in the tissues of the freshwater mollusc *Elliptio complanata* in a mining area. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41, 1463-1472.
- Tessier, A., Y. Couillard, P.G.C. Campbell et J.-C. Auclair (1993) Modeling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve *Anodonta grandis*. *Limnol. Oceanogr.* 38, 1-17.
- Timmermans, K.R. et P.A. Walker (1989) The fate of trace metals during the metamorphosis of chironomids (Diptera, Chironomidae). *Environ. Pollut.* 62, 73-85.
- Timmermans, K.R., W. Peeters et M. Tonkes (1992) Cadmium, zinc, lead and copper in larvae of *Chironomus riparius* (Meigen) (Diptera, Chironomidae): uptake and effects. *Hydrobiologia* 241, 119-134.
- Tjalve, H. et J. Gottofrey (1986) Tissue disposition of $^{109}\text{Cd}^{2+}$ in brown trout (*Salmo trutta*) studied by autoradiography and impulse counting. *Toxicol. Environ. Chem.* 12, 31-45.
- Triggle, D.J. (1991) Calcium-channel drugs: structure-function relationships and selectivity of action. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 18 (Suppl. 10), S1-S6.
- Triggle, D.J. (1992) Calcium-channel antagonists: mechanisms of action, vascular selectivities, and clinical relevance. *Cleve. Clin. J. Med.* 59, 617-627.
- Ullberg, S., 1977. The technique of whole body autoradiography. *Science Tools, Special Issue on Whole Body Autoradiography. The LKB Instrument Journal, Stockholm*, pp. 2-29.
- Van Hattum, B., K.R. Timmermans et H.A. Govers (1991) Abiotic and biotic factors influencing in situ trace metal levels in macroinvertebrates in freshwater ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 275-292.
- Verbost, P.M., G. Flik, R.A.C. Lock et S.E. Wendelaar Bonga (1987) Cadmium inhibition of Ca^{2+} uptake in rainbow trout gills. *Amer. J. Physiol.* 253, R216-R221.
- Verbost, P.M., J. Van Rooij, G. Flik, R.A. Lock et S.E. Wendelaar Bonga (1989) The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *J. Exper. Biol.* 145, 185-197.
- Verta, M., S. Rekolainen, J. Mannio et K. Surma-Aho (1986) The origin and level of mercury in Finnish forest lakes. *Publication Water Res. Inst., National Board Waters, Finland* 65, 21-31.
- Wang, Y. et R.D. Evans (1993) Cadmium uptake in freshwater mussels *Elliptio complanata*: the role of calcium concentrations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 2591-2596.

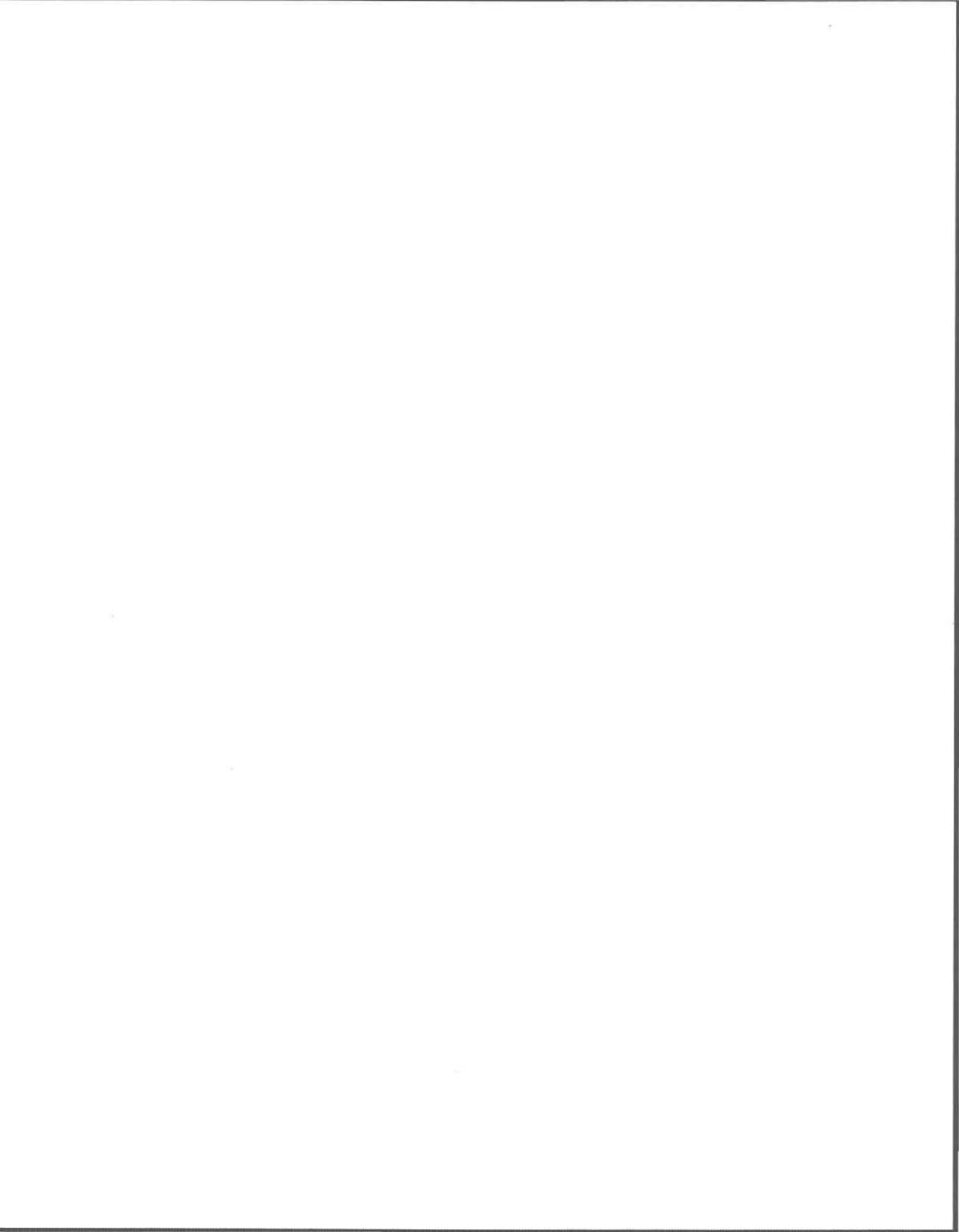
- Ward, J.V. (1992) *Aquatic Insect Ecology 1. Biology and Habitat*. John Wiley and Sons, New York, N.Y. 438 pp.
- Warren, L., L. Hare et A. Tessier (1998) Modelling cadmium accumulation by benthic invertebrates in situ: the relative contributions of sediment and overlying water to organism cadmium concentration. *Limnol. & Oceanogr.*, in press.
- Weiss, G. B. (1974) Cellular pharmacology of lanthanum. *Annu. Rev. Pharmacol.* 14, 343-354.
- Wentzel, R., A. McIntosh et G. Atchison (1977) Sublethal effects of heavy metal contaminated sediment on midge larvae (*Chironomus tentans*). *Hydrobiol.* 56, 153-156.
- White, S.L. et P.S. Rainbow (1986) Accumulation of cadmium by *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 32, 17-25.
- Wicklund Glynn, A., L. Norrgren et A. Mussener (1994) Differences in uptake of inorganic mercury and cadmium in the gills of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Aquat. Toxicol.* 30, 13-26.
- Wicklund, A., P. Runn et L. Norrgren (1988) Cadmium and zinc interactions in fish: effects of zinc on the uptake, organ distribution, and elimination of ¹⁰⁹Cd in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17, 345-354.
- Wright, D.A. (1977) The effect of calcium on cadmium uptake by the shore crab *Carcinus maenas*. *J. Exper. Biol.* 67, 163-173.
- Wright, D.A. (1980) Cadmium and calcium interactions in the freshwater amphipod *gammarus pulex*. *Freshwat. Biol.* 10, 123-133.
- Yamamura, M., K.T. Suzuki, S. Hatakeyama et K. Kubota (1983) Tolerance to cadmium and cadmium-binding proteins induced in the midge larva, *Chironomus yoshimatsui* (Diptera, Chironomidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 75C, 21-24.





SECTION 2:

ARTICLES SCIENTIFIQUES



Article No. 1 : Accepté pour publication dans Aquatic Toxicology

L'effet du régime d'exposition sur la distribution du cadmium chez des larves de *Chironomus staegeri* (Insecta, Diptera).

Albert Craig¹, Landis Hare¹, Pierre-Mathieu Charest² et André Tessier¹

1. Université du Québec, INRS-Eau, C. P. 7500, Sainte-Foy, Québec, G1V 4C7, Canada

2. Département de phytologie, Pavillon C.-E. Marchand, Université Laval, Québec, Québec, G1K 7P4, Canada

Résumé :

Les arthropodes tels que l'insecte *Chironomus* sp. sont souvent employés pour tester la toxicité aiguë des polluants dans l'eau seulement. Cependant, ces insectes benthiques peuvent aussi accumuler des contaminants des sédiments qu'ils habitent. Il existe peu d'information sur l'influence du vecteur du polluant et de l'effet de la durée d'exposition sur l'accumulation et la distribution des contaminants chez les insectes. Nous avons employé l'autoradiographie de corps entier (« whole-body autoradiography ») pour déterminer la localisation détaillée du cadmium (Cd) dans l'animal entier. Nous avons exposé des larves de quatrième stade larvaire de *Chironomus staegeri* Lundbeck à 10 nM de Cd dans des microcosmes sous deux régimes d'exposition : (i) à court terme dans l'eau seulement (5 jours) ou (ii) à long terme dans l'eau et le sédiment (140 jours). La microautoradiographie d'animaux entiers a démontré que le tractus digestif était l'organe principal d'accumulation du Cd sous les deux régimes d'exposition. La majorité du Cd était confinée à une petite section du tractus digestif moyen, suggérant que la prise en charge du Cd se fait là. Nos résultats suggèrent aussi que le régime d'exposition au Cd n'affecterait pas l'organe de l'animal dans lequel le Cd exercerait sa toxicité chez les larves de *C. staegeri*.

Mots clefs : Cadmium, Métal, Accumulation, Localisation, Autoradiographie, Régime d'exposition, Insecte, *Chironomus*.

Effect of exposure regime on the internal distribution of cadmium in Chironomus staegeri
larvae (Insecta, Diptera)

Albert Craig¹, Landis Hare^{1*}, Pierre-Mathieu Charest² and André Tessier¹

1. Université du Québec, INRS-Eau, C. P. 7500, Sainte-Foy, Québec, G1V 4C7, Canada

*2. Département de phytologie, Pavillon C.-E. Marchand, Université Laval, Québec,
Québec, G1K 7P4, Canada*

*Corresponding author.

Landis Hare
Tel. 418-654-2640
Fax. 418-654-2600
E-mail: landis@inrs-eau.quebec.ca

Abstract

Although insects are routinely used to test the acute toxicity of pollutants in water alone, little information exists on the influence of exposure regime on the accumulation of contaminants in these animals. We exposed fourth instar Chironomus staegeri larvae to 10 nM Cd in microcosms under two exposure regimes: a water only short-term (5 d) exposure, or a water and sediment long-term (140 d) exposure. Microautoradiography of whole animals demonstrated that the digestive tract was the principal organ of Cd accumulation under both exposure regimes. The majority of accumulated Cd was confined to a small section of the insect's midgut, suggesting uptake in this region. Our results suggest that the Cd exposure regime of Chironomus larvae would not alter the body organ in which Cd would exert its toxicity.

Keywords: Cadmium; Metal; Accumulation; Localization; Autoradiography; Exposure regime; Chironomus

1. Introduction

Humankind has become a major force in the global flux of trace metals. The human-induced mobilization of cadmium (Cd) into the biosphere is approximately 30 times the global emission rate from natural sources (Nriagu and Pacyna, 1988). Aquatic systems can be important sinks for Cd, and benthic and planktonic animals readily accumulate this trace metal (Bryan, 1971; Luoma, 1983; Tessier et al., 1993; Hare and Tessier, 1996). Patterns of metal distribution within animals can provide critical information on mechanisms of metal toxicity and exchange between an animal and its environment (Luoma, 1983; Hare, 1992). Localization of metal accumulation sites can be a useful means of determining the organs in which patho-physiological effects might be observed (Verboost et al., 1987; Reid and McDonald, 1988; Lowe and Clarke, 1989; Hemelraad et al., 1990; Marigomez et al., 1990; Ghosh and Chakrabarti, 1993). For example, studies with fish have shown that exposure to Cd generally leads to accumulation in the gills and, at high concentrations, to a breakdown of their ion-regulation function (Roch and Maly, 1979; Larsson et al., 1981; Fu et al., 1989).

Cadmium concentrations tend to vary greatly among the internal organs of freshwater invertebrates including bivalve mollusks (Tessier et al., 1984), decapod crustaceans (Anderson and Bower, 1978; Madigosky et al., 1991), and insects (Krantzberg and Stokes, 1990; Hare et al., 1991a and b). The internal distribution patterns of Cd in marine crustaceans have been shown to vary depending on whether Cd is taken up from food or from water (Davies et al., 1981; Canli and Furness, 1995). The results of

several marine studies suggest that aqueous Cd exposure favors accumulation in respiratory structures, while dietary exposure favors accumulation in the digestive tract (Davies et al., 1981; Canli and Furness, 1995). Although no comparable studies exist on Cd in freshwater invertebrates, the internal distribution of total mercury (Hg) in the mayfly Hexagenia rigida has been shown to depend on the Hg source (Saouter et al., 1993). When Hg was added to water (as either HgCl_2 or CH_3HgCl), the gills of this insect were a more important site of Hg accumulation than was the animal's gut. In contrast, when either form of Hg was added to sediment the gills were a relatively minor site of Hg accumulation compared to the gut. Patterns of internal Cd partitioning are also reported to vary according to the duration of the Cd exposure in some bivalve species (Patel and Anthony, 1991), while in others it does not (Malley et al., 1989). No comparable information exists for temporal effects on the internal partitioning of Cd in freshwater arthropods.

In freshwater ecosystems, insects are often the most abundant and diverse group of benthic animals (Ward, 1992), and are known to take up Cd (e.g., van Hattum et al., 1991; Hare and Campbell, 1992). We measured the distribution patterns of Cd within an aquatic insect exposed to ^{109}Cd under two exposure regimes: (i) a short exposure (5 d) to Cd in water only, and (ii) a long exposure (140 d) to Cd in both water and food (i.e., sediment). The former treatment mimics the type of exposure regime used in simple laboratory toxicity tests, while the latter treatment corresponds to Cd-exposure as it might occur in field populations. Larvae of the genus Chironomus were chosen as study animals because (i) they are a key component of the benthic fauna of many lakes (Butler and

Anderson, 1990), (ii) they can be an important source of food for fish (Bay and Anderson, 1966), and (iii) they have a long history of use as test animals for contaminants in water and sediment (Wentzel et al., 1977; Havas and Likens, 1985; Pascoe et al., 1989; Timmermans et al., 1992; Sibley et al., 1996). Although the internal distribution of Cd has been studied in a few Chironomus species (Yamamura et al., 1983; Sumi et al., 1984; Seidman et al., 1986b; Hare et al., 1991a), neither the detailed distribution pattern of Cd along the gut, the main Cd accumulating organ, nor the effects of exposure regime on Cd localization have been investigated.

We used a whole-body microautoradiographic technique, never before used in invertebrate toxicology, to localize ^{109}Cd in Chironomus staegeri larvae. The technique, as we applied it, comprises several advantages: (i) it permits a finer resolution than would be possible by simple dissection; (ii) unlike histochemical staining (Sumi et al., 1984) and autometallography, autoradiography is not sensitive to the manner in which the Cd is bound within cells, e.g., to a metalloprotein or in granules; (iii) the use of complete sagittal sections (whole-body) rather than transversal sections (Seidman et al., 1986b) allows the simultaneous visual comparison of metal distributions in most of an individual's organs (Tjalve and Gottofrey, 1986; Rouleau et al., 1993) as well as along morphologically differentiated organs such as the gut; (iv) the application of a liquid photographic emulsion to glass microscope slides permits the observation of results directly on the tissues rather than on negatives as in traditional whole-body autoradiograms (Ullberg, 1977; Tjalve and Gottofrey, 1986).

2. Methods

2.1. Insect collection

Chironomus staegeri larvae were collected from Lake St. Joseph (46°55' N, 71°40' W), a 5 km² water body situated in a largely forested drainage basin on the Precambrian Shield near Quebec City, Quebec, Canada. There are no major industrial sources of metals in the drainage basin and thus any anthropogenic metal contamination of the site probably originates from local domestic sources and long-range atmospheric transport. The identification of C. staegeri, a member of the thummi complex (Wülker et al., 1971), was confirmed by M. G. Butler (North Dakota State University, Fargo, N.D.) on the basis of larval salivary chromosomes (Butler et al., 1995).

Sediment was collected with an Ekman grab or by divers from a depth of 8 to 10 m near the outlet of Lake St. Joseph. Fine particles were eliminated in the field by sieving with a 0.5 mm mesh aperture net. Insects and remaining sediment were transported to the laboratory in lake water in 4-L plastic bags in a cooler. In the laboratory, fourth instar C. staegeri larvae were sorted from remaining sediment and placed in holding aquaria with unsieved Lake St. Joseph sediment. Artificial lakewater having a pH (6.0) and Ca (100 µM) and Mg (20 µM) concentrations similar to that of Lake St. Joseph water was used in the holding tanks and for all of the Cd exposures. The holding aquaria were aerated, kept in the dark at 10°C and larvae were removed as required for the experiments. Littoral sediment for Cd exposures was collected from Lake Duprat, located in the Rouyn-Noranda mining area of north-western Quebec (48°20' N, 79°08' W). Total Cd concentrations in oxic surficial sediment from lakes St. Joseph and Duprat were 47 and 66

nmol g⁻¹ dry weight, respectively.

2.2. Exposure Protocol

A short-term (5 d), water-only exposure regime was designed to approximate conditions in a simple laboratory toxicity test. Five replicate groups of 25 fourth instar *C. staegeri* larvae were each held in 800 mL of artificial lakewater in 1-L high-density polyethylene bottles. Use of this type of plastic minimizes Cd sorption to container walls (Hare and Tessier, unpublished). Sufficient ¹⁰⁹CdCl₂ was added to attain a total dissolved Cd²⁺ concentration of 10 nM (calculated with the computer code HYDRAQL; Papelis et al., 1988). Control animals were exposed to the same conditions except that the 10 nM Cd²⁺ solution was without radiotracer. Free Cd ion concentrations near 10 nM have been reported for metal contaminated lakes in areas affected by mining and smelting activities (Hare and Tessier, 1996; Croteau et al., 1997).

A long term (140 d) exposure to Cd in water and food (sediment) was designed to approximate conditions to which animals might be exposed in the field. Larvae were held in acrylic containers (30 larvae in each of two 2-L containers) filled with 0.5 L of sediment from Lake Duprat and 1.0 L of aerated artificial St. Joseph lakewater. Sediment (1.0 L) was spiked with 18.5 x 10⁶ Beq of ¹⁰⁹CdCl₂ (specific activity 3.9 x 10⁶ Beq μg⁻¹ Cd) giving an estimated total Cd concentration of 90 nM Cd g⁻¹ dry wt of sediment. The pH of water overlying the sediment was adjusted by adding acid to obtain a Cd²⁺ concentration of 10 nM in the overlying water. The pH (6.0) needed to obtain the desired concentration of Cd²⁺ in the water overlying the sediment was estimated with a model based on surface

complexation concepts (Tessier et al., 1993). Total Cd in the water overlying the sediment, measured on 4 occasions, was within 2% of the nominal 10 nM concentration. Control animals were exposed to Cd in the same manner except for the absence of radiotracer in the sediment.

To purge all unassimilated radiotracer from the digestive tract of animals after their Cd exposure, larvae were rinsed with artificial lakewater and placed in the ^{109}Cd -free control sediment described above. After 48 hours in the unmarked sediment, the organisms were rinsed in 10 μM EDTA (5 mL individual⁻¹) for 10 minutes to remove any remaining surface-bound ^{109}Cd .

2.3. *Autoradiography and counting*

Larvae from both the short-term and long-term exposure experiments were fixed in 3% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer for 3 hours. Tannic acid (0.5%) was included in the fixative to minimize the loss of Cd from body tissues during fixation (Murakami et al., 1975). Larvae were rinsed and dehydrated to toluene and embedded in paraffin. Sagittal sections of 15 μm thickness were floated (17% EtOH, 0.1% gelatin) onto glass microscope slides. Sections of this thickness were used to ensure the presence of sufficient radioactivity, which allowed the use of short exposure times (1-3 weeks). The sections were held for 12 hours in 2% paraformaldehyde vapor to harden the gelatin. The slides were deparaffinized with toluene and dipped in undiluted Kodak NTB-3 nuclear track emulsion in a darkroom maintained at 30°C with a relative humidity of 80%. A Safelight[®] was employed with a Kodak[®] No. 2 filter. The slides were allowed to dry for

two hours and refrigerated in light-tight boxes for 1-3 weeks of exposure. Sample slides were developed and observed at regular intervals to determine if the exposure time was adequate. Once the slides were judged sufficiently exposed, they were developed at 14°C in D-19 (Kodak®) for 4 min. Sections were stained with Harris' haematoxylin and eosin-Y.

To evaluate Cd loss during the histological manipulations, a subsample of short-term water-only Cd-exposed larvae were counted individually for radioactivity before and after fixation-dehydration through alcohol to toluene. The mean 5% metal loss during fixation and dehydration of the larvae was not significant (Wilcoxon Matched Pairs Test, $n = 10$, $P = 0.54$), suggesting that the Cd distribution patterns observed in our experiments are unlikely to be artifacts of the histological techniques employed. To quantify the relative importance of gut tissues (Fig. 1) in Cd accumulation, ^{109}Cd was measured in both the empty gut and in the remainder, after dissection, of several animals from the short-term water-only exposure. All counts of radioactivity were made on a "LKB Wallac 1282 Compugamma" gamma particle counter (NaI well type). Correction was made for background radiation and counting efficiency (60%).

3. Results

Cadmium in the gut comprised $94 \pm 5\%$ (mean \pm s.d., $n = 31$) of the ^{109}Cd present in larvae after a 5 d water-only exposure. Control insects showed no autoradiographic marking (Figs. 2a and 2b). Marking in Cd-exposed larvae was observed only in gut tissues (Figs. 2c and 2e). The digestive tract of Chironomus larvae can be divided into four regions based on their structure (Fig. 1) and function (Pierson, 1956): the esophagus (or

stomodeum), the anterior dilated portion of the mesenteron (or anterior midgut), the posterior mesenteron (or posterior midgut) and the proctodeum (or hindgut) (Fig. 1). Larvae from both short-term (Figs. 2c and 2d) and long-term (Figs. 2e and 2f) laboratory exposures showed autoradiographic marking only in the anterior portion of the posterior mesenteron.

4. Discussion

The similarity in the Cd localization patterns in larvae from the two exposure groups indicates that the anterior portion of the posterior mesenteron is the principal site of Cd accumulation regardless of the duration of the Cd exposure or the presence or absence of Cd in food.

In our experiment, Cd in the gut comprised $94 \pm 5\%$ (mean \pm s.d., $n = 31$) of the ^{109}Cd present in larvae after a short-term water-only exposure as determined by dissection and counting. This distribution is very similar to that observed in individuals from our study population in the field, i.e., $96 \pm 2\%$ (mean, s.d., $n = 7$) of the total Cd is reported to be localized in gut tissues (Martin and Hare, unpublished). These results also agree with data for field-collected *Chironomus* spp. larvae from other lakes, in which approximately 75% of the total bioaccumulated Cd is reported to be associated with the posterior mesenteron (as determined by dissection; Hare et al., 1991a). The gut has also been shown to be the major site of Cd accumulation for larvae of *Chironomus yoshimatsui* (Sumi et al., 1984) and *Chironomus thummi* (Seidman et al., 1986b) in short-term laboratory

experiments. The digestive tract appears to be the major organ of Cd storage in a number of other aquatic insects (Hare et al., 1991a).

Contrary results, i.e., differences in metal localization patterns between short-term and long-term exposure or between our results and data from the field, would have suggested that laboratory bioaccumulation studies are not representative of bioaccumulation in natural systems. Since the accumulation of Cd is thought to be related to its toxicity (Hemelraad et al., 1990; Marigomez et al., 1990; Ghosh and Chakrabarti, 1993), contrary results would have generated serious reservations about the validity of short-term toxicity tests as well as extrapolations from them to biological effects in the field.

The localization of the great majority of the accumulated Cd in the gut tissues of *C. staegeri* larvae exposed to Cd in water only, indicates that Cd in this organ does not necessarily come from food (i.e., sediment), that is, gut tissues are the major site of Cd storage regardless of the apparent Cd source. Conversely, one cannot identify the source of Cd accumulated by larvae based solely on the distribution of Cd in the insect's body.

It is reported that assimilated Cd can be redistributed among an animal's body parts over time (Wright, 1980; Marigomez and Ireland, 1989). However, in our experiments we saw no evidence of Cd translocation as there was no detectable difference in the distribution of ^{109}Cd among organs between the 5 and 140 day exposures. Furthermore, the short-term exposure autoradiograms show that there was no detectable Cd in any

organ other than the gut, suggesting that the gut is the principal site of entry for Cd and that little of the Cd reaches other organs. These conclusions are drawn with the semi-quantitative character of autoradiography in mind. That is, because autoradiograms are developed in such a manner as to avoid over-exposure of the most heavily-marked tissues, in our case the gut, the relatively small quantity of ^{109}Cd likely to be present in other larval tissues (estimated at < 5% of the total) would not be marked. The role of the gut as the site of Cd uptake in Chironomus is further supported by studies that show that Cd accumulated by larvae is limited to the gut after either 6 hours (Seidman, 1986b) or 2 days (Sumi et al., 1984) of Cd exposure. Moreover, there are no other organs likely to play a role in Cd uptake since chironomids lack gills and the anal papillae of aquatic insects are thought to absorb only monovalent ions (Taylor, 1986).

The most likely explanation for the confinement of Cd to a small section of the midgut is that accumulation of the metal is related to the physical structure and physiological function of this section of the gut. The anterior section of the posterior midgut, the major site of Cd accumulation by chironomids in this experiment, has been characterized in several studies. Histochemical and cytological analyses of the digestive tract of Chironomus plumosus have shown this section of the mesenteron to be rich in mitochondria and alkaline phosphatase, suggesting that active absorption occurs in this region of the gut (Pierson, 1956). In C. thummi, the posterior midgut epithelium has long microvilli and numerous apical mitochondria, once again implying that absorption occurs in this section of the midgut (Seidman et al., 1986a). These studies support the hypothesis that Cd is assimilated in the posterior midgut region.

The midgut is also reported to be the major absorption site for the essential element calcium in terrestrial insects (Taylor, 1985). Thus the Cd taken up by larvae could enter through pathways used by calcium. Cadmium-calcium interactions have been demonstrated in crustaceans (Wright, 1980; Stephenson and Mackie, 1989), bivalves (Wang and Evans, 1993; Roesijadi and Unger, 1993), and fish (Pärt et al., 1985). Cadmium uptake through Ca channels in fish gill membranes has also been reported (Verbost et al., 1989). These observations suggest that Cd accumulated in the midgut of C. staegeri enters via Ca channels in this region.

The absorptive function of the mesenteron may explain its assimilation of Cd but it does not explain the fact that the metal is retained in this region of the digestive tract. Cadmium is likely to be sequestered by metal binding proteins, at least initially, as has been reported for both C. yoshimatsui (Yamamura et al., 1983) and C. thummi (Seidman et al., 1986b). It is also possible that this bound Cd is eventually stored in a more permanent form such as the membrane bound granules and residual bodies observed in the posterior mesenteron of C. thummi (Seidman et al., 1986a). This method of Cd detoxification has been demonstrated in terrestrial insects (Martoja et al., 1983) but has yet to be reported in aquatic insects.

In summary, a small region of the posterior midgut was the main site of Cd accumulation in C. staegeri, under both of our exposure regimes. Cadmium does not appear to traverse this epithelium to any great extent. Since the body organ to which Cd in restricted does not change under the two exposure regimes, we suggest that neither does

the organ in which Cd would elicit toxicity. We also hypothesize that the propensity of the posterior midgut for accumulating Cd relates to its function as an absorption site for the essential element Ca.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the United States Environmental Protection Agency, and the Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec. We thank A. Goulet and G. Audet for their assistance with the histological analyses, M. G. Butler for identifying Chironomus staegeri, and J.-J. Soghomonian for having so graciously received us in his laboratory.

References

- Anderson, R.V. and J.E. Brower (1978) Patterns of trace metal accumulation in crayfish populations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 120-127.
- Bay, E.C. and L.D. Anderson (1966) Studies with the mosquitofish, Gambusia affinis, as a Chironomus control. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 59, 150-153.
- Bryan, G.W. (1971) The effects of heavy metals (other than mercury) on marine and estuarine organisms. *Proc. Royal Soc. London B* 177, 389-410.
- Butler, M.G. and D.H. Anderson (1990) Cohort structure, biomass, and production of a merovoltine Chironomus population in a Wisconsin lake. *J. N. Amer. Benthological Soc.* 9, 180-192.
- Butler, M.G., I.I. Kiknadze, J.K. Cooper and M. Sürin (1995) Cytologically identified Chironomus species from lakes in North Dakota and Minnesota, USA. In P. Cranston (editor), *Chironomids: from genes to ecosystems*. CSIRO Publications, East Melbourne, Australia, pp. 31-37.
- Canlı, M. and R.W. Furness (1995) Mercury and cadmium uptake from seawater and from food by the Norway lobster Nephrops norvegicus. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 819-828
- Croteau, M.-N., L. Hare and A. Tessier (1997) Refining and testing a trace metal biomonitor (Chaoborus) in highly acidic lakes. *Environ. Sci. Technol.*, under review.
- Davies, I.M., W.C. Topping, C.R. Falconer, A.D. McIntosh and D. Seward (1981) Field and experimental studies on cadmium in the edible crab Cancer pagarus. *Mar. Biol.* 64, 291-297.
- Fu, H., R.A.C. Lock and S.E. Wendelaar Bonga (1989) Effect of cadmium on prolactin cell activity and plasma electrolytes in the freshwater teleost Oreochromis mossambicus. *Aquat. Toxicol.* 14, 295-306.
- Ghosh, A.R. and P. Chakrabarti (1993) Histopathological and histochemical changes in liver, pancreas and kidney of the freshwater fish Heteropneustes fossilis (Bloch) exposed to cadmium. *Environ. Ecol.* 11, 185-188.
- Hare, L. (1992) Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation, and toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 327-369.
- Hare, L. and P.G.C. Campbell (1992) Temporal variations of trace metals in aquatic insects. *Freshwat. Biol.* 27, 13-27.
- Hare, L. and A. Tessier (1996) Predicting animal cadmium concentrations in lakes. *Nature* 380, 430-432.

- Hare, L., A. Tessier and P.G.C. Campbell (1991a) Trace element distribution in aquatic insects: variations among genera, elements and lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 1481-1491.
- Hare, L., E. Saouter, P.G.C. Campbell, A. Tessier and R. Ribeyre (1991b) Dynamics of cadmium, lead, and zinc exchange between nymphs of the burrowing mayfly Hexagenia rigida (Ephemeroptera) and the environment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 39-47.
- Havas, M. and G.E. Likens (1985) Toxicity of aluminum and hydrogen ions to Daphnia catawba, Holopedium gibberum, Chaoborus punctipennis, and Chironomus anthracinus from Mirror Lake, New Hampshire. *Can. J. Zool.* 63, 1114-1119.
- Hemelraad, J., H.J. Herwig, E.G. van Donselaar, D.A. Holwerda and D.I. Zandee (1990) Effects of cadmium in freshwater clams. II. Ultrastructural changes in the renal system of Anodonta cygnea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 691-698.
- Krantzberg, G. and P.M. Stokes (1990) Metal concentrations and tissues distribution in larvae of Chironomus with reference to X-ray microprobe analysis. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 84-93.
- Larsson, A., B.E. Bengtsson and C. Haux (1981) Disturbed ion balance in flounder, Platichthys flesus L. exposed to sublethal levels of cadmium. *Aquat. Toxicol.* 1, 19-35.
- Lowe, D.M. and K.R. Clarke (1989) Contaminant-induced changes in the structure of the digestive epithelium of Mytilus edulis. *Aquat. Toxicol.* 15, 345-58.
- Luoma, S.N. (1983) Bioavailability of trace metals to aquatic organisms - a review. *Sci. Total Environ.* 28, 1-22.
- Madigosky, S.R., X. Alvarez-Hernandez and J. Glass (1991) Lead, cadmium, and aluminum accumulation in the red swamp crayfish Procambarus clarkii G. collected from roadside drainage ditches in Louisiana. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 253-258.
- Malley, D. F., P.S.S. Chang and R.H. Hesslein (1989) Whole lake addition of cadmium-109: radiotracer accumulation in the mussel population in the first season. *Sci. Total Environ.* 87-88, 397-417.
- Marigomez, J.A. and M.P. Ireland (1989) Accumulation, distribution and loss of cadmium in the marine prosobranch Littorina littorea (L.). *Sci. Total Environ.* 78, 1-12.
- Marigomez, J.A., M.P. Cajaraville, E. Angulo and J. Moya (1990) Ultrastructural alterations in the renal epithelium of cadmium-treated Littorina littorea (L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 863-871.
- Martoja, R., J.M. Bouquegneau and C. Verthe (1983) Toxicological effects and storage of cadmium and mercury in an insect Locusta migratoria (Orthoptera). *J. Invert. Path.* 42, 17-32.
- Murakami, M., K. Hirose, S. Suzuki and H. Katsumuma (1975) On the betterment of fixation method of accumulated cadmium in kidney. *Ind. Health* 13, 123-127.

- Nriagu, J.O. and J.M. Pacyna (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333, 134-139.
- Papelis, C., K.F. Hayes and J.O. Leckie (1988) Hydraql: a program for the computation of chemical equilibrium composition of aqueous batch systems including surface-complexation modeling of ion adsorption at the oxide-solution interface. Dept. of Civil Engineering Technical report No. 306, Stanford University, Stanford, CA, 130 pp.
- Pärt, P., O. Svanberg and A. Kiessling (1985) The availability of cadmium to perfused rainbow trout gills in different water qualities. *Water Res.* 19, 427-434.
- Pascoe, D., K.A. Williams and D.W.J. Green (1989) Chronic toxicity of cadmium to Chironomus riparius Meigen - effects upon larval development and adult emergence. *Hydrobiol.* 175, 109-115.
- Patel, B. and K. Anthony (1991) Uptake of cadmium in tropical marine lamellibranchs, and effects on physiological behavior. *Mar. Biol.* 108, 457-470.
- Pierson, M. (1956) Contribution a l'histologie de l'appareil digestif de Chironomus plumosus L. *Ann. Sci. Nat., Zool.* 11, 107-122.
- Reid, S.D. and 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.
- Roch, M. and 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.
- Roesijadi, G. and M.E. Unger (1993) Cadmium uptake in gills of the mollusc Crassostrea virginica and inhibition by calcium channel blockers. *Aquat. Toxicol.* 24, 195-206.
- Rouleau, C., E. Pelletier and H. Tjalve (1993) The uptake and distribution of (HgCl₂)-Hg-203 and (CH₃HgCl)-Hg-203 in the starfish Asterias rubens After 24-H exposure studied by impulse counting and whole body autoradiography. *Aquat. Toxicol.* 26, 103-115.
- Saouter, E., L. Hare, P.G.C. Campbell, A. Boudou and F. Ribeyre (1993) Mercury accumulation in the burrowing mayfly (Hexagenia rigida; Ephemeroptera) exposed to CH₃HgCl or HgCl₂ in water and sediment. *Water Res.* 27, 1041-1048.
- Seidman, L.A., G. Bergtrom and C.C. Remsen (1986a) Structure of the midgut of the fly Chironomus thummi and its relationship to sites of cadmium sequestration. *Tissue and Cell* 18, 407-18.
- Seidman, L.A., G. Bergtrom, D. J. Gingrich and C.C. Remsen (1986b) Accumulation of cadmium by the fourth instar larva of the fly Chironomus thummi. *Tissue and Cell* 18, 395-405.

- Sibley, P.K., G.T. Ankley, A.E. Cotter and E.N. Leonard (1996) Predicting chronic toxicity of sediments spiked with zinc: an evaluation of the acid-volatile sulfide model using a life-cycle test with the midge Chironomus tentans. Environ. Toxicol. Chem. 15, 2102-2112.
- Stephenson, M. and G.L. Mackie (1989) A laboratory study of the effects of waterborne cadmium, calcium, and carbonate concentrations on cadmium concentrations in Hyalella azteca (Crustacea: Amphipoda). Aquat. Toxicol. 15, 53-62.
- Sumi, Y., T. Suzuki, M. Yamamura, S. Hatakeyama, Y. Sugaya and K.T. Suzuki (1984) Histochemical staining of cadmium taken up by the midge larva, Chironomus yoshimatsui (Diptera, Chironomidae). Comp. Biochem. Physiol. 79A, 353-357.
- Taylor, C.W. (1985) Calcium absorption by the midgut of the blowfly, Calliphora vicina. J. Exper. Biol. 114, 551-561.
- Taylor, C.W. (1986) Calcium regulation in insects. In Advances in Insect Physiology, Edited by P.D. Evans and V.B. Wigglesworth, Academic Press, London, pp 155-186.
- Tessier, A., P.G.C. Campbell, J.-C. Auclair and M. Bisson (1984) Relationships between the partitioning of trace metals in sediments and their accumulation in the tissues of the freshwater mollusc Elliptio complanata in a mining area. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 41, 1463-1472.
- Tessier, A., Y. Couillard, P.G.C. Campbell and J.-C. Auclair (1993) Modeling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve Anodonta grandis. Limnol. Oceanogr. 38, 1-17.
- Timmermans, K.R., W. Peeters and M. Tonkes (1992) Cadmium, zinc, lead and copper in Chironomus riparius (Meigen) larvae (Diptera, Chironomidae): Uptake and effects. Hydrobiol. 241, 119-34.
- Tjalve, H. and J. Gottofrey (1986) Tissue disposition of $^{109}\text{Cd}^{2+}$ in brown trout (Salmo trutta) studied by autoradiography and impulse counting. Toxicol. Environ. Chem. 12, 31-45.
- Ullberg, S., 1977. The technique of whole body autoradiography. Science Tools, Special Issue on Whole Body Autoradiography. The LKB Instrument Journal, Stockholm, pp. 2-29.
- Van Hattum, B., K.R. Timmermans and H.A. Govers (1991) Abiotic and biotic factors influencing in situ trace metal levels in macroinvertebrates in freshwater ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 10, 275-292.
- Verboost, P.M., G. Flik, R.A.C. Lock and S.E. Wendelaar Bonga (1987) Cadmium inhibition of Ca^{2+} uptake in rainbow trout gills. Amer. J. Physiol. 253, R216-R221.

- Verbost, P.M., J. Van Rooij, G. Flik, R.A. Lock and S.E. Wendelaar Bonga (1989) The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *J. Exper. Biol.* 145, 185-197.
- Wang, Y. and R.D. Evans (1993) Cadmium uptake in freshwater mussels Elliptio complanata: the role of calcium concentrations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 2591-2596.
- Ward, J.V. (1992) *Aquatic Insect Ecology 1. Biology and Habitat.* John Wiley & Sons, New York, N.Y. 438 pp.
- Wentzel, R., A. McIntosh and G. Atchison (1977) Sublethal effects of heavy metal contaminated sediment on midge larvae (Chironomus tentans) [Dipt., Chironomidae]. *Hydrobiol.* 52, 153-156.
- Wright, D.A. (1980) Cadmium and calcium interactions in the freshwater amphipod Gammarus pulex. *Freshwat. Biol.* 10, 123-133.
- Wülker, W.F., J.E. Sublette, M.F. Sublette and J. Martin (1971) A review of the genus Chironomus (Diptera, Chironomidae) I. The staegeri group. *Studies in Natural Sciences* 1(1), 1-89.
- Yamamura, M., K.T. Suzuki, S. Hatakeyama and K. Kubota (1983) Tolerance to cadmium and cadmium-binding proteins induced in the midge larva, Chironomus yoshimatsui (Diptera, Chironomidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 75C, 21-24.

Figure captions

Figure 1. Drawing of a generalized Chironomus larval gut (anterior on left) indicating the four major morphologically defined regions. Two of the four excretory organs, the Malpighian tubules, are also shown.

Figure 2. Microautoradiographs of sagittal sections of the whole body (a, c, e; scale bar 500 μm) or segments containing the anterior portion of the posterior midgut region (b, d, f; scale bar 50 μm) of Chironomus staegeri larvae: 2a and 2b, control; 2c and 2d, short-term Cd exposure in water only; 2e and 2f, long-term Cd exposure in water and sediment. Larvae are oriented with their anterior end on the left.

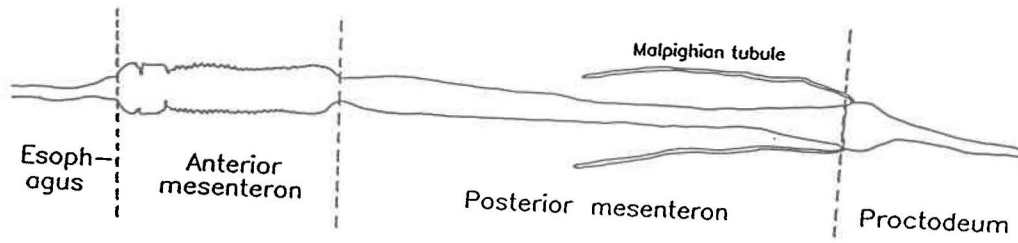


Figure 1. Craig et al.

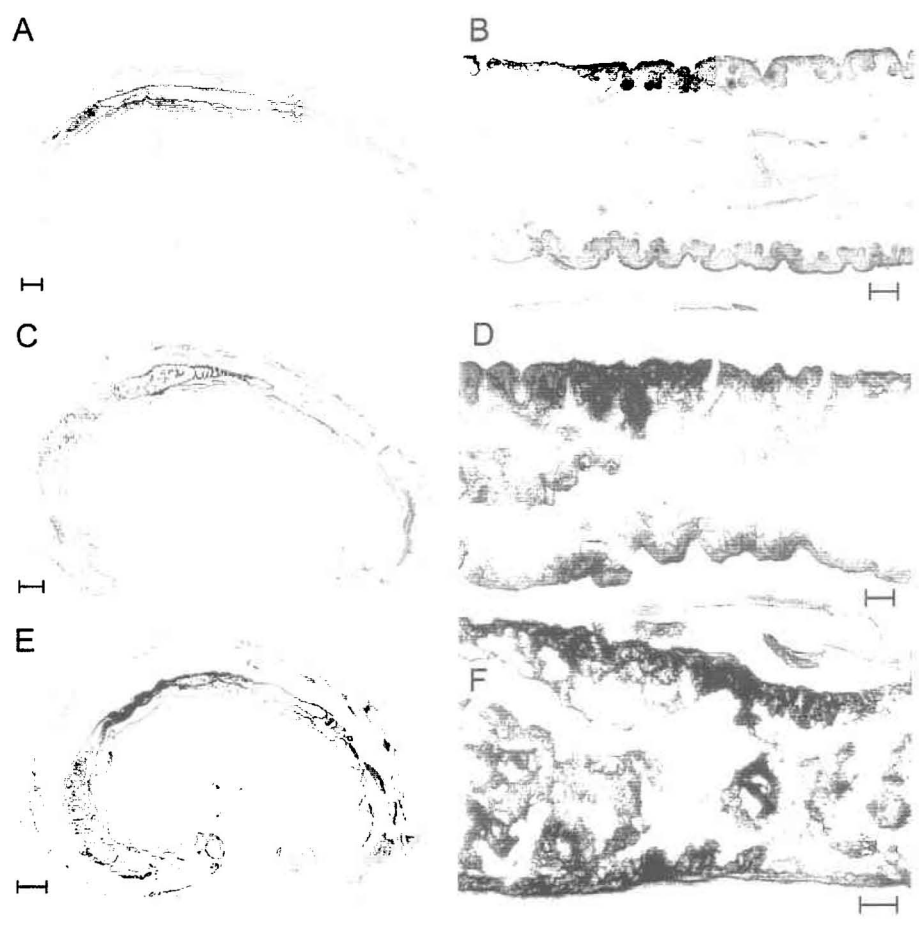


Figure 2.



Article No. 2 : Soumis à Aquatic Toxicology

Évidence expérimentale de la prise en charge du cadmium par les canaux calciques chez l'insecte aquatique *Chironomus staegeri*.

Albert Craig, Landis Hare et André Tessier

Université du Québec, INRS-Eau, C. P. 7500, Sainte-Foy, Québec, G1V 4C7, Canada

Résumé

Le mécanisme de la prise en charge du cadmium (Cd) chez les larves de quatrième stade de *Chironomus staegeri* a été étudié. Nous avons exposé, pendant trois jours, les larves à 50 nM de Cd dans l'eau seulement. Nous avons mesuré l'effet de la concentration de Ca (0.1-10 mM Ca) ainsi que l'effet des bloqueurs de canaux calciques, le lanthane (La) (10 µM et 100 µM) et le verapamil (100 µM et 300 µM), sur l'accumulation du Cd. Des concentrations de Ca élevées ont inhibé significativement l'accumulation du Cd par les larves (de 46% à 88%). Un modèle théorique simple des interactions Cd-Ca au site de prise en charge concorde bien avec nos observations. L'accumulation du Cd était inhibée significativement et en fonction des concentrations de La (73% et 92%) et de verapamil (59% et 85%). Nos résultats suggèrent fortement que le Cd entre dans ces insectes par des canaux calciques.

Mots Clefs : Métal, Cadmium, Accumulation, Prise en charge, Canal calcique, Calcium, Insecte, *Chironomus*.

Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in the aquatic insect

Chironomus staegeri.

Albert Craig, Landis Hare* and André Tessier

Université du Québec, INRS-Eau, C. P. 7500, Sainte-Foy, Québec, G1V 4C7, Canada

*Corresponding author.

Landis Hare

Tel. 418-654-2640

Fax. 418-654-2600

E-mail: landis@inrs-eau.quebec.ca

Abstract

We used the chironomid Chironomus staegeri to investigate the mechanism of cadmium (Cd) uptake in aquatic insects. We exposed C. staegeri larvae to a low nominal Cd concentration (50 nM) for 3 days and measured the effects of calcium (Ca) concentration (0.1-10 mM Ca) as well as the Ca channel blockers lanthanum and verapamil on Cd accumulation. When Ca^{2+} concentrations were increased above a control (0.1 mM Ca^{2+}) to 1 to 10 mM, Cd accumulation by larvae was inhibited by from 46% to 88%, respectively. A simple theoretical model of Cd-Ca competition for uptake sites fitted our observations well. Cadmium accumulation was significantly inhibited in a concentration dependent manner by both La (73% at 10 μM and 92% at 100 μM) and verapamil (59% at 100 μM and 85% at 300 μM). Our findings represent strong evidence that Cd entry into these insects occurs through Ca channels.

Keywords: Cadmium; Calcium; Metal; Accumulation; Uptake; Calcium channel; Insect;

Chironomus

1. Introduction

Cadmium (Cd) is an important contaminant of aquatic ecosystems (Dillon et al., 1986; Malley, 1996) where it is accumulated by animals (Ray, 1984; Hare and Tessier, 1996, 1998) and can be toxic to them (Bryan, 1971; Hare, 1992; Timmermans et al., 1992). The first step in Cd uptake by organisms is its entry through an apical epithelial membrane, the interface with the external environment. Because the lipid bilayer that constitutes this cell membrane has an intrinsically low permeability to dissolved hydrophilic trace metal ions, their uptake by aquatic organisms is generally thought to occur by facilitated diffusion through proteinaceous ionophores (Simkiss and Taylor, 1995). The role of these ion channels or pores in the assimilation of essential cations, including Ca, has been demonstrated in numerous organisms (Alberts et al., 1983).

Cadmium is taken up through Ca channels in mammalian cells (Hinkle et al., 1987; Blazka and Shaikh, 1991) as well as in fish (Verbost et al., 1987, 1989; Wicklund Glynn et al., 1994). The hypothesis of a common entry pathway for Cd and Ca is also supported by reports that Cd uptake in fish is inhibited by high aqueous Ca concentrations (Pärt et al., 1985, Wicklund and Runn, 1988). Conversely, Cd has been shown to have an inhibitory effect on Ca uptake in fish (Reid and McDonald, 1988; Reader and Morris, 1988). Interactions between Cd and Ca uptake have likewise been reported in several types of aquatic invertebrates. The concentration of dissolved Ca has been shown to influence Cd accumulation in marine (Bjerregaard and Depledge, 1994) and freshwater mollusks (Wang and Evans, 1993). The inhibition of Cd uptake by Ca channel blockers has been reported in excised gills of the bivalves *Anodonta anatina* (Holwerda et al., 1989) and *Crassostrea*

virginica (Roesijadi and Unger, 1993). In the freshwater crustacean Gammarus pulex, Cd uptake has been shown to be affected by the animal's Ca uptake rate (Wright, 1980). Moreover, increasing aqueous Ca concentrations reduces Cd accumulation in both the shore crab Carcinus maenas (Wright, 1977) and the amphipod Hyaella azteca (Stephenson and Mackie, 1989).

Despite the ecological importance of insects in fresh waters (Ward, 1992), neither the mechanism of Cd uptake nor the interactions between Cd and Ca in these animals have been studied. Cadmium is reported to be accumulated mainly in the digestive tract of many types of aquatic insects (Hare et al., 1991) including the dipteran Chironomus (Yamamura et al., 1983; Sumi et al., 1984; Seidman et al., 1986b; Craig et al., 1998). Studies on the digestive tract of Chironomus larvae suggest that the region of Cd accumulation in the gut is also a site at which essential elements such as Ca are taken up (Pierson, 1956; Seidman et al., 1986a). Moreover, the midgut has been shown to be the region responsible for Ca uptake in terrestrial insects (Taylor, 1985, 1986). Given this evidence for insects and that cited above for other types of animals, we hypothesize that Cd enters insects mainly via Ca uptake sites.

We chose larvae of the genus Chironomus to test this hypothesis because (i) they are a key component of the benthic fauna of many lakes (Butler and Anderson, 1990), (ii) there is a considerable base of knowledge on the localization of Cd in these larvae (e.g., Seidman et al., 1986b; Hare et al., 1991; Craig et al., 1998) and (iii) a better understanding of trace metal accumulation by these insects could help to interpret the results of the toxicity tests in which these animals are widely used (Luoma, 1995).

To verify if Cd in Chironomus larvae is assimilated via Ca pathways, two complementary approaches were used in the present study: i) larvae were exposed to a fixed concentration of Cd but various concentrations of Ca in order to evaluate the effect of Ca on Cd accumulation; and ii) larvae were exposed to a fixed concentration of Cd and two Ca channel blockers to determine if this would inhibit Cd accumulation.

2. Methods

Chironomus staegeri larvae were collected from Lake St. Joseph (46°55' N, 71°40' W), a 5 km² water body situated in a largely forested drainage basin on the Precambrian Shield near Quebec City, Quebec, Canada. There are no major industrial sources of Cd in the drainage basin and thus any anthropogenic Cd contamination of the site probably originates from local domestic sources (cottages) and long-range atmospheric transport. The identification of C. staegeri Lundbeck, a member of the thummi complex (Wülker et al., 1971), was made by M. G. Butler (North Dakota State University, Fargo, N. D.) on the basis of larval salivary chromosomes (Butler et al., 1995).

Sediment was collected with an Ekman grab or by diver operated net from a depth of 8 to 10 m near the outlet of Lake St. Joseph. Fine particles were eliminated in the field by sieving with a 0.5 mm mesh aperture net. Insects and remaining sediment were transported to the laboratory in 4-L plastic bags filled with lake water kept in a cooler. In the laboratory, fourth instar C. staegeri larvae were sorted from remaining sediment and placed in holding aquaria with unsieved Lake St. Joseph sediment. These aquaria were aerated, kept in the dark at 10°C and larvae were removed as required for the

experiments. Background Cd concentrations in fourth instar C. staegeri larvae in Lake St. Joseph range from 3 to 6 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight (Martin and Hare, unpublished data). Artificial lakewater of similar chemistry to that of Lake St. Joseph water was used in the holding tanks, as well as for all of the Cd exposures (albeit with added Cd, Ca or Ca-channel blocker depending on the treatment). The concentrations of major ions in the artificial water were: pH 6.0, Ca 100 μM , Mg 19 μM , Na 39 μM , K 2.6 μM , CO_3 94 μM , SO_4 42 μM , Cl 16 μM , NO_3 9.6 μM .

Three replicates of 10 C. staegeri larvae were kept in artificial lakewater without added Cd as a mortality control. In all three of the experimental treatments larvae were exposed to the same low Cd activity, $p[\text{Cd}] = 7.30$ (which corresponds to a Cd concentration of between 50 and 86 nM Cd, depending on the ionic strength of the medium), by the addition of $^{109+112}\text{CdCl}_2$ to artificial lakewater. Total Cd ion concentrations needed to achieve the required Cd activity were estimated with the computer code HYDRAQL (Papelis et al., 1988). We did not control for metal ion loss onto larval feces. In one treatment, larvae were exposed to Ca^{2+} concentrations of either 0.1 (our artificial lakewater), 1, 2.5, 5 or 10 mM Ca^{2+} created by the addition of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. In the two other treatments, larvae were exposed to either one of two calcium channel blockers: lanthanum (La, 10 μM and 100 μM) and verapamil (100 μM and 300 μM). The control for the Ca-blocker treatments was the lowest Ca treatment level (0.1 mM Ca^{2+}). For each treatment level, we used three replicate groups of 15 C. staegeri larvae. Larvae were exposed in the dark at 10°C in 150 mL of artificial lakewater in 250 mL HDPE bottles for 36 hours.

To purge any unassimilated radiotracer from the digestive tract of the animals after their ^{109}Cd exposure (larvae were not fed but did swallow water), larvae were held in the ^{109}Cd -free sieved Lake St. Joseph sediment for 48 hours (Martin and Hare, unpublished data). The organisms subsequently were rinsed in $10\ \mu\text{M}$ EDTA ($5\ \text{mL individual}^{-1}$) for 30 minutes to remove any remaining surface-bound ^{109}Cd . Each insect was then placed in a pre-weighed vial and counted in a "LKB Wallac 1282 Compugamma" gamma particle counter (NaI well type). Correction was made for background radiation and counting efficiency (60%) and counts were converted to total Cd accumulated during the experimental exposure (using a specific activity for Cd of $9.84 \times 10^7\ \text{BEQ mg}^{-1}$). Insects were then dried at 60°C to constant weight.

3. Results

For our experiments, we assumed that Cd uptake by the insect was equivalent to its net Cd accumulation, i.e., we ignored Cd losses from larvae during the experimental period. Our assumption is based on the results of a preliminary pulse and chase type experiment during which we measured no Cd loss from larvae over a 16 d depuration period (Craig, unpublished data).

3.1 Effect of Ca exposure on Cd accumulation

The accumulation of Cd by larvae of Chironomus staegeri was inversely related to the Ca concentration in water (Fig. 1). Cadmium accumulation differed significantly at all Ca concentrations (log normalized, one way ANOVA, Tukey honest significant difference

(HSD), $p < 0.05$). Increases in Ca concentrations of 10, 25, 50, or 100 times the control caused a reduction in larval Cd concentrations of 46%, 67%, 82% and 88% respectively (Fig. 1).

3.2 Effect of calcium channel blockers on Cd accumulation

The calcium channel blockers, La and verapamil, significantly (log normalized, one way ANOVA, Tukey honest significant difference (HSD), $p < 0.05$) inhibited the accumulation of Cd by larvae of *C. staegeri* at all concentrations used (Fig. 2). The inhibitory effect of both blockers was significantly greater (log normalized, one way ANOVA, Tukey (HSD), $p < 0.05$) at higher blocker concentrations (Fig. 2). The relative inhibition of Cd accumulation by La was 73% and 92% at the 10 and 100 μM concentrations, respectively. For verapamil, the inhibition of Cd accumulation was 59% and 85% at the 100 and 300 μM concentrations, respectively. Organism survival under experimental conditions (Ca channel blockers and elevated [Ca]) was not significantly different ($p > 0.05$, z-test) from that for control animals (22% mortality) except for the 300 μM verapamil exposure (42% mortality). Although a mortality rate above the control level at the highest verapamil concentration indicates that the results for this treatment level should be accepted with caution, it should be noted that only apparently healthy animals behaving in a normal fashion were used for our Cd analyses.

4. Discussion

As we increased Ca^{2+} concentrations, at a fixed Cd^{2+} concentration, Cd

accumulation was inhibited (Fig. 1), supporting the hypothesis that Cd enters Chironomus staegeeri through a Ca pathway. The simplest explanation for this effect is that the two ions compete for passage through the same site of entry; the ionic radii of Cd²⁺ and Ca²⁺ are quite similar at 0.97 Å and 0.99 Å, respectively (Pauling, 1960).

We compared our experimental results to the predictions of a theoretically-based model, the "free-ion activity model" (FIAM). According to the FIAM, uptake of Cd by an aquatic animal should be proportional to the concentration (or activity) of the free Cd ion, Cd²⁺, rather than to the total dissolved Cd concentration (Campbell, 1995). This model assumes that the rate of reaction of the metal with the uptake sites at the biological surface is fast compared with the rate of transfer across the membrane. For this reason, based on the FIAM, the interaction of Ca and Cd with the uptake site on an organism can be described by the following pseudo-equilibrium reactions (charges on uptake sites are ignored for simplicity and square and curved brackets refer to concentrations and activities, respectively):



Where $\equiv\text{SCd}$ and $\equiv\text{SCa}$ represent sites occupied by Cd or Ca, respectively, $\equiv\text{S}$ represents sites that are unoccupied by either metal, and K_{Cd} and K_{Ca} are pseudo-equilibrium constants. The total concentration of metal uptake sites on an organism is given by:

$$[S_T] = [≡S] + [≡SCd] + [≡SCa] \quad (3)$$

which, if combined with the expressions for the equilibrium constants in equations (1) and (2) and assuming that only a small fraction of the sites is occupied by Cd, gives

$$[≡SCd] = \frac{[S_T] K_{Cd} \{Cd^{2+}\}}{1 + K_{Ca} [Ca^{2+}]} \quad (4)$$

If we assume that Cd accumulated by an organism after a given time can be related to $[≡SCd]$ by a proportionality constant, k , i.e.,

$$[Cd]_{\text{organism}} = k [≡SCd] \quad (5)$$

combining equations (4) and (5) gives

$$[Cd]_{\text{organism}} = k [≡SCd] = \frac{k [S_T] K_{Cd} \{Cd^{2+}\}}{1 + K_{Ca} [Ca^{2+}]} \quad (6)$$

Since our experiments were carried out at constant Cd^{2+} activity, the numerator in equation (6) is also a constant if we assume that $[S_T]$ is constant among individuals. $[Cd]_{\text{organism}}$, or in our case, $[Cd]_{C. \text{ staegeri}}$, can now be fitted to $[Ca^{2+}]$ by nonlinear regression. Our estimates for $k[S_T]K_{Cd}$ and K_{Ca} (made using the Marquardt-Levenberg algorithm) are $0.226 \pm 0.018 \text{ L g}^{-1}$ and $975 \pm 28 \text{ L mol}^{-1}$, respectively (values \pm SE). This estimate of K_{Ca} is close to the value of 1100 L mol^{-1} reported for fish gill binding sites (Reid and

McDonald, 1991). Using our estimates of these constants, we are able to express Cd accumulation by C. staegeri as a function of the Ca concentration in their medium (curve in Fig. 1). The correspondence between the theoretical curve and our observed data points is striking. These predictions of Cd-Ca interactions in C. staegeri are based on the assumption that the number of uptake sites remains unchanged in larvae regardless of their respective environmental [Ca]. This is plausible since both terrestrial (Taylor, 1986) and aquatic insects (Barkai and Williams, 1983) are known to regulate Ca not by controlling uptake but rather by the excretion of excess Ca.

Our data suggest that the effect of Ca-Cd competition on Cd accumulation would not be adequately described by molar ratios of the two cations, as has been suggested for bivalves (Wang and Evans, 1993), but that absolute Ca concentrations must also be considered. Although the effect of Ca-Cd competition on Cd accumulation could be described as linear over narrow concentration intervals, it is clear from Eqn. 6 and Figure 1 that assumptions of linearity would be incorrect over a wider range of cation concentrations (as has been reported for fish; Pärt et al., 1985).

A field example of the influence of dissolved [Ca] on animal [Cd] is provided by data for the freshwater amphipod Hyaella azteca for which Cd concentrations are reported to be lower in lakes with higher aqueous [Ca] (Stephenson and Mackie, 1988). In another field study on similar lakes, Cd concentrations in the aquatic insect Chaoborus punctipennis were reportedly not influenced by [Ca²⁺] (Hare and Tessier, 1996). There are two possible explanations for the difference in the conclusions of the two studies. First, because highly acidic lakes were included in the data set of the latter study the strong H⁺-

Cd^{2+} competition for Cd uptake sites on organisms could have obscured the influence of Ca on animal [Cd]. Second, the Ca concentrations and demands of crustaceans are known to be higher than those of those of insects (Taylor, 1986) and thus Ca-Cd competition may be more important to crustaceans.

Our observed inhibition of Cd accumulation by the Ca channel blockers verapamil and La also suggests that Cd enters the insect through Ca channels. Verapamil, a specific Ca channel blocker, acts upon both potential-dependent (L-type) (Hosey and Lazdunski, 1988) and receptor-mediated Ca channels (Hughes et al., 1986). This organic molecule inactivates the channel by interacting with a specific receptor domain found on a large membrane-spanning protein that constitutes a substantial portion of the calcium channel (Triggle, 1991, 1992). Lanthanum (La^{3+}) forms a very strong bond with the Ca channel, thus preventing the passage of Ca through the ion pore. According to Weiss (1974), lanthanum's effect depends on the similarity of its ionic radius (115 Å) to that of Ca and its higher valence than that of Ca^{2+} . Verapamil and La are reported to inhibit Cd uptake by excised marine bivalve gills by approximately 50% for verapamil (250 μM for 3 h: Roesijadi and Unger, 1993) and 40% for La (0.1-10 μM for 1 h: Holwerda et al., 1989). Our results with similar concentrations of both verapamil (300 μM) and La (10 μM) yielded higher rates of inhibition, i.e., 85% and 73%, respectively. The lower Cd-inhibition values observed for bivalves than for our insect is consistent with the idea that mollusks have non-ionophoric Ca and Cd entry pathways (Roesijadi and Unger, 1993) that are absent in insects.

In summary, Cd accumulation in fourth instar larvae was inhibited by both

increased Ca concentrations and Ca channel blockers. It is thus quite probable that Cd employs the same entry pathway as Ca in this aquatic insect. Nearly all of the Cd accumulated by C. staegeri larvae is found in the anterior portion of the posterior midgut and appears to enter the organism at this site (Craig et al., 1998). We propose the corollary that the same region of the midgut is also the site of Ca uptake in this aquatic insect.

Acknowledgments

Our study was supported by grants from the Natural Science and Engineering Research Council of Canada, the United States Environmental Protection Agency, and the Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec. We thank M.-R. Doyon, M. Lebrun, L. Rancourt, R. Rodrigue and P. Charbonneau for their technical assistance.

References

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D., 1983. Molecular biology of the cell. Garland, New York, 1146 pp.
- Barkai, A.I. and Williams, R.W., 1983. The exchange of calcium in larvae of the mosquito Aedes aegypti. J. Exp. Biol., 104: 139-148.
- Bjerregaard, P. and Depledge, M.H., 1994. Cadmium accumulation in Littorina littorea, Mytilus edulis and Carcinus maenas: the influence of salinity and calcium ion concentrations. Mar. Biol., 119: 385-395.
- Blazka, M.E. and Shaikh Z.A., 1991. Differences in cadmium and mercury uptakes by hepatocytes: Role of calcium channels. Toxicol. Appl. Pharmacol., 110: 355-363.
- Bryan, G.W., 1971. The effects of heavy metals (other than mercury) on marine and estuarine organisms. Proc. Royal Soc. London B, 177: 389-410.
- Butler, M.G. and Anderson, D.H., 1990. Cohort structure, biomass, and production of a merovoltine Chironomus population in a Wisconsin lake. J. N. Amer. Benthological Soc., 9: 180-192.

- Butler, M.G., Kiknadze, I.I., Cooper, J.K. and Sürin, M., 1995. Cytologically identified Chironomus species from lakes in North Dakota and Minnesota, USA. In: P. Cranston (Editor), Chironomids: from genes to ecosystems. CSIRO Publications, East Melbourne, Australia, pp. 31-37.
- Campbell, P.G.C., 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the Free-ion Activity Model. In: A. Tessier and D.R. Turner (Editors), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. John Wiley & Sons, New York, pp. 45-102.
- Craig, A., Hare, L., Charest, P.-M. and Tessier, A., 1998. Effect of exposure regime on the internal distribution of cadmium in Chironomus staegeri larvae (Insecta, Diptera). Aquat. Toxicol., 41: 265-275.
- Dillon, P.J., Reid, R.A. and Girard, R., 1986. Changes in the chemistry of lakes near Sudbury, Ontario following reductions of SO₂ emissions. Water, Air, Soil Pollut., 31: 59-65.
- Hare, L., 1992. Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation, and toxicity. Crit. Rev. Toxicol., 22: 327-369.
- Hare, L., and Tessier, A., 1996. Predicting animal cadmium concentrations in lakes. Nature, 380: 430-432.
- Hare, L. and Tessier, A., 1998. The aquatic insect Chaoborus as a biomonitor of trace metals in lakes. Limnol. & Oceanogr., 43: in press.
- Hare, L., Tessier, A. and Campbell, P.G.C., 1991. Trace element distribution in aquatic insects: variations among genera, elements and lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 48: 1481-1491.
- Hinkle, P.M., Kinsella, P.A. and Osterhoudt, K.C., 1987. Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. J. Biol. Chem., 262: 16333-16337.
- Holwerda, D.A., de Knecht, J.A., Hemelraad, J. and Veenhof, P.R., 1989. Cadmium kinetics in freshwater clams. Uptake of cadmium by the excised gill of Anodonta anatina. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 42: 382-388.
- Hosey, M.M. and Lazdunski, M., 1988. Calcium channels: Molecular pharmacology, structure and regulation. J. Membrane Biol., 104: 81-105.
- Hughes, B.P., Milton, S.E., Barritt, G.J. and Auld, A.M., 1986. Studies with verapamil and nifedipine provide evidence for the presence in the liver cell plasma membrane of two types of Ca²⁺ inflow transporters which are dissimilar to potential-operated Ca²⁺ channels. Biochem. Pharmac., 35: 3045-3052.
- Luoma, S.N., 1995. Prediction of metal toxicity in nature from bioassays: Limitations and research needs. In: A. Tessier and D.R. Turner (Editors), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. John Wiley & Sons, New York, pp. 609-659.
- Malley, D.F., 1996. Cadmium whole-lake experiment at the Experimental Lakes Area: an anachronism? Can. J. Fish. Aquat. Sci., 53: 1862-1870.

- Papelis, C., Hayes, K.F. and Leckie, J.O., 1988. HYDRAQL: a program for the computation of chemical equilibrium composition of aqueous batch systems including surface-complexation modeling of ion adsorption at the oxide-solution interface. Dept. of Civil Engineering Technical report No. 306, Stanford University, Stanford, CA, 130 pp.
- Pärt, P., Svanberg, O. and Kiessling, A., 1985. The availability of cadmium to perfused rainbow trout gills in different water qualities. *Water Res.*, 19: 427-434.
- Pauling, L., 1960. The nature of the Chemical Bond, 3rd edition, Cornell University Press, Ithaca, N.Y.
- Pierson, M., 1956. Contribution a l'histologie de l'appareil digestif de Chironomus plumosus L. *Ann. Sci. Nat., Zool.*, 11: 107-122.
- Ray, S., 1984. Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. *Experientia*, 40: 14-23.
- Ray, S., McLeese, D.W., Waiwood, B.A. and Pezzack, D., 1980. The disposition of cadmium and zinc in Pandalus montagui. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 9: 675-681.
- Reader, J.P. and Morris, R., 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. and McDonald, D.G., 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. and McDonald, D.G., 1991. Metal binding activity of the gills of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 1061-1068.
- Roesijadi, G. and Unger, M.E., 1993. Cadmium uptake in gills of the mollusc Crassostrea virginica and inhibition by calcium channel blockers. *Aquat. Toxicol.*, 24: 195-206.
- Seidman, L.A., Bergtrom, G. and Rensen, C.C., 1986a. Structure of the midgut of the fly Chironomus thummi and its relationship to sites of cadmium sequestration. *Tissue and Cell*, 18: 407-418.
- Seidman, L.A., Bergtrom, G., Gingrich, D.J. and Rensen, C.C., 1986b. Accumulation of cadmium by the fourth instar larva of the fly Chironomus thummi. *Tissue and Cell*, 18: 395-405.
- Simkiss, K. and Taylor, M.G., 1995. Transport of metals across membranes. In: A. Tessier and D.R. Turner (Editors), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons, New York, pp. 1-44.
- Stephenson, M. and Mackie, G.L., 1988. Multivariate analysis of correlations between environmental parameters and cadmium concentrations in Hyalella azteca (Crustacea: Amphipoda) from central Ontario lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45: 1705-1710.
- Stephenson, M. and Mackie, G.L., 1989. A laboratory study of the effects of waterborne cadmium, calcium, and carbonate concentrations on cadmium concentrations in Hyalella azteca (Crustacea: Amphipoda). *Aquat. Toxicol.*, 15: 53-62.

- Sumi, Y., Suzuki, T., Yamamura, M., Hatakeyama, S., Sugaya, Y. and Suzuki, K.T., 1984. Histochemical staining of cadmium taken up by the midge larva, Chironomus yoshimatsui (Diptera, Chironomidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 79A: 353-357.
- Taylor, C.W., 1985. Calcium absorption by the midgut of the blowfly, Calliphora vicina. *J. Exper. Biol.*, 114: 551-561.
- Taylor, C.W., 1986. Calcium regulation in insects. In: P.D. Evans and V.B. Wigglesworth (Editors), *Advances in Insect Physiology*. Academic Press, London, pp. 155-186.
- Timmermans, K.R., Peeters, W. and Tonkes, M., 1992. Cadmium, zinc, lead and copper in Chironomus riparius (Meigen) larvae (Diptera, Chironomidae): Uptake and effects. *Hydrobiol.*, 241: 119-34.
- Triggle, D.J., 1991. Calcium-channel drugs: structure-function relationships and selectivity of action. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 18 (Suppl. 10): S1-S6.
- Triggle, D.J., 1992. Calcium-channel antagonists: mechanisms of action, vascular selectivities, and clinical relevance. *Cleve. Clin. J. Med.*, 59: 617-627.
- Verboost, P.M., Flik, G., Lock, R.A.C. and Wendelaar Bonga, S.E., 1987. Cadmium inhibition of Ca^{2+} uptake in rainbow trout gills. *Amer. J. Physiol.*, 253: R216-R221.
- Verboost, P.M., Van Rooij, J., Flik, G., Lock, R.A. and Wendelaar Bonga, S.E., 1989. The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *J. Exper. Biol.*, 145: 185-197.
- Wang, Y. and Evans, R.D., 1993. Cadmium uptake in freshwater mussels Elliptio complanata: the role of calcium concentrations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50: 2591-2596.
- Ward, J.V., 1992. *Aquatic Insect Ecology 1. Biology and Habitat*. John Wiley & Sons, New York, 438 pp.
- Weiss, G. B., 1974. Cellular pharmacology of lanthanum. *Annu. Rev. Pharmacol.*, 14: 343-354.
- Wicklund, A. and Runn, P., 1988. Calcium effects on cadmium uptake, redistribution, and elimination in minnows, Phoxinus phoxinus, acclimated to different calcium concentrations. *Aquat. Toxicol.*, 13: 109-122.
- Wicklund Glynn, A., Norrgren, L. and Mussener, A., 1994. Differences in uptake of inorganic mercury and cadmium in the gills of the zebrafish, Brachydanio rerio. *Aquat. Toxicol.*, 30: 13-26.
- Wright, D.A., 1977. The effect of calcium on cadmium uptake by the shore crab Carcinus maenas. *J. Exper. Biol.*, 67: 163-173.
- Wright, D.A., 1980. Cadmium and calcium interactions in the freshwater amphipod Gammarus pulex. *Freshwat. Biol.*, 10: 123-133.
- Wülker, W.F., Sublette, J.E., Sublette, M.F. and Martin, J., 1971. A review of the genus Chironomus (Diptera, Chironomidae) I. The staegeri group. *Studies in Natural Sciences*, 1: 1-89.

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

Figure captions

Figure 1: Cadmium accumulation in Chironomus staegeri larvae after a 36 h water-only exposure to a constant nominal Cd^{2+} activity (50 nM) and either 0.1, 1, 2.5, 5, or 10 mM Ca. Circles are means (\pm SE, $n = 29$ to 35) for each treatment level, whereas the curved line represents expected Cd accumulation as estimated using equation (6) with $K_{\text{Ca}} = 975$ and $kS_{\text{T}}K_{\text{Cd}} = 0.226$.

Figure 2: Cadmium accumulation in Chironomus staegeri larvae ($X \pm$ SE, $n = 33$ for the control) after a 36 h water-only exposure to a constant nominal Cd^{2+} activity (50 nM) and either of two calcium channel blockers: La (10 μM , $n = 40$; or 100 μM , $n = 37$) or verapamil (100 μM , $n = 40$; or 300 μM , $n = 24$). Results that are statistically different ($p < 0.05$) are indicated by the symbol * (based on log-transformed data used in one-way ANOVA and Tukey HSD tests).

Figure 1

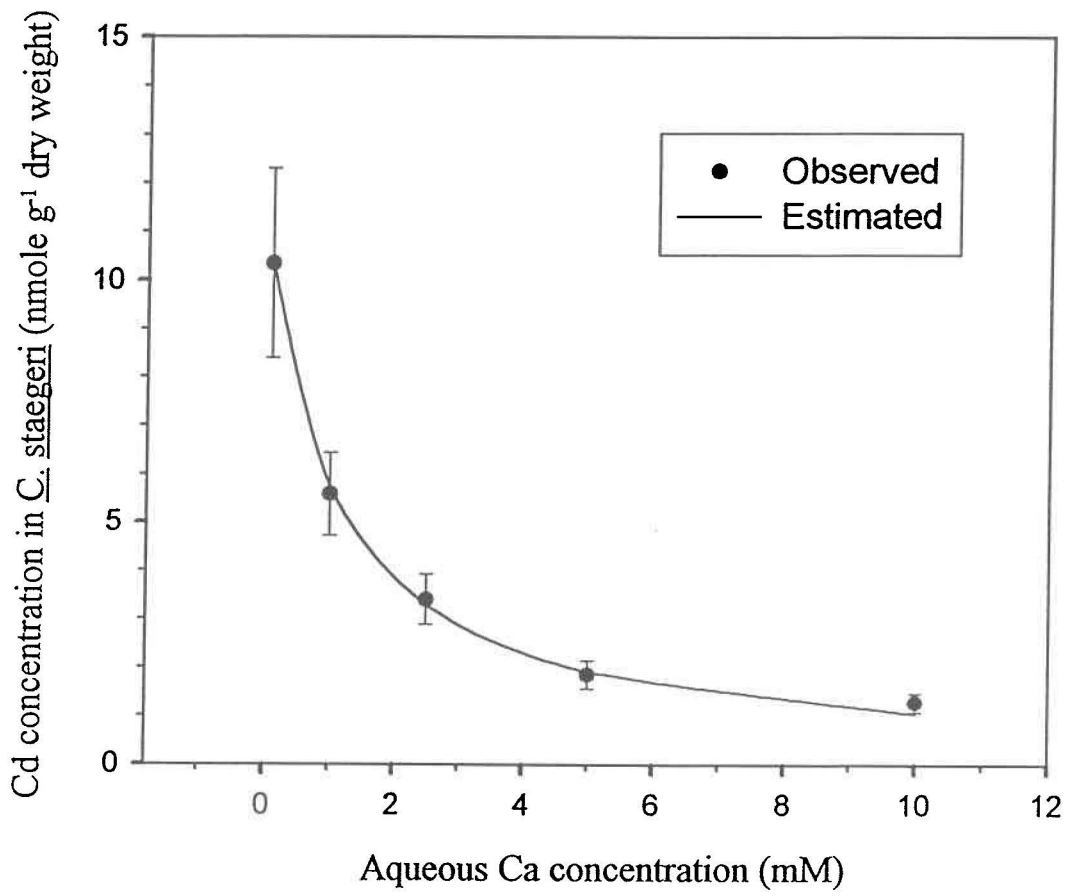
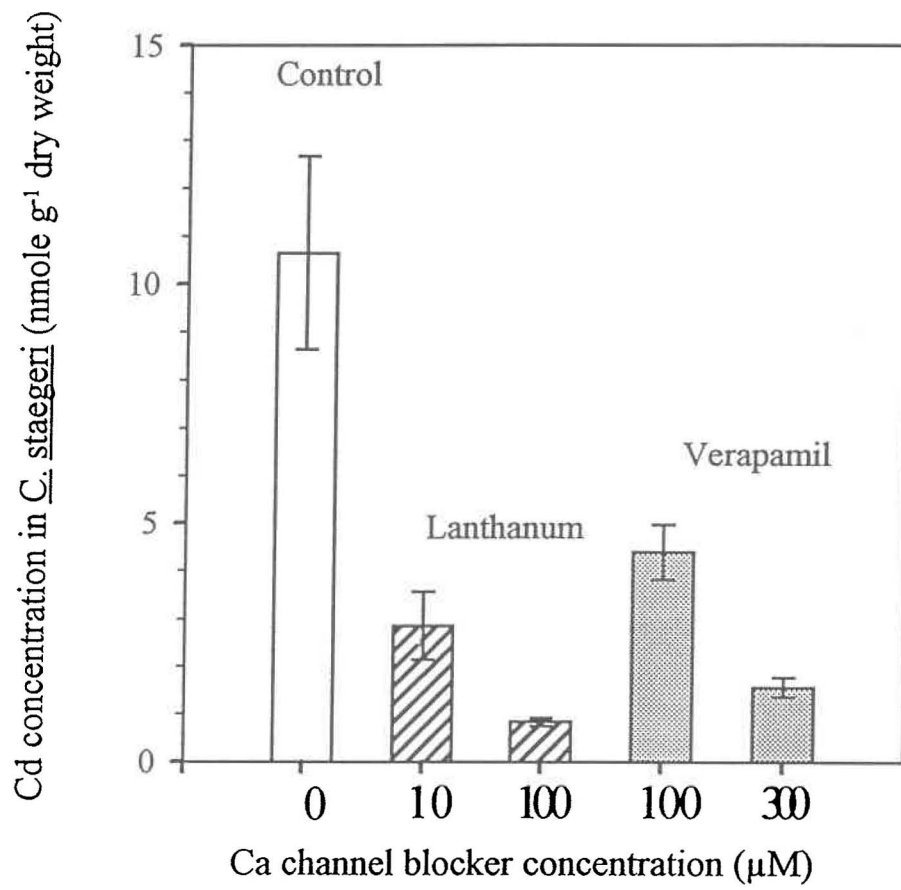
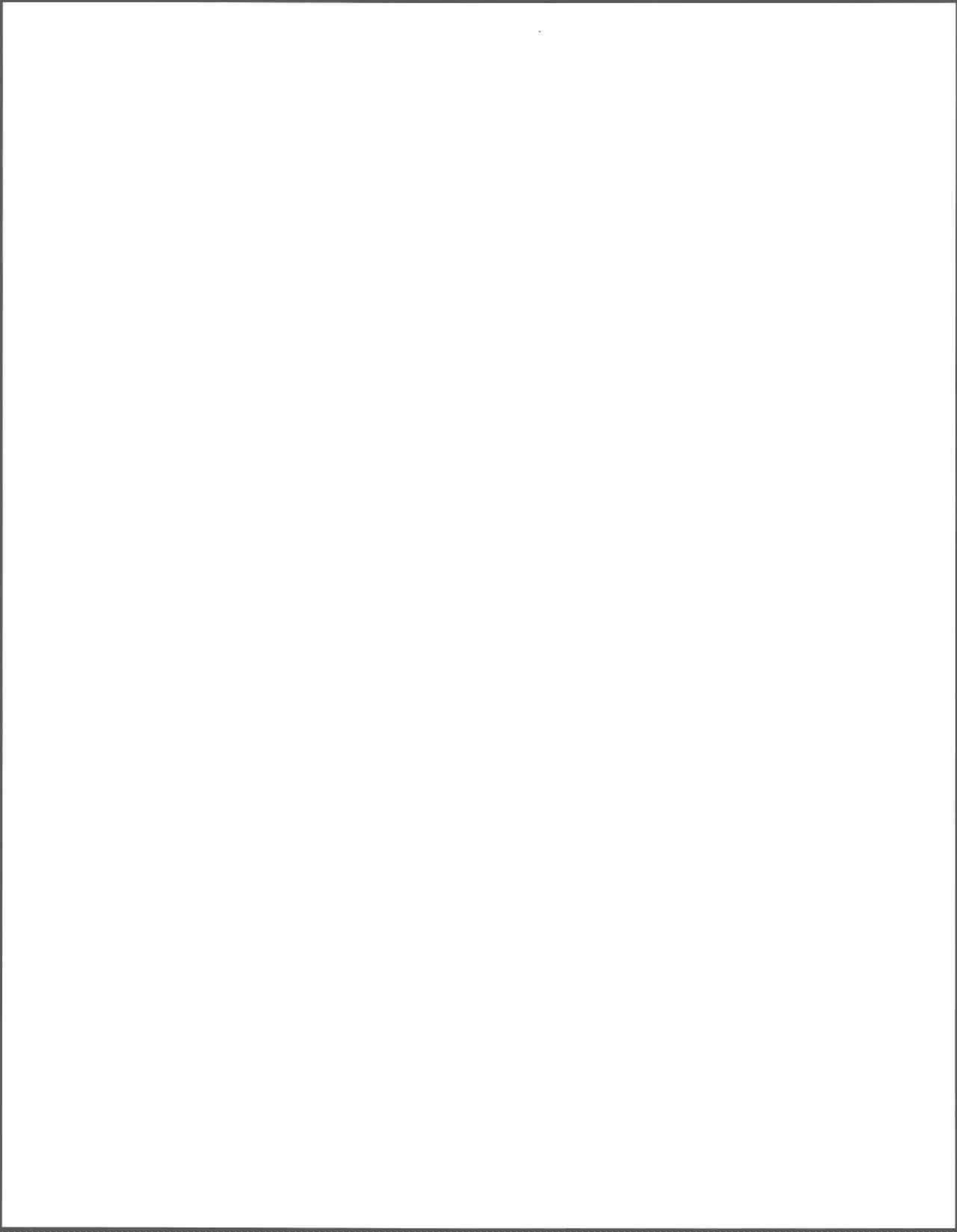
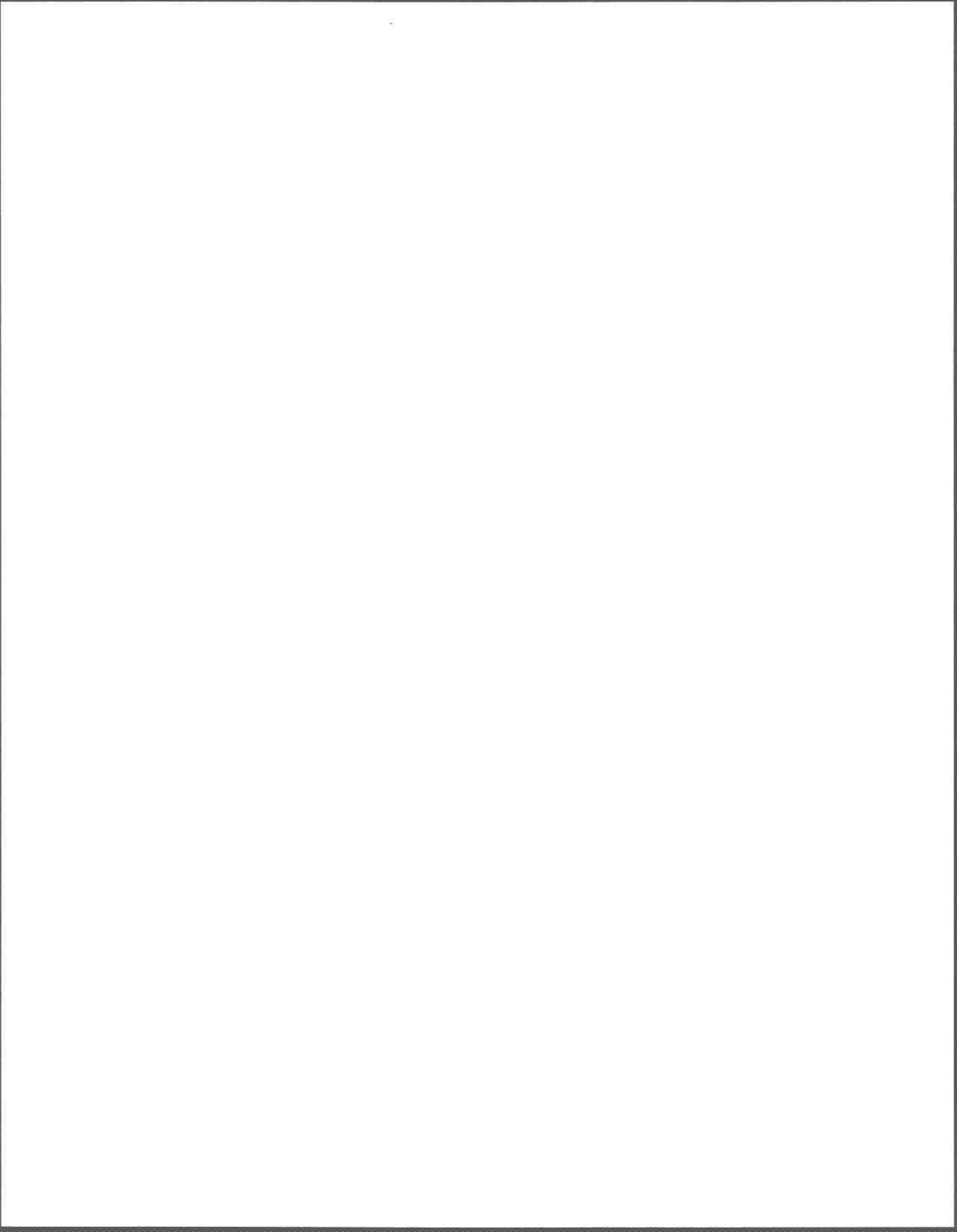


Figure 2





ANNEXE 1



Influence of exposure time on the distribution of cadmium within the cladoceran

Ceriodaphnia dubia

Catherine Munger^a, Landis Hare^{a,*}, Albert Craig^a, Pierre-Mathieu Charest^b

^a Université du Québec, INRS-Eau, C.P. 7500, Sainte-Foy, Québec, G1V 4C7, Canada

^b Département de phytologie, Pavillon C.-E. Marchand, Université Laval, Québec,

Québec, G1K 7P4, Canada

*Corresponding author.

Abstract

The internal distribution of a trace metal can be useful in determining in which body organ toxic effects are most likely to occur and the animal function most likely to be affected. In addition, because a metal's distribution within an organism is likely to influence the rate and efficiency with which it is transferred to a higher trophic level, laboratory measurements of trophic transfer could be influenced by exposure duration. We compared the internal distribution of cadmium (Cd) in a cladoceran crustacean (Ceriodaphnia dubia) destined as food for a predatory insect (Chaoborus) after either a 1 d or a lifetime of exposure of prey to the trace metal. Prey were exposed to $^{112+109}\text{Cd}$ in both water (10 nM) and their food (algae), as might occur in nature. The internal distribution of ^{109}Cd in the cladoceran was determined by whole-animal autoradiography. Both the amount and the tissue distribution of Cd in prey were the same after the short and the long term exposures, suggesting that metal accumulation parameters measured after short-term metal exposures can be valid for this animal. Cadmium was mainly accumulated in diverticula of the anterior midgut, a region reported to be responsible for nutrient absorption. We hypothesize that Cd is accumulated in the diverticula because of their purported role as sites of calcium uptake.

Keywords: Cadmium; Calcium; Metal; Bioaccumulation; Autoradiography; Histology; Ceriodaphnia

1. Introduction

Trace metals such as cadmium (Cd) are major contaminants of aquatic environments that can be taken up by animals from water and food thereby causing toxic effects (Kay, 1985; Wright and Welbourne, 1994; Malley, 1996). Although aquatic animals are treated as black boxes in many ecotoxicological studies, knowledge of the internal distribution of a trace metal (e.g., Hare et al., 1991) can be useful in determining in which body organ toxic effects are most likely to occur and which animal function is most likely to be affected. Furthermore, a metal's internal distribution can influence its transfer to higher trophic levels by affecting the efficiency with which it is assimilated by a consumer. Consideration of internal metal partitioning is especially important when prey animals are experimentally exposed to metal prior to feeding to a predator. In the laboratory, organisms offered as food to a consumer are often exposed to the metal for only a short period of time relative to their lifetime. Such a procedure could yield food in which metal is bound in easily exchangeable pools (Jannasch et al., 1988) leading to an overestimation of the amount transferred to a consumer. Furthermore, prey tissues synthesized prior to the metal exposure might not be contaminated (Reinfelder and Fisher, 1994). Although long-term metal exposures are ideal, they tend to be costly in both time and effort.

We compared the internal distribution of Cd in the planktonic crustacean Ceriodaphnia dubia (Richard) after a short (1 d) or long (60 d) exposure to the metal. Cladocerans such as C. dubia are important prey for freshwater predators such as Chaoborus and have been used to study Cd transfer between primary and secondary consumers (Munger and Hare, 1997). Ceriodaphnia dubia is also widely used in toxicity tests because of its short life cycle and the ease with which it reproduces in the laboratory (Environment Canada, 1992).

We used whole-body microautoradiography to localize ^{109}Cd in C. dubia. This technique has several advantages: i) it is sensitive to all forms of metal including those bound to metalloproteins or in granules; ii) it is easily applied to organisms that are too small to dissect; iii) the use of sagittal sections of entire animals (whole-body) allows the simultaneous comparison of metal distributions in most of an individual's organs; iv) the application of a liquid photographic emulsion to glass microscope slides permits the observation of results directly on the tissues rather than on negatives as in traditional autoradiograms (Craig et al., 1997).

2. Methods

2.1. Rearing and ^{109}Cd exposure of C. dubia

Ceriodaphnia dubia was cultured at room temperature in dechlorinated tap water adjusted to a hardness of 180 mg L^{-1} by the addition of magnesium and calcium chlorides

in proportions of 1 : 3.5, respectively (Environment Canada, 1992). Food for the cladoceran consisted of the green alga Selenastrum capricornutum, (cultured in Bold Basal Medium prepared according to Starr and Zeikus, 1993), and an organic supplement (yeast, alfalfa and trout chow in approximately 1 : 1 : 1 proportions by dry weight).

To favor Cd distribution patterns that would be similar to what might be observed in nature, C. dubia were exposed to ^{109}Cd both in water and algae in a medium favorable for the coexistence and reproduction of both organisms. A concentration of $10\text{ nM }^{112+109}\text{Cd}$ (167 GBq g^{-1} specific activity) was used for the cladoceran/algal exposures, Cd concentrations this high have been measured in lakes subject to Cd deposition from metal smelters (Tessier et al., 1993; Hare and Tessier, 1996; Croteau et al., 1998).

We used two Cd exposure durations; a 1 d exposure, such as might be used in a short-term laboratory food-chain transfer experiment, versus a 60 d exposure in which animals could accumulate Cd over several generations, as might occur in nature. The life span of animals under our experimental conditions was about 30 d, whereas their generation time was about 5 d. To distinguish between the two treatment levels, we use the terms “1 d exposure” and “life-time_exposure”. Following Cd exposure, samples of 30 adult C. dubia (length $\approx 1\text{ mm}$) were held in $100\text{ }\mu\text{M}$ EDTA for 5 min to remove the Cd sorbed on their exoskeleton. The animals were then placed in uncontaminated water containing ^{109}Cd -free algae for 30 min to allow them to eliminate their ^{109}Cd -rich gut contents. A 30 min depuration period is sufficient to allow the gut contents of C. dubia to be replaced 6 times (Munger and Hare, 1997), thereby removing all Cd-rich gut contents and any Cd adsorbed

on the gut wall. ^{109}Cd accumulation was measured by gamma-counting (LKB Wallac 1282 Compugamma NaI(Tl) well-type counter; 60% counting efficiency for ^{109}Cd). Variations in counts due to the position of samples in vials were avoided by counting animals in a constant volume of water (1 mL) in a single type of vial. Counts per minute were converted to Cd concentrations per gram of *C. dubia* based on the specific activity of the Cd solutions used and a mean dry weight of 0.368 ± 0.019 mg (\pm S.D.) for 5 pooled samples of 30 individuals.

2.2 Autoradiography

The same reagent solutions were used for all specimens at each step of the autoradiographic process to ensure that Cd-exposure patterns could be compared among specimens. *Ceriodaphnia dubia* from the short-term and long-term exposures were fixed in 3% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) containing 0.5% tannic acid to prevent translocation of Cd within tissues (Murakami and Webb, 1981; Craig et al., 1997). Samples of 30 *C. dubia* were dehydrated to toluene and were embedded in paraffin in a random orientation. Sections of 10 μm thickness were placed on microscope slides, exposed to 2% paraformaldehyde vapor to harden the gelatin, then deparaffinized with toluene. Craig et al. (1997) measured negligible Cd loss from insect tissues during fixation and dehydration to toluene, suggesting that the Cd distribution patterns observed in our crustacean are unlikely to be artifacts of the histological techniques employed. All slides were dipped at the same time in a single batch of Kodak NTB-3 nuclear track emulsion in a darkroom maintained at 30°C with a relative humidity of 80%, and dried and

refrigerated in the dark for 20-24 d of exposure. When test slides showed sufficient autoradiographic labeling, all remaining slides were developed shortly thereafter (at 24 d) at 14°C in Kodak D-19 for 4 min. Sections were stained with methylene blue. Fifty C. dubia per exposure time were examined under a light microscope. Craig et al. (1997) demonstrated that slides of animals not exposed to ^{109}Cd show no labeling.

3. Results & Discussion

Cadmium concentrations in whole fresh C. dubia were not significantly different ($p > 0.05$, t -test on log transformed data) after either a 1 d or a 60 d Cd exposure; that is, mean Cd concentrations (\pm S.D.) in samples of 30 animals from the two treatments levels were 64 (± 4 , $n = 3$) and 53 (± 7 , $n = 8$) $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ d.w., respectively. This rapid achievement of steady-state Cd concentrations was also observed in a previous study in which Cd concentrations in C. dubia reached 90% of their maximum value after a 1 d exposure to Cd from water and food (Munger and Hare, 1997). These whole-animal data suggest that short term Cd exposures would be sufficient to produce animals having the same Cd concentrations as those exposed to the metal for several generations. However, because the internal distribution of Cd could influence its availability to a predator, total animal concentrations alone might not be sufficient to justify short term prey exposures to metal.

The anatomy of a cladoceran is presented in schematic view (Fig. 1). All C. dubia showed the same Cd distribution pattern; complete individuals that were cut by chance along either their longitudinal or cross sectional axis are presented in figure 2 to facilitate

the recognition of animal structures. Autoradiographic labeling was weak on the exoskeleton of C. dubia (Fig. 2), as might be expected since external Cd had been removed from animals by desorption in EDTA. The removal of sorbed Cd is clearly necessary to avoid externally sorbed Cd obscuring internal Cd distribution patterns (as in Carney et al., 1986). A weakly labeled exoskeleton is also consistent with the reportedly small amounts of Cd present in the exoskeleton matrix of C. dubia (Munger and Hare, 1997). In contrast, substantial amounts of Cd are reported in the exoskeleton of some larger crustacean species, i.e., from 24 to 50% of the body total in the amphipod Gammarus pulex (Wright, 1980) and the shrimp Palaemon elegans (White and Rainbow, 1986), respectively.

Autoradiographic labeling was strongly concentrated in the anterior midgut region, especially in the gut diverticula - a pair of sacs that curve backward from the midgut to terminate blindly behind the animal's eye (GD, Fig. 1). The gut diverticula of a related species, Daphnia magna, are reported to undergo a dramatic change in structure following Cd exposure (Griffiths, 1980), suggesting that these organs are the major site of Cd accumulation in these cladocerans as well. Although the function of the midgut region (including the diverticula) has not been studied in C. dubia, nutrients are reported to be taken up mainly in this region in the cladoceran Daphnia pulex (Schultz and Kennedy, 1976). Because Cd is thought to cross animal membranes mainly at uptake sites for calcium (Simkiss and Taylor, 1995; Craig et al., 1998), a consequence in part of the similar ionic radii of the two ions (Pauling, 1960), our results suggest that the gut diverticula function in Ca exchange. This hypothesis is supported by the fact that Ca-rich

granules can be observed in intercellular channels located in the diverticula of Cd-exposed D. magna (Griffiths, 1980). From this observation it has been hypothesized that Cd-exposure impairs Ca metabolism and eventually gut diverticula morphology (Griffiths, 1980). The generally high Ca requirements of crustaceans compared to insects (Taylor, 1986) could explain the greater sensitivity of crustaceans to acute Cd exposures than their arthropod cousins (Williams et al., 1985).

Because the gut was the major organ in which we observed Cd accumulation after both short and long term Cd exposures, this organ is likely to be the site at which the animal's physiology is affected and thus at which toxic effects occur. Furthermore, given the reportedly small loss rates of Cd from C. dubia (Munger and Hare, 1997), it seems likely that there is little transfer of Cd to other body organs; if this had been the case, then Cd in organs other than the gut should have been visible in autoradiographs of animals exposed to the metal for their lifetime. However, because our study was not designed to reveal the presence of minor accumulation sites, we cannot rule out the possibility that they were hidden by the strong labeling of the gut diverticula. Feeding contaminated animals Cd-free algae would allow the measurement of Cd movement from gut tissues to other organs and to the surrounding water. Studies at the biochemical level have indicated that the majority of the Cd in C. dubia is found in the non-lipid fraction regardless of the Cd-exposure duration (Munger and Hare, 1997). The fact that the internal distribution of Cd in C. dubia achieves steady state rapidly and does not appear to vary over time could make this animal a good candidate as prey for use in Cd trophic transfer experiments. Laboratory experiments designed to study the accumulation of Cd from planktonic food as well as the

efficiency with which the metal is assimilated by predators could rely on C. dubia that have been exposed to Cd for only 1 d to produce patterns representative of those likely to occur in animals exposed to the metal throughout their lifetime.

Acknowledgments

Funding for our study was provided by Human Resources Development Canada, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, and the Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec. Technical assistance was furnished by A. Goulet.

References

- Carney, G.C., Shore, P. and Chandra, H., 1986. The uptake of cadmium from a dietary and soluble source by the crustacean Daphnia magna. Environ. Res., 39: 290-298.
- Craig A., Hare, L., Charest, P.-M. and Tessier, A., 1997. Effect of exposure regime on the internal distribution of cadmium in Chironomus staegeri larvae (Insecta, Diptera). Aquat. Toxicol., in press.
- Craig A., Hare, L. and Tessier, A., 1998. Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in the aquatic insect Chironomus staegeri. Aquat. Toxicol., in review.
- Croteau M.-N., Hare, L. and Tessier, A., 1998. Refining and testing a trace metal biomonitor (Chaoborus) in highly acidic lakes. Environ. Sci. Technol., 32, in press.
- Dodson, S.I. and Frey, D.G., 1991. Cladocera and other Branchiopoda. In: J.H. Thorp and A.P. Covich (Editors), Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. Academic Press, San Diego, pp. 723-786.
- Environment Canada, 1992. Biological test method: Test of reproduction and survival using the cladoceran Ceriodaphnia dubia. Report EPS 1/RM/21. Environmental Protection Publishers, Environment Canada, Ottawa.
- Griffiths, P.R.E., 1980. Morphological and ultrastructural effects of sublethal cadmium poisoning on Daphnia. Environ. Res., 22: 277-284.
- Hare, L. and Tessier, A., 1996. Predicting animal cadmium concentrations in lakes. Nature, 380: 430-432.
- Hare, L., Saouter, E., Campbell, P.G.C., Tessier, A., Ribeyre, F. and Boudou, A., 1991. Dynamics of cadmium, lead, and zinc exchange between nymphs of the burrowing mayfly Hexagenia rigida (Ephemeroptera) and the environment. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 48: 39-47.

- Jannasch, H.W., Honeyman, B.D., Balistrieri, L.S. and Murray, J.W., 1988. Kinetics of trace metal uptake by marine particles. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 52: 567-577.
- Kay, S.H., 1985. Cadmium in aquatic food webs. *Res. Reviews*, 96: 13-43.
- Malley, D.F., 1996. Cadmium whole-lake experiment at the experimental lakes area: an anachronism? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53: 1862-1870.
- Munger, C. and Hare, L., 1997. Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): implications for predicting Cd bioaccumulation in nature. *Environ. Sci. Technol.*, 31: 891-895.
- Murakami, M. and Webb, M., 1981. A morphological and biochemical study of the effects of L-cysteine on the renal uptake and nephrotoxicity of cadmium. *Br. J. exp. Path.*, 62: 115-130.
- Pauling, L. (Editor), 1960. *The nature of the chemical bond*, 3rd edition. Cornell University Press, Ithaca, N.Y., 644 pp.
- Reinfelder, J.R. and Fisher, N.S., 1994. Retention of elements absorbed by juvenile fish (*Menidia menidia*, *Menidia beryllina*) from zooplankton prey. *Limnol. Oceanogr.*, 39: 1783-1789.
- Simkiss, K. and Taylor, M.G., 1995. Transport of metals across membranes. In: A. Tessier and D.R. Turner (Editors), *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. John Wiley and Sons, N.Y., pp. 1-44.
- Schultz, T.W. and Kennedy, J.R., 1976. The fine structure of the digestive system of *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera). *Tissue Cell*, 8: 479-490.
- Starr, R.C. and Zeikus, J.A., 1993. UTEX-The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *J. Phycol.*, 29 (Suppl.): 1-106.
- Taylor, C.W., 1986. Calcium regulation in insects. In: P.D. Evans and V.B. Wigglesworth (Editors), *Advances in insect physiology*. Academic Press, London, pp. 155-186.

- Tessier, A., Couillard, Y., Campbell, P.G.C. and Auclair, J.-C., 1993. Modeling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve Anodonta grandis. *Limnol. Oceanogr.*, 38: 1-17.
- White, S.L. and Rainbow, P.S., 1986. Accumulation of cadmium by Palaemon elegans (Crustacea: Decapoda). *Mar. Biol.*, 32: 17-25.
- Williams, K.A., Green, D.W.J. and Pascoe, D., 1985. Studies on the acute toxicity of pollutants to freshwater macroinvertebrates 1. cadmium. *Arch. Hydrobiol.*, 102: 461-471.
- Wright, D.A., 1980. Cadmium and calcium interactions in the freshwater amphipod Gammarus pulex. *Freshwat. Biol.*, 10: 123-133.
- Wright, D.A. and Welbourne, P.M., 1994. Cd in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. *Environ. Rev.*, 2: 187-214.

6. Figure captions

Figure 1. Schematic view of Ceriodaphnia sp. Scale bar represents 0.1 mm. Figure redrawn from Dodson and Frey (1991).

Figure 2. Sagittal sections showing Cd accumulation sites in two typical C. dubia individuals as revealed by autoradiographic labeling (regions of black points): low (a and c) and high (b and d) magnification views of individuals that were exposed to Cd for either 60 d (a) and (b) or 1 d (c) and (d). GD= gut diverticula; E=exoskeleton; M=midgut. Scale bar represents 500 μm in a and c, and 50 μm in b and d.

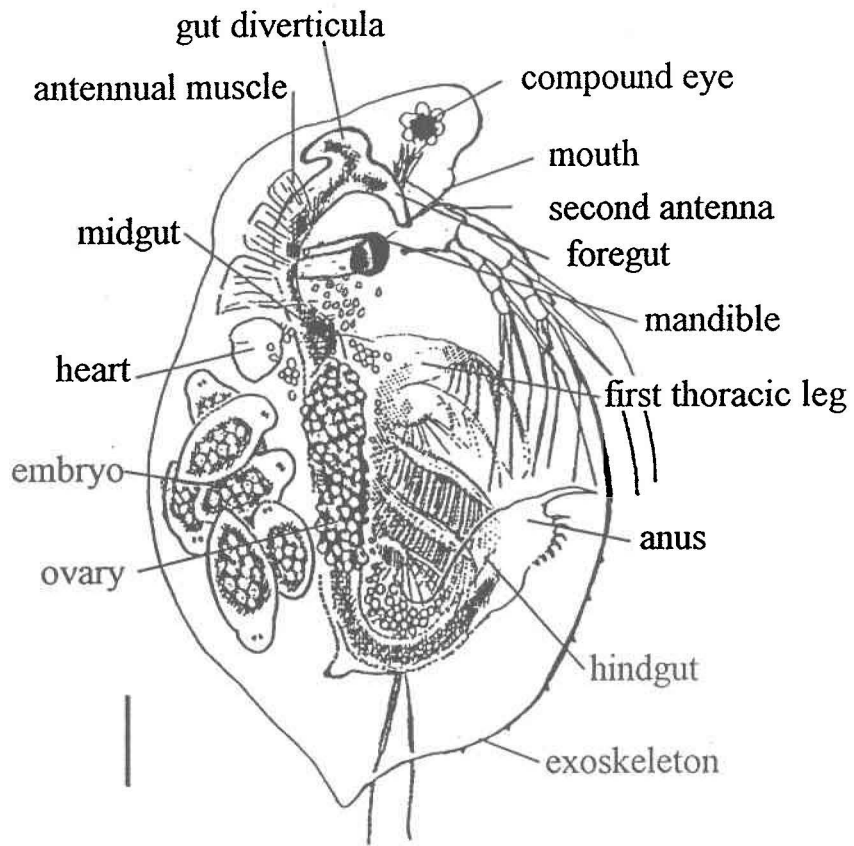
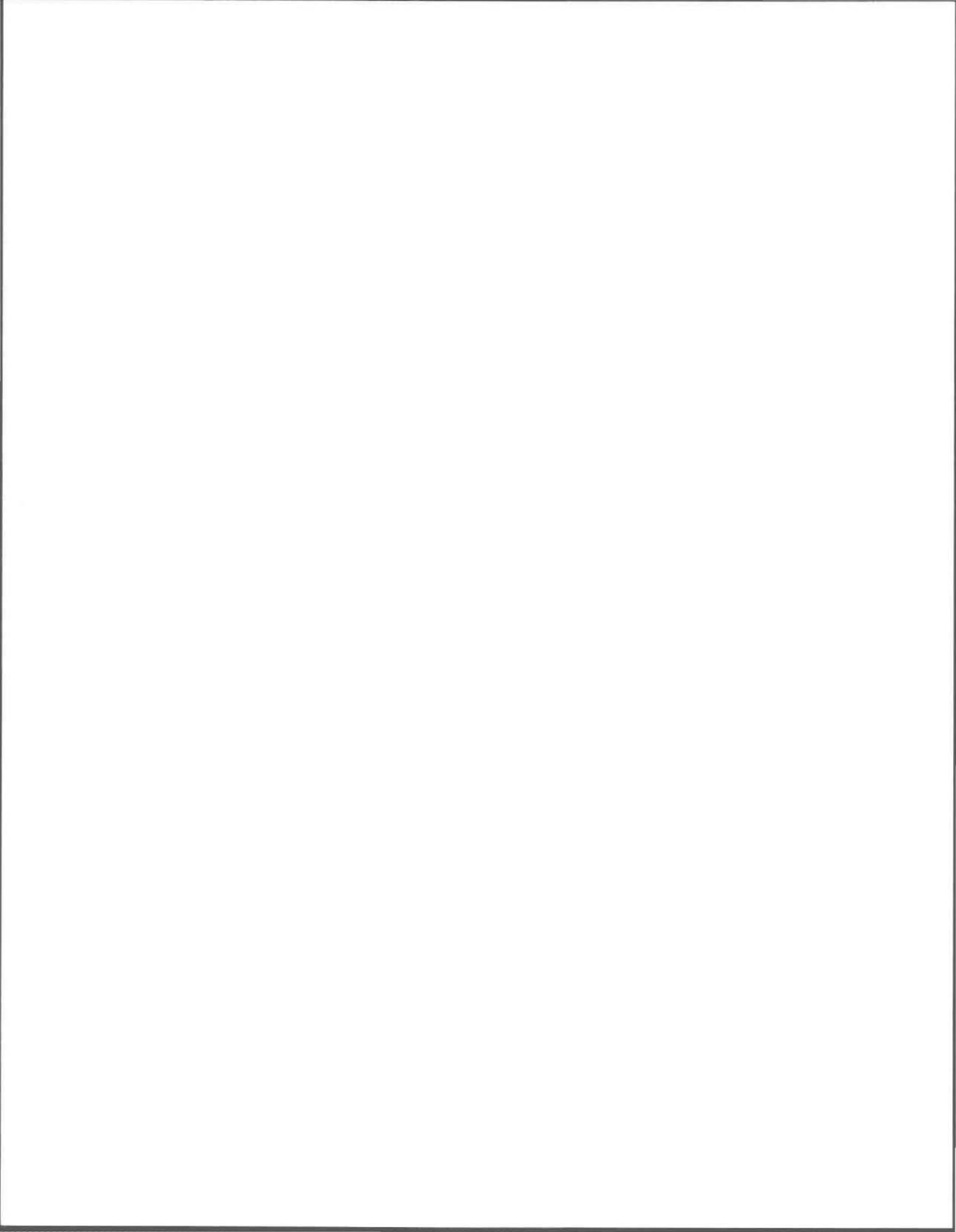


Figure 1. Munger, Hare, Craig and Charest



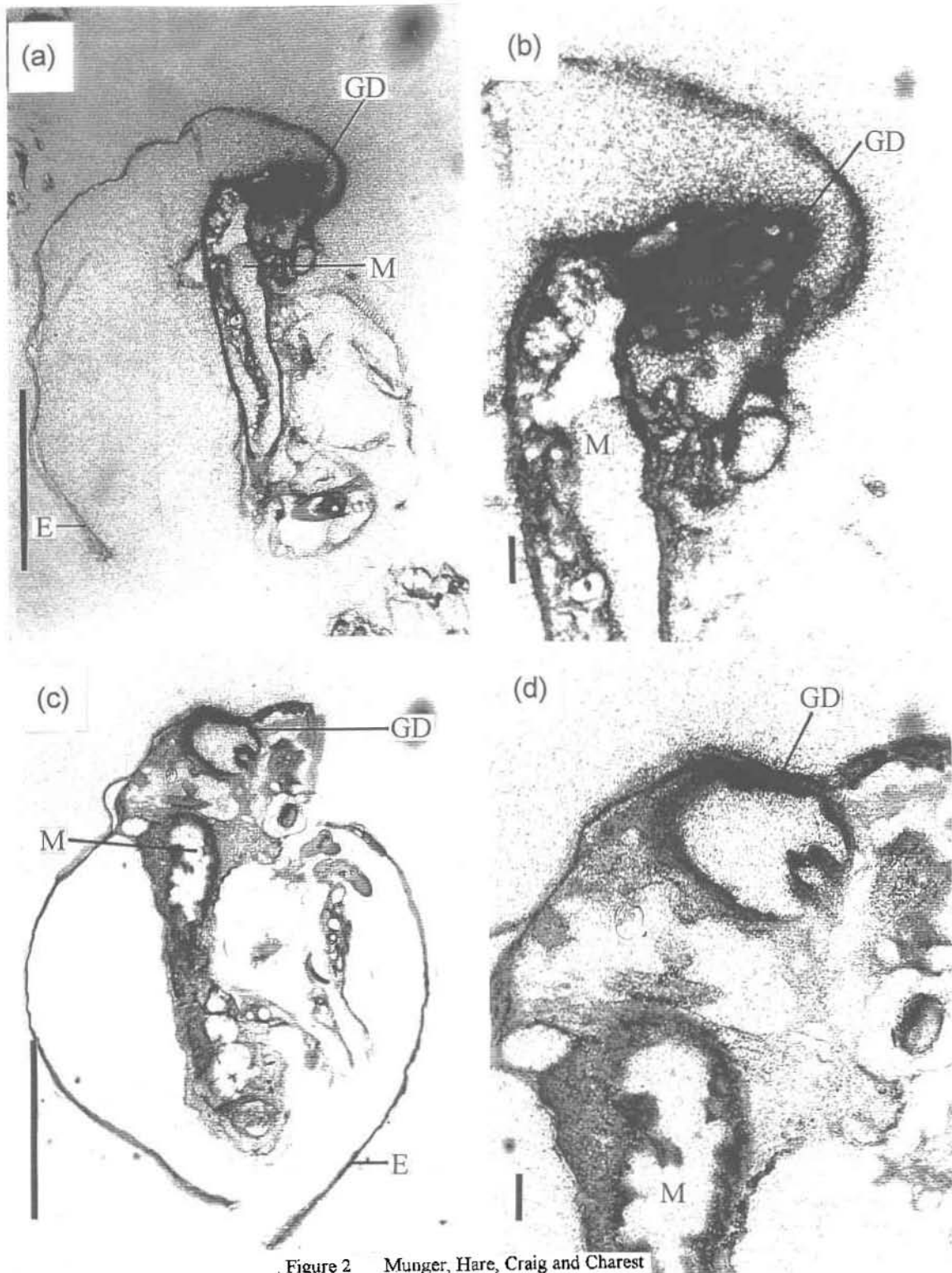


Figure 2 Munger, Hare, Craig and Charest



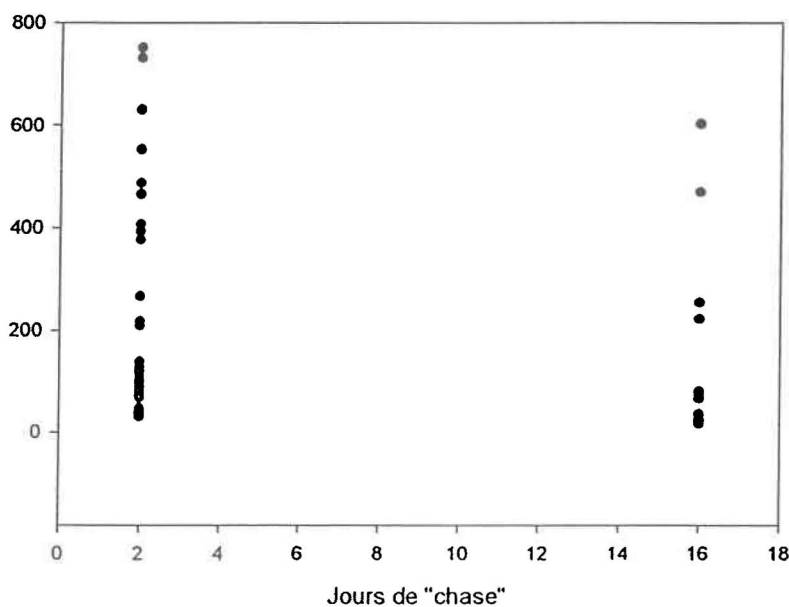
ANNEXE 2

Annexe 2: Données d'expérience préliminaires de "Pulse and chase".

Méthodologie:

1. Exposition des larves (n = 35) au Cd: 24 heures, eau seulement, [$^{112}\text{Cd} + ^{109}\text{Cd}$] = 10nM.
2. Dépuration de 48 heures dans du sédiment sans radio-isotope.
3. Le Cd dans les larves a été mesuré (temps = 2 jours).
4. Les larves ont été retournées au sédiment sans radio-isotope
5. Le ^{109}Cd dans les larves a été mesuré 14 jours plus tard, au 16^e jour (n = 11 individus).

Résultats:



Analyse statistique (Sigmastat):

Mann-Whitney Rank Sum Test

Normality Test: Failed ($P = <0.001$)

Group	N	Missing
zero	35	0
sixteen	11	0

Group	Median	25%	75%
zero	106.000	68.750	389.750
sixteen	78.000	28.500	247.000

$T = 206.000$ $n(\text{small}) = 11$ $n(\text{big}) = 35$ ($P = 0.181$)

The differences in the median values among the two groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0.181$)

Conclusion:

Il n'y a pas de différence statistiquement significative dans la perte de métal chez des larves de *Chironomus staegeri* ayant subies des périodes de dépuration de 2 et 16 jours respectivement.