

Université du Québec
INRS-Eau, Terre et Environnement

DYNAMIQUE D'ÉCHANGE DE CADMIUM ENTRE LE
BIOMONITEUR *HEXAGENIA* ET LE MILIEU NATUREL

Par

Annick L. Michaud
(B.Sc. Biologie)

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en Sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Examineur externe	Magalie Baudrimont Laboratoire d'Écophysiologie et Écotoxicologie des Systèmes Aquatiques Université de Bordeaux
Examineur interne	André Tessier INRS-Eau, Terre et Environnement
Directeur de recherche	Landis Hare INRS-Eau, Terre et Environnement
Codirecteur de recherche	Peter G. C. Campbell INRS-Eau, Terre et Environnement

Décembre 2004

*« L'aventure repose sur la richesse des liens qu'elle établit,
des problèmes qu'elle pose, des créations qu'elle provoque. »*

Antoine de Saint-Exupéry

AVANT PROPOS

Ce mémoire de type « par article » se compose de deux parties. La première partie est constituée d'une synthèse qui inclut une introduction au domaine de l'écotoxicologie aquatique, ainsi que les objectifs de recherche de mon projet de maîtrise. La deuxième partie se compose de l'article qui a été écrit dans le cadre de la maîtrise et soumis à la revue *Limnology and Oceanography*.

La contribution des auteurs de l'article lié au projet de recherche s'établit comme suit :

- Annick Michaud :
- Conception et réalisation du projet :
 - Échantillonnage
 - Développement des méthodes analytiques
 - Analyses
 - Traitement et interprétation des données
 - Rédaction de la synthèse
 - Rédaction initiale et finale de l'article
- Landis Hare :
- Conception du projet
 - Contribution au traitement et à l'interprétation des données
 - Rédaction initiale et finale de l'article
- Peter G. C. Campbell :
- Conception du projet
 - Rédaction finale de l'article

L'important n'est pas de convaincre, mais de donner à réfléchir.

Bernard Werber

REMERCIEMENTS

Autant de mercis qu'il y a d'insectes aquatiques dans tous les cours d'eau de la Terre à mon directeur de recherche, Landis Hare, qui m'a accompagnée et soutenue dans cette quête du savoir et de la connaissance. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir poussée à me dépasser en m'offrant une maîtrise aussi stimulante qui représentait un grand défi à plusieurs niveaux. Votre sagesse, votre respect et votre patience m'ont stimulée tout au long de cette aventure. Merci aussi pour les opportunités de congrès scientifiques internationaux qui m'ont introduite parmi un monde plein de créativité et qui m'ont permis d'y faire des rencontres enrichissantes. Merci de votre grande disponibilité et de votre écoute si attentive. Une maîtrise sans vous ne m'aurait pas fait autant grandir sur les plans académique et personnel.

J'aimerais également remercier mon codirecteur de maîtrise, Peter G.C. Campbell, pour son enthousiasme face à cette étude, ainsi que pour ses précieux commentaires et conseils lors des étapes critiques de ce projet de recherche.

Un immense merci à tous mes stagiaires d'été pour leur dévouement à produire des résultats de qualité. Édith, Jonathan, Nicolas et Philippe, une part de ce travail vous revient et je vous en remercie infiniment.

Mille mercis aux techniciennes et techniciens du laboratoire de l'INRS-Eau, Terre et Environnement pour leur aide et leurs conseils lors des analyses chimiques. Merci de votre immense disponibilité et de m'avoir enseigné comment travailler efficacement au laboratoire. Je pense ici à Michelle Geoffroy-Bordeleau, Sébastien Duval, Pauline Fournier, Stéfane Prémont, Lise Rancourt et René Rodrigue.

Je ne peux passer sous silence l'immense soutien moral et l'amour inconditionnel de ma mère Huguette et de mon frère Stéphane. Finalement, merci à ma marraine, Cécile et mon parrain, Jean-Claude. Ces personnes sont les plus importantes à mes yeux, car elles m'ont accompagnée tout au long de ma vie et ont toujours cru en moi. Merci aussi à Raymond, le petit nouveau de ce club sélect, pour ses sages conseils et pour sa bienveillance à mon égard. Un immense merci à tous mes précieux amis qui ont traversé cette aventure avec moi, de près ou de loin.

*« Une quête commence toujours par la Chance du Débutant.
Et s'achève par l'Épreuve du Conquérant. »*

Paulo Coelho

*Dédié à Huguette Lamarre, ma tendre et
exceptionnelle maman
ainsi qu'à la mémoire de Cécile Courcy, ma fée
marraine*

*« Il n'y a qu'une chose qui puisse rendre un rêve impossible,
c'est la peur d'échouer. »*

Paulo Coelho

RÉSUMÉ

Les organismes biomoniteurs permettent d'estimer la concentration de métal biodisponible dans l'environnement. La larve de l'éphémère *Hexagenia limbata* a été choisie comme biomoniteur en raison de sa présence dans un grand nombre de lacs et de rivières, de sa facilité d'identification, de son comportement sédentaire qui permet une représentation de la contamination locale et de sa tolérance à de fortes concentrations en métaux traces.

Pour que l'utilisation d'un biomoniteur soit efficace, il est avantageux de connaître son temps de réponse à un changement dans les concentrations d'un métal et ce, idéalement dans la nature. De cette façon, on peut mieux interpréter les concentrations de métaux mesurés chez le biomoniteur et ainsi prédire son temps de réponse lors d'un changement des concentrations de ce métal dans l'environnement.

Pour mesurer les taux d'échange de cadmium (Cd) dans la nature, nous avons effectué une transplantation réciproque de larves de l'éphémère *Hexagenia limbata* entre deux rivières localisées au Québec, soit dans le nord du Québec (Rivière Allard), soit en Abitibi (Rivière Colombière), et possédant des concentrations différentes en Cd. Les mesures des gains et des pertes de Cd se sont effectuées sur une période de 36 jours dans deux organes, le tractus digestif et le corps, et dans plusieurs fractions cellulaires (isolées par centrifugation différentielle).

Dans le cas des larves transplantées vers la rivière Allard, nous avons observé un accroissement de la concentration en Cd dans le temps, une accumulation principale du Cd dans le tractus intestinal et une localisation du Cd dans la fraction subcellulaire des peptides et des protéines stables à la chaleur. Dans le cas des larves transplantées vers la rivière Colombière, nous avons observé une diminution des concentrations en Cd dans le tractus intestinal et que la perte en Cd s'est manifestée principalement dans la fraction des protéines stables à la chaleur. Si la fraction des protéines stables à la chaleur contient majoritairement de la métallothionéine, comme montré chez d'autres espèces aquatiques, on peut supposer qu'une augmentation de la part de Cd fixée à cette fraction relativement aux autres, serait liée à une synthèse accrue de métallothionéines, donc à la mise en place d'un système de protection et/ou détoxification. De plus, ces résultats suggèrent que la métallothionéine soit rapidement recyclée chez cet organisme.

Les changements dans les concentrations en Cd les plus notables ont été remarqués dans les deux premières semaines de la transplantation, ce qui suggère que *H. limbata* soit un bon biomoniteur pour les changements en Cd à court terme, contrairement à d'autres invertébrés comme les bivalves d'eau douce, pour qui les échanges de Cd avec leur environnement sont plus lents. De plus, un modèle mathématique à un compartiment explique avec succès les données obtenues lors de la transplantation et les constantes obtenues à partir du modèle sont similaires à celles mesurées dans une étude antérieure effectuée en laboratoire avec *Hexagenia rigida*.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT PROPOS.....	iii
REMERCIEMENTS	v
RÉSUMÉ.....	ix
TABLE DES MATIÈRES	xi
LISTE DES FIGURES	xiii
<i>PREMIÈRE PARTIE : SYNTHÈSE</i>	1
1. INTRODUCTION.....	3
1.1 Les métaux traces chez les organismes aquatiques	3
1.2 Les mesures des métaux à différents niveaux biologiques	4
1.2.1 L'individu.....	4
1.2.2 Les organes.....	4
1.2.3 La répartition subcellulaire	5
1.3 Évaluation de l'exposition et des effets des métaux.....	6
1.4 Les insectes en tant que biomoniteur	8
1.5 Cycle vital de <i>Hexagenia</i>	9
1.6 Le cadmium dans l'environnement.....	10
1.7 La modélisation des taux d'échange de cadmium	11
2. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES	13
3. RÉGION D'ÉTUDE.....	15
4. MÉTHODES.....	17
4.1 Transplantation de larves de <i>Hexagenia limbata</i>	17
4.2 Mesures du Cd dans le sédiment et dans l'eau interstitielle	18
4.3 Traitement des échantillons biologiques.....	19
5. RESULTATS ET DISCUSSION	21
5.1 Cd dans le milieu versus Cd dans les larves	21
5.2 Les taux d'échange du Cd chez <i>H. limbata</i>	21
5.3 Cd dans les parties de <i>H. limbata</i> (tractus et corps)	23
5.4 Cd dans les fractions subcellulaires	24
5.5 La modélisation	26
6. CONCLUSION	27
6.1 Récapitulation des résultats	27
6.2 Perspectives de recherche	28
7. Liste des références.....	29
<i>DEUXIÈME PARTIE : ARTICLE SCIENTIFIQUE</i>	37



LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1. Impact sur la santé des organismes en fonction de la concentration des métaux non essentiels et essentiels.....	3
Figure 2 Radiographie d'un tube creusé par une larve de <i>Hexagenia limbata</i>	10
Figure 3. Larve et adulte de l'insecte <i>Hexagenia limbata</i>	10
Figure 4. Modèle hypothétique des changements temporels escomptés dans notre expérience de transplantation réciproque.....	15
Figure 5. Carte géographique représentant les sites d'échantillonnage de la rivière Allard et de la rivière Colombière.....	17
Figure 6. Schéma de la transplantation réciproque de larves de <i>Hexagenia limbata</i>	20
Figure 7. Prise en charge et perte du ¹⁰⁹ Cd chez <i>Hexagenia rigida</i> en laboratoire pour le corps et pour le tractus digestif.....	24
Figure 8 Comparaison entre le pourcentage (\pm l'écart-type) de Cd retrouvé dans le tractus digestif et les concentrations moyennes (\pm l'écart-type) dans les larves entières de <i>Hexagenia limbata</i> provenant de différents lacs.....	26
Figure 9 Représentation de la proportion de Cd accumulé dans les différentes fractions subcellulaires chez différents organismes et dans différents organes.....	27



PREMIÈRE PARTIE

Synthèse



1. INTRODUCTION

1.1 Les métaux traces chez les organismes aquatiques

Parmi les métaux, certains sont classés essentiels pour les organismes lors de réactions enzymatiques ou de processus physiologiques. Les organismes possèdent en général des mécanismes pour réguler leurs concentrations internes de ces métaux. Cependant, même s'ils sont considérés comme essentiels aux organismes, ces métaux peuvent s'avérer toxiques s'ils sont présents en excès dans l'environnement et que leurs flux d'entrée surpassent les capacités biochimiques de l'organisme à les métaboliser (Hare 1992). D'autres métaux sont classés non essentiels pour les organismes puisqu'ils n'ont aucune fonction biologique connue. Ces métaux non essentiels exercent leurs effets toxiques sur les organismes s'ils entrent dans les processus métaboliques (figure 1) (Hopkin 1989). Cependant, la frontière qui sépare les métaux classés essentiels de ceux classés non essentiels s'avère flexible. En effet, certains travaux suggèrent que le cadmium (Cd, métal non essentiel) puisse se substituer au zinc (Zn, métal essentiel) et jouer un rôle biologique chez le phytoplancton marin (Lane & Morel 2000; Lee et al. 1995; Lee & Morel 1995; Price & Morel 1990) carencés en Zn.

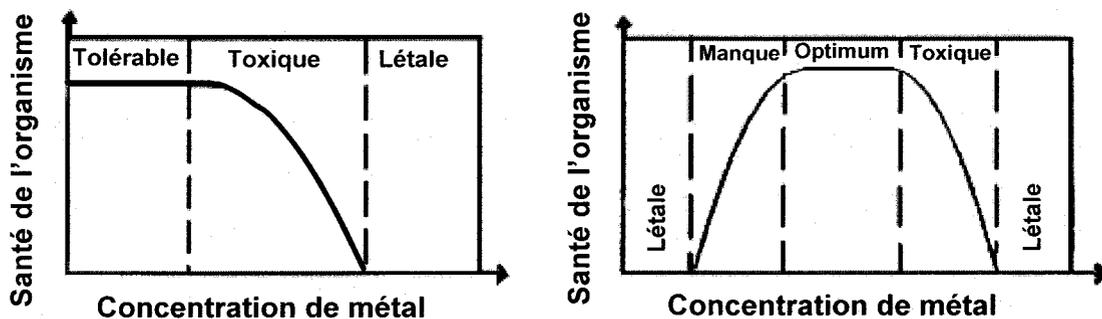


Figure 1. Impact sur la santé des organismes en fonction de la concentration des métaux non essentiels (A) et essentiels (B). Modifié de Chapman et al. (1996)

1.2 Les mesures des métaux à différents niveaux biologiques

1.2.1 L'individu

Les mesures des concentrations en métaux dans les organismes entiers permettent de donner une estimation des concentrations que l'on retrouve dans l'environnement à la condition qu'une relation ait été établie entre les concentrations en métaux dans les organismes et celles dans leur environnement. Un organisme utilisé pour évaluer le niveau de contamination en métaux des systèmes aquatiques se nomme biomoniteur. Cependant, pour répondre à des questions sur les mécanismes d'accumulation, il faut descendre à un niveau d'organisation biologique inférieur. Les réponses à ces questions nous permettent, entre autre, de connaître la voie d'entrée empruntée par les métaux pour s'accumuler dans les organismes, c'est-à-dire l'eau ou la nourriture.

1.2.2 Les organes

En mesurant les concentrations de métaux dans les différentes parties d'un organisme, on peut déterminer l'organe ou le tissu qui est le plus susceptible de subir des dysfonctions suite à l'accumulation de métaux. La connaissance de l'organe d'accumulation principale permet aussi de suggérer la voie d'entrée du métal. Ainsi, une accumulation de métaux dans les branchies suggère une entrée par l'eau, alors qu'une accumulation dans le tractus digestif suggère une entrée par la nourriture. Hare et al. (1991a) ont noté que les concentrations en Cd étaient plus élevées dans le tractus digestif que dans les autres organes chez *H. limbata*, suggérant une entrée du Cd par la nourriture. Dans cette étude, cette augmentation majeure des concentrations en Cd dans le tractus digestif était réellement due à la présence du métal dans les tissus du tractus puisque tout le sédiment avait été enlevé lors de la dissection des larves. Une accumulation dans les organes qui n'ont pas de contact direct avec le milieu extérieur, par exemple les muscles, laisse entrevoir la possibilité d'une translocation du métal entre les organes, comme observé dans le cas du méthyle mercure par Smith et al. (1975) pour le bivalve *Anodonta grandis* (nommé maintenant *Pyganodon grandis*) et par Rouleau et al. (1995) pour l'étoile de mer *Leptasterias polaris*.

1.2.3 La répartition subcellulaire

Les mesures de métaux au niveau cellulaire peuvent fournir un aperçu de leur biodisponibilité interne (Roesijadi 1980; Jenkins & Mason 1988; Klerks & Bartholomew 1991). Le cytosol peut être un endroit important d'accumulation pour les métaux essentiels tels que le cuivre (Cu) et le Zn et pour certains métaux non essentiels incluant le Cd (Cain & Luoma 1998; Suzuki et al. 1988). Par conséquent, les concentrations de métaux cytosoliques sont souvent plus fortement reliées à la toxicité que les concentrations totales dans l'organisme (Roesijadi 1994). Peu d'études se sont cependant attardées à mesurer les concentrations cytosoliques de métaux chez les insectes aquatiques. Suzuki et al. (1988) ont examiné l'accumulation cytosolique du Cd, Cu et Zn dans une population contaminée de l'éphémère *Baetis thermicus* au Japon; Cain & Luoma (1998) ont mesuré les concentrations cytosoliques de Cd, Cu, plomb (Pb) et Zn chez les trichoptères *Hydropsyche occidentalis* et *Hydropsyche cockerelli* le long d'un gradient de contamination dans la rivière Clark Fork au Montana; Cain et al. (2000) ont mesuré l'accumulation de l'aluminium (Al), Cd, Cu, fer (Fe), mercure (Hg), Pb et Zn dans le cytosol chez le trichoptère *Hydropsyche californica* provenant de la rivière Sacramento en Californie et Cain et al. (2004) ont mesuré l'accumulation cytosolique du Cd, Cu et Zn chez les éphémères *Baetis* spp, *Epeorus albertae* et *Serratella tibialis*, chez les trichoptères *Hydropsyche* spp et *Arctopsyche grandis* provenant la rivière Clark Fork au Montana.

Dans le cytosol, on retrouve la métallothionéine (MT), une protéine stable à la chaleur de faible poids moléculaire (6-7 kDa), riche en cystéine et qui a été identifiée chez plusieurs genres d'insectes aquatiques incluant la larve du diptère *Chaoborus* (Croteau et al. 2002) et les éphémères *Baetis thermicus* (Aoki et al. 1989) et *H. limbata* (Y. Couillard, INRS-ETE, données non publiées). Cette protéine séquestre certains métaux sur ses acides aminés cystéine, qui représentent 30 % du nombre total des acides aminés. Une molécule de MT peut lier jusqu'à 7 atomes de Cd ou de Zn et un nombre variable d'atomes des autres métaux des groupes IB et IIB (argent (Ag), Cu et Hg), ce qui lui confère un rôle central dans la régulation des métaux essentiels comme le Cu et Zn et dans la détoxification de ces métaux lorsqu'ils sont présents en excès (Mason & Jenkins 1995; Viarengo 1989). La MT permettrait aussi la détoxification des métaux non essentiels comme le Cd et le Hg et, par le fait même, l'augmentation de la tolérance des organismes

pour les populations vivant dans les environnements contaminés par ces métaux (Mason & Jenkins 1995; Roesijadi 1992; Viarengo 1989).

Les métaux retrouvés dans les cellules peuvent aussi être séquestrés à l'intérieur de granules. Ceux-ci rendent possible l'entreposage et parfois l'excrétion des métaux accumulés. Si on compare la répartition subcellulaire du Cd chez les insectes mentionnés plus haut à celle que l'on retrouve dans les branchies du bivalve *Pyganodon grandis*, on constate que chez ce dernier, le Cd se trouve principalement associé aux granules (Bonneris et al. 2004). D'autres auteurs ont aussi rapporté que la séquestration des métaux dans les granules peut être un phénomène important chez certains organismes marins (Roesijadi & Robinson 1994). Par contre, chez la perchaude (*Perca flavescens*), le Cd accumulé dans le foie semble être surtout associé à la fraction des protéines stables à la chaleur (L. Kraemer, INRS-ETE, données non publiées). La tolérance d'un organisme aux métaux traces dépendra, en partie, de sa capacité à synthétiser des métallothionéines, à isoler les métaux dans des granules ou un mélange des deux.

L'évaluation de l'accumulation métallique dans chacune des fractions subcellulaires devrait permettre de clarifier les relations entre l'exposition au métal et les effets sur les organismes. Il a été suggéré qu'une accumulation excessive de métaux au-delà des capacités de liaison des protéines comme le métallothionéine et des granules disponibles dans la cellule puisse résulter en la liaison de ces métaux en excès à d'autres ligands intracellulaires sensibles. Ce sont ces surplus de métaux qui seraient responsables de la toxicité cellulaire et des effets néfastes sur la santé de l'organisme (Brown & Parson 1978; Couillard et al. 1995b; Johansson et al. 1986; Mason & Jenkins 1995).

1.3 Évaluation de l'exposition et des effets des métaux

Pour faire le suivi et l'évaluation des concentrations en métaux à l'intérieur d'un écosystème aquatique, on peut mesurer les concentrations totales en métaux dans l'eau ou dans les sédiments. Les données obtenues sont cependant d'une utilité restreinte puisqu'elles ne nous renseignent pas nécessairement sur la fraction du contaminant qui peut être potentiellement assimilée par les organismes vivants et qui pourrait avoir un effet sur leur santé, c'est-à-dire la fraction biodisponible (Campbell 1995). Dans le cas des métaux sédimentaire, une approche plus ciblée pour évaluer la disponibilité et la toxicité

des métaux est de tenir compte de la concentration de sulfures volatile à l'acide (appelé AVS pour acid-volatile sulfide). Le principe de base de cette approche est que l'association entre les métaux et le sulfure réactif gère la toxicité dans les sédiments en contrôlant les concentrations de métaux dans l'eau interstitielle. Le sulfure réactif peut former un précipité de sulfure métallique thermodynamiquement stable dans les sédiments et de ce fait, gouverner le comportement des métaux divalents tels que le Cd, Cu, Ni, Pb et Zn. La toxicité des métaux n'apparaissait pas chez les organismes benthiques utilisés dans les expériences où il y avait suffisamment de sulfures volatile à l'acide dans les sédiments pour séquestrer tout le métal simultanément extrait (appelé SEM pour *simultaneously extracted metal*), c'est-à-dire quand $[AVS] > [SEM]$, alors que les sédiments possédant $[SEM] > [AVS]$ démontraient un accroissement de la mortalité (Ankley et al. 1996). Même si les concentrations en métaux dans l'eau interstitielle anoxique peuvent être majoritairement contrôlées par l'équilibre des sulfures de métaux, l'exposition des organismes aux métaux n'est pas nécessairement liée à ceux dans l'eau interstitielle (Hare et al. 2001). L'exposition de la plupart des organismes benthiques aux métaux va se produire par l'ingestion de particules et par l'eau surnageante oxygène (Hare et al. 2003). De ce fait, l'accumulation et les effets des métaux sont influencés non seulement par la géochimie des sédiments (ex. $[AVS]$) mais aussi par les comportements fouisseur et nutritionnel des animaux benthiques.

Une autre approche utilisée pour évaluer la contamination en métaux dans les environnements aquatiques est l'utilisation de tests de toxicité en laboratoire. Cependant, cette approche comporte plusieurs lacunes. La période d'exposition des organismes est souvent de courte durée, alors que les organismes en milieu naturel sont exposés aux métaux de manière chronique. De ce fait, les concentrations métalliques des organismes exposés en laboratoire n'atteindront pas forcément un état stationnaire (Hare 1992), alors que les études de Benson & Birge (1985) et Pynnönen (1995) ont permis d'observer que des mécanismes de tolérance entrent en jeu lors d'expositions chroniques en laboratoire ou dans le milieu naturel. De plus, les concentrations utilisées lors des expériences en laboratoire sont souvent de loin supérieures à celles retrouvées en nature, ce qui rend difficile l'extrapolation de ces résultats vers le milieu naturel. Les concentrations accumulées et les effets toxicologiques seront potentiellement différents de ceux mesurés chez des organismes indigènes présents dans un milieu naturel possédant des concentrations plus faibles. D'autre part, les expériences en laboratoire n'exposent les

organismes qu'à un ou quelques métaux à la fois à des concentrations constantes, alors qu'en nature, les organismes sont exposés simultanément à plusieurs métaux dans l'eau et dans la nourriture à des concentrations biodisponibles qui peuvent fluctuer dans le temps (Hare 1992). Enfin, les organismes en laboratoire sont souvent mis en présence d'un métal sous forme dissoute dans l'eau uniquement. Cependant, l'importance de la nourriture comme source du métal a été observée chez plusieurs organismes dont, entre autres, les insectes (Munger & Hare 1997; Roy & Hare 1999).

Une troisième approche est la mesure des concentrations en métaux dans les organismes prélevés dans le milieu naturel. Comme mentionné auparavant, il est maintenant reconnu que les concentrations totales en métaux traces dans l'eau ou dans les sédiments ne sont pas forcément proportionnelles à celles qui sont biodisponibles (i.e. la fraction du métal qui est potentiellement assimilable par les organismes). Par contre, les concentrations de métaux accumulés par les organismes tendent à être proportionnelles à celles qui sont biodisponibles dans le milieu naturel. L'étude présentée ici se concentrera sur cette dernière approche, c'est-à-dire l'utilisation des organismes pour évaluer le degré de contamination d'un environnement aquatique.

1.4 Les insectes en tant que biomoniteur

Pour être un bon biomoniteur, l'organisme doit posséder quelques caractéristiques essentielles. Il doit se retrouver dans une vaste gamme de milieux, être de taille adéquate pour les analyses, être facile à identifier et à récolter ainsi qu'être tolérant aux contaminants. Il doit aussi être sédentaire, ce qui lui permet d'être représentatif de la contamination locale. De plus, l'utilisation optimale d'un biomoniteur repose sur une bonne connaissance de son écologie et de son comportement.

Les insectes sont des organismes possédant un bon potentiel pour être des biomoniteurs puisqu'ils sont un des groupes d'organismes les plus abondants et diversifiés que l'on puisse retrouver dans les eaux douces (Hare 1992). Plusieurs d'entre eux sont benthiques et sédentaires, et vivent donc en étroite association avec les sédiments qui sont un important réservoir de métaux traces. De plus, certains insectes sont tolérants aux métaux traces et leurs concentrations en métaux sont directement corrélées à celles dans l'environnement (Croteau et al. 1998; Hare & Tessier 1996; Warren et al. 1998). Les

insectes aquatiques représentent aussi une quantité non négligeable de proies pour les maillons trophiques supérieurs et par le fait même, une voie potentiellement importante pour le transfert des métaux vers les poissons. Un organisme qui satisfait à plusieurs de ces exigences de biomoniteur est l'éphémère *Hexagenia*.

1.5 Cycle vital de *Hexagenia*

Les éphémères se retrouvent dans la plupart des régions géographiques, à l'exception des régions polaires et quelques îles océaniques. Cependant, la plus grande diversité d'éphémères se trouve dans les régions tempérées où elles peuvent être une source de nourriture importante pour les poissons (Brittain 1982). Dans une région donnée, on retrouve les éphémères surtout dans les zones littorales et sublittorales des eaux oligotrophes à moyennement eutrophes. *Hexagenia* est un genre commun d'éphémère qui se trouve à l'état larvaire dans le sédiment mou dont elle se nourrit puisque celui-ci contient des algues, des bactéries et des débris organiques (Zimmerman 1977).

Le cycle de vie de *Hexagenia* se résume ainsi, en débutant par l'adulte. La femelle de *Hexagenia* dépose ses œufs à la surface de l'eau et ceux-ci se déposeront par la suite à la surface des sédiments. Suite à l'éclosion, la larve entre dans les sédiments et commence sa vie de foreur en construisant des tubes en forme de U (figure 2). Ce stade durera jusqu'à la maturation, soit quelques mois à quelques années selon les conditions environnementales. La larve se nourrit et grossit en prévision des stades ailés (Hunt 1953).

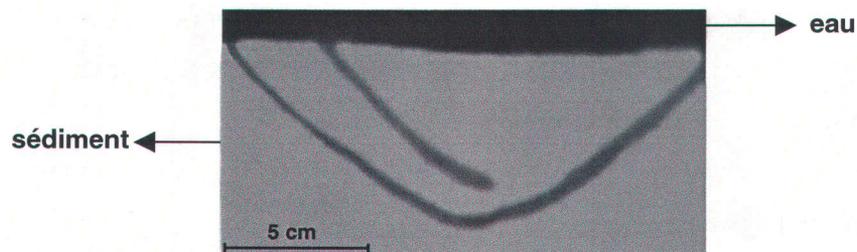


Figure 2. Radiographie d'un tube creusé par une larve de *Hexagenia limbata*. Modifié de Charbonneau & Hare (1998).

Au moment de la maturation, la larve délaisse le sédiment et nage jusqu'à la surface, d'où elle émerge sous la forme d'un adulte immature (subimago) possédant deux paires d'ailes (figure 3). Ce subimago vole vers la rive la plus proche et se trouve un refuge sur lequel il pourra rester pour les prochains jours. Après ce laps de temps, il y a une seconde mue qui le transforme en adulte mature (imago) (Hunt 1953).

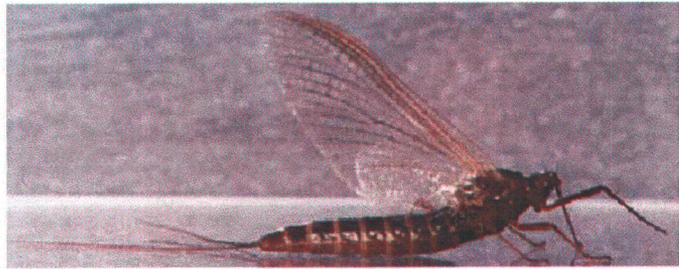
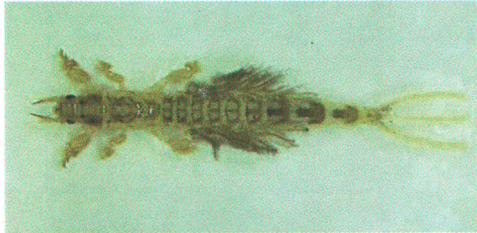


Figure 3. Larve (gauche) et adulte (droite) de l'insecte *Hexagenia limbata*

La présence de deux stades adultes ailés dans le cycle vital des éphémères est unique chez les insectes (Zimmerman 1977). À la tombée de la nuit suivant la dernière mue, les femelles et mâles vont se reproduire à proximité d'un plan d'eau. La femelle s'éloigne ensuite en direction de l'eau pour y déposer ses œufs. Les adultes ne mangent pas et meurent quelques heures après l'accouplement (Hunt 1953).

Notre étude se concentrera sur la partie du cycle vital qui se déroule dans les sédiments, c'est-à-dire la larve aquatique, ainsi que sur l'espèce *Hexagenia limbata*. Cette espèce d'éphémère est l'une des plus commune en Amérique du Nord et constitue souvent une part importante de la biomasse du macrobenthos des sédiments mous dans les lacs et les rivières (Lobinske et al. 1996).

1.6 Le cadmium dans l'environnement

Le Cd est un élément rare; sa concentration dans la lithosphère se situe entre 0,1 et 0,2 $\mu\text{g/g}$, le plaçant 67^{ième} au rang des éléments les plus abondants (Nriagu 1980). Il est un métal toxique et carcinogène pouvant entraîner des problèmes au niveau de la locomotion, de la respiration, de l'alimentation, de la croissance et de la reproduction

(Hare 1992). La toxicité du Cd surpasse d'ailleurs celle du Zn, du Cu et du Pb (Malley 1996), ce qui en fait un métal d'intérêt prioritaire. Il est en 7^{ième} position dans la liste des métaux les plus à risque pour l'humain au US Department of Health and Human Services (Nriagu 1980) et il est classé 5^{ième} au Canada sur la liste des substances d'intérêt prioritaire (Environnement Canada 1994).

D'une part, la présence de Cd dans l'environnement résulte de processus naturels dont les feux de forêt, les émissions volcaniques, l'altération et l'érosion des roches riches en Cd (Environnement Canada 1994; Nriagu 1980). D'autre part, le Cd provient de plusieurs sources anthropiques, dont la principale est l'industrie minière par la production pyrométallurgique de métaux non-ferreux, puisque le Cd est un sous-produit de l'extraction du Cu, du Pb et du Zn. Le Cd est utilisé dans les piles Nickel-Cd, les pigments, comme stabilisant dans les plastiques et les produits synthétiques ainsi que dans les alliages (Environnement Canada 1994; Nriagu 1980). Outre les dépôts atmosphériques, les déversements ponctuels et le ruissellement de surface constituent des sources de Cd pour les systèmes aquatiques (Pacyna et al. 1995).

1.7 La modélisation des taux d'échange de cadmium

Pour utiliser efficacement *Hexagenia limbata* comme biomoniteur pour le Cd, il serait utile de connaître les taux d'échange du Cd entre cet éphémère et son milieu à différents niveaux biologiques, c'est-à-dire au niveau de l'individu entier, de ses organes ainsi qu'au niveau cellulaire. Hare et al. (1991b) ont mesuré des taux d'échange rapides pour le Cd et le Zn chez l'éphémère *Hexagenia rigida* en laboratoire, mais en nature ils restent inconnus. Chez les invertébrés à croissance lente comme les bivalves, le temps de réponse à des changements dans les concentrations en Cd dans l'environnement est de l'ordre de mois ou même d'années (Baudrimont et al. 2003, Couillard et al. 1995a). Ces organismes seraient donc intéressants comme biomoniteurs pour les changements à long terme. À l'opposé, les organismes petits, actifs et à croissance rapide, comme les insectes, ont le potentiel de répondre plus rapidement aux changements dans les concentrations en métaux dans l'environnement et par conséquent, seraient de bons biomoniteurs pour les changements à plus court terme (Hare 1992).

Un modèle à un compartiment a été utilisé pour décrire les changements dans les concentrations en Cd chez *Hexagenia*, c'est-à-dire $[Cd]_{Hexagenia}$

$$\frac{d[Cd]_{Hexagenia}}{dt} = \underbrace{k_I [Cd]_{environs}}_{\text{entrée}} - \underbrace{k_E [Cd]_{Hexagenia}}_{\text{sortie}} \quad (1)$$

où k_I et k_E sont des constantes du taux d'entrée et de sortie de Cd, respectivement, et $[Cd]_{environs}$ représente la $[Cd]$ biodisponible dans l'environnement où se trouve *Hexagenia* (Hare et al. 1991a). Pour estimer la $[Cd]_{environs}$, il faut connaître la source du Cd pour les larves, c'est-à-dire l'eau oxique, l'eau anoxique ou la nourriture (les sédiments). Comme la réponse à cette question n'est pas encore connue pour *Hexagenia* et comme les concentrations totales de Cd dans les environs étaient à l'opposé de celles mesurées chez *Hexagenia*, nous avons substitué la constante k'_I pour le terme de prise en charge dans l'équation 1 en présumant que $[Cd]_{environs}$ n'a pas changé durant l'expérience, c'est-à-dire

$$k_I [Cd]_{environs} = k'_I \quad (2)$$

En substituant l'équation 2 dans l'équation 1 et en intégrant celle-ci, on obtient

$$[Cd]_{Hexagenia} = \frac{k'_I}{k_E} - \left(\frac{k'_I}{k_E} - [Cd]_{Hexagenia}^0 \right) e^{-k_E t} \quad (3)$$

En utilisant nos données expérimentales, nous pouvons estimer k'_I et k_E par itération pour la larve entière ainsi que pour ses parties (tractus digestif et corps). Nous pouvons générer des courbes avec le modèle à partir des valeurs des constantes obtenues et la valeur appropriée de $[Cd]_{Hexagenia}^0$ en résolvant l'équation 3. Il est à prévoir que la valeur de la constante du constant de prise en charge apparent (k'_I) pourrait varier avec la température (Croteau et al. 2002).

2. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Notre première objectif était de mesurer le gain et la perte du Cd chez l'insecte aquatique *Hexagenia limbata* dans la nature; de telles informations sont inconnues pour cet insecte. Pour mesurer les échanges du Cd dans la nature, nous avons réalisé une transplantation réciproque de larves de *H. limbata* entre deux rivières (Allard et Colombière; section 3) possédant des concentrations différentes en Cd. Les concentrations en Cd des larves transplantées devraient tendre vers celles des larves indigènes après une certaine période de temps qui sera déterminée dans la présente étude (Figure 4).

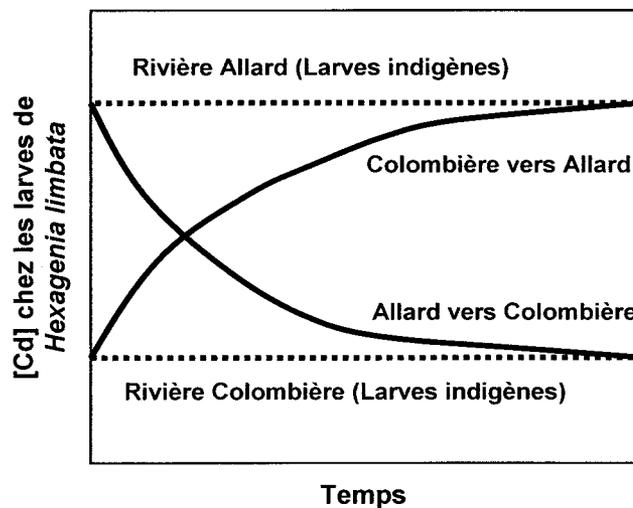


Figure 4. Modèle hypothétique des changements temporels escomptés dans notre expérience de transplantation réciproque

En deuxième lieu, nous avons tenté d'identifier l'organe, soit le tractus digestif ou le corps de la larve, qui accumulait et perdait la plupart du Cd dans le but de suggérer les voies d'entrée et de sortie potentielles pour ce métal. Une accumulation de Cd dans le tractus suggérerait une voie d'entrée par la nourriture, alors qu'une accumulation de Cd dans le corps suggérerait une voie d'entrée par l'eau.

En troisième lieu, nous avons évalué la répartition subcellulaire du Cd, ce qui nous a permis de déterminer si le métal accumulé par *H. limbata* était détoxiqué (par des protéines ou des granules) ou s'il était accumulé dans les fractions cellulaires dites « sensibles » à la présence de Cd.

En dernier lieu, nous avons comparé nos données obtenues en nature avec des courbes théoriques générées grâce à un modèle mathématique (section 1.7).

3. RÉGION D'ÉTUDE

Les échantillons de sédiment, d'eau interstitielle ainsi que de larves de *H. limbata* ont été récoltés à l'été 2002 dans deux rivières au nord-ouest du Québec, c'est-à-dire la rivière Colombière près de Val d'Or et la rivière Allard près de Matagami (figure 5).

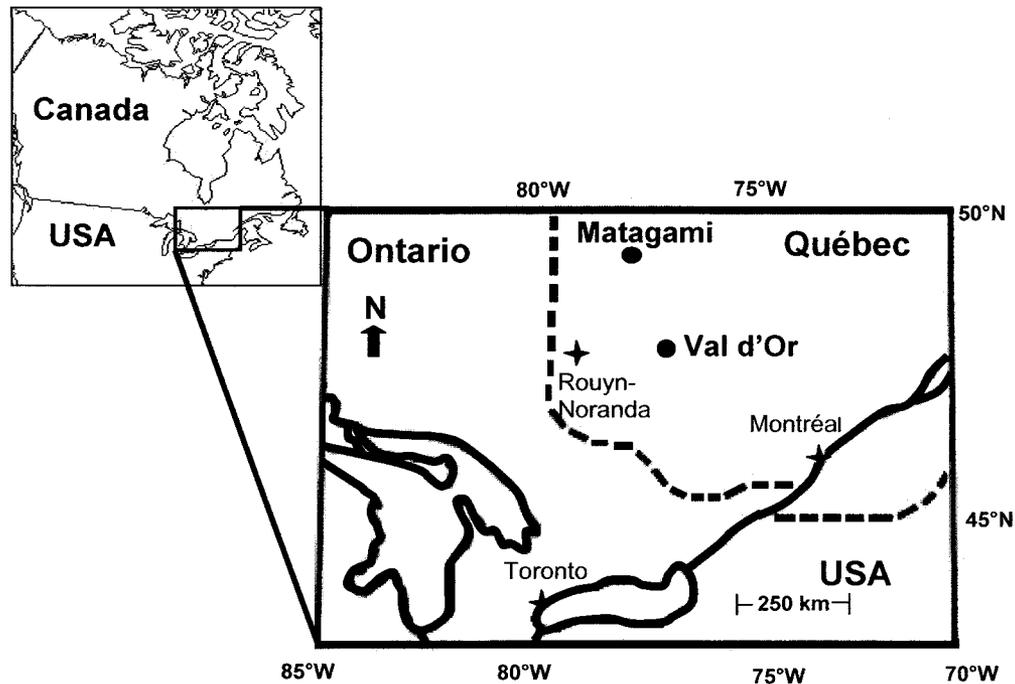


Figure 5. Carte géographique représentant les sites d'échantillonnage de la rivière Allard (près de Matagami) dans la région de la Baie-James, et de la rivière Colombière (près de Val d'Or) dans la région minière de l'Abitibi, au nord-ouest de Montréal.

Ces deux rivières sont sujettes à un apport en métaux en provenance d'industries minières présentes et passées. D'après les données préliminaires de l'année 2001, les larves de *H. limbata* de la rivière Allard possédaient une plus forte concentration en Cd que celles de la rivière Colombière. D'après ces résultats, il nous paraissait intéressant de réaliser une transplantation réciproque de larves entre les deux rivières dans le but de mesurer, au même moment, la prise en charge et la perte de Cd chez *H. limbata*. Pour réaliser la transplantation réciproque, il nous fallait choisir une station dans chaque rivière où il était possible de trouver un grand nombre de larves. Bien que le chrome (Cr), le

nickel (Ni), le Zn, le Cu, le Pb et l'uranium (U) aient été analysés dans les échantillons récoltés, seuls les résultats du Cd seront discutés dans ce mémoire. En effet, peu de différence n'a été observée dans les concentrations des autres métaux entre les larves des deux rivières.

4. MÉTHODES

4.1 Transplantation de larves de *Hexagenia limbata*

Les détails méthodologiques sont contenus dans l'article qui constitue la deuxième partie de ce mémoire. Un sommaire des méthodes employées est cependant donné ci-bas.

Pour chacune des deux rivières, des plongeurs ont récolté des sédiments aux profondeurs où on retrouvait une bonne quantité de larves de *H. limbata*, c'est-à-dire entre 1 et 2 mètres de la surface. Ces sédiments étaient mélangés dans des grands contenants avant d'être redistribués dans des bacs en plastique. Cette étape servait à s'assurer que le sédiment qui recevrait les larves était uniforme dans tous les bacs. Ensuite, chaque bac était fermé par un couvercle hermétique et mis en place par un plongeur dans le fond de la rivière pour une période d'une semaine dans le but d'asphyxier toutes les larves présentes dans les bacs (Warren et al. 1998). Après cette période d'anoxie, quelques bacs étaient sélectionnés et tamisés pour s'assurer que toutes les larves indigènes étaient mortes. Une fois cette vérification effectuée, les couvercles hermétiques des bacs restants étaient remplacés par des couvercles grillagés (mailles de 1 mm) pour une période de deux semaines afin de permettre la formation d'une couche superficielle de sédiment oxygène.

Après cette période de deux semaines, des larves de *H. limbata* de la rivière Allard ont été récoltées à l'aide d'un filet benthique (mailles de 1 mm). Les larves étaient ensuite transportées vers la rivière Colombière et mises dans les bacs contenant du sédiment préparé tel que décrit plus haut. Au même moment, des larves de la rivière Colombière, que l'on a nommées témoins-bacs, ont aussi été placées dans des bacs contenant du sédiment de la rivière Colombière dans le but de leur faire subir le même traitement que les larves transplantées. L'échantillonnage des larves transplantées s'est effectué à 9 temps sur une durée totale de 36 jours, soit aux jours 0, 3, 6, 9, 12, 15, 21, 28 et 36 dans les deux rivières. Aux jours d'échantillonnage 0, 6, 9, 15 et 28, nous avons récolté aussi des larves témoins-bacs (2 bacs contenant 10 larves) et des larves indigènes à proximité des bacs que nous nommons des témoins hors-bacs (20 larves). Les mêmes étapes ont été reproduites pour la transplantation réciproque, c'est-à-dire de la rivière Colombière vers la rivière Allard (figure 6).

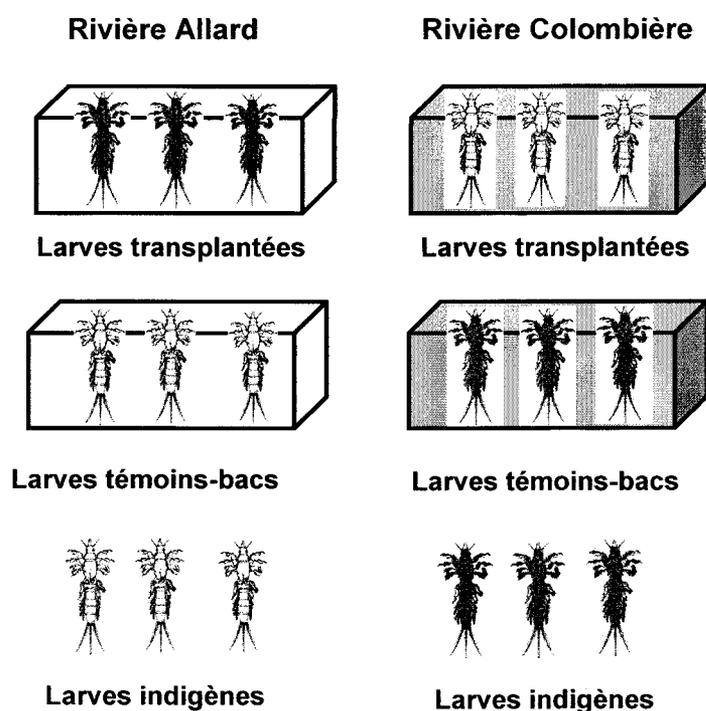


Figure 6. Schéma de la translocation réciproque des larves de *H. limbata*

Après dépuration au laboratoire, les larves ont été disséquées en deux parties, soit le tractus digestif et le reste de l'insecte que l'on a nommé le corps. Les parties étaient déposées sur un morceau de Téflon, insérées dans un tube à microcentrifugation et entreposées dans de l'azote liquide jusqu'au moment des analyses. Les morceaux de Téflon et les tubes à microcentrifuger avaient été préalablement nettoyés à l'acide nitrique 15%.

4.2 Mesures du Cd dans le sédiment et dans l'eau interstitielle

Pour mesurer la concentration en Cd des sédiments et pour comparer ces concentrations entre les bacs et le milieu naturel, des carottes de sédiment ont été récoltées à l'aide d'un tube en plastique de 3 cm de diamètre dans les bacs et dans le milieu naturel, à proximité des bacs au dernier jour d'échantillonnage de chaque rivière.

Pour mesurer la concentration en Cd dans les eaux interstitielles des bacs et du milieu naturel, des dialyseurs en Plexiglas ont été posés verticalement dans les sédiments des bacs et dans les sédiments du milieu naturel au temps 0 pour une durée de 3 semaines (Hare et al. 1994).

4.3 Traitement des échantillons biologiques

Les tractus ou corps de quatre organismes furent combinés pour chacun des réplicats (N=4) et ensuite homogénéisés dans du tampon TRIS 25 mM. Après l'homogénéisation, une aliquote était prélevée pour déterminer la concentration totale en métal dans l'échantillon entier, c'est-à-dire avant le fractionnement subcellulaire. Il faut savoir que les techniques de fractionnement employées permettent une séparation opérationnelle des fractions de la cellule. Ainsi, il faut reconnaître que chacune des fractions obtenues n'est pas pure à 100%, mais qu'elles nous donnent une bonne estimation du contenu réel (Couillard et al. 1995b, Wallace et al. 2003a et b). L'application d'un protocole inspiré de celui de Wallace et al. (1998), nous a permis d'obtenir 3 fractions (Voir figure 1, Deuxième Partie).

La première fraction obtenue (P1) était un culot constitué surtout de granules ainsi que d'autres parties comme les organelles et l'exosquelette. La deuxième fraction (S2) consistait principalement en un surnageant représentant la fraction des protéines cytosoliques qui sont stables à la chaleur, comme la métallothionéine (MT) et le glutathion qui lie le Cd entré dans la cellule. Un accroissement des concentrations de Cd dans cette fraction suggère une réponse de détoxification de la part de l'organisme. La dernière fraction obtenue (P2) était un culot représentant majoritairement la fraction des protéines cytosoliques qui sont dénaturées par la chaleur, comme les enzymes. Un accroissement de Cd dans cette dernière fraction suggère que le processus de détoxification par les composantes de la fraction des protéines stables à la chaleur soit surchargé et que le Cd en excès dans la cellule se lie à d'autres protéines, ce qui peut entraîner un effet toxique chez l'organisme.



5. RESULTATS ET DISCUSSION

5.1 Cd dans le milieu versus Cd dans les larves

Il est intéressant de noter que la rivière où les larves accumulent le plus de Cd n'est pas la rivière qui possède les plus fortes concentrations en Cd dans le milieu. En effet, les larves de la rivière Allard ont de plus fortes concentrations en Cd que les larves de la rivière Colombière, alors que les sédiments de cette dernière sont au moins 5 fois plus concentrés en Cd que ceux de la rivière Allard (Voir figure 3 et 5, Deuxième Partie). De plus, les concentrations en Cd dissous dans la colonne d'eau de la rivière Colombière sont plus grandes que celles de la rivière Allard, alors que les concentrations en Cd des deux rivières sont semblables au niveau de l'eau interstitielle (Voir figure 4, Deuxième Partie). On peut donc remarquer qu'en ne tenant compte que des concentrations de Cd total dans les sédiments ou dans l'eau, on ne peut prévoir l'accumulation du Cd par *H. limbata*. Étant donnée la complexité des relations entre les facteurs régissant la biodisponibilité du Cd, il n'est pas surprenant qu'il n'y ait pas de corrélation directe entre les concentrations totales du Cd dans les sédiments et celles dans l'insecte benthique que nous avons étudié (Tessier et al. 1993).

5.2 Les taux d'échange du Cd chez *H. limbata*

Nos résultats suggèrent que les taux d'échange de Cd entre *H. limbata* et son milieu sont rapides par rapport à ceux mesurés pour certains bivalves d'eau douce (Couillard et al. 1995a; Baudrimont et al. 2003) et d'eau salée (Roesijadi et al. 1984). En effet, les concentrations en Cd des larves transplantées de la rivière Colombière ([Cd] faibles chez *H. limbata*) vers la rivière Allard ([Cd] fortes chez *H. limbata*) rejoignent celles des larves indigènes de la rivière Allard après seulement 2 semaines. La transplantation inverse a permis de constater que les taux de perte de Cd sont presque aussi rapides, car il y a une forte diminution des concentrations en Cd dans les 2 premières semaines, mais ensuite, cette diminution se fait plus lentement jusqu'à la fin de l'expérience sans pour autant atteindre les concentrations des larves indigènes de la rivière Colombière (Voir figure 5, Deuxième Partie).

Ces taux d'échange rapides pour le Cd sont semblables à ceux déjà mesurés en laboratoire pour une autre espèce du même genre, *Hexagenia rigida* (Hare et al. 1991b) (figure 7; Voir tableau 2, Deuxième Partie). De plus, les larves d'un autre genre d'éphémère, *Baetis thermicus* (Aoki et al. 1989), avaient un taux de prise en charge en laboratoire similaire à ce que nous avons mesuré pour *H. limbata*. Des changements rapides dans les concentrations en Cd ont aussi été observées chez *Cryptochironomus* sp. et *Sialis velata* (Roy & Hare 1999) ainsi que chez des espèces de *Chaoborus* (Croteau et al. 2001; Munger et al. 1999). D'un point de vue appliqué, la connaissance des taux d'échange nous permet d'estimer le temps de réponse d'un organisme face à un changement dans les concentrations en métaux dans son environnement. Les larves de *H. limbata* (et possiblement les éphémères en général) s'avèrent donc des organismes susceptibles d'être de bons biomoniteurs pour les changements en Cd à court terme (semaines).

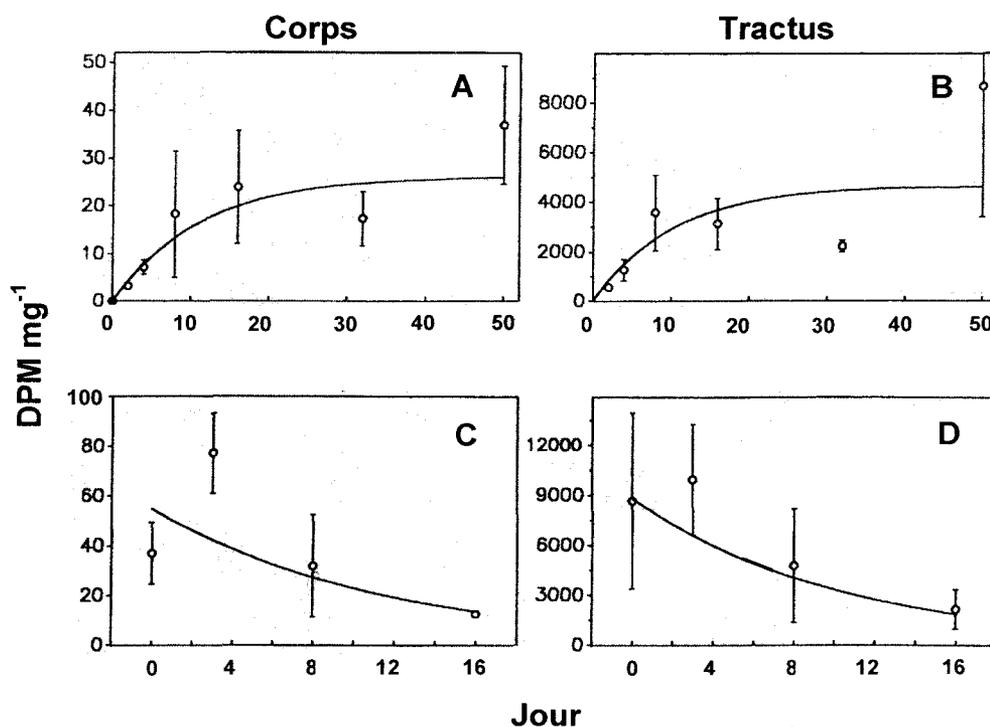


Figure 7. Prise en charge et perte du ^{109}Cd chez *Hexagenia rigida* en laboratoire. Prise en charge pour le corps (A) et le tractus digestif (B) ainsi que la perte du ^{109}Cd du corps (C) et du tractus digestif (D). Modifié de Hare et al. 1991b

Les taux de prise en charge et de perte du Cd chez des bivalves sont en général plus lents que ceux mesurés chez *H. limbata*. En effet, Couillard et al. (1995a) ont observé que les concentrations en Cd dans les branchies du bivalve *Pyganodon grandis*, transplantés vers un lac plus contaminé, n'ont atteint que le tiers de celles des indigènes après plus d'un an d'exposition. Dans une expérience similaire, Baudrimont et al. (2003) ont observé dans les tissus mous du bivalve *Corbicula fluminea*, transporté d'un milieu naturel contaminé en Cd vers un milieu peu contaminé en Cd au laboratoire, que les concentrations en Cd du bivalve n'ont diminué que de 18 % par rapport aux concentrations initiales sur une période de 6 mois.

5.3 Cd dans les parties de *H. limbata* (tractus et corps)

Les changements dans les concentrations de la larve entière de *H. limbata* s'expliquent presque entièrement par des changements dans la concentration d'un seul organe, le tractus digestif. Les concentrations en Cd dans le corps ont effectivement peu changé durant la même période de temps (Voir figure 6, Deuxième Partie). Nos résultats suggèrent donc que la nourriture (les sédiments) est la source majeure de ce métal et que l'entrée du Cd chez la larve de *H. limbata* se fasse par son tractus. Cette interprétation fait abstraction de la translocation possible du métal entre les organes, comme observé par Smith et al. (1975) avec le méthyle mercure pour le bivalve *Anodonta grandis* (nommé maintenant *Pyganodon grandis*) et par Rouleau et al. (1995) pour l'étoile de mer *Leptasterias polaris*. En effet, les concentrations en Cd dans le tractus des larves transplantées dans les sédiments de la rivière Allard ont augmenté de façon notable jusqu'à rejoindre celles dans le tractus digestif des larves indigènes. Hare et al. (1991a) ont aussi noté que les concentrations en Cd étaient beaucoup plus élevées dans le tractus digestif que dans les autres organes chez *H. limbata*. Cette augmentation majeure des concentrations en Cd dans le tractus digestif est réellement due à la présence du métal dans les tissus du tractus puisque tout le sédiment a été enlevé lors de la dissection des larves dans l'étude de Hare et al. (1991a) et dans la nôtre.

Hare et al. (1991a) ont comparé les concentrations de Cd dans la larve entière de *H. limbata* avec la proportion de Cd localisé dans l'organe majeur d'accumulation de *H. limbata*, c'est-à-dire le tractus digestif (figure 8). Les résultats de la figure 8 supposent que plus on augmente les concentrations de Cd dans la larve, plus la quantité et la

proportion de Cd accumulé dans le tractus digestif augmentent. Les larves de la rivière Colombière auront donc une plus faible proportion de Cd dans le tractus digestif que les larves de la rivière Allard (O et ☆, respectivement dans la figure 8) ce qui est aussi suggéré dans notre étude (Voir figure 8, Deuxième Partie).

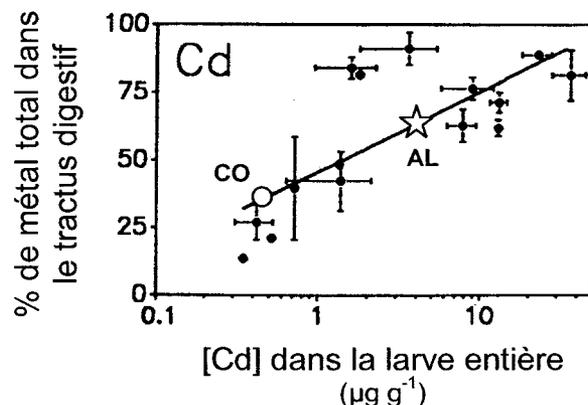


Figure 8. Comparaison entre le pourcentage (\pm l'écart-type) de Cd retrouvé dans le tractus digestif et les concentrations moyennes (\pm l'écart-type) dans les larves entières de *Hexagenia limbata* provenant de différents lacs. Modifié de Hare et al. (1991a.). L'étoile représente les larves de la rivière Allard, alors que le cercle représente celles de la rivière Colombière.

5.4 Cd dans les fractions subcellulaires

Les changements de concentrations du Cd intracellulaire dans le tractus digestif de *H. limbata* nous montrent que le Cd présent dans les cellules n'est pas majoritairement entreposé dans des granules, mais se trouve surtout dans le cytosol. Dans le cytosol, la majorité du Cd se trouve dans la fraction des protéines stables à la chaleur, qui comprennent la métallothionéine (MT), le glutathion, de petits peptides et des acides aminés libres (Voir figure 8, Deuxième Partie). Le Cd qui se trouve au niveau du corps a une répartition subcellulaire plus uniforme, aucune des fractions n'est un site d'entreposage majeur (Voir figure 9, Deuxième Partie). La MT est une protéine qui permet la liaison du Ag, Cd, Hg et Zn dans la cellule, alors que le glutathion est un antioxydant ayant une forte affinité pour ces mêmes métaux, ce qui diminue leur disponibilité pour les autres ligands cellulaires sensibles, (Mason & Jenkins 1995; Baudrimont et al. 2003). Nos

résultats nous indiquent que les larves de *H. limbata* ont une grande capacité à se protéger d'une entrée de Cd en synthétisant des protéines stables à la chaleur comme mécanisme de détoxification. Nous croyons que les effets néfastes et le coût de synthèse de ces protéines ne sont pas majeurs pour les individus de cette population de *H. limbata*, car la croissance des larves ne semble pas avoir été compromise suite à leur transfert vers la rivière Allard (Voir figure 2, Deuxième Partie).

Si on compare la répartition subcellulaire du Cd chez ces insectes à celle du bivalve *Pyganodon grandis* (Bonneris et al. 2004), on constate que dans les branchies de ce dernier, le Cd se trouve principalement associé aux granules (figure 9), alors que dans la glande digestive, le Cd se trouve principalement associé aux protéines stables à la chaleur. Wallace et al. (2003a) ont comparé la répartition subcellulaire de deux bivalves entiers et ont remarqué que celle-ci différait entre les deux espèces étudiées (figure 9).

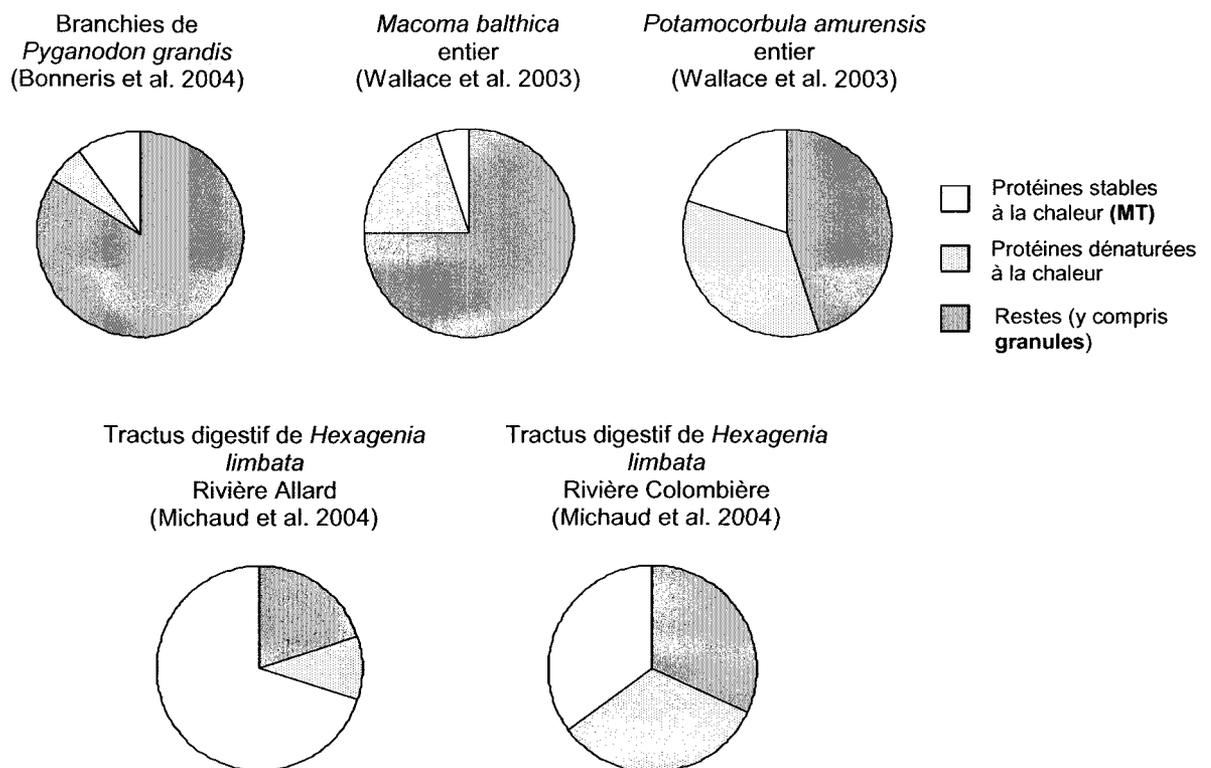


Figure 9. Représentation de la proportion de Cd accumulé dans les différentes fractions subcellulaires chez différents organismes et dans différents organes.

Par contre, une étude de transplantation de perchaudes d'un lac peu contaminé vers un lac plus contaminé en Cd a permis de constater une augmentation importante des concentrations en Cd dans la fraction des protéines stables à la chaleur dans le foie des perchaudes, sans toutefois voir un changement dans la fraction des granules (L. Kraemer, INRS-ETE, données non publiées).

Les prédateurs pouvant facilement assimiler le métal dans la fraction cytosolique de leurs proies (Reinfelder & Fisher 1991; 1994, Wallace & Lopez 1997; Wallace & Luoma 2003b), les larves de *H. limbata* pourraient être une source importante de Cd pour les poissons. Par contre, un tel transfert risque d'être moins important pour les prédateurs consommant des organismes comme les bivalves parce que les métaux dans les granules sont probablement moins facilement assimilés par les prédateurs. En effet, Wallace et al. (1998) ont montré une plus grande efficacité d'assimilation du Cd chez des crevettes nourries avec une espèce d'oligochète séquestrant le Cd dans la fraction des protéines stables à la chaleur que chez des crevettes nourries avec des oligochètes séquestrant le Cd majoritairement dans la fraction des granules.

5.5 La modélisation

En général, les courbes obtenues à partir du modèle décrit dans la section 1.7 correspondent bien aux données expérimentales, suggérant que ce modèle simple est suffisant pour décrire l'accumulation du Cd par *H. limbata* dans la nature (Voir figures 5 et 6, Deuxième Partie). Exceptionnellement, la superposition de la courbe obtenue pour l'accumulation du Cd dans la portion du corps est moins exacte, en grande partie due au fait que la valeur de k'_1 est surestimée en raison de la rapidité à laquelle cette partie de l'insecte a rejoint l'état stationnaire.

6. CONCLUSION

6.1 Récapitulation des résultats

Les concentrations totales de Cd dans les sédiments de la rivière Allard sont plus faibles que celles de la rivière Colombière, alors que les larves de l'éphémère *Hexagenia limbata* provenant de la rivière Allard sont plus contaminées en Cd que celles de la rivière Colombière.

Les larves de *H. limbata* ayant de faibles concentrations en Cd (celles de la rivière Colombière) ont accumulé du Cd suite à leur transfert dans la rivière Allard, pour atteindre un état stationnaire après 1 à 2 semaines. Parallèlement, les larves transplantées dans le sens inverse ont perdu du Cd pour s'approcher des concentrations mesurées dans les indigènes de la rivière Colombière après la même période de temps.

Le tractus digestif était l'organe majeur d'accumulation du Cd chez les larves de *H. limbata*. Ce résultat suggère que le Cd entre dans l'insecte par sa nourriture (les sédiments).

Au niveau subcellulaire, le Cd s'accumule en grande majorité dans le cytosol du tractus digestif et plus précisément dans la fraction des protéines stables à la chaleur (fraction métallothionéine et glutathion). Le Cd qui se retrouve dans les larves semble donc détoxiqué. Cependant, le fait qu'il soit entreposé sous la forme d'un complexe métalloprotéique lui confère la possibilité d'être transféré dans la chaîne trophique en étant facilement assimilable par les prédateurs. Le maintien d'un taux de croissance similaire entre les larves transplantées et les larves indigènes suggère que l'entrée du Cd chez les larves n'a pas provoqué d'effets néfastes.

D'après notre étude, *H. limbata* serait un bon biomoniteur pour les changements à court terme des concentrations en Cd ambiant puisque les changements les plus notables dans les concentrations internes en Cd se sont produits dans les deux premières semaines de la transplantation. De plus, le modèle à un compartiment utilisé permet de voir une bonne correspondance entre les données expérimentales et les courbes théoriques.

6.2 Perspectives de recherche

Il serait intéressant d'étudier le lien entre l'efficacité d'assimilation des métaux par les prédateurs et la distribution cellulaire des métaux dans les proies comme *Hexagenia*. En effet, que l'entreposage des métaux se fasse dans les protéines (incluant la métallothionéine) ou dans les granules influence la biodisponibilité des métaux pour les prédateurs. Reinfelder & Fisher (1991 et 1994), Wallace & Lopez (1996 et 1997) et Wallace & Luoma (2003b) ont observé que des prédateurs nourris avec des proies qui entreposaient les métaux dans le cytosol ont absorbé une grande partie des métaux associés avec le cytosol alors que les prédateurs nourris avec des proies entreposant les métaux dans des granules n'ont presque pas absorbé les métaux en provenance des proies puisque ces granules sont peu solubles dans le tractus digestif des organismes (Mason & Nott 1981; Wallace & Lopez 1997). Il y aurait donc lieu de penser que les prédateurs se nourrissant des larves de *H. limbata* absorberaient facilement les métaux accumulés par celles-ci puisque la stratégie de détoxification principale de *H. limbata* est la liaison des métaux par les protéines stables à la chaleur incluant la métallothionéine.

Les résultats obtenus dans notre étude suggèrent que les larves de *H. limbata* prennent leur cadmium de leur nourriture, les sédiments. Cette observation est supportée par l'étude en laboratoire effectuée par Hare et al. (1991a) avec *H. rigida*, mais encore une fois de façon indirecte. Il serait intéressant de réaliser une étude pour déterminer de façon directe la source du Cd chez *H. limbata*, c'est-à-dire l'eau ou la nourriture, en s'inspirant des protocoles expérimentaux de Munger & Hare (1997) et Roy & Hare (1999). Ce résultat nous permettrait d'utiliser un modèle à deux compartiments qui ferait intervenir l'eau et la nourriture dans les équations, ce qui pourrait optimiser encore plus la correspondance entre les données expérimentales et les courbes modèles.

Un dernier point à noter serait l'optimisation du protocole de la centrifugation différentielle chez les insectes. Il serait intéressant d'estimer la qualité du broyage pour avoir une idée de la quantité de cellules intactes par microscopie. Il serait aussi pertinent de définir avec exactitude le contenu de chaque fraction subcellulaire à l'aide de techniques microscopiques et biochimiques. La vérification de l'efficacité du traitement à la chaleur pour la dénaturation des protéines mériterait d'être vérifié pour s'assurer de la présence prépondérante des métallothionéines dans le surnageant S2.

7. Liste des références

- Ankley, G.T. 1996. "Evaluation of metal/acid-volatile sulfide relationships in the prediction of metal bioaccumulation by benthic macroinvertebrates". Environ. Toxicol. Chem. 15: 2138-2146.
- Aoki, Y., S. Hatakeyama, N. Kobayashi, Y. Sumi, T. Suzuki, & K. 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.
- Baudrimont, M., S. Andres, G. Durrieu, & A. Boudou. 2003. "The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after *in situ* exposure to Cd and Zn". Aquat. Toxicol. 63: 89-102.
- Benson, S.M., & W.J. Birge. 1985. "Heavy metal tolerance and metallothionein induction in fathead minnows: results from field and laboratory experiments". Environ. Toxicol. Chem. 4: 209-217.
- Bonneris, E., O. Perceval, S. Masson, L. Hare, & P.G.C. Campbell. 2004. "Sub-cellular partitioning of Cd, Cu and Zn in tissues of indigenous unionid bivalves living along a metal exposure gradient and links to metal-induced effects". Environ. Pollut. Accepté, révisions mineures.
- Brittain, J.E. 1982. "Biology of mayflies". Ann. Rev. Entomol. 27: 119-147.
- Brown, D.A., & T.R. Parson. 1978. "Relationship between cytoplasmic distribution of mercury and toxic effects to zooplankton and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) exposed to mercury in a controlled ecosystem". J. Fish. Res. Board Can. 35: 880-884.
- Brown, W.M., R.P. Sharma, & S.J. Kleinschuster. 1984. "Cadmium accumulation and subcellular distribution in relation to cadmium chloride induced cytotoxicity *in vitro*". Toxicol. 33: 93-102.
- Cain, D.J., J.L. Carter, S.V. Fend, S.N. Luoma, C.N. Alpers, & H.E. Taylor. 2000. "Metal exposure in a benthic macroinvertebrate, *Hydropsyche californica*, related to mine drainage in the Sacramento River". Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57: 380-390.
- Cain, D.J., & S.N. Luoma. 1998. "Metal exposures to native populations of the caddisfly *Hydropsyche* (Trichoptera: Hydropsychidae) determined from cytosolic and whole body metal concentrations". Hydrobiologia 386: 103-117.

- Cain, D.J., S.N. Luoma, & W.G. Wallace. 2004. "Linking metal bioaccumulation of aquatic insects to their distribution patterns in a mining-impacted river". Environ. Toxicol. Chem. 23: 1463-1473.
- Campbell, P.G.C. 1995. "Interaction between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model". In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. John Wiley & Sons, Ltd, New York, NY, pp. 45-102.
- Chapman, P.H., H.E. Allen, K. Godtfredsen, & M.N. Zraggen. 1996. Evaluation of bioaccumulation factors in regulating metals". Environ. Sci. Technol. 30: A448-A452.
- Charbonneau, P., & L. Hare. 1998. "Burrowing behavior and biogenic structures of mud-dwelling insects". J. N. Am. Benthol. Soc. 17: 239-249.
- Couillard, Y., P.G.C. Campbell, A. Tessier, J. Pellerin-Massicotte, & J.C. Auclair. 1995a. "Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I. Temporal changes in metallothionein and metal (Cd, Cu, and Zn) concentrations in soft tissues". Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52: 690-702.
- Couillard, Y., P.G.C. Campbell, J. Pellerin-Massicotte, & J.C. Auclair. 1995b. "Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. II. Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence for cytotoxicity, and links to effects at higher levels of biological organization". Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52: 703-715.
- Croteau, M.-N., L. Hare, & A. Tessier. 1998. "Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes". Environ. Toxicol. Chem. 32: 1348-1353.
- Croteau, M.-N., L. Hare, P.G.C. Campbell, & Y. Couillard. 2002. "Metallothionein-like metal-binding protein in the biomonitor *Chaoborus*: occurrence and relationship to ambient metal concentrations in lakes". Environ. Toxicol. Chem. 21: 737-741.
- Environnement Canada. 1994. "Loi canadienne sur la protection de l'environnement. Liste des substances d'intérêt prioritaire. Rapport d'évaluation. Le cadmium et ses composés". Cat No. En 40-215/40F.
- Hare, L. 1992. "Aquatic insects and trace metals: Bioavailability, bioaccumulation and toxicity". Crit. Rev. Toxicol. 22: 327-369.
- Hare, L., R. Carignan, & M.A. Huerta-Diaz. 1994. "A field study of metal toxicity and accumulation by benthic invertebrates: implications for the acid-volatile sulfide (AVS) model". Limnol. Oceanogr. 39: 1653-1668.

- Hare, L., A. Tessier, & P.G.C. Campbell. 1991a. "Trace element distribution in aquatic insects: variations among genera, elements, and lakes". Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48: 1481-1493.
- Hare, L., E. Saouter, P.G.C. Campbell, A. Tessier, F. Ribeyre, & A. Boudou. 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., & A. Tessier. 1996. "Predicting animal cadmium concentrations in lakes". Nature 380: 430-432.
- Hare, L., A. Tessier, and U. Borgmann. 2003. "Metal sources for freshwater invertebrates: Pertinence for risk assessment". Hum. Ecol. Risk Assess. 9: 779-793
- Hare, L., A. Tessier, and L. Warren. 2001. "Cadmium accumulation by invertebrates living at the sediment-water interface". Environ. Toxicol. Chem. 20: 880-889.
- Hopkin, S.P. 1989. "Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates". Elsevier Applied Science, London, 366 pages.
- Hunt, B.P. 1953. "The life history and economic importance of a burrowing mayfly, *Hexagenia limbata*, in southern Michigan lakes". Bull. Inst. Fisheries Res. 4: 1-127. Université du Michigan, Ann Arbor, Michigan.
- Jenkins, K.D., & A.Z. Mason. 1988. "Relationships between subcellular distributions of cadmium and perturbations in reproduction in the polychaete *Neanthes arenaceodentata*". Aquat. Toxicol. 12: 229-244.
- Johannson, C., D.J. Cain, & S.N. Luoma. 1986. "Variability in the fractionation of Cu, Ag, and Zn among cytosolic proteins in the bivalve *Macoma balthica*". Mar. Ecol. Prog. Ser. 28: 87-97.
- Klerks, P.L., & P.R. Bartholomew. 1991. "Cadmium accumulation and detoxification in a Cd-resistant population of the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*". Aquat. Toxicol. 19: 97-112.
- Lane, T.W., & F.M.M. Morel. 2000. "A biological function for cadmium in marine diatoms". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 4627-4631.
- Lee, J.G., & F.M.M. Morel. 1995. "Replacement of zinc by cadmium in marine-phytoplankton". Mar. Ecol. Prog. Ser. 127: 305-309.
- Lee, J.G., S.B. Roberts, & F.M.M. Morel. 1995. "Cadmium — a nutrient for the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*". Limnol. Oeanogr. 40: 1056-1063.

- Lobinske, R.J., A. Ali, & I.J. Stout. 1996. "Life history and productivity of *Hexagenia limbata* (Ephemeroptera: Ephemeridae) and selected physico-chemical parameters in two tributaries of the Wekiva River, central Florida". Florida Entomol. 79: 543-551.
- Malley, D.F. 1996. "Cadmium whole-lake experiment at the Experimental Lakes Area: an anachronism?". Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53: 1862-1870.
- Mason, A.Z., & K.D. Jenkins. 1995. "Metal detoxification in aquatic organisms". In Tessier A, Turner DR eds, Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. John Wiley & Sons Ltd., New York, NY, USA, pp. 478-608.
- Mason, A.Z., & J.A. Nott. 1981. "The role of intracellular biomineralized granules in the regulation and detoxification of metals in gastropods with special reference to the marine prosobranch *Littorina littorea*". Aquat. Toxicol. 1: 239-256.
- Michaud, A.L., L. Hare, & P.G.C. Campbell. 2005. "Exchange rates of cadmium between a burrowing mayfly and its surroundings in nature". Limnol. Oceanogr. Soumis
- Munger, C., & 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. Tessier. "Cadmium sources and exchange rates for *Chaoborus* larvae in nature". Limnol. Oceanogr. 44: 1763-1771.
- Nriagu, J.O. 1980. "Part I: Ecological Cycling". Cadmium in the environment. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Pacyna, J.M., M.T. Scholtz, & Y.-F. Li. 1995. "Global budget of trace metal sources". Environ. Rev. 3: 145-159.
- Price, N.M., & F.M.M. Morel. 1990. "Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom". Nature. 344: 658-660.
- Pynnönen, K. 1995. "Effects of pH, hardness and maternal pre-exposure on the toxicity of Cd, Cu and Zn to the glochidial larvae of a freshwater clam *Anodonta cygnea*". Water Res. 29: 247-254.
- Reinfelder, J.R., & N.S. Fisher. 1991. "The assimilation of elements ingested by marine copepods". Science (Washington, D.C.) 251: 794-796.
- Reinfelder, J.R., & N.S. Fisher. 1994. "Retention of elements absorbed by juvenile fish (*Menidia menidia*, *Menidia beryllina*) from zooplankton prey". Limnol. Oceanogr. 39: 1783-1789.
- Roesijadi, G. 1980. "The significance of low molecular weight, metallothionein proteins in marine invertebrates; current status". Mar. Environ. Res. 4: 167-179.

- Roesijadi, G. 1992. "Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals". Aquat. Toxicol. 22: 81-114.
- Roesijadi, G. 1994. "Behavior of metallothionein-bound metals in a natural population of an estuarine mollusk". Mar. Environ. Res. 38: 147-168.
- Roesijadi, G., & W.E. Robinson. 1994. "Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release". In Aquatic Toxicology. D.C. Malins & G.K. Ostrander [Eds]. Lewis Publishers, London. pp. 387-420.
- Roesijadi, G., J.S. Young, A.S. Drum, & J.M. Gurtisen. 1984. "Behavior of trace metals in *Mytilus edulis* during a reciprocal transplant field experiment". Mar. Ecol. Prog. Ser. 18: 155-170.
- Rouleau, C., E. Pelletier, & H. Tjalve. 1995. "Short-term bioconcentration and distribution of methylmercury, tributyltin and corresponding inorganic species in the starfish *Leptasterias polaris*". Appl. Organometal. Chem. 9: 327-334
- Roy, I., & L. Hare. 1999. "Relative importance of water and food as cadmium sources to the predatory insect *Sialis velata* (Megaloptera)". Can. J. Fish. Aquat. Sci. 56: 1143-1149.
- Smith, A.L., R.H. Green, & A. Lutz. 1975. "Uptake of mercury by freshwater clams (Family Unionidae)". J. Fish. Res. Board Can. 32: 1297-1303.
- Suzuki, K.T., H. Sunaga, Y. Aoki, S. Hatakeyama, Y. Sugaya, Y. Sumi, & T. Suzuki. 1988. "Binding of cadmium and copper in the mayfly *Baetis thermicus* larvae that inhabit a river polluted with heavy metals". Comp. Biochem. Physiol. 91C: 487-492.
- Tessier, A., Y. Couillard, P.G.C. Campbell, & 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.
- Viarengo, A. 1989. "Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level". Aquat. Sci. 1: 295-317.
- Wallace, W.G., B.G. Lee, & S. N. Luoma. 2003a. "Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM)". Mar. Ecol. Prog. Ser. 249: 183-197.
- Wallace, W.G., & S.N. Luoma. 2003b. "Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM)". Mar. Ecol. Prog. Ser. 257: 125-137.

- Wallace, W.G., & G.R. Lopez. 1996. "Relationship between subcellular cadmium distribution in prey and cadmium trophic transfer to a predator". Estuarine Res. Fed. 19: 923-930.
- Wallace, W.G., & G.R. Lopez. 1997. "Bioavailability of biologically sequestered cadmium and the implications of metal detoxification". Mar. Ecol. Prog. Ser. 147: 149-157.
- Wallace, W.G., G.R. Lopez, & J.S. Levinton. 1998. "Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp". Mar. Ecol. Prog. Ser. 172: 225-237.
- Warren, L.A., A. Tessier, & L. Hare. 1998. "Modeling cadmium accumulation by benthic invertebrates *in situ*: the relative contributions of sediment and overlying water reservoirs to organism cadmium concentrations". Limnol. Oceanogr. 43: 1442-1454.
- Zimmerman, M.C. 1977. "Aspects of the life history, feeding behavior, and nutritional dynamics of the burrowing mayfly, *Hexagenia limbata*, in an Ohio pond". Thèse de doctorat. Univ. of Miami, Oxford, Ohio, USA.

DEUXIÈME PARTIE

Article scientifique



Exchange rates of cadmium between a burrowing mayfly and its surroundings in nature

Annick L. Michaud, Landis Hare,¹ and Peter G.C. Campbell

Institut national de la recherche scientifique – Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE), Université du Québec, 490 de la Couronne, Québec, Québec, Canada, G1K 9A9

For submission to Limnology and Oceanography as an article

Running head: Insect Cd exchange in nature.

¹ Corresponding author (landis@ete.inrs.ca)

Résumé de l'article

Les organismes biomoniteurs permettent d'estimer la concentration biodisponible d'un contaminant dans l'environnement. Pour que l'utilisation d'un biomoniteur soit efficace, il est avantageux de connaître son temps de réponse à un changement dans les concentrations d'un contaminant dans la nature. La larve de l'éphémère *Hexagenia limbata* a été choisie puisqu'elle a été souvent utilisée pour mesurer les contaminations métalliques et organiques. Cependant, il y a peu de données sur les taux d'échange de contaminants entre cette larve et son milieu dans la littérature.

Pour pallier à cette absence de données, nous avons mesuré les taux d'échange de cadmium dans la nature en effectuant une transplantation réciproque de larves de l'éphémère *H. limbata* entre deux rivières québécoises (Rivière Allard et Rivière Colombière) qui abritent des populations de cet insecte qui présentent des concentrations différentes en Cd. Cette expérience nous a permis de mesurer les taux de gains et de pertes de Cd à plusieurs niveaux biologiques, c'est-à-dire, la larve entière, le tractus digestif et le corps, ainsi que 3 fractions cellulaires.

Lors de la prise en charge de Cd aussi bien que lors de la perte de Cd, les plus grands changements dans les concentrations en Cd se sont produits au niveau du tractus digestif où le Cd était en majorité associé avec les protéines stables à la chaleur. Si effectivement la fraction des protéines stables à la chaleur contient majoritairement de la métallothionéine, comme montré chez d'autres espèces aquatiques, on peut supposer qu'une augmentation de la part de Cd fixée à cette fraction relativement aux autres, serait liée à une synthèse accrue de métallothionéines, donc à la mise en place d'un système de protection et/ou détoxification. De plus, ces résultats suggèrent que la métallothionéine soit rapidement recyclée chez cet organisme, que cet insecte prend son Cd de sa nourriture (les sédiments) et qu'il est tolérant au Cd en raison de sa grande capacité à synthétiser des protéines stables à la chaleur comme la métallothionéine. D'autre part, puisque ce Cd semble lié à une protéine plutôt qu'associé aux granules, il serait potentiellement plus facilement transférable vers les niveaux trophiques supérieurs, incluant les poissons. Un modèle à un compartiment explique avec succès les changements en Cd observés chez la larve et les valeurs des constants obtenues sont similaires à celles mesurées dans une expérience antérieure en laboratoire pour une autre espèce de *Hexagenia*. Les changements dans les concentrations en Cd les plus notables ont

été remarqués dans les deux premières semaines de la transplantation, ce qui suggère que *H. limbata* serait un bon biomoniteur pour les changements dans les [Cd] à court terme contrairement aux bivalves d'eau douce pour lesquels les changements dans les [Cd] s'observent sur des mois et même des années

Abstract

Metals such as cadmium (Cd) can be accumulated to high concentrations by animals living in lakes and rivers that are exposed to fallout and runoff from mines, smelters and other industrial sites. The bioaccumulation of Cd and its toxic effects are usually measured in the laboratory and then these results are extrapolated to animals living in the field. There have been few experimental field studies to test whether such extrapolation is valid, as well as to measure how animals in the field take up and manage metals. To help fill this knowledge gap, we conducted a reciprocal transfer of nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia limbata* between two rivers harboring populations of this insect that differ in their Cd concentrations. We measured Cd uptake and loss rates in the field at several levels of biological organization, that is, in whole nymphs, in their gut and body, as well as in three subcellular fractions. The most marked changes in Cd occurred in the insect's gut, where Cd was largely associated with heat-stable proteins, a fraction that includes the metal-binding protein metallothionein. Our results suggest that much of this mayfly's Cd comes from its food (sediment) and that its apparent tolerance to Cd is linked to its efficient synthesis of metal-binding proteins. Because most nymph Cd is protein bound, rather than associated with granules, it is likely readily transferred to higher trophic levels such as fish. Our results suggest that nymphs of *H. limbata* would respond rapidly to changes in bioavailable cadmium in nature and could be useful for monitoring changes in ambient Cd over weeks or months. A one-compartment model successfully explained the changes we observed in nymph Cd. Furthermore, values of the model constant for Cd loss rate were close to those reported for *Hexagenia rigida* in the laboratory, which suggests that accumulation patterns observed in the laboratory can be representative of those measured in nature.

Acknowledgments

Funding was provided by COREM and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. We thank Philippe Bourret, Nicolas Lemay, Stéphane Masson, Jonathan Perreault and Édith Sénéchal for their assistance in the field and laboratory as well as Sébastien Duval, Michelle Geoffroy-Bordeleau, Pauline Fournier, Stéphane Prémont, Lise Rancourt and René Rodrigue for their analytical expertise. Magalie Baudrimont and André Tessier provided valuable comments on the manuscript.

Introduction

Cadmium is a potentially toxic trace metal that commonly appears on government priority-substances lists such as that in the Canadian Environmental Protection Act (Environment Canada 1994). Because this metal is released as a by-product of the mining and smelting of copper, nickel and zinc ores, it can be a major contaminant of lakes and rivers in mining regions where it is readily accumulated by organisms (Croteau et al. 2002a). As part of risk assessment protocols for Cd in aquatic systems, we require reliable tools to evaluate the exposure of organisms to this metal, their accumulation of Cd and its toxic effects (Chapman and Wang 2000). Traditional approaches to achieve these ends involve either laboratory tests performed under often-unrealistic conditions (exposures of short duration, to a single metal, in dissolved form only, at unrealistically high concentrations), or measurements of invertebrate community structure in the field, the results of which are difficult to interpret given the large variability inherent in most natural systems (Hare 1992; Luoma 1995). In contrast, we chose to conduct a field experiment so that we could expose an invertebrate to Cd under natural conditions. We did this by transferring the burrowing mayfly *Hexagenia limbata* between two rivers that differed in their Cd concentrations, which allowed us to measure the rate of Cd gain and loss simultaneously without adding Cd to the insect's surroundings.

We selected the burrowing mayfly *Hexagenia* for our reciprocal transplant experiment because it has several qualities that make it a good biomonitor for metals, that is, it is: of adequate size for contaminant measurements; often present at high densities in suitable sediments (Charbonneau and Hare 1998); widely distributed in temperate lakes and rivers (Brittain 1982); tolerant of metals (Gosselin and Hare 2004). Moreover, this nymph is a potentially important source of contaminants for higher trophic levels such as fish.

We measured Cd influx and efflux rates at several levels within *H. limbata*, that is: in gut tissues, because this organ is reported to be the major site at which Cd accumulates in this insect (Hare et al. 1991a and b); and in various subcellular fractions, because the likelihood of toxic effects and the potential for trophic transfer is thought to depend on how metals are bound in cells (Jenkins and Mason 1988; Cain and Luoma 1998; Cain et al. 2004; Campbell et al. 2005). We compared our measurements of Cd influx and efflux to the predictions of a bioaccumulation model to determine if it could reliably describe Cd exchange in this mayfly.

Methods

Study area—In June 2002, we collected nymphs of *H. limbata* at a single station in each of two rivers situated in largely-forested drainage basins located in northwestern Quebec, Canada, that is, in the Allard River (77°47'38.3" N and 49°49'35.9" W), near Matagami in the James Bay region, and in the Colombière River (77°37'45.0" N and 48°08'59.2" W), near Val d'Or in the Abitibi region. Both rivers are impacted by activities associated with the mining of copper, gold and zinc, including abandoned surface mines and mine tailings as well as atmospheric deposition from a metal smelter in Rouyn-Noranda, Québec. We chose the stations for our experiment both on the basis of the presence of large numbers of *H. limbata* nymphs and on preliminary measurements that showed Cd concentrations to be lower in nymphs from the Colombière River than in those from the Allard River. During our experiment, the waters of these rivers (Colombière and Allard, respectively) were circum-neutral (pH 6.6 and 7.3) and fairly similar in their conductivity (210 and 80 $\mu\text{S cm}^{-1}$) and their dissolved organic carbon concentrations (12 and 13 mg L^{-1}) (S. Masson and P.G.C. Campbell, INRS-ETE, unpublished).

Reciprocal transplantation of Hexagenia limbata—In each river, divers collected ≈ 400 L of surficial sediment (< 5 cm depth) by dragging a large pail along the river bottom in an area where *H. limbata* nymphs were abundant. These sediments were mixed thoroughly in 80-L plastic barrels and then ≈ 9 L were placed into each of a series of plastic containers (30 \times 30 \times 15 cm deep, surface area 0.09 m^2). The 30 containers for a given river were covered with tight-fitting lids and pushed by divers into the river bottom (on June 16 and 18, 2002, in the Colombière and Allard Rivers, respectively) at the sites from which the sediments had been collected. Containers were left for 1 week to asphyxiate any remaining *H. limbata* (Warren et al. 1998); 4 control containers examined at the end of this period contained no live nymphs. The hermetic lids were removed from the containers and replaced by mesh lids (aperture 1 mm) to allow the oxidation of the surficial sediments.

After 2 weeks, *H. limbata* nymphs were collected in each river by dragging a 1-mm mesh-aperture net along the river bottom and nymphs of uniform size (to minimize variability) were selected for reciprocal transfer between the two rivers. The mean (\pm SD) lengths of nymphs (excluding cerci) collected from the Allard and Colombière Rivers were 15.4 ± 2.5 and 14.6 ± 1.1 mm, respectively. Nymphs originating from one river were transported to the other river where

10 individuals were placed into each of the sediment-filled containers. Nymph densities in these containers were ≈ 110 nymphs m^{-2} , which is somewhat less than the mean reported for 22 North American lakes (160 nymphs m^{-2} , Charbonneau and Hare 1998). Additional nymphs were introduced into containers filled with sediment from their own river (10 nymphs per container) and these containers were placed in their home river to serve as controls to determine if confinement affected their metal concentrations or growth rates. All containers were fitted with 1-mm mesh aperture lids that served to prevent nymph exchange between containers and surrounding sediments. Transplanted nymphs were collected on 9 occasions (days 0, 3, 6, 9, 12, 15, 21, 28 and 36), whereas *H. limbata* in control containers were collected on 5 occasions (days 0, 6, 9, 15 and 28). At each sampling time, divers collected 2 containers and removed the nymphs by sieving through a 1-mm mesh-aperture net. Lastly, 20 indigenous nymphs were collected on 5 occasions (days 0, 6, 9, 15 and 20) by dragging the river bottom near the containers, but slightly downstream, with a 1-mm mesh-aperture net.

Nymphs were transported to the field laboratory and held in river water for 12 h to partially eliminate the sediment in their gut. They were then held in an anesthetic solution (carbonated water) and their length measured under a dissecting microscope. Nymphs were dissected into two portions, the gut and remaining parts that we refer to as the body. Guts that were not empty were opened to remove remaining sediment (Hare et al. 1989). The parts of 4 nymphs were pooled, i.e., 4 bodies or 4 guts (when there had been no mortality), and placed on pieces of acid-washed Teflon sheeting held in polypropylene, freeze-resistant, acid-washed tubes (Wheaton). These tubes were stored in liquid nitrogen in the field laboratory and at -80°C on return to the central laboratory; analyses were completed between 1 and 10 months after collection.

Cd measurements in sediment and porewater—Porewater samplers and labware used for Cd measurements in water and sediment were washed in 15% v/v HNO_3 for 24 h, rinsed 7 times with ultrapure water and dried under a laminar flow hood prior to use.

To compare Cd concentrations between rivers, we collected sediment samples in each river on the last sampling day (August 12 and 17, 2002, in the Colombière and Allard Rivers, respectively). We also collected sediment from containers to compare Cd concentrations in containers with those in surrounding sediments. The 3-cm diameter cores were extruded and sectioned at 1 cm intervals (to a depth of 10 cm); slices were placed in pre-weighed 20-ml

plastic vials, held at 4°C in the field and then frozen on their return to the laboratory. Sediment samples were freeze-dried (FTS Systems™) to constant weight and then digested in a mixture of 4% HNO₃ and 5% HCl at 85°C for 2 h (modification of method 200.2, U.S. E.P.A., 1992). Concentrations of Cd were measured by inductively coupled plasma - mass spectrometry (ICP-MS, Thermo Instrument, X7). Reference sediment from the Saint-Lawrence River (CRM 1-21 and 2-31, COREM and INRS-ETE, Québec, Québec, Canada) was digested at the same time and Cd measurements were within 2% of certified values.

To collect Cd in porewaters, we used acrylic diffusion samplers (peepers) comprising a vertical series of 10 4-ml cells situated at 1-cm intervals (Hare et al. 1994). The samplers were held under a nitrogen atmosphere for 3 weeks prior to use, filled with ultrapure water (~18 MΩ cm), covered with a polysulfone membrane (Pall Gelman Sciences, HT-200; 0.2 μm) and then stored under a nitrogen atmosphere for at least one week prior to use to ensure removal of oxygen (Carignan et al. 1994). Porewater samples for Cd analyses were obtained by piercing the membrane with a Pipetman pipette (P5000) fitted with an acid-washed plastic tip and injected into pre-washed and pre-acidified (40 μl of 2N HNO₃ Seastar) 4-ml high-density polyethylene vials. All samples were stored at 4°C prior to analysis. Cadmium in porewaters was measured by ICP-MS (Thermo Instrument, X7). Blanks and certified samples (riverine water reference material, NIST 1640, U.S. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland) were analyzed during each analytical run and measured trace metal concentrations were within the certified range.

Fractionation and analysis of biological samples—Tubes containing biological samples were pre-washed in 70% v/v HNO₃ for 1 h, rinsed 7 times with ultrapure water and dried under a laminar-flow hood prior to use. During manipulation, biological samples were kept on ice to minimize enzymatic degradation of tissues.

Frozen samples of *H. limbata* were transferred into pre-weighed centrifuge tubes and weighed; guts were held in 1.5-ml polypropylene microcentrifuge tubes (Eppendorf), whereas bodies were held in 3-ml polyallomer centrifuge tubes (Beckman). These samples were homogenized in ice-cold isotonic buffer (TRIS 25 mmol L⁻¹, Omnipure #9210, 99.8% purity, adjusted to pH 7.2 with 35% trace metal grade HCl; Y. Couillard, INRS-ETE, unpublished) at dilutions of 1: 2 (w/w) for bodies and 1: 5 (w/w) for guts. Homogenization was performed

manually in the centrifugation tubes using a glass pestle; we determined by visual inspection that 4 and 7 turns of the pestle were sufficient to homogenize guts and bodies, respectively.

We removed a 10- μ l aliquot of homogenate to measure total Cd and then used the following procedure (Fig. 1) to obtain 3 subcellular fractions (modified from Wallace et al. 1998). The homogenate was centrifuged at $100\,000 \times g$ (Beckman TL-100 with a TLA-100.3 fixed angle rotor) for 1 h at 4°C to yield a pellet containing granules and exoskeleton (C1, Fig. 1), that we refer to as the remainder. The supernatant (S1, Fig.1) was heated at 80°C for 10 min, cooled on ice for 1 h and then centrifuged at $50\,000 \times g$ (Sorvall RC 5C Plus with an SS-34 rotor) for 10 min at 4°C to yield a second supernatant (S2, Fig. 1) containing heat-stable moieties that should include the metal-binding protein metallothionein (MT) as well as glutathione, small peptides and free amino acids. The pellet (C2, Fig. 1) is expected to contain heat-denatured proteins. All pellets and homogenates were frozen, whereas the supernatants were acidified with an equal volume of concentrated HNO_3 (trace metal grade) and held at 4°C . Although the cell fractions obtained with this type of technique are operationally defined, several researchers have reported that they give a reliable estimate of metal partitioning at the subcellular level (Wallace et al. 2003; Cain et al. 2004).

All fractions were freeze-dried (FTS SystemsTM) to constant weight and digested in their centrifugation tubes at room temperature in concentrated trace-metal grade HNO_3 . Each mg dry weight of sample (to a limit of 26 mg) was digested in 100 μ l of acid for 5 d followed by the addition of 40 μ l of H_2O_2 for 24 h and then dilution with 860 μ L of ultrapure water. Samples weighing more than 26 mg were treated like 26 mg samples. Cadmium concentrations in all subcellular fractions were measured by ICP-MS (Thermo Instrument, X7). We submitted samples of similar weight of a certified reference material (lobster hepatopancreas, TORT-1, National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario) to the same digestion procedure during each run. The mean percentage recovery of Cd in TORT-1 reference samples (N=14) was $95 \pm 5\%$ (\pm SD) and was within the certified range for this metal. Digestion blanks indicated negligible Cd contamination during sample preparation, digestion and analysis. The mean (\pm SD) sum of Cd in the subcellular fractions was close to the values measured for whole homogenate, that is, $103 \pm 9\%$ for the gut portion and $86 \pm 9\%$ for the body portion, suggesting that there was little loss of Cd during the fractionation procedure.

Results

Survival and growth of nymphs—For the Cd uptake experiment (nymphs transferred from the Colombière River to the Allard River), recovery was high (8-10 of the 10 nymphs introduced per container) and nymphs grew at a mean (\pm SD) rate of 0.19 ± 0.02 mm d⁻¹ (Fig. 2A) over the 36-d period. Control nymphs in containers and indigenous nymphs from the Allard River (Fig. 2B) grew at similar rates (0.12 ± 0.02 and 0.16 ± 0.02 mm d⁻¹, respectively; $p > 0.05$, t test). For the Cd loss experiment (nymphs transferred from the Allard River to the Colombière River), nymph growth rates (0.17 ± 0.02 mm d⁻¹) were similar to those in the Cd-influx experiment (Fig. 2C). Control nymphs in containers and indigenous nymphs from the Colombière River (Fig. 2D) had similar growth rates with 0.18 ± 0.08 and 0.16 ± 0.07 mm d⁻¹, respectively ($P > 0.05$, t test). Nymph recovery from containers in the Colombière River was variable (3-10 of 10) because divers lost some nymphs during their insertion into the containers. The similarity in growth rates between nymphs in containers and indigenous nymphs suggests that the container environment was similar to that in nature. The similarity in nymph growth rates between rivers is consistent with the similarity in water temperatures between the two rivers (Fig. 2B,D).

[Cd] in water and sediments—Cadmium concentrations were lower in sediments from the Allard River (Fig. 3A,B) than in those from the Colombière River (Fig. 3C,D). However, dissolved Cd concentrations in interstitial waters were similar in the two rivers (Fig. 4A,B versus 4C,D). Cadmium concentrations measured in the overlying water of the Colombière River were higher and more variable (Fig. 4C,D) than those measured in the Allard River (Fig. 4A,B). This variability could be due to deposits of iron oxyhydroxides observed on peeper membranes in the water column of the Colombière River (but not on those from the Allard River); variable quantities of iron oxyhydroxides, along with sorbed Cd, could have inadvertently entered peeper cells during sampling in the Colombière River.

In both rivers, Cd concentrations in sediment (Fig. 3) and interstitial waters (Fig. 4) were similar between the containers and their surroundings, suggesting that sediment manipulation did not create experimental artifacts. Sedimentary Cd profiles in the environs were more uniform (Fig. 3A,C) than those measured in containers (Fig. 3B,D). The trends in container sediment profiles could be explained if sedimentary Cd concentrations changed during the experiment, that is, they were initially lower in the Allard River and higher in the Colombière River than at the

end of the experiment (we measured Cd in sediment only at the end of our experiments). However, we cannot prove that hypothesis is reasonable because we do not have sediment Cd profiles in the environs at the beginning of our experiment to compare with those at the experiment's end. Cadmium profiles in containers were vertical near the sediment surface, likely due to nymph burrowing activities; visual assessment of the depth of nymph burrowing in each river coincided with the zone of uniform Cd concentrations, that is, from 0 to 3-4 cm in the Colombière River and from 0 to 5-6 cm in the Allard River (Fig. 3).

[Cd] in whole nymphs—Cadmium concentrations in whole *H. limbata* transferred to the Allard River increased over time reaching those of indigenous nymphs from the Allard River in < 2 weeks (Fig. 5A). In the case of the transfer to the Colombière River, Cd concentrations in whole nymphs decreased over time but did not quite reach the low levels of indigenous nymphs from this river by the end of our 36-day experiment (Fig. 5B).

Cd in the nymph gut and body—Cadmium concentrations in the gut tissues of nymphs transplanted to the Allard River attained those of indigenous Allard River nymphs after a few weeks (Fig. 6A), whereas Cd concentrations in the body increased between times 0 and 3 d after which they stabilized near those of indigenous nymphs (Fig. 6B). In the Cd-loss experiment, gut Cd concentrations in nymphs transplanted to the Colombière River decreased but did not reach those of indigenous nymphs from the Colombière River (Fig. 6C), whereas Cd concentrations in the bodies of these transplanted nymphs declined to reach those of indigenous nymphs from the Colombière River after several weeks (Fig. 6D).

Cadmium concentrations in the gut (Fig. 6A,C) far exceeded those in the body portion (Fig. 6B,D) of *H. limbata*. In terms of Cd burdens, indigenous nymphs having higher Cd concentrations (those from the Allard River) had the majority of their Cd in the gut (Fig. 7A), whereas those with lower Cd concentrations (those from the Colombière River) had greater mean proportions of their Cd in the body than in the gut (Fig. 7C). Accordingly, in transplanted *H. limbata* there was a change over time in the major organ of Cd accumulation towards that measured in indigenous nymphs (Fig. 7B,D).

Cd in subcellular fractions of H. limbata —During the Cd-uptake experiment (transfer to the Allard River, Fig. 8A-C), Cd concentrations in the gut increased in the “remainder” fraction (intact cells, granules, etc.) early in the experiment (Fig. 8A) to reach those of indigenous nymphs from

the Allard River whereas those in the heat-denatured proteins fraction showed little trend (Fig. 8B). In contrast, Cd concentrations in the heat-stable proteins fraction of the gut increased markedly within the first two weeks of the uptake experiment, eventually reaching those in indigenous nymphs from the Allard River (Fig. 8C). In all nymphs, Cd concentrations in the heat-stable proteins fraction far exceeded those in the other fractions (compare vertical scales in Fig. 8A-C).

During the Cd-loss experiment (transfer to the Colombière River, Fig. 8D-F), Cd concentrations in the gut declined somewhat in the “remainder” fraction (Fig. 8D) to reach those of indigenous nymphs from the Colombière River, remained stable in the heat-denatured proteins fraction (Fig. 8E) but declined substantially in the heat-stable proteins fraction to reach those in indigenous *H. limbata* from the Colombière River (Fig. 8F).

During the Cd-uptake experiment (Fig. 9A-C), Cd concentrations in the body portion increased slightly in the “remainder” fraction (intact cells, granules, etc.; Fig. 9A) but did not reach those in the bodies of indigenous nymphs from the Allard River, whereas those in the heat-denatured proteins fraction increased from days 0 to 3 at which time they equaled those of indigenous nymphs from the Allard River (Fig. 9B). Cadmium concentrations in the heat-stable proteins fraction also increased to reach those in the body portion of indigenous nymphs from the Allard River within ≈ 2 weeks (Fig. 9C).

During the Cd-loss experiment (Fig. 9D-F), Cd concentrations in the body changed little in the “remainder” fraction and stayed higher than those in indigenous nymphs from Colombière River (Fig. 9D) but declined in both protein fractions to reach those of indigenous nymphs (Fig. 9E,F).

The burden of Cd in the gut of indigenous low-Cd nymphs from the Colombière River was equally distributed among the three sub-cellular fractions (Fig. 10C). When these nymphs were transplanted to the Allard River, the proportion of Cd associated with the heat-stable proteins fraction increased rapidly such that $\sim 80\%$ of the total came to be associated with this fraction (Fig. 10B), as in indigenous *H. limbata* from this river (Fig. 10A). For nymphs transplanted to the Colombière River (the Cd-loss experiment), the proportion of gut Cd in the heat-stable proteins fraction fell somewhat (Fig. 10D), but did not reach that of indigenous nymphs in this river (Fig. 10C).

In the body portion of indigenous nymphs from the Colombière River, a minority of their Cd was in the heat-stable proteins fraction (~10%, triangles in Fig. 11C). When these nymphs were transplanted to the Allard River, the proportion of Cd in this fraction increased (Fig. 11B) to reach those of indigenous nymphs from the Allard River (~40%, Fig. 11A) within about two weeks time. For *H. limbata* nymphs transplanted to the Colombière River (the Cd-loss experiment), the proportion of body Cd in the heat-stable proteins fraction declined (Fig. 11D) to reach that of indigenous nymphs in this river (Fig. 11C). Changes in the proportion of Cd in the heat-denatured proteins fraction were minor whereas changes in the "remainder" fraction were substantial, driven in large part by changes in the heat-stable protein fraction (Fig. 11A-D).

Discussion

Cd concentrations in Hexagenia limbata versus those in its environs—Cadmium concentrations in nymphs were not directly related to those in either the sediment or the water of our study rivers. In fact, higher Cd concentrations in sediment were associated with lower Cd concentrations in *H. limbata*. However, much of the Cd in sediment is unavailable for uptake by burrowing animals (Bryan and Langston 1992; Ankley 1996). Furthermore, invertebrates such as *Hexagenia* are not necessarily exposed to metals in anoxic sediment because they live in an oxic microenvironment of their own creation (Lee et al. 2000; Wang et al. 2001; Gosselin and Hare 2004). Likewise, to relate Cd concentrations in water to those in animals it is often necessary to consider free Cd ion concentrations, rather than the total Cd in water, as well as competitive relationships between Cd²⁺ and ions such as Ca²⁺ and H⁺ (Croteau et al. 1998, 2002b). Because relating Cd concentrations in animals to those in their surroundings was not the goal of our study, we did not pursue these relationships further.

Cadmium in Hexagenia limbata—The following model (Hare et al. 1991a) can be used to describe changes in Cd concentrations in *Hexagenia* or its parts, [Cd]_{Hexagenia}, that is,

$$\frac{d[\text{Cd}]_{\text{Hexagenia}}}{dt} = k_I [\text{Cd}]_{\text{environs}} - k_E [\text{Cd}]_{\text{Hexagenia}} \quad (1)$$

(influx) (efflux)

where k_I and k_E are first-order rate constants for Cd influx and efflux, respectively. The term [Cd] environs represents bioavailable [Cd] in the insect's environs, whether the Cd is in the sediment or the water or both (the relative importance of water and food as Cd sources for

Hexagenia is unknown). If we assume that $[Cd]_{\text{environs}}$ was constant during our 36 day experiment, then Cd influx can be represented as an apparent uptake rate constant (k'_I) in Equation 1, that is,

$$k_I [Cd]_{\text{environs}} = k'_I \quad (2)$$

Substituting Eq. 2 in Eq. 1 and integrating the resulting equation yields

$$[Cd]_{\text{Hexagenia}} = \frac{k'_I}{k_E} - \left(\frac{k'_I}{k_E} - [Cd]_{\text{Hexagenia}}^0 \right) e^{-k_E t} \quad (3)$$

Using Eq. 3 and data from our Cd-uptake experiment we estimated, by iteration, k'_I and k_E for whole *H. limbata* and for its constituent parts (the gut and the body). We then used these estimates of k'_I and k_E (Table 1) along with appropriate values of $[Cd]_{\text{Hexagenia}}^0$ to generate model curves for both our Cd-uptake and Cd-loss experiments, as shown in Figures 5 (whole nymphs) and 6 (nymph parts).

Model curves for the Cd-uptake experiments fit our observed data well (Figs. 5A and 6AB), suggesting that the model we used, although simple, is sufficient to characterize Cd accumulation by *H. limbata*. Likewise, model curves fit our Cd-loss data well (Figs. 5B and 6CD), even though the rate constants k_E and k'_I were estimated from our data for Cd-uptake. Exceptionally, the fit of the model curve for Cd loss from the body portion (Fig. 6D) was somewhat less exact. We attribute this lack of fit to a very rapid Cd uptake by the nymph body (Fig. 6B), which led to an overestimate of the apparent uptake rate constant k'_I for this insect part (Table 1). This overestimate could be related to the presence of iron oxyhydroxide deposits on the exoskeleton of *H. limbata* from the Colombière River; when these nymphs were transferred to the Allard River, Cd would have sorbed rapidly onto these deposits. Cadmium sorption onto the exoskeleton was not, however, the sole process involved because the concentration of heat stable proteins increased in the body portion of these nymphs (Fig. 9C). Cadmium efflux from the body portion (Fig. 6D) was likely due solely to physiological Cd loss (note the decline in heat stable proteins in the body portion in Fig. 9F), since there were no visible deposits of iron oxyhydroxides on the exoskeleton of nymphs transferred from the Allard River. To eliminate bias due to metal sorption in the Cd-uptake experiment, we determined a second value of k_E for the body using data from our Cd-loss experiment. For this purpose, we

assumed that during our Cd-loss experiment Cd uptake by nymphs was negligible because bioavailable $[Cd]_{\text{environs}}$ was likely very low in the Colombière River (given the very low $[Cd]$ in indigenous nymphs from this river). In this case, Eq. 1 reduces to

$$\frac{d[Cd]_{\text{Hexagenia}}}{dt} = -k_E [Cd]_{\text{Hexagenia}} \quad (4)$$

which can be integrated to

$$[Cd]_{\text{Hexagenia}} = [Cd]_{\text{Hexagenia}}^0 e^{-k_E t} \quad (5)$$

where the superscript zero refers to initial conditions. The value of the loss rate constant k_E derived in this manner is given in Table 1 and was used in Eq. 5 to generate a second model curve for Cd loss from the body portion (broken line in Fig. 6D). The fit of this model curve is improved over that generated using data from the uptake experiment, suggesting that this value of k_E better describes physiological Cd loss than that derived from the uptake experiment. We also used Eq. 5 to estimate the biological half-life ($t_{1/2}$) of Cd, which is ~1 week for the whole insect and its constituent parts (Table 1).

At 0.09 d^{-1} (Table 1), the value of the loss rate constant k_E for Cd in whole *H. limbata* is in the same order of magnitude, but somewhat lower, than those reported for copepods ($0.1\text{-}2.0 \text{ d}^{-1}$; Wang and Fisher 1998; Fisher et al. 2000; Xu et al. 2001) and much higher than those reported for bivalves ($0.01\text{-}0.03 \text{ d}^{-1}$; Roditi and Fisher 1999; Chong and Wang 2001; Shi and Wang 2004) and gastropods ($0.001\text{-}0.005 \text{ d}^{-1}$; Wang and Ke 2002). The values of the loss rate constants for the gut and body portions that we measured in our field study (Table 1) are similar to those reported from a laboratory study on *H. rigida* (0.09 d^{-1} for the body and 0.1 d^{-1} for the gut; Hare et al. 1991a), which suggests that species of *Hexagenia* differ little in this respect and that results in the laboratory for this genus can be representative of those obtained in the field. The similarity in these Cd-loss rate constants is echoed by that of the biological half-lives for Cd in these species, which are 7-8 d for both *H. limbata* and *H. rigida* (Table 1). Half-lives for Cd on the order of one to several weeks have been reported for aquatic arthropods (van Hattum et al. 1989; Wang and Fisher 1998; Timmermans et al. 1999) and juvenile fish (Baines et al. 2002); half-lives for bivalves are generally much longer, ranging from months to years (Roditi and Fisher 1999, Baudrimont et al. 2003).

In a matter of weeks, Cd concentrations in nymphs transplanted to the Allard River (Cd-uptake experiment) attained a steady state that was close to the concentrations measured in indigenous nymphs from the Allard River. These results are consistent with those reported for *H. limbata* colonizing Cd-amended sediments in open containers on a lake bottom, that is, nymph Cd concentrations reached a plateau after ~18 d (Warren et al. 1998). However, in this latter study, Cd concentrations in nymphs from containers did not reach those of indigenous nymphs, likely because nymphs could enter and leave the open containers at will (the containers we used were covered with netting). The results of laboratory experiments also suggest that rapid Cd exchange rates are typical for aquatic insects. Thus, nymphs of the mayflies *Hexagenia rigida* (Hare et al. 1991a) and *Baetis thermicus* (Aoki et al. 1989) as well as larvae of the phantom midge *Chaoborus* (Croteau et al. 2001) reach a steady state in their Cd concentrations within weeks of an increase in Cd exposure. Given this rapidity of Cd exchange, insects would likely be useful for monitoring Cd within weeks of a change in exposure concentrations. In contrast, Cd concentrations in some bivalves are reported to take years to attain those of indigenous animals (Couillard et al. 1995; Baudrimont et al. 2003).

The relative proportions of Cd in the gut and body portions of *H. limbata* depend on nymph Cd concentrations, that is, indigenous low-Cd nymphs from the Colombière River had a majority of their Cd in the body portion compared to the more contaminated nymphs from the Allard River that had the majority of their Cd in the gut. These values for nymphs from our study rivers fell on the regression line of a larger data set for 15 lakes (Fig. 12) suggesting that the proportion of Cd in the gut of *H. limbata* is directly related to Cd concentrations in this insect irrespective of the collection site. When we transferred *H. limbata* between rivers, the proportional distribution of Cd in nymphs rapidly changed to resemble that of mayflies in the receiving river. The similarity of the rate constants for Cd loss from these two parts (Table 1) suggests that it is uptake rates that control the relative Cd concentrations in the gut and body. If we assume that little Cd is transferred between parts of this mayfly, then our results suggest that Cd is taken up from both water, into the body, and food (sediment), into the gut, and that food becomes an increasingly important source of Cd in more Cd-contaminated environments.

The majority of the Cd in *H. limbata* is found in the cytosol (our two protein fractions), rather than bound to granules or cell membranes (the “remainder” fraction). The cytosol has also been reported to contain the majority of the Cd present in field-collected mayflies (Suzuki et al. 1988; Cain et al. 2004), caddisflies (Cain et al. 2000, 2004) and shrimp (Wallace et al. 2000). In

contrast, Cd in some field-collected annelids (the tubificid oligochaete *Limnodrilus*; Wallace et al. 1998) and mollusks (the freshwater bivalve *Pyganodon*, Bonneris et al. 2004) is largely bound in granules (especially in the gills). Because some consumers more readily assimilate metal from the cytosolic fraction of their food rather than from non-cytosolic fractions such as granules (Reinfelder and Fisher 1991, 1994; Nott and Nicolaidou 1994; Wallace and Lopez 1997), the majority of the Cd in *H. limbata* is likely easily assimilated by such predators. Thus, shrimp were reported to assimilate Cd more efficiently from oligochaetes having a greater proportion of their Cd bound in the cytosol compared to those in which Cd is largely present in granules (Wallace et al. 1998). The cytosolic fraction of metal found in macroinvertebrates such as *Hexagenia* could constitute a highly available dietary source of metals to fish (Reinfelder and Fisher 1991; Wallace and Lopez 1997). Furthermore, concentrations of cytosolic metals are likely a better diagnostic of toxicity than are whole animal metal concentrations (Roesijadi 1994; Cain and Luoma 1998, Cain et al. 2004).

In the gut cytosol of *H. limbata* from the Allard River, where nymphs have high Cd concentrations, the majority of the Cd was associated with the heat-stable protein fraction, likely metallothionein. Numerous investigators have reported that this low molecular weight (6-7 kDa), cysteine-rich protein plays a major role in metal metabolism and detoxification in free-living aquatic invertebrates (Johansson et al. 1986; Roesijadi 1992; Mason and Jenkins 1995; Baudrimont et al. 2003). Although we did not measure metallothionein directly, it is reported to be important in binding both essential and non-essential metals in several genera of aquatic insects including *Hexagenia* (Y. Couillard, INRS-ETE, unpubl.), the mayfly *Baetis* (Aoki et al. 1989) and the phantom midge *Chaoborus* (Croteau et al. 2002b). Because most of the Cd entering *H. limbata* was detoxified, little was found in the heat-sensitive protein fraction and thus we would not expect this metal to have produced direct toxic effects. On the one hand,, it could be argued that if the energetic cost of producing metal-binding proteins was sufficiently high there could be have been indirect deleterious effects on nymphs. On the other hand, nymph growth rates were similar among all treatment levels, suggesting that the cost of Cd detoxification was negligible. This ability to detoxify Cd could explain in part the presence of *H. limbata* in Cd-contaminated habitats (Hare et al. 1991b; Gosselin and Hare 2004).

Cadmium concentrations in nymphs transplanted to the Colombière River declined substantially but did not reach those of indigenous nymphs from the Colombière River during our 36 d experiment. This result implies the existence of more than one Cd pool in nymphs. Our data

on subcellular partitioning suggests that there is a fast-exchanging pool of Cd bound to heat-stable proteins such as metallothionein (Gut: Fig. 8C,F; Body: Fig. 9C,D) and a slow-exchanging pool bound to either or both of the remaining fractions (remainder, heat-denatured proteins; Gut: Fig. 8A-E; Body: Fig. 9A-E).

In conclusion, although our estimates for the elimination rate constant k_E (Eq. 1) can be compared to those for other metals and types of animals, our estimates of the uptake rate constant k'_i are specific to our study site since they include $[Cd]_{\text{environs}}$ (Eq. 2). Knowing from where *H. limbata* takes up its Cd, that is, water or food (sediment), would allow us to determine whether we should consider free Cd ion concentrations in water or some measure of sedimentary Cd or both to predict $[Cd]_{\text{Hexagenia}}$. Future research should be directed at resolving this uncertainty. For example, if food is a major Cd source for this animal, and we suspect that it is because the gut was a major site of Cd accumulation, being able to measure bioavailable Cd in sediment would be critical to estimating $[Cd]_{\text{environs}}$. However, evaluating metal bioavailability in sediment is no simple task; our measurements of sedimentary Cd clearly included non-bioavailable metal because the trend they showed between the two study rivers was the opposite to that observed for Cd concentrations in the mayflies. We suggest that by collecting sediment in the gut, so as to provide a sample that better represents the particles chosen by the animal, and by digesting this gut sediment in digestive fluid (Weston and Maruya 2002) or in some medium that mimics such fluid (Voparil and Mayer 2004), we could obtain more meaningful measurements of bioavailable sedimentary Cd. Such information would be useful in developing a model that could be applied to *Hexagenia* from a range of sites differing in their $[Cd]_{\text{environs}}$. If such a model were available, it would likely facilitate the use of *Hexagenia* as a Cd biomonitor.

The model we used to describe changes in Cd concentrations in *H. limbata* (Eq. 1) is simple because it considers this mayfly as a single compartment. Model simplicity is an advantage because only a limited number of data points are needed to estimate values for the few constants involved; in our case, k_E and k'_i . As such, simple models are generally preferred both by environmental researchers and managers. However, this does not preclude that, with improvements in knowledge about this insect's metal sources (water versus food) and its methods for managing Cd at the cellular level, it could prove advantageous to consider several conceptual compartments for modeling purposes. For example, a two-compartment model might

include Cd uptake from water into the body portion and from food into the gut with appropriate rate constants for Cd uptake and loss from each of these compartments.

References

- ANKLEY, G.T. 1996. Evaluation of metal/acid-volatile sulfide relationships in the prediction of metal bioaccumulation by benthic macroinvertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 2138-2146.
- AOKI, Y., S. Hatakeyama, N. Kobayashi, Y. Sumi, T. Suzuki, and K. 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.
- BAINES, S.B., N.S. Fisher, and R. Stewart. 2002. Assimilation and retention of selenium and other trace elements from crustacean food by juvenile striped bass (*Morone saxatilis*). *Limnol. Oceanogr.* 47: 646-655.
- BAUDRIMONT, M., S. Andres, G. Durrieu, and A. Boudou. 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after *in situ* exposure to Cd and Zn. *Aquat. Toxicol.* 63: 89-102.
- BONNERIS, E., O. Perceval, S. Masson, L. Hare, and P.G.C. Campbell. 2004. Sub-cellular partitioning of Cd, Cu and Zn in tissues of indigenous unionid bivalves living along a metal exposure gradient and links to metal-induced effects. *Environ. Pollut.*, in press
- BRITTAİN, J.E. 1982. Biology of mayflies. *Ann. Rev. Entomol.* 27: 119-147.
- BRYAN, G.W., and 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.
- CAIN, D.J., J.L. Carter, S.V. Fend, S.N. Luoma, C.N. Alpers, and H.E. Taylor. 2000. Metal exposure in a benthic macroinvertebrate, *Hydropsyche californica*, related to mine drainage in the Sacramento River. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57: 380-390.
- CAIN, D.J., and S.N. Luoma. 1998. Metal exposures to native populations of the caddisfly *Hydropsyche* (Trichoptera: Hydropsychidae) determined from cytosolic and whole body metal concentrations. *Hydrobiologia* 386: 103-117.
- CAIN, D.J., S.N. Luoma, and W.G. Wallace. 2004. Linking metal bioaccumulation of aquatic insects to their distribution patterns in a mining-impacted river. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 1463-1473.
- CAMPBELL, P.G.C., A. Giguère, E. Bonneris, and L. Hare. 2005. Cadmium-handling strategies in two chronically exposed indigenous freshwater organisms - the yellow perch (*Perca flavescens*) and the floater mollusc (*Pyganodon grandis*). *Aquat. Toxicol.* *In press.*

- CARIGNAN, R., S. St-Pierre, and R. Gächter. 1994. Use of diffusion samplers in oligotrophic lake sediments: effects of free oxygen in sampler material. *Limnol. Oceanogr.* 39: 468-474.
- CHAPMAN, P.M., and F.Y. Wang. 2000. Issues in ecological risk assessment of inorganic metals and metalloids. *Human Ecol. Risk Assess.* 6: 965-988.
- CHARBONNEAU, P., and L. Hare. 1998. Burrowing behavior and biogenic structures of mud-dwelling insects. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 17: 239-249.
- CHONG, K., and W.-X. Wang. 2001. Comparative studies on the biokinetics of Cd, Cr, and Zn in the green mussel *Perna viridis* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Environ. Pollut.* 115: 107-121.
- COUILLARD, Y., P.G.C. Campbell, A. Tessier, J. Pellerin-Massicotte, and J.C. Auclair. 1995. Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I. Temporal changes in metallothionein and metal (Cd, Cu, and Zn) concentrations in soft tissues. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 690-702.
- CROTEAU, M.-N., L. Hare, P.G.C. Campbell, and Y. Couillard. 2002b. Metallothionein-like metal-binding protein in the biomonitor *Chaoborus*: occurrence and relationship to ambient metal concentrations in lakes. *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 737-741.
- CROTEAU, M.-N., L. Hare, and A. Tessier. 1998. Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. *Environ. Toxicol. Chem.* 32: 1348-1353.
- CROTEAU, M.-N., L. Hare, and A. Tessier. 2001. Differences in Cd accumulation among species of the lake-dwelling biomonitor *Chaoborus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58: 1737-1746.
- CROTEAU, M.-N., L. Hare, and A. Tessier. 2002a. Increases in food web cadmium following reductions in atmospheric inputs to some lakes. *Environ. Sci. Technol.* 36: 3079-3082.
- ENVIRONMENT CANADA. 1994. Canadian Environmental Protection Act. Priority Substances List Assessment Report. Cadmium and its compounds. Cat No. En 40-215/40E.
- FISHER, N.S., I. Stupakoff, S. Sañudo-Wilhelmy, W.-X. Wang, J.-L. Teyssié, S.W. Fowler and J. Crusius. 2000. Trace metals in marine copepods: a field test of a bioaccumulation model coupled to laboratory uptake kinetics data. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 194: 211-218.
- GOSSELIN, A., and L. Hare. 2004. Effect of sedimentary cadmium on the behavior of a burrowing mayfly (Ephemeroptera, *Hexagenia limbata*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 383-387.
- HARE, L. 1992. Aquatic insects and trace metals: Bioavailability, bioaccumulation and toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 22: 327-369.

- HARE, L., P.G.C. Campbell, A. Tessier, and N. Belzile. 1989. Gut sediments in a burrowing mayfly (Ephemeroptera: *Hexagenia limbata*): their contribution to trace element burdens, their removal, and the efficacy of a correction for their presence. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 451-456.
- HARE, L., R. Carignan, and M. A. Huerta-Diaz. 1994. A field study of metal toxicity and accumulation by benthic invertebrates: implications for the acid-volatile sulfide (AVS) model. *Limnol. Oceanogr.* 39: 1653-1668.
- HARE, L., E. Saouter, P.G.C. Campbell, A. Tessier, F. Ribeyre, and A. Boudou. 1991a. Dynamics of cadmium, lead, and zinc exchange between nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* (Ephemeroptera) and the environment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 39-47.
- HARE, L., A. Tessier, and P.G.C. Campbell. 1991b. Trace element distributions in aquatic insects: variations among genera, elements, and lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 1481-1493.
- JENKINS, K.D., and A.Z. Mason. 1988. Relationships between subcellular distributions of cadmium and perturbations in reproduction in the polychaete *Neanthes arenaceodentata*. 1988. *Aquat. Toxicol.* 12: 229-244.
- JOHANNSON, C., D.J. Cain, and S.N. Luoma. 1986. Variability in the fractionation of Cu, Ag, and Zn among cytosolic proteins in the bivalve *Macoma balthica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 28: 87-97.
- LEE, B.-G., S. B. Griscom, J.-S. Lee, J. J. Choi, C.-H. Koh, S.N. Luoma, and N.S. Fisher. 2000. Influences of dietary uptake and reactive sulfides on metal bioavailability from aquatic sediments. *Science* 287: 282-284.
- LUOMA, S.N. 1995. Prediction of metal toxicity in nature from bioassays: limitations and research needs. In Tessier A., Turner DR eds, *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA, pp. 609-659.
- MASON, A.Z, and K.D. Jenkins. 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. In Tessier A, Turner DR eds, *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA, pp. 478-608.
- NOTT, J.A., and A. Nicolaidou. 1994. Variable transfer of detoxified metals from snails to hermit crabs in marine food chains. *Mar. Biol.* 120: 369-377.
- REINFELDER, J.R. and N.S. Fisher. 1991. The assimilation of elements ingested by marine copepods. *Science (Washington, D.C.)* 251: 794-796.
- RODITI, H.A., and N.S. Fisher. 1999. Rates and routes of trace element uptake in zebra mussels. *Limnol. Oceanogr.* 44: 1730-1749.

- ROESIJADI, G. 1992. Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 22: 81-114.
- ROESIJADI, G. 1994. Behavior of metallothionein-bound metals in a natural population of an estuarine mollusk. *Mar. Environ. Res.* 38: 147-168.
- SHI, D., and W.-W. Wang. 2004. Understanding the differences in Cd and Zn bioaccumulation and subcellular storage among different populations of marine clams. *Environ. Sci. Technol.* 38: 449-456.
- SUZUKI, K.T., H. Sunaga, Y. Aoki, S. Hatakeyama, Y. Sugaya, Y. Sumi, and T. Suzuki. 1988. Binding of cadmium and copper in the mayfly *Baetis thermicus* larvae that inhabit a river polluted with heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol.* 91C: 487-492.
- TIMMERMANS, K.R., W. Peeters, and M. Tonkes. 1992. Cd, Zn, Pb and Cu in *Chironomus riparius* (Meigen) larva (Diptera, Chironomidae): uptake and effects. *Hydrobiol.* 241: 119-134.
- U.S. E.P.A. 1992. Method 200.2. Sample Preparation Procedure for Spectrochemical Determination of Total Recoverable Elements. In *Methods for the Determination of Metals in Environmental Samples*. Cincinnati, Ohio.
- VAN HATTUM, B., P. de Voogt, L. van den Bosch, N.M. van Straalen, and E.N.G. Jooisse. 1989. Bioaccumulation of cadmium by the freshwater isopod *Asellus aquaticus* (L.) from aqueous and dietary sources. *Environ. Pollut.* 62: 129-151.
- VOPARIL, I.M., and L.M. Mayer. 2004. Commercially available chemicals that mimic a deposit feeder's (*Arenicola marina*) digestive solubilisation of lipids. *Environ. Sci. Technol.* 38: 4334-4339.
- WALLACE, W.G., T.M. Hoexum Brouwer, M. Brouwer, and G.R. Lopez. 2000. Alterations in prey capture and induction of metallothioneins in grass shrimp fed cadmium-contaminated prey. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 962-971.
- WALLACE, W.G., B.G. Lee, and S. N. Luoma. 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 249: 183-197.
- WALLACE, W.G., and G.R. Lopez. 1997. Bioavailability of biologically sequestered cadmium and the implications of metal detoxification. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 147: 149-157.
- WALLACE, W.G., G.R. Lopez, and J.S. Levinton. 1998. Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 172: 225-237.
- WANG, W.- X., and N.S. Fisher. 1998. Accumulation of trace elements in a marine copepod. *Limnol. Oceanogr.* 43: 273-283.

-
- WANG, W.-X., and C. Ke. 2002. Dominance of dietary intake of cadmium and zinc by two marine predatory gastropods. *Aquat. Toxicol.* 56: 153-165.
- WANG, F., A. Tessier, and L. Hare. 2001. Oxygen measurements in the burrow of freshwater insects. *Freshwat. Biol.* 46: 317-327.
- WARREN, L.A., A. Tessier, and L. Hare. 1998. Modeling cadmium accumulation by benthic invertebrates *in situ*: the relative contributions of sediment and overlying water reservoirs to organism cadmium concentrations. *Limnol. Oceanogr.* 43: 1442-1454.
- WESTON, D.P., and K.A Maruya. 2002. Predicting bioavailability and bioaccumulation with *in vitro* digestive fluid extraction. *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 962-971.
- XU, Y., W.-X. Wang, and D.P.H. Hsieh. 2001. Influences of metal concentration in phytoplankton and seawater on metal assimilation and elimination in marine copepods. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1067-1077.

Table 1. Estimated values (\pm SE; $N = 9$) of model constants for Cd exchange in nymphs of *Hexagenia limbata* from our field study compared to those reported for *H. rigida* nymphs that were exposed in the laboratory to Cd-amended lake sediment (Hare et al. 1991a). Two values are given for constants related to Cd loss from the body portion, those estimated from our Cd-uptake experiment and those estimated from our Cd-loss experiment (see text for explanation). N/A, not available.

Term	Units	Symbol	Our field study on <i>H. limbata</i>			Laboratory study on <i>H. rigida</i>		
			Whole nymph	Body; uptake exper.	Body; loss exper.	Gut	Body	Gut
Efflux rate constant	d ⁻¹	k_E	0.086	0.084	0.142	0.112	0.088 (± 0.023)	0.098 (± 0.034)
Biological half-life	d	$t_{1/2}$	8	8	8	6	8	7
Apparent influx rate constant	$\mu\text{g g}^{-1}\text{d}^{-1}$	k'_i	0.43	1.32	N/A	5.14	N/A	N/A

Figure Captions

Figure 1. Protocol used to separate *Hexagenia limbata* guts and bodies into remainder (P1), heat-denatured cytosolic proteins (P2) and heat-stable cytosolic proteins such as metallothionein (S2).

Figure 2. Temporal changes in the mean length (\pm SD, $n = 10-16$) of *Hexagenia limbata* nymphs that were either transplanted (A,C; solid circles), placed in containers as controls (B,D; open circles with dots), or indigenous to the river (B,D; open circles without dots). River water temperatures during our experiments are shown in panels B and D.

Figure 3. Depth profiles of Cd concentrations (nmol g^{-1} dry weight) in sediment cores collected within (B and D) or near (A and C) our experimental containers. The various symbols are for replicate cores.

Figure 4. Dissolved Cd profiles within (B and D) or near (A and C) our experimental containers. The various symbols are for replicate profiles. The horizontal broken line indicates the sediment-water interface.

Figure 5. Temporal changes in mean Cd concentrations (\pm SD, nmol/g dry weight, $n = 4$) of whole *Hexagenia limbata* for the (A) uptake experiment and (B) loss experiment. Model curves were generated using equation 3.

Figure 6. Temporal changes in mean Cd concentrations (\pm SD, nmol g^{-1} dry weight, $n = 4$) in either the gut (A,C) or body (B,D) of *Hexagenia limbata* transferred to the Allard River (A,B) or to the Colombière River (C,D). Solid symbols represent transplanted nymphs and open symbols represent indigenous nymphs. Note differences in vertical scales for the gut and body. Model curves were generated using equation 3 with the exception of the broken line in D that was generated using equation 5.

Figure 7. Mean contributions ($\% \pm$ SD, $n = 4$) of Cd in parts of indigenous (A,C) and transplanted (B,D) *Hexagenia limbata* to their total Cd burdens in the Allard (A,B) and Colombière (C,D) rivers. Open circles represent the nymph gut, whereas solid circles represent the body.

Figure 8. Temporal changes in mean Cd concentrations (\pm SD, nmol g⁻¹ dry weight, n = 4) in the following subcellular fractions of *Hexagenia limbata* gut tissues during the Cd-uptake experiment (A-C) or the Cd loss experiment (D-F): remainder (A,D); heat-denatured cytosolic proteins (B,E); heat-stable cytosolic proteins (C,F). Solid symbols represent nymphs transplanted between rivers, whereas open symbols represent nymphs indigenous to the rivers.

Figure 9. Temporal changes in mean Cd concentrations (\pm SD, nmol g⁻¹ dry weight, n = 4) in the following subcellular fractions of *Hexagenia limbata* body tissues during the Cd-uptake experiment (A-C, nymphs transferred to the Allard River) or the Cd-loss experiment (D-F, nymphs transferred to the Colombière River): remainder (A,D); heat-denatured cytosolic proteins (B,E); heat-stable cytosolic proteins (C,F). Solid symbols represent nymphs transplanted between rivers, whereas open symbols represent nymphs indigenous to the rivers.

Figure 10. Temporal changes in the mean relative contributions (\pm SD, n = 4) of the three subcellular fractions to total Cd burdens in the gut of *Hexagenia limbata* that were either indigenous to the Allard (A,C) or the Colombière rivers (B,D) or transplanted between these rivers (B,D). Fractions are represented as follows: remainder, open circles; heat-denatured proteins, closed circles; heat-stable proteins, triangles.

Figure 11. Temporal changes in the mean relative contributions (\pm SD, n = 4) of three subcellular fractions to total Cd burdens in the body of *Hexagenia limbata* that were either indigenous to the Allard (A,C) or the Colombière rivers (B,D) or transplanted between these rivers (B,D). Fractions are represented as follows: remainder, open circles; heat-denatured proteins, closed circles; heat-stable proteins, triangles.

Figure 12. Comparison between the mean percentage (\pm SD) of Cd found in the gut and the mean Cd concentration (\pm SD) of whole nymphs of *Hexagenia limbata* from 15 Canadian lakes (solid circles; Hare et al. 1991) as well as indigenous nymphs from the Allard River (star) and the Colombière River (open circle).

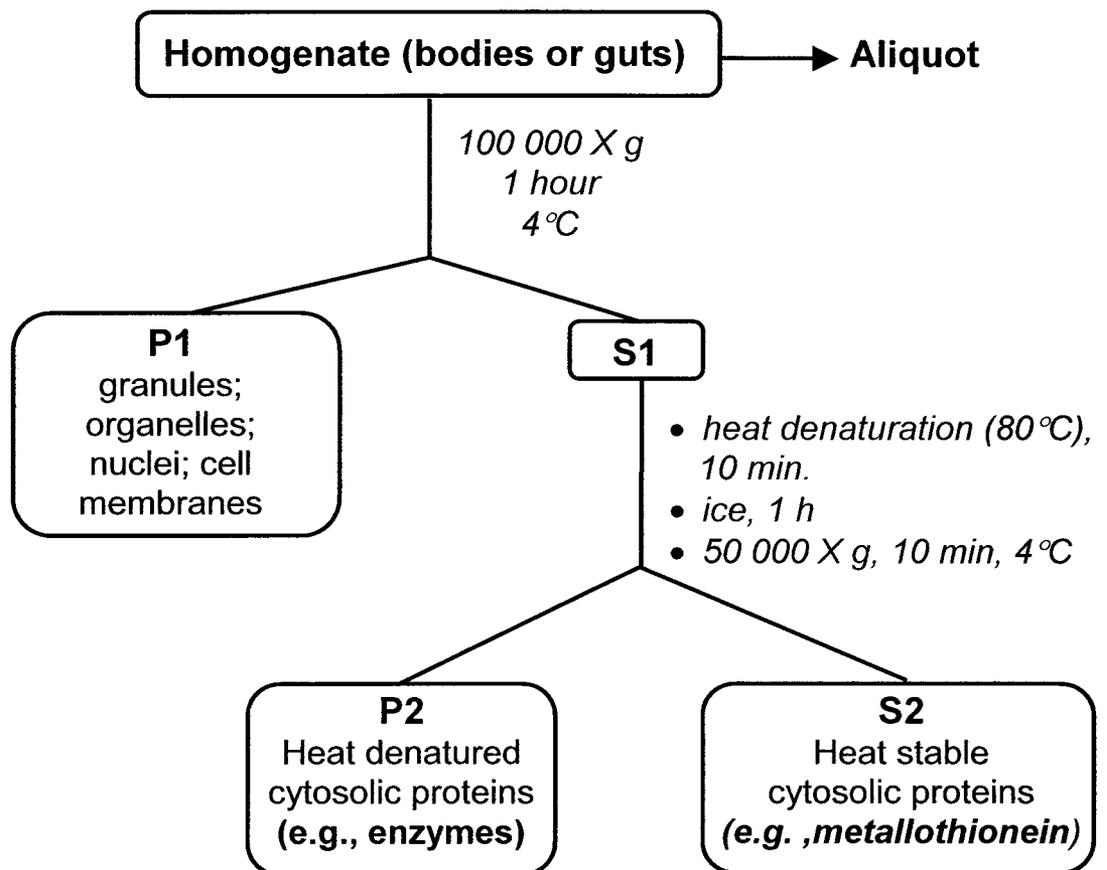


Figure 1. Michaud et al. 2004

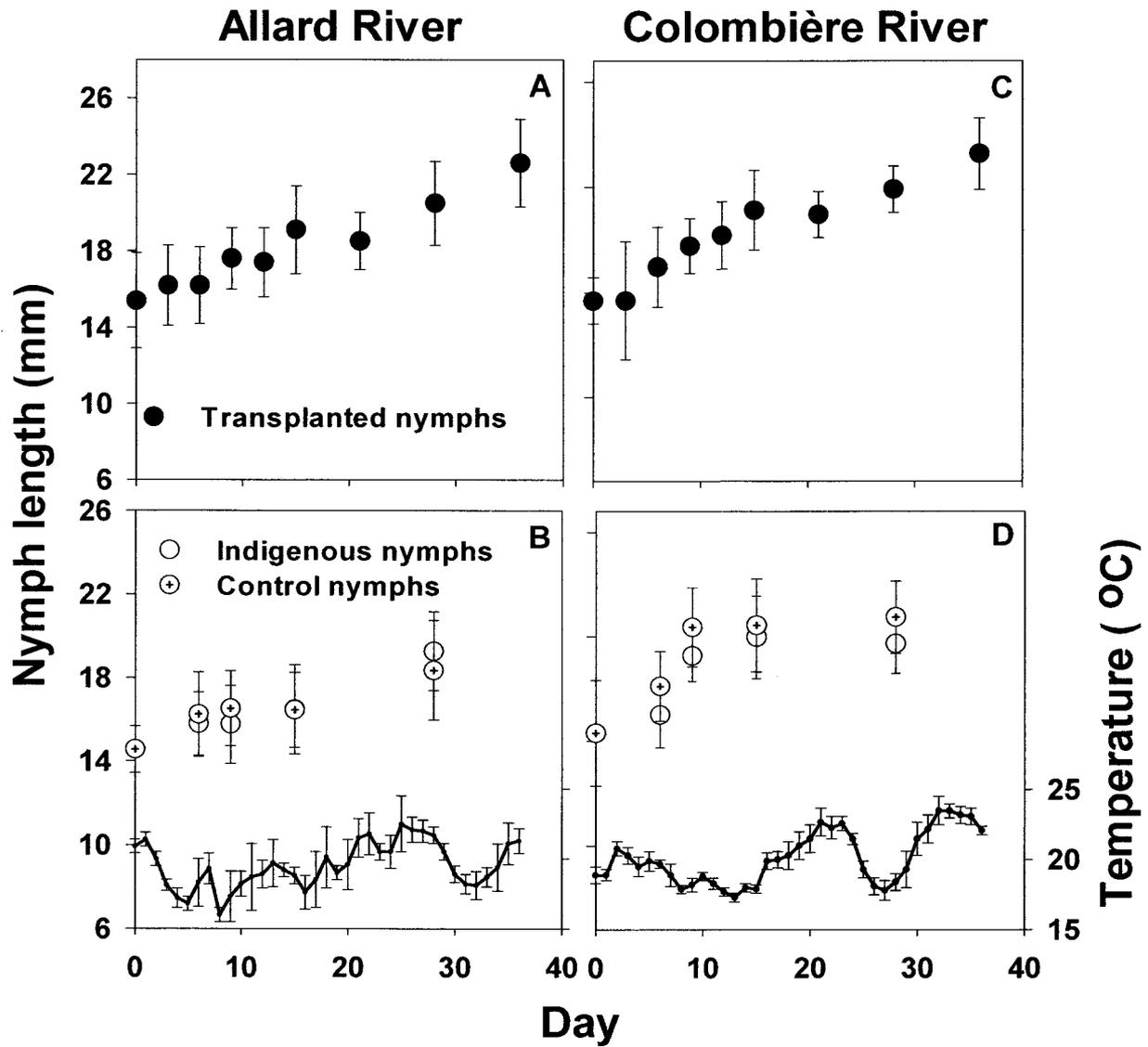


Figure 2. Michaud et al. 2004

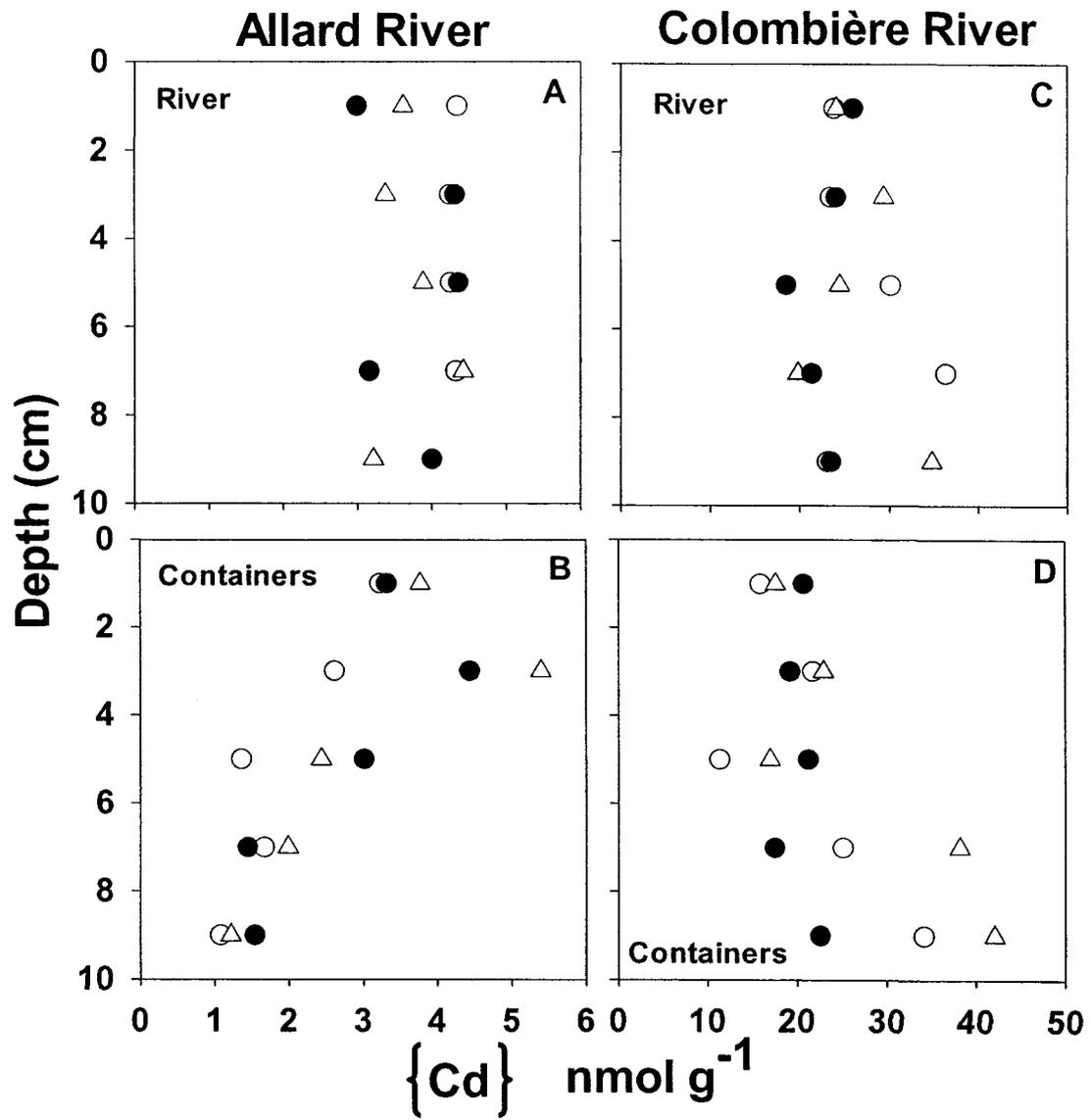


Figure 3. Michaud et al. 2004

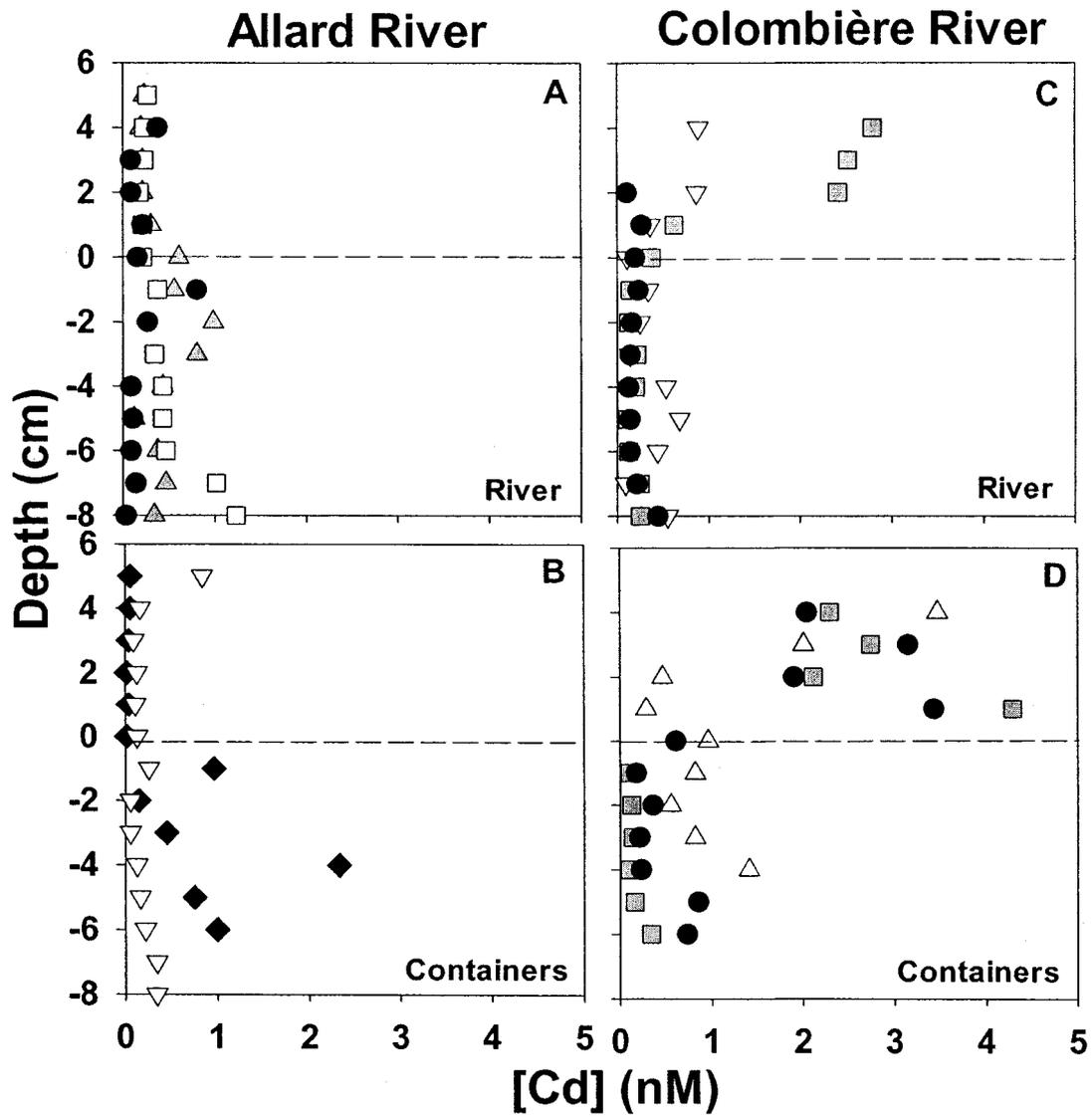


Figure 4. Michaud et al. 2004

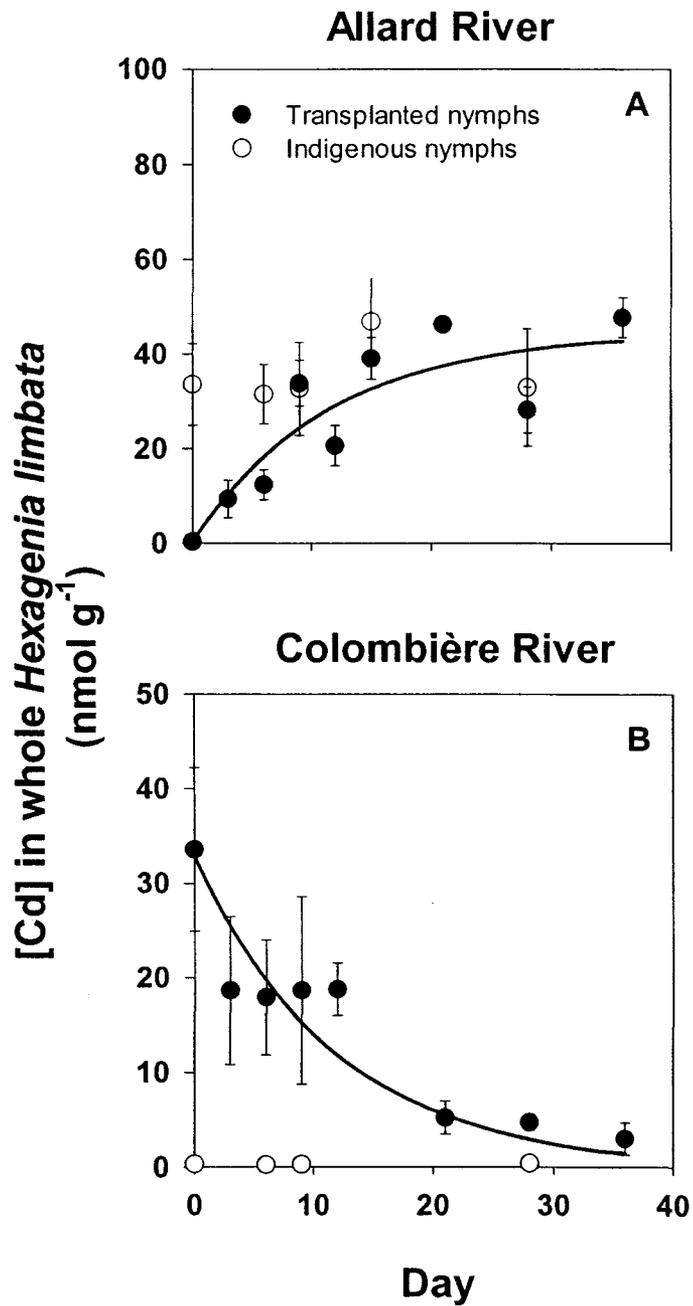


Figure 5. Michaud et al. 2004

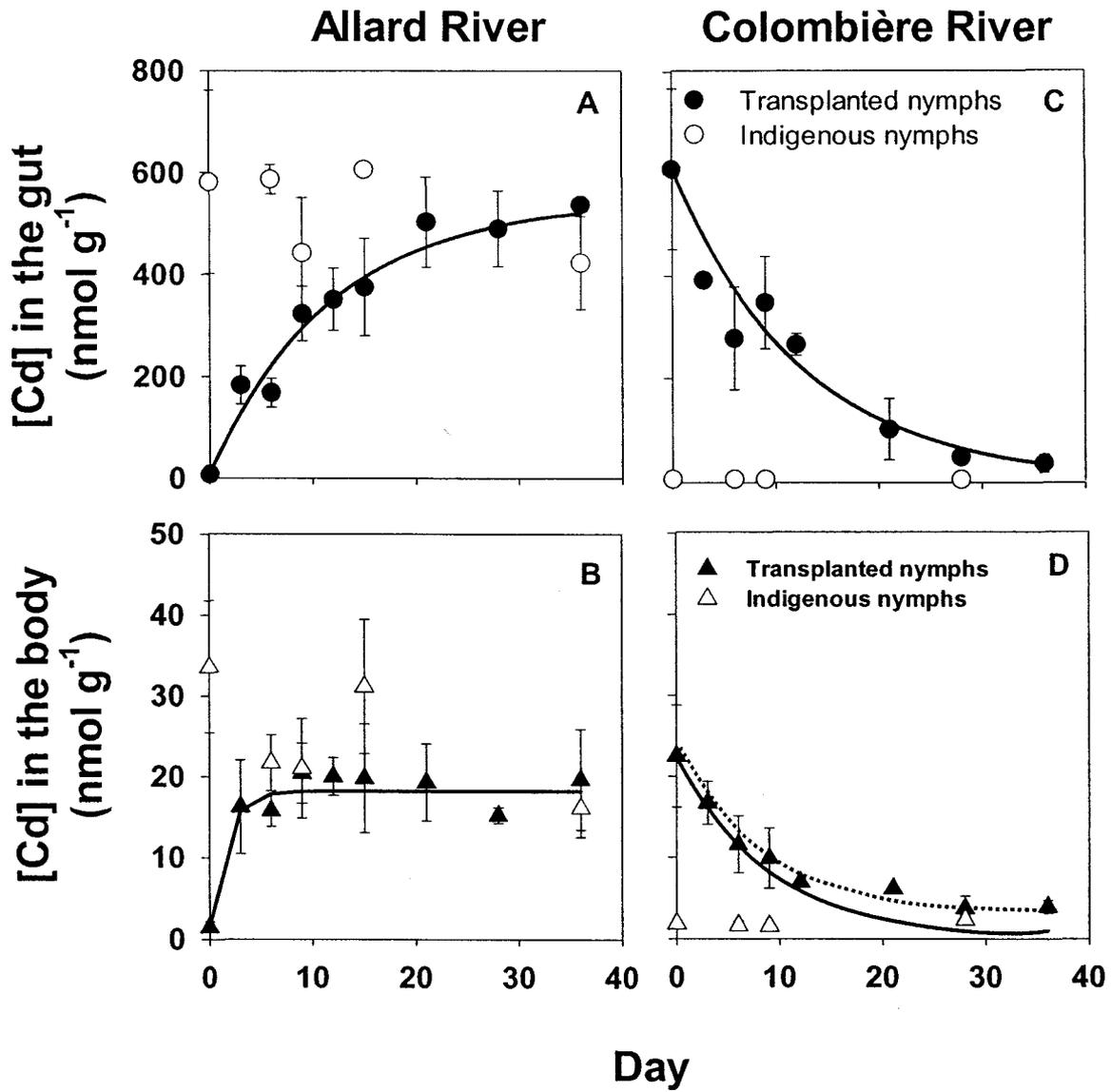


Figure 6. Michaud et al. 2004

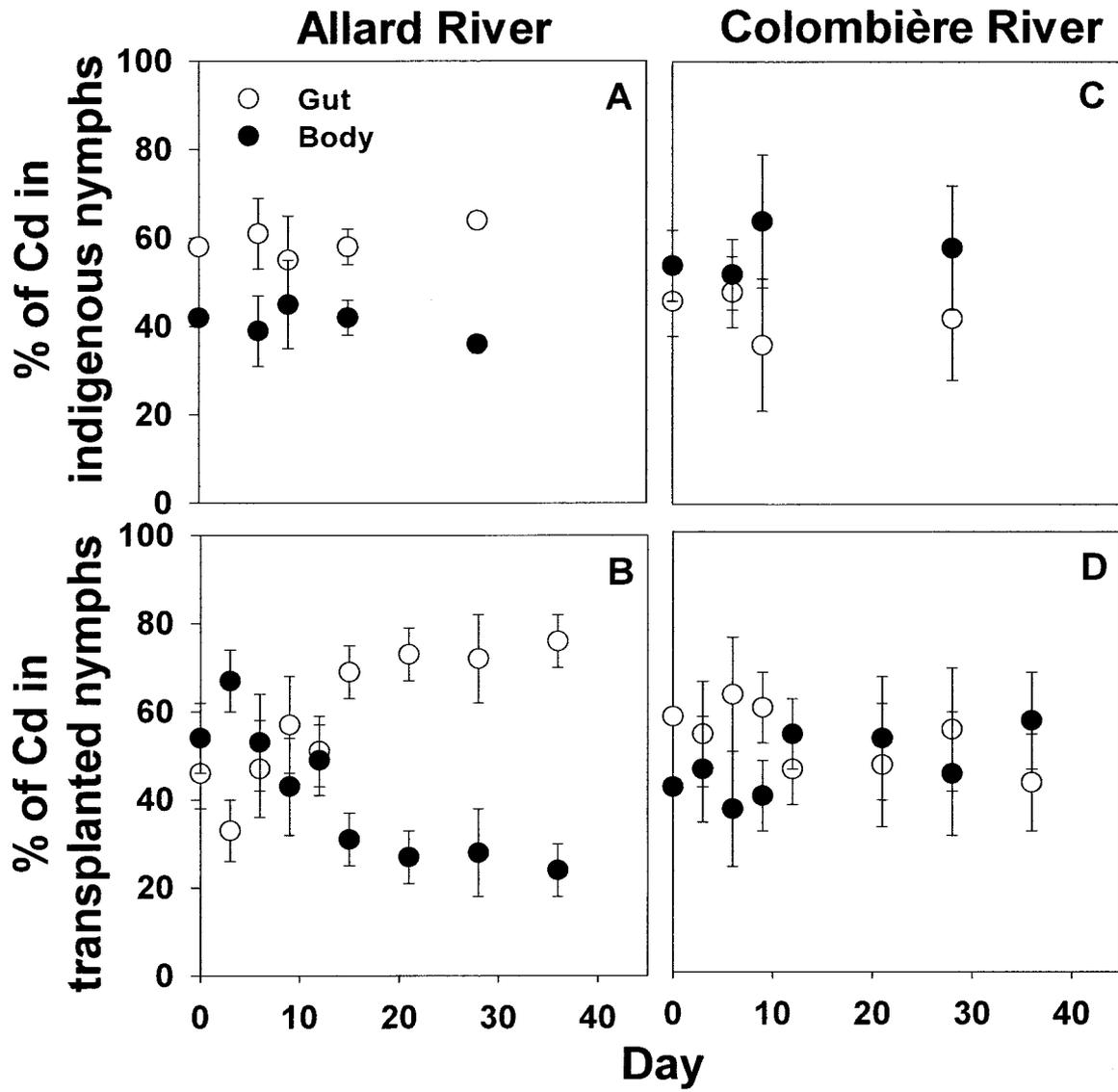


Figure 7. Michaud et al. 2004

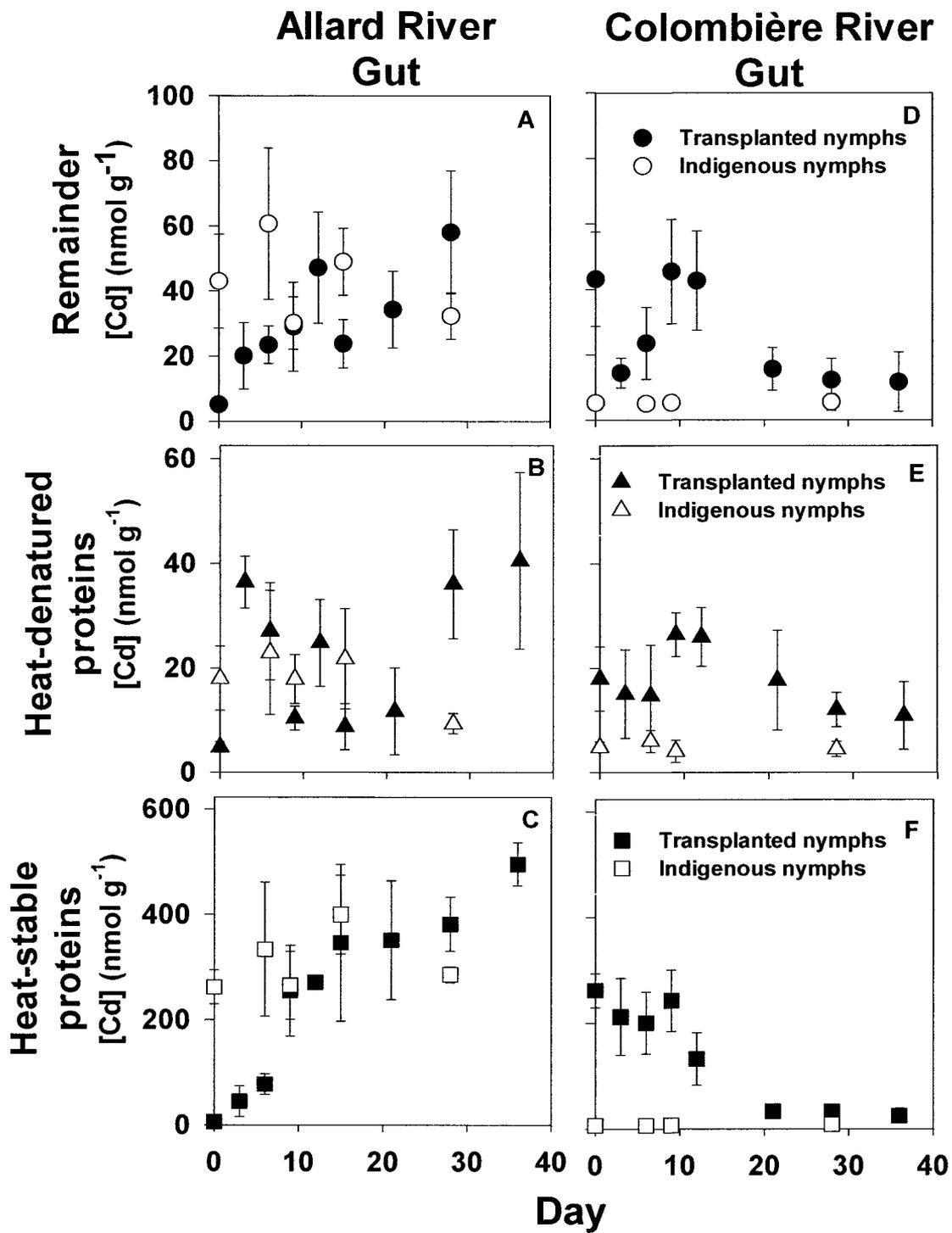


Figure 8. Michaud et al. 2004

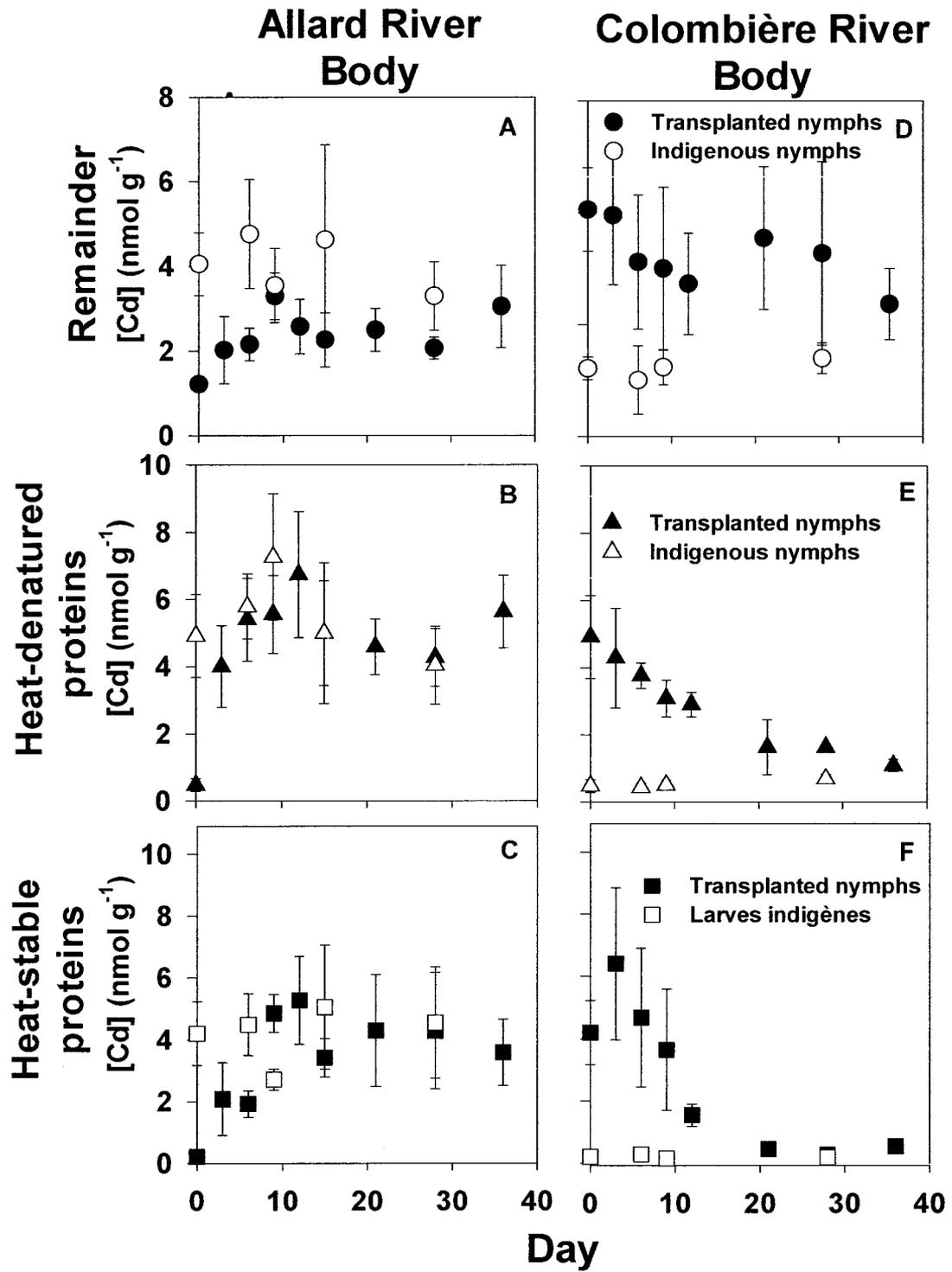


Figure 9. Michaud et al. 2004

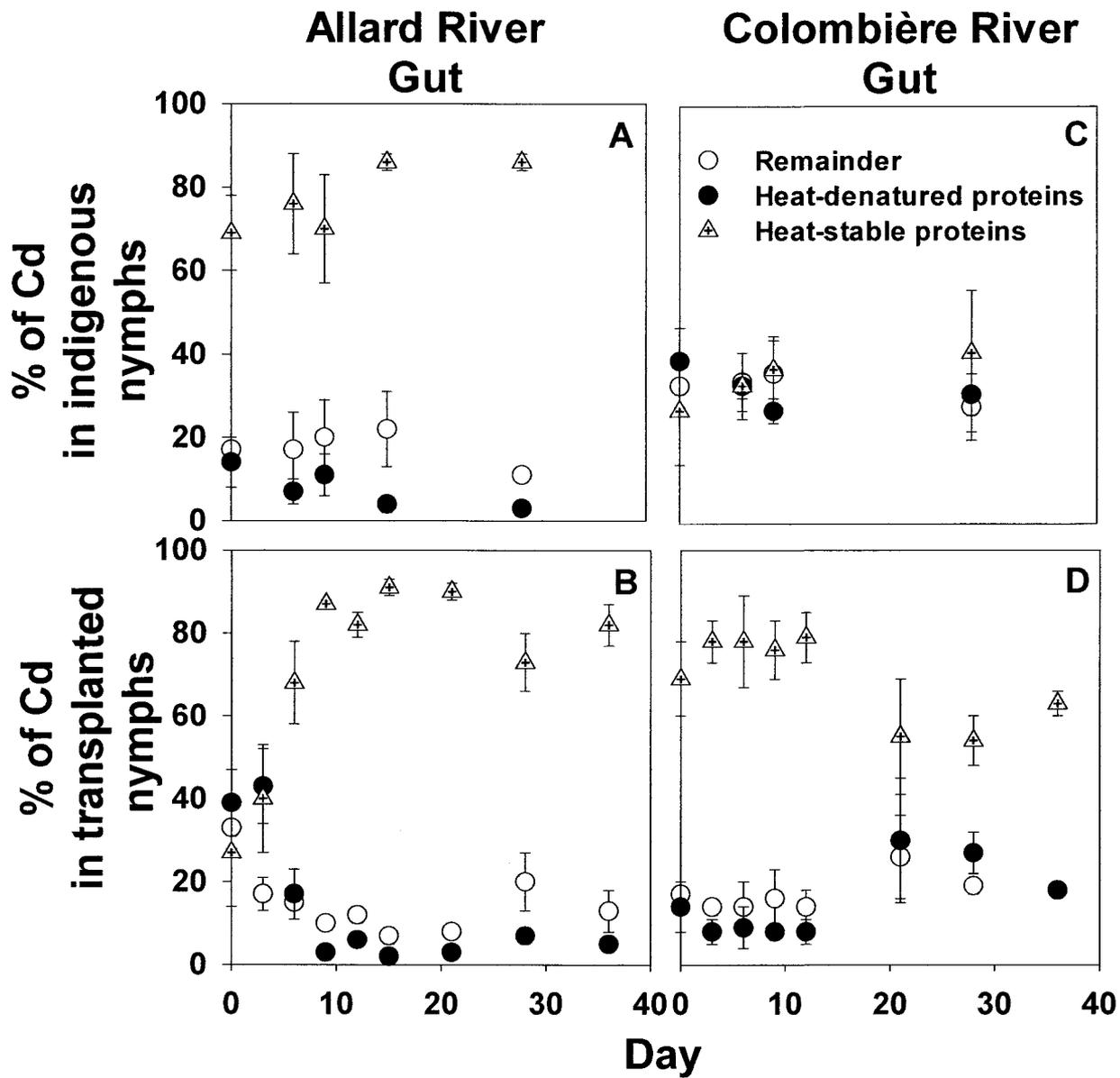


Figure 10. Michaud et al. 2004

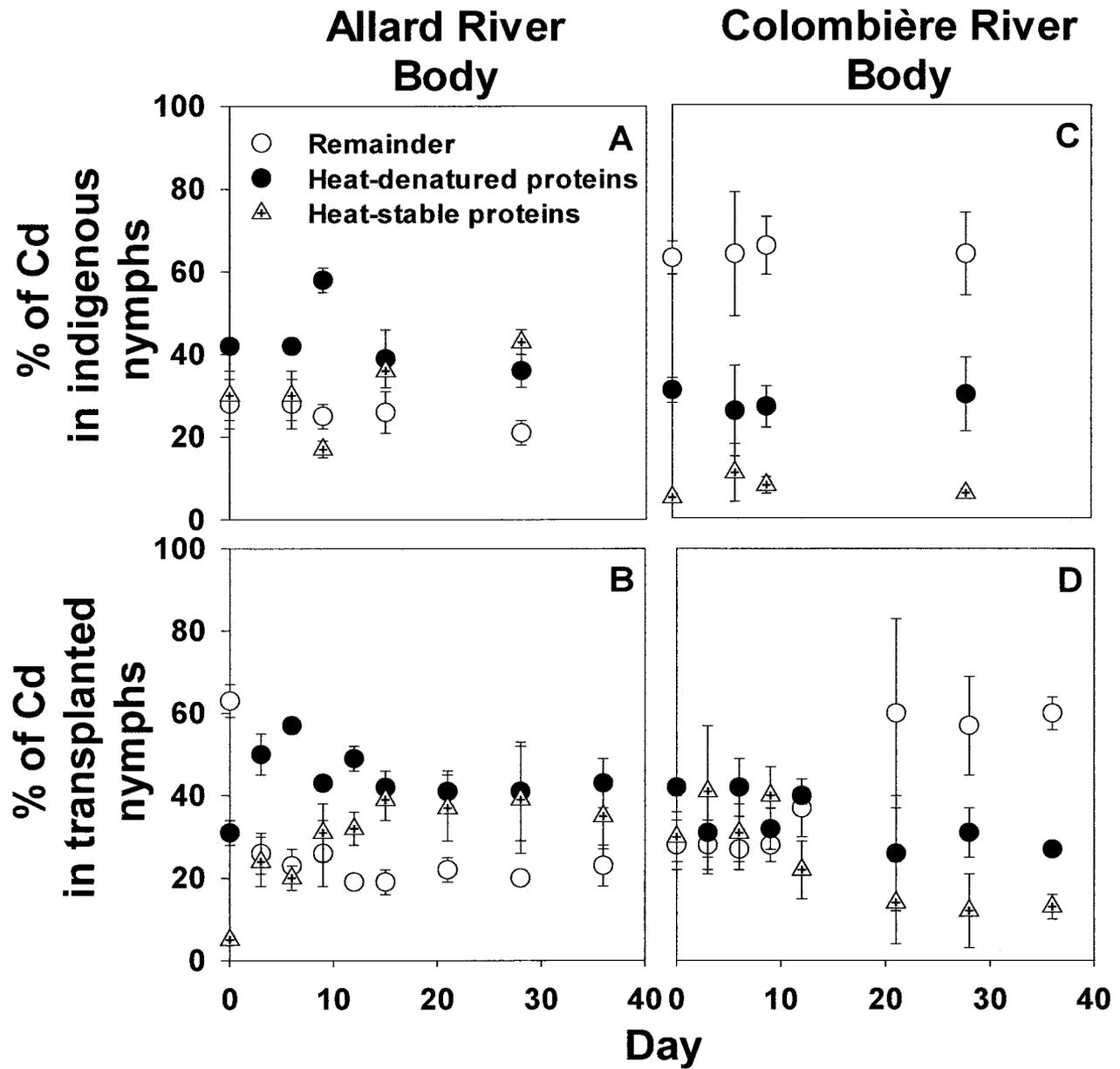


Figure 11. Michaud et al. 2004

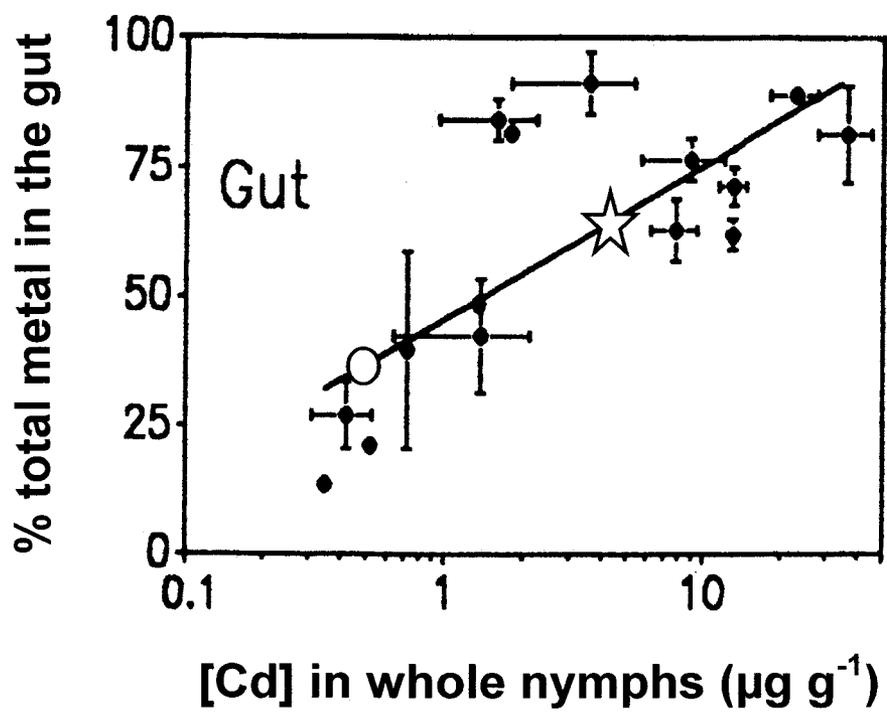


Figure 12. Michaud et al. 2004