

Université du Québec  
INRS-Eau, Terre et Environnement

Efficacité d'assimilation de *Sialis velata*  
pour le nickel et le thallium présents chez  
ses proies ; importance de la distribution  
subcellulaire des métaux chez les proies

Par  
Julie Dumas  
(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	Michael R. Twiss Clarkson University
Examineur interne	Patrice Couture INRS-Eau, Terre et Environnement
Directeur de recherche	Landis Hare INRS-Eau, Terre et Environnement

2007



## AVANT PROPOS

Ce mémoire de type « par article » est divisé en deux parties. La première partie est constituée d'une synthèse incluant une introduction à l'écotoxicologie des métaux en milieu aquatique, les objectifs de recherche du projet de maîtrise, les méthodes utilisées, ainsi qu'une discussion des résultats obtenus. La deuxième partie est composée d'un article écrit dans le cadre de la maîtrise et qui est pour soumission à la revue Environmental Pollution.

La contribution des auteurs de l'article lié au projet de recherche est :

- Julie Dumas :
- Conception et réalisation du projet :
  - Développement des méthodes
  - Échantillonnage
  - Réalisation des expériences
  - Traitement et interprétation des données
  - Rédaction de la synthèse et de l'article
- Landis Hare :
- Conception du projet
  - Contribution au traitement et à l'interprétation des données
  - Correction de la synthèse et de l'article



## REMERCIEMENTS

Un très grand merci à mon directeur de recherche, Landis Hare, pour sa confiance en moi et son soutien malgré les difficultés rencontrées. Votre écoute et votre disponibilité ont été très importantes pour moi. Vous avez une grande patience et sagesse qui m'ont grandement inspirée tout au long de ma maîtrise. Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche et merci de votre aide lors des échantillonnages au lac St-Joseph. Je ne pouvais espérer mieux comme directeur de recherche ; j'ai été énormément choyée.

Merci à Maïté, ma collègue de laboratoire, qui m'a accompagnée dans ce grand projet. Tu as été d'une grande aide et d'un grand soutien pour le développement des protocoles. Je suis sûr que tu es devenue la meilleure pour récolter des *Sialis* !

Merci à Pierre Marcoux et René Rodrigue, pour nous avoir accompagnés sur le lac St-Joseph. Je remercie également Dominic, Anthony, Raoul, Jord et Isabelle pour votre aide.

Je n'oublie pas les techniciens de laboratoire de l'INRS-Eau, Terre et Environnement pour leur précieuse aide pour le fonctionnement des appareils. Je pense ici à Stéphane Prémont, Lise Rancourt, Pauline Fournier, Sébastien Duval, René Rodrigue et Michelle Bordeleau. Votre disponibilité a été grandement appréciée.

Merci à ma mère et mon père pour leur soutien moral durant cette grande aventure. Je ne serais pas rendue ici si vous n'aviez pas été là pour m'accompagner tout au long de ma vie.



## RÉSUMÉ

L'activité industrielle a relargué au cours des années de grandes quantités de métaux dans des cours d'eau avoisinants et éloignés des industries. Les animaux aquatiques peuvent être exposés à ces métaux par l'eau environnante et/ou la nourriture qu'ils ingèrent. Pour plusieurs animaux, les métaux viennent majoritairement de leur diète. Nous avons testé un indice potentiel de l'efficacité de transfert des métaux entre deux maillons d'une chaîne alimentaire : la distribution subcellulaire des métaux dans le maillon inférieur. Selon cet indice, si les métaux présents dans les cellules du maillon inférieur se trouvent dans le cytosol ou dans les organites, ils devraient être entièrement disponibles pour le consommateur. En revanche, les métaux séquestrés dans des granules ou associés aux membranes cellulaires le seraient beaucoup moins. Nous avons testé cette hypothèse pour deux métaux problématiques au niveau environnemental, le nickel (Ni) et le thallium (Tl).

Des *Chironomus riparius* (Insecta, Diptera, Chironomidae) et des *Tubifex tubifex* (Annelida, Oligochaeta, Tubificidae), proies du prédateur *Sialis velata* (Insecta, Megaloptera, Sialidae), ont été contaminés en laboratoire. Par la suite, nous avons utilisé un protocole (appliqué précédemment à plusieurs types d'animaux aquatiques) pour distinguer des pools subcellulaires de métaux chez ces proies. Le Ni et le Tl se sont avérés être principalement liés à des protéines stables à la chaleur dans le cytosol des cellules de ces invertébrés. Les efficacités de transfert des deux métaux vers le prédateur étaient toutes élevées. Cela implique que le transfert trophique du Ni et du Tl est plutôt facile et que ces deux métaux pourraient se retrouver facilement en haut de la chaîne alimentaire. Une augmentation de la proportion de Ni dans les fractions potentiellement biodisponibles était associée à une plus importante assimilation par le prédateur. Par contre, l'efficacité d'assimilation du Tl ne variait pas avec un changement de pourcentage dans les fractions dites « biodisponibles ». Si nous comparons ces deux variables pour l'ensemble des combinaisons métaux-proies, la distribution subcellulaire s'est avérée être un bon indice de l'efficacité d'assimilation pour deux combinaisons proie-métal sur quatre. Pour les deux autres combinaisons, l'efficacité de transfert était quelque peu plus

élevée que le pourcentage des métaux présents dans les fractions sensées être disponibles au prédateur. Ces résultats suggèrent qu'une partie des métaux présents dans les granules ou les débris cellulaires peut potentiellement être assimilable.

La facilité de transfert du Ni et du Tl étant importante entre les deux maillons, la diète devrait être prise en considération pour expliquer la prise en charge de ces métaux et les effets nocifs qu'ils peuvent avoir chez les animaux aquatiques.



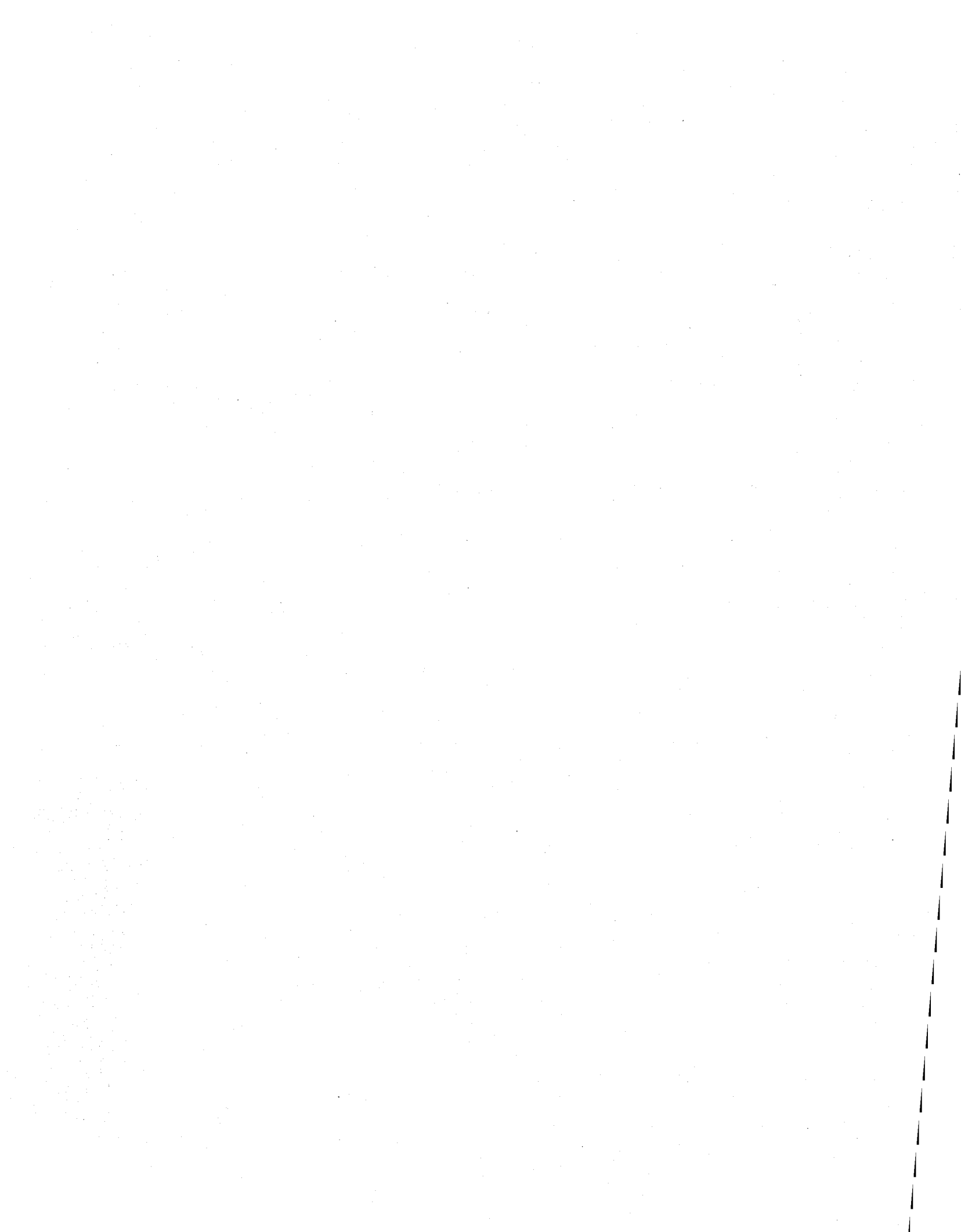
# TABLE DES MATIÈRES

	Page
AVANT PROPOS .....	III
REMERCIEMENTS .....	V
RÉSUMÉ .....	VII
TABLE DES MATIÈRES .....	IX
LISTE DES FIGURES .....	XI
PREMIÈRE PARTIE : SYNTHÈSE .....	1
1. Introduction.....	3
1.1 Les métaux traces en milieux aquatiques.....	3
1.1.1 Le nickel.....	3
1.1.2 Le thallium .....	4
1.2 Accumulation des métaux traces.....	5
1.2.1 Route d'exposition .....	5
1.2.2 Biodisponibilité des métaux.....	6
1.2.3 Ingestion, assimilation et élimination .....	7
1.3 La répartition subcellulaire et l'efficacité d'assimilation .....	8
1.4 Biologie des invertébrés étudiés .....	12
1.4.1 L'insecte <i>Chironomus riparius</i> .....	12
1.4.2 L'oligochète <i>Tubifex tubifex</i> .....	13
1.4.3 L'insecte <i>Sialis velata</i> .....	14
2. Objectifs spécifiques.....	17
3. Méthodes.....	19
3.1 Collecte de <i>Sialis velata</i> et élevage de <i>Chironomus riparius</i> et <i>Tubifex tubifex</i> .....	19
3.2 Contamination des sédiments avec du Ni ou du Tl.....	20
3.3 Exposition des proies aux sédiments contaminés .....	21
3.4 Fractionnement subcellulaire des proies contaminées .....	21
3.5 Mesures de l'efficacité d'assimilation du Ni et du Tl chez <i>Sialis velata</i> .....	23
4. Résultats et discussion .....	25
4.1 Concentrations totales du Ni et du Tl chez <i>C. riparius</i> et <i>T. tubifex</i> .....	25
4.2 Répartition subcellulaire du Ni et du Tl chez les deux types de proies .....	26
4.2.1 Le Ni .....	26
4.2.2 Le Tl.....	28
4.2.3 Détoxification du Ni et du Tl .....	30
4.3 Efficacité d'assimilation de <i>Sialis velata</i> pour le Ni et le Tl selon le type de proie .....	32
5. Conclusion .....	35
5.1 Synthèse des résultats .....	35
5.2 Perspectives.....	36
6. Liste des références.....	39
DEUXIÈME PARTIE : ARTICLE.....	47
Nickel and thallium transfer from prey to predator .....	49



## LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1. Relation entre la concentration de l'ion libre ( $M^{Z+}$ ) dans l'eau environnante et celle dans une chaîne alimentaire où le dernier maillon accumule les métaux par sa diète seulement.....	6
Figure 2. Schéma d'une métallothionéine .....	8
Figure 3. Granules provenant des branchies du bivalve <i>Mercenaria mercenaria</i> .....	9
Figure 4. Hypothèses générales concernant l'importance des fractions subcellulaires dans les organismes pour décrire la toxicité et le transfert trophique .....	10
Figure 5. Efficacité d'assimilation de différents éléments chez trois espèces de copépodes en fonction de la fraction biodisponible (dans le cytosol et les organites) des éléments chez une diatomée .....	11
Figure 6. Larve, nymphe et adulte mâle de <i>Chironomus</i> sp.....	12
Figure 7. L'oligochète <i>Tubifex tubifex</i> .....	13
Figure 8. Larve, nymphe et adulte de <i>Sialis</i> sp.....	14
Figure 9. Protocole utilisé pour séparer les proies en 5 fractions opérationnellement définies .....	22
Figure 10. Distribution subcellulaire du Ni chez <i>C. riparius</i> et <i>T. tubifex</i> .....	27
Figure 11. Distribution du Ni entre les fractions détoxiquées (HSP et granules), sensibles (HDP) ou potentiellement sensibles (organites) aux métaux, ainsi que les débris cellulaires chez <i>C. riparius</i> et <i>T. tubifex</i> .....	28
Figure 12. Distribution subcellulaire du Tl chez <i>C. riparius</i> et <i>T. tubifex</i> .....	29
Figure 13. Distribution du Tl entre les fractions détoxiquées (HSP et granules), sensibles (HDP) ou potentiellement sensibles (organites) aux métaux, ainsi que les débris cellulaires chez <i>C. riparius</i> et <i>T. tubifex</i> .....	29
Figure 14. Relation entre les efficacités d'assimilation (EA) du Ni et du Tl par le prédateur <i>S. velata</i> et les proportions de Ni et de Tl dans ses proies qui sont théoriquement disponibles pour la prise en charge .....	33



## **PREMIÈRE PARTIE : SYNTHÈSE**



# **1. Introduction**

## **1.1 Les métaux traces en milieux aquatiques**

Les métaux traces sont présents naturellement dans les cours d'eau. Néanmoins, les activités humaines peuvent mobiliser des quantités importantes de métaux (Pacyna et al. 1995), qui se retrouveront par la suite dans les milieux aquatiques. Les sources anthropiques locales de métaux sont principalement des rejets provenant de mines, de fonderies et d'industries (Cain et al. 1992). Les métaux peuvent également être originaires de sources éloignées, desquelles ils sont transportés dans l'atmosphère vers les milieux aquatiques (Nriagu et Pacyna 1988). Une fois dans ces milieux, les métaux sont accumulés par les organismes et, à des concentrations suffisamment élevées, peuvent provoquer des effets néfastes. Les métaux essentiels (exemples : Cu, Zn) sont vitaux pour les organismes et ces derniers contrôlent souvent leurs concentrations dans leur corps. Un manque et un excès de ces métaux essentiels peuvent entraîner des problèmes pour les organismes. Des concentrations élevées de métaux non essentiels (exemples : Cd, Hg) entraîneront également des problèmes si les organismes n'ont pas la capacité de les détoxifier (Chapman et al. 1996). Le nickel et le thallium sont deux métaux préoccupants en Amérique du Nord (Environnement Canada 1994, Cheam 2001) et auxquels nous nous attarderons dans cette étude, puisqu'ils font l'objet de peu d'études environnementales.

### **1.1.1 Le nickel**

Le nickel (Ni) est un métal de transition qui a un numéro atomique de 28 et une masse atomique de 58,71. Le Ni d'origine anthropique se retrouve dans les cours d'eau à cause de l'activité minière, de la combustion du mazout et de l'incinération des déchets (Jaques 1987). Il y a une concentration naturelle de  $1,2 \mu\text{mol g}^{-1}$  dans la croûte terrestre, ce qui lui donne le 24<sup>e</sup> rang des éléments en abondance (Chau et Kulikovskiy-Cordeiro 1995). Le Ni est utilisé entre autres dans les domaines de la céramique, de l'électricité et de la bijouterie. L'air est la première voie de transport du Ni, les rejets directs dans l'eau

venant en seconde place (Chau et Kulikovsky-Cordeiro 1995). L'espèce chimique du Ni la plus commune dans l'eau et l'environnement est la forme divalente (Chau et Kulikovsky-Cordeiro 1995).

Près de la ville de Sudbury en Ontario, les cours d'eau peuvent être très contaminés en Ni, puisque c'est dans cette région que se situe une des plus importantes mines de Ni et ce au niveau mondial (Chau et Kulikovsky-Cordeiro 1995). Les sédiments de certains lacs dans cette région ont une concentration qui peut atteindre  $\sim 100 \mu\text{mol Ni g}^{-1}$  de poids sec, tandis que les sédiments provenant d'un lac non contaminé contiennent plutôt  $\sim 1 \mu\text{mol de Ni g}^{-1}$  de poids sec (Borgmann et al. 2001, Pyle et al. 2005). Ces fortes concentrations en Ni peuvent affecter les organismes benthiques. Par exemple, une étude en laboratoire réalisée par Borgmann et al. (2001) a révélé que les sédiments de Sudbury pouvaient affecter la survie de l'amphipode *Hyalella azteca*, et que le Ni était vraisemblablement le métal responsable. Croteau et al. (1998) ont mesuré les concentrations de Ni dissous dans des lacs de Sudbury et la valeur pouvait atteindre  $5,8 \mu\text{M}$ . Gauthier et al. (2006) ont observé une forte mortalité des larves du poisson *Pimephales promelas* (tête-de-boule) dans les lacs à fortes concentrations de Ni, mais il est possible que d'autres contaminants ou facteurs stressants soient en cause.

Le Ni est un métal essentiel pour les plantes et pour certaines espèces de vertébrés terrestres, mais son essentialité n'a pas encore été démontrée chez les humains et les invertébrés aquatiques (Muysen et al. 2004). Il est considéré comme étant moyennement toxique, par comparaison aux Hg, Tl ou Cd (Chau et Kulikovsky-Cordeiro 1995). Le mécanisme de toxicité du Ni est cependant peu connu.

### 1.1.2 Le thallium

Le thallium (Tl) est un élément dans la classe des métaux pauvres, avec un numéro atomique de 81 et une masse atomique de 204,28. Il est présent naturellement dans la croûte terrestre à des concentrations de  $1,5$  à  $2,4 \text{ nmol g}^{-1}$  de poids sec. Ce métal est



utilisé, entre autres, dans la bijouterie, les lentilles optiques, les thermomètres et comme poison à rats (Galván-Arzate et Santamaria 1998, Nriagu 1998). Le Tl est un métal présent naturellement dans l'eau en quantités traces. Cependant, il peut se retrouver en plus grande concentration dans l'eau et les sédiments des lacs près des manufacturiers de charbon, de fer, d'acier, de l'industrie minière et des fonderies (World Health Organization 1996). C'est un métal qui peut être sous forme monovalente et trivalente dans l'eau (Lin et Nriagu 1999). Une étude menée par Lin et Nriagu (1999) sur la spéciation du Tl a indiqué que 68 % du Tl dissous dans l'eau du Lac Michigan (USA) était sous la forme trivalente. La concentration moyenne de Tl total dissous dans le Lac Michigan est de 5,9 à 70 pM (Cheam 2001).

Le Tl est très toxique (2<sup>e</sup> après le mercure ; World Health Organization 1996), et non essentiel pour les êtres vivants. Le mécanisme de toxicité de ce métal serait relié à sa similarité avec le potassium (K), substituant ce dernier dans les processus biologiques (Galván-Arzate et Santamaria 1998). De plus, le Tl aurait une grande affinité pour les groupes sulfhydriques des protéines et d'autres molécules (Galván-Arzate et Santamaria 1998). La concentration de Tl dans les truites grises du Lac Michigan (~0,6 nmol g<sup>-1</sup> de poids humide) est à un niveau qui peut potentiellement être dangereux pour ceux qui consomment régulièrement cette espèce de poisson (Lin et al. 2001).

## **1.2 Accumulation des métaux traces**

### **1.2.1 Route d'exposition**

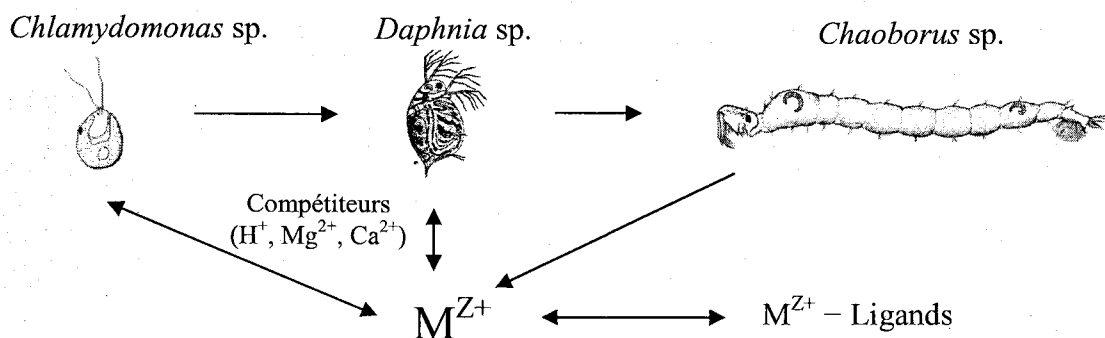
Les animaux aquatiques peuvent accumuler les métaux par deux voies : l'eau et leur nourriture. L'importance relative de ces deux voies d'exposition dépend de plusieurs facteurs, par exemple, la physiologie de l'animal, son comportement nutritionnel (filtreur, détritivore, prédateur), et les concentrations disponibles des métaux dans l'eau et dans sa nourriture (Hare et al. 2003). On a longtemps pensé que l'eau était la principale voie d'exposition aux métaux, alors les études se penchaient presque qu'exclusivement sur cette voie. Des observations récentes ont prouvé que la nourriture peut être la voie

majeure d'entrée des métaux chez certains animaux (Croisetière et al. 2006, Hare et al. 2003, Meyer et al. 2005).

Une fois dans un animal, la distribution interne des métaux peut varier selon qu'ils proviennent majoritairement de l'eau ou de la nourriture (Hare 1992). Par exemple, les métaux provenant de l'eau auront tendance à s'accumuler dans les organes respiratoires mais ceux provenant de la nourriture se trouveront en plus grande proportion dans les organes associés au système digestif (Hare 1992).

### 1.2.2 Biodisponibilité des métaux

Certaines formes de métaux sont peu disponibles pour les organismes. Nous ne pouvons pas toujours relier la concentration totale d'un métal dans l'eau ou les sédiments à celle présente dans un organisme. Pour les organismes aquatiques prenant principalement leurs métaux de l'eau, le modèle de l'ion libre propose que la réponse biologique à la présence des métaux soit liée à la concentration de métaux libres dans l'eau (Campbell 1995). Dans le cas d'animaux qui prennent la totalité d'un métal de leur nourriture, la relation entre la concentration de l'ion libre du métal dans l'eau ambiante et celle dans l'animal est indirecte et passe par sa chaîne alimentaire (Figure 1) (Croteau et al. 1998).



**Figure 1.** Relation entre la concentration de l'ion libre ( $M^{Z+}$ ) dans l'eau environnante et celle dans une chaîne alimentaire où le dernier maillon accumule les métaux par sa diète seulement. Certains cations sont des compétiteurs des métaux pour les sites d'entrée dans les organismes.

### 1.3 La répartition subcellulaire et l'efficacité d'assimilation

Les métaux qui entrent dans les cellules d'organismes vivants vont se lier à des ligands. Par exemple, les métallothionéines (MT ; Figure 2), des protéines de faible poids moléculaire riches en cystéine, lient certains métaux pour réguler la concentration dans le cytosol de ceux qui sont essentiels ou pour détoxiquer ceux qui ne sont pas essentiels (Roesijadi 1992).



**Figure 2.** Schéma d'une métallothionéine. Deux chaînes de polypeptides (mauve) entourent les cystéines (jaune) qui se lient au métal (bleu). Tiré du site Internet « [bioc.unizh.ch/mtpage/poster/posterevol.html](http://bioc.unizh.ch/mtpage/poster/posterevol.html) ».

Les métaux peuvent aussi être séquestrés dans des granules (Figure 3) ou des lysosomes (souvent considérés comme des granules mais que nous distinguons dans ce texte). Ils sont alors non-toxiques et excrétés à l'extérieur ou entreposés dans la cellule. Par exemple, le Zn et le Mg se retrouvent souvent dans des granules de phosphate de calcium et de magnésium (Vijver et al. 2004). Des métaux comme le Cd, Cu, Hg et Ag vont plutôt être séquestrés dans des dépôts riches en sulfure originaires des lysosomes (Hopkin 1989, Vijver et al. 2004). Les insectes aquatiques ont tendance à utiliser les métallothionéines comme principal moyen de détoxification (Cain et al. 2004, Michaud et al. 2005), tandis que chez les oligochètes, les granules servent aussi à cette fin (Wallace et Lopez 1996).

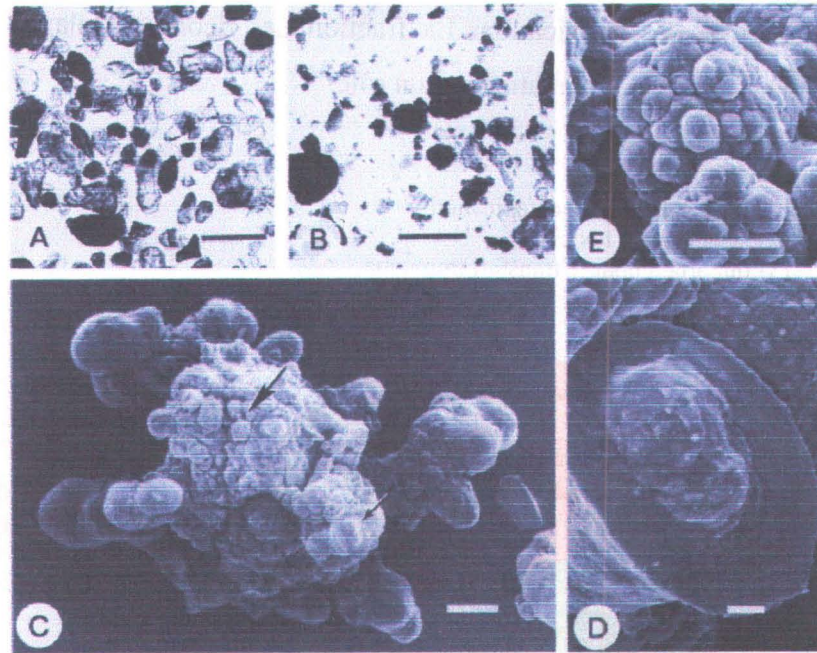
### 1.2.3 Ingestion, assimilation et élimination

Ingérer un métal ne signifie pas que la totalité du métal dans la nourriture sera accumulée par l'animal. Une proportion seulement sera dissociée des particules de nourriture et absorbée par la paroi du tractus digestif. Certains auteurs font une distinction entre l'absorption et l'assimilation, ou ce dernier terme implique l'entrée du métal dans les cellules (Penry 1998, Wang et Fisher 1999). Ici, nous utilisons le terme efficacité d'assimilation signifiant le pourcentage du métal retenu par l'animal (après évacuation de son tube digestif des matières non-assimilables).

Il est utile de connaître l'efficacité d'assimilation des métaux pour établir des modèles cinétiques de bioaccumulation. L'accumulation des métaux peut s'exprimer à l'aide de l'équation suivante :

$$d[M]_{\text{animal}} / dt = (k_{\text{eau}} * [M]_{\text{eau}}) + (EA * TI * [M]_{\text{nourriture}}) - (k_{\text{efflux}} + k_{\text{croissance}}) * [M]_{\text{animal}}$$

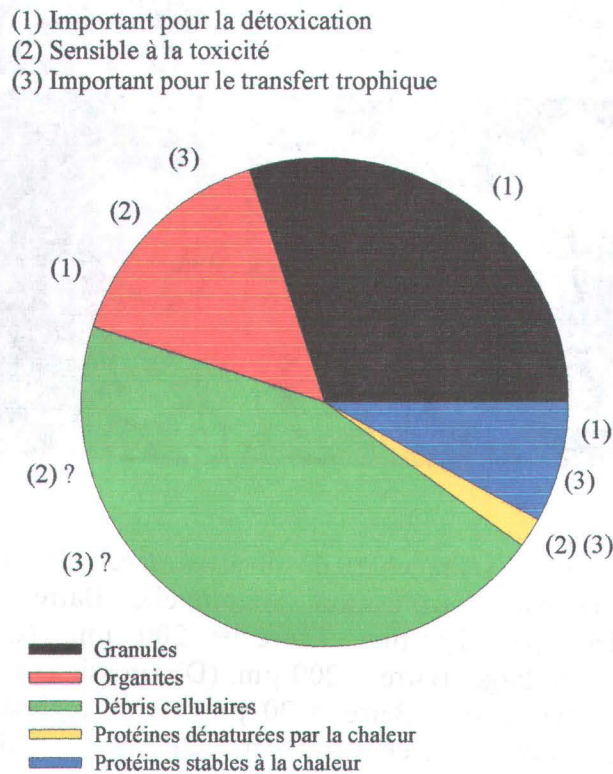
où  $[M]_{\text{animal}}$  est la concentration en métal dans l'animal,  $t$  est le temps,  $k_{\text{eau}}$  est la constante cinétique d'accumulation du métal venant de l'eau,  $[M]_{\text{eau}}$  est la concentration en métal dans l'eau,  $EA$  est l'efficacité d'assimilation du métal présent dans la nourriture,  $TI$  est le taux d'ingestion du consommateur,  $[M]_{\text{nourriture}}$  est la concentration de métal dans sa nourriture,  $k_{\text{efflux}}$  est la constante cinétique de perte physiologique du métal et  $k_{\text{croissance}}$  est la constante du taux de croissance de l'animal (Munger et al. 1999). L'efficacité d'assimilation d'un métal est liée à la nourriture elle-même (quantité ingérée et qualité) et au consommateur (temps de passage de la nourriture dans le tube digestif, pH et enzymes présentes dans le tube digestif ; Reinfelder et al. 1998). Dans le cas des prédateurs, il y a des évidences que l'efficacité d'assimilation des métaux est influencée par la disponibilité des métaux dans les cellules de leurs proies, comme discuté à la section suivante.



**Figure 3.** Granules provenant des branchies du bivalve *Mercenaria mercenaria*. (A) Granules isolées par centrifugation différentielle. Barre = 200  $\mu\text{m}$ . (B) Granules isolées par digestion. Barre = 200  $\mu\text{m}$ . (C) Une granule exceptionnellement large. Barre = 200  $\mu\text{m}$ . (D) Grossissement de la granule où la petite flèche en (C). Barre = 20  $\mu\text{m}$ . (E) Grossissement de petites granules où la grande flèche en (C). Barre = 20  $\mu\text{m}$ . Tiré de Sullivan et al. 1988.

Pour certaines combinaisons prédateurs-proies, les métaux présents dans le cytosol (liés à des protéines) ou situé dans les organites seraient plus facilement transférés au niveau trophique supérieur que s'ils sont présents dans des granules ou liés aux membranes cellulaires (Wallace et Lopez 1996). Les métaux liés à ces deux derniers ligands seraient plus difficilement dissociables lors de la digestion et seraient donc moins absorbés par les parois du système digestif d'un prédateur ayant un système digestif simple dont le temps de passage de la nourriture est rapide (exemple : copépodes; Reinfelder et Fisher 1991). Il y aurait donc une relation potentielle entre la proportion de métal présent dans les fractions cytosoliques et les organites, et le pourcentage d'efficacité d'assimilation. La figure 4 montre les différents rôles que pourrait avoir chaque fraction cellulaire (obtenue à l'aide du protocole illustré à la figure 9). La fraction des organites a deux rôles opposés, puisqu'elle contient des microsomes et des mitochondries sensibles aux métaux et des

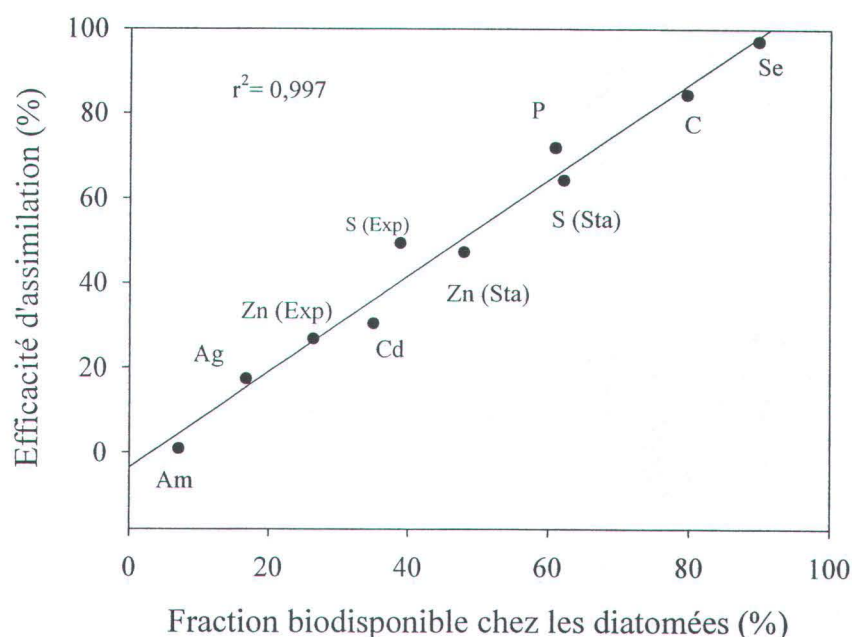
lysosomes ayant un rôle de détoxication. La fraction des débris cellulaires ayant un contenu inconnu, il est difficile de lui attribuer un rôle.



**Figure 4.** Hypothèses générales concernant l'importance des fractions subcellulaires dans les organismes pour décrire la toxicité et le transfert trophique. La superficie des pointes de tarte correspond à la distribution du Cd chez l'oligochète *Limnodrilus hoffmeisteri*. Adapté de Wallace et al. 1998.

On peut observer une relation ~1:1 entre le pourcentage de métaux dans la fraction dite « biodisponible » de diatomées et l'efficacité d'assimilation chez plusieurs espèces de copépodes (Figure 5). La même tendance se voit chez la crevette *Palaemon macrodactylus* qui assimile 60% du Cd présent chez le bivalve *Potamocorbula amurensis*, qui concorde avec la proportion de Cd dans le cytosol et les organites des cellules du bivalve (Wallace et Luoma 2003). Certains organismes seraient néanmoins capables de digérer des métaux plus difficilement dissociables de leur nourriture, dû possiblement à des conditions dans leur système digestif. Par exemple, chez *Thais clavigera* il n'y a pas de concordance entre l'efficacité d'assimilation du Cd et du Ag et

leur répartition subcellulaire (Cheung et Wang 2005). De plus, Blackmore et Wang (2004) n'ont trouvé aucune corrélation entre l'efficacité d'assimilation de certains métaux (Cd, Hg, et Zn) chez l'huître *Saccostrea cucullata* et la répartition subcellulaire de ces métaux dans les fractions « biodisponibles » de sa nourriture. Donc, les fractions dites « non-biodisponibles » pourraient être en partie assimilables par certains prédateurs. Wallace et Lopez (1997) estiment que ~50 % du Cd présent dans la partie non-biodisponible de l'oligochète *Limnodrilus hoffmeisteri* serait absorbé par la crevette *Palaemonetes pugio*. Il est donc difficile de généraliser concernant la disponibilité d'un métal dans la nourriture pour tous les types de prédateurs et de proies.



**Figure 5.** Efficacité d'assimilation de différents éléments chez trois espèces de copépodes en fonction de la fraction biodisponible (dans le cytosol et les organites) des éléments chez une diatomée. Exp et Sta entre parenthèses signifient que les algues étaient en phase de croissance exponentielle ou stationnaire (respectivement). Adaptée de Reinfelder et Fisher (1991).

Il existe très peu de données concernant la disponibilité du Ni et du Tl dans la nourriture, ce qui justifie leur étude. Nous avons choisi une chaîne alimentaire composée d'un insecte et d'un oligochète comme proies, et d'un insecte comme prédateur pour vérifier

l'existence d'une relation entre la répartition subcellulaire du Ni et du Tl et leur efficacité d'assimilation.

## 1.4 Biologie des invertébrés étudiés

### 1.4.1 L'insecte *Chironomus riparius*

*Chironomus riparius* fait partie de la famille des Chironomidae et de l'ordre Diptera. Ces larves rouges (Figure 6) sont aquatiques et construisent un tube en forme de « U » ou de « J » dans les sédiments (Charbonneau et Hare 1998). Elles peuvent se nourrir d'algues et de particules de sédiments en sortant leur tête à l'extérieur des tubes ou en filtrant les particules de la colonne d'eau dans leur tube (Ristola 2000, Walshe 1947). La vie de *C. riparius* est divisée en quatre stades : l'œuf, la larve, la nymphe et l'adulte.



**Figure 6.** Larve (gauche), nymphe (milieu) et adulte mâle (droite) de *Chironomus* sp.  
Tiré des sites Internet « [shef.ac.uk/aps/mbiolsci/ross-simon/organims.html](http://shef.ac.uk/aps/mbiolsci/ross-simon/organims.html) »,  
« [peatlandsni.gov.uk/wildlife/aquainvert/insectlarv.htm](http://peatlandsni.gov.uk/wildlife/aquainvert/insectlarv.htm) » et  
« [de.wikipedia.org/wiki/Zuckmücken](http://de.wikipedia.org/wiki/Zuckmücken) ».

La durée de vie totale du *Chironomus* est influencée par la température et plusieurs autres conditions environnementales (Ristola et al. 1999). À 20°C, elle est d'environ trois semaines (Bonnet 2000), mais en arctique elle peut être aussi longue que sept ans (Butler et Anderson 1990). Les adultes s'accouplent en vol et la ponte a lieu 24 à 48 h plus tard. La femelle dépose alors ses masses de 150 à 600 œufs enrobées d'une couche mucilagineuse sur un substrat présent à la surface de l'eau (e.g. macrophytes ; Ristola 2000). À l'éclosion, les larves consomment la couche mucilagineuse et s'enfouissent dans les sédiments. Il y a quatre stades larvaires ; le quatrième stade se transformant en



nymphe et nageant vers la surface de l'eau où les adultes émergent. Ces derniers vivent de quatre à onze jours en ne se nourrissant pas. Ils ressemblent à un moustique, mais ne piquent pas. Le mâle peut être différencié de la femelle par, entre autres, la présence d'antennes plumeuses sur la tête. Les larves sont tolérantes à l'eutrophisation des lacs (Environnement Canada 1997). On peut dénombrer 50 000 larves de *Chironomus* et plus par mètre carré (Kajak et Prus 2004). Ils sont un constituant important dans le régime alimentaire des macroinvertébrés, des poissons et des oiseaux (Environnement Canada 1997).

#### 1.4.2 L'oligochète *Tubifex tubifex*

*Tubifex tubifex* est dans la famille des Tubificidae, dans la classe des Oligochaeta. Ce sont des vers segmentés de trois à quatre centimètres de long avec peu de soies longues sur le corps (Figure 7). Ils habitent dans les sédiments du fond des lacs et rivières, où ils forment un tube muqueux vertical (Smith 2001). Ces vers sortent seulement leur partie postérieure à l'extérieur des sédiments pour capter l'oxygène (Tachet et al. 2002). Ils obtiennent des nutriments en ingérant des sédiments (Smith 2001). *Tubifex* peut survivre dans un environnement très pollué en matières organiques (Amerind Publishing Co. 1980), où le nombre d'individus peut atteindre des centaines par centimètre carré (Tachet et al. 2002).



**Figure 7.** L'oligochète *Tubifex tubifex*. Tiré des sites Internet « [ebiomedica.com/prod/BOanelids.html](http://ebiomedica.com/prod/BOanelids.html) » et « [townoflakelure.com/aquatic\\_worms.htm](http://townoflakelure.com/aquatic_worms.htm) ».

## Efficacité d'assimilation de *Sialis velata* pour le nickel et le thallium présents chez ses proies; importance de la distribution subcellulaire des métaux chez les proies

Soumis à des conditions défavorables, ils ont la capacité de ralentir leur métabolisme et de former un ciste (Smith 2001). Ces vers sont hermaphrodites et leurs œufs se développent dans des cocons (Tachet et al. 2002). Leur durée de vie est généralement d'un an, mais elle diffère selon la température et les conditions environnementales (Lazim et Learner 1986). Les *Tubifex tubifex* sont une source de nourriture pour les crustacés, poissons et insectes prédateurs comme *Sialis velata*.

### 1.4.3 L'insecte *Sialis velata*

*Sialis velata* fait partie de la famille des Sialidae, de l'ordre des Megaloptera. Il existe 36 espèces de *Sialis* répertoriées dans le monde, dont 24 en Amérique du Nord, bien que sa taxonomie soit encore mal connue (Elliott 1996a). Son cycle de vie comprend quatre stades : l'œuf, la larve, la nymphe et l'adulte (Figure 8).



**Figure 8.** Larve (haut), nymphe (milieu) et adulte (bas) de *Sialis* sp. Tiré des sites Internet « [uoguelph.ca/debu/STEVEdweb/html/Sialis\\_larva\\_NA\\_lg.htm](http://uoguelph.ca/debu/STEVEdweb/html/Sialis_larva_NA_lg.htm) », « [xerces.org/aquatic/Columbia\\_Slough/2004\\_collection\\_data.htm](http://xerces.org/aquatic/Columbia_Slough/2004_collection_data.htm) » et « [focusnature.be/keywords/sialis-lutaria](http://focusnature.be/keywords/sialis-lutaria) ».

Les larves vivent dans les sédiments du fond des lacs et des rivières, où elles irriguent un tunnel en forme de « U » (Charbonneau et Hare 1998). Elles peuvent atteindre une longueur de 25 mm (Evans et Neunzig 1996). Leur durée de vie est de un à trois ans selon la latitude et comprend jusqu'à 10 stades larvaires (Locklin et al. 2005). Elles sont des prédateurs généralistes qui attendent leurs proies dans leur tunnel (Canterbury 1978). La diète de *Sialis* est composée largement de chironomes, d'oligochètes et d'ostracodes. Les *Sialis* peuvent vivre jusqu'à deux mois sans nourriture (Locklin et al. 2005). Le stade de nymphe peut durer deux semaines et se produit au printemps ou tôt en été. Les larves sortent de l'eau sur le bord de la rive et creusent une chambre dans le sol (Elliott 1996b). Ensuite, les adultes sortent du sol et s'accouplent. La durée de vie des adultes est de trois semaines maximum (Evans et Neunzig 1996). Les femelles pondent leurs œufs à l'envers de feuilles ou de branches (souvent des aulnes, d'où leur nom anglais « alderfly ») au-dessus de l'eau (Ross 1937). Les larves qui émergent tombent alors dans l'eau et sont planctoniques. C'est lors du deuxième stade que les larves s'enfouissent dans les sédiments (Elliott 1996a). Bien que nous ne savons pas si la nourriture est la principale source de Ni et de Tl pour *S. velata*, ils accumulent néanmoins plusieurs métaux (As, Cd, Co, Cu, et Zn) presque exclusivement de leurs proies (Croisetière et al. 2006, Roy et Hare 1999).



## 2. Objectifs spécifiques

Le premier objectif était de déterminer le pourcentage de Ni et de Tl dans les différentes fractions subcellulaires des proies *Chironomus riparius* et *Tubifex tubifex*. Nous avons alors déterminé si la méthode de détoxification changeait selon l'espèce de proie et le métal. Ceci nous a permis d'évaluer les proportions de Ni ou de Tl qui se retrouvaient dans la partie potentiellement biodisponible pour le prédateur *Sialis velata*. Pour réaliser ce premier objectif, les deux espèces de proies ont été exposées à l'un ou l'autre des métaux, jusqu'à l'atteinte d'un état stationnaire, et le fractionnement subcellulaire a ensuite été effectué.

Deuxièmement, l'efficacité d'assimilation du prédateur *S. velata* pour les deux métaux présents chez ses deux types de proies a été mesurée. On a alors vérifié si cette efficacité d'assimilation était élevée et si elle changeait selon la diète et le métal. Ainsi, on a pu déterminer si la distribution subcellulaire des métaux était un bon indice de l'efficacité de transfert de ceux-ci chez le prédateur.



### 3. Méthodes

Les détails des méthodes utilisées sont dans la deuxième partie de ce document, mais un résumé est donné ici.

#### 3.1 Collecte de *Sialis velata* et élevage de *Chironomus riparius* et *Tubifex tubifex*

Les larves de *S. velata*, ainsi que l'eau et les sédiments servant à la contamination de *C. riparius* et de *T. tubifex* ont été récoltés au lac St-Joseph (46°52'25" N, 71°38'20" O). Ce lac ne contient que des faibles concentrations de métaux dans ses sédiments, dans l'eau et dans les *S. velata* (Hare et Campbell 1992, Warren et al. 1998). Les sédiments et les *S. velata* ont été récoltés à environ 5 m de profondeur à l'aide d'une benne Ekman. Des sédiments pour l'exposition des proies ont été gardés au laboratoire à 4 °C. D'autres sédiments ont été tamisés dans un filet sur le terrain pour extraire les larves de *S. velata*. L'eau, pour garder les larves du prédateur en laboratoire, a été prise à la surface du lac et entreposée à 4 °C. Au laboratoire, les *S. velata* ont été placés individuellement dans des contenants en polystyrène de 30 mL avec 20 mL d'eau provenant du lac changée une fois par semaine et maintenus à 10 °C à la noirceur.

Des masses d'œufs de *C. riparius* nous ont été fournies par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec à Québec (Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec). Ceux-ci ont servi à instaurer un élevage continu de cette espèce. La culture se faisait dans des aquariums contenant ~3 cm de sable fin et 8 L d'eau reconstituée ([Ca<sup>+2</sup>] ~0,8 mM, [Cl<sup>+2</sup>] ~0,95 mM, [K<sup>+1</sup>] ~50 µM, [Mg<sup>+2</sup>] ~0,250 mM, [Na<sup>+2</sup>] ~1 mM, [SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>] ~0,62 mM). La moitié du volume d'eau était changée deux fois par semaine. De la nourriture pour poissons (Aquatox) était donnée après chaque changement d'eau. Les aquariums étaient maintenus à la température de la pièce avec un éclairage 18:6.

Les *T. tubifex* ont été achetés chez Aquatic Research Organisms (Hampton, Virginie, USA). Ils ont été placés dans des aquariums contenant ~3 cm de sédiments provenant du lac St-Joseph et ~8 L d'eau reconstituée. Par la suite, ces élevages ont été traités comme pour les *C. riparius*.

### 3.2 Contamination des sédiments avec du Ni ou du Tl

Les sédiments utilisés pour exposer les proies ont été contaminés artificiellement par l'ajout de Ni ou de Tl. Des sédiments provenant du lac St-Joseph ont été contaminés avec une solution contenant 1 mCi de  $^{204}\text{TlCl}_3$  et du  $\text{TlNO}_3$  pour obtenir une concentration nominale totale de 8 nmol Tl  $\text{g}^{-1}$  de poids sec. Cette concentration existe dans les milieux naturels contaminés (Cheam et al. 1998). Dans le cas du Ni, 5 mCi de  $^{63}\text{NiCl}_2$  et du  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ont été ajoutés pour obtenir une concentration nominale totale de 10  $\mu\text{mol Ni g}^{-1}$  de poids sec. Une telle concentration en Ni peut se trouver dans les lacs contaminés près de Sudbury, Ontario (Borgmann et al. 2001). Dans les deux cas, les sédiments ont alors été brassés 10 minutes à chaque jour pendant trois jours et ont été laissés à 4 °C pendant au moins deux semaines avant le début des expériences. Pour minimiser la production de déchets radioactifs, ces sédiments ont été réutilisés pour toutes les expériences (qui ont duré un an pour le Tl et trois mois pour le Ni). Les concentrations biodisponibles de métaux ont probablement changé d'une expérience à l'autre, mais comme nous n'avions pas comme objectif de faire un lien entre les concentrations des métaux chez les proies et celles dans les sédiments, nous avons ignoré ces changements. De plus, nous ne croyons pas que de tels changements auraient influencés la distribution subcellulaire des métaux chez les proies parce qu'entre essais à des temps différents (pour le Tl au moins), aucune différence importante n'a été remarquée dans la distribution subcellulaire.



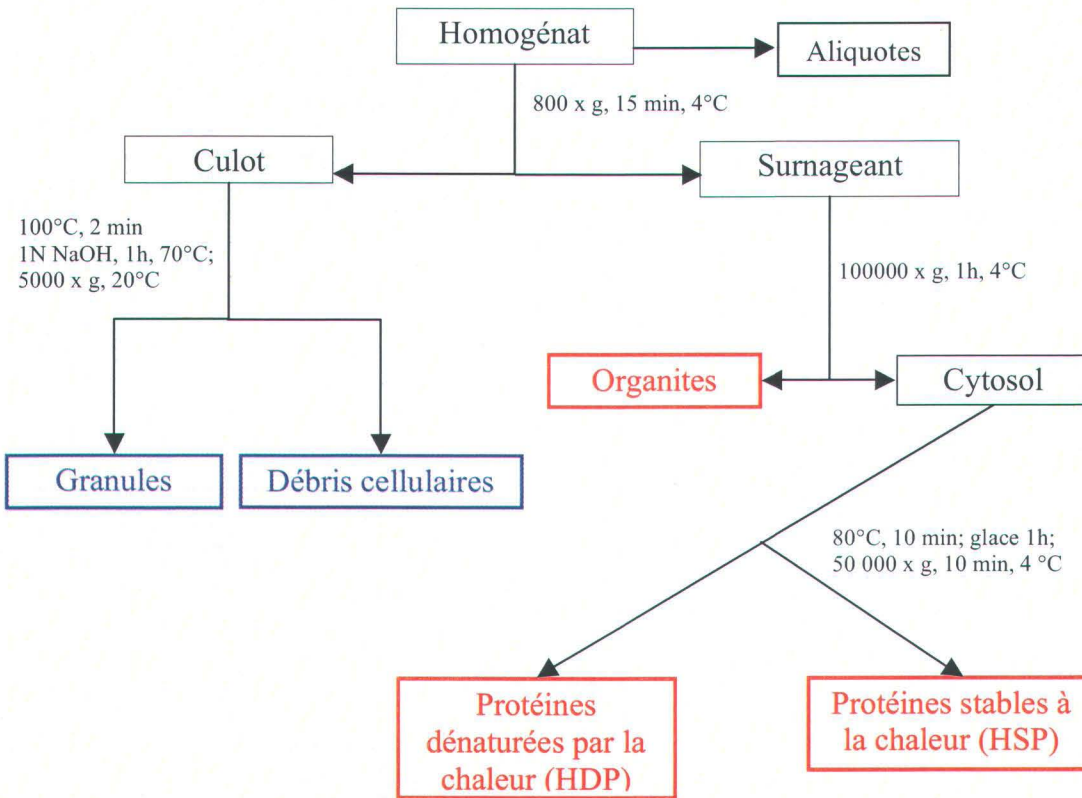
### 3.3 Exposition des proies aux sédiments contaminés

Un ou deux jours avant l'exposition à un métal, la quantité de proies requises pour une expérience était enlevée du substrat d'élevage et placée à 10 °C dans un bac en plastique avec du sable fin d'aquarium ou des sédiments et de l'eau reconstituée ( $[Ca^{+2}] \sim 80 \mu M$ ,  $[Cl^{+2}] \sim 95 \mu M$ ,  $[K^{+1}] \sim 5 \mu M$ ,  $[Mg^{+2}] \sim 25 \mu M$ ,  $[Na^{+2}] \sim 100 \mu M$ ,  $[SO_4^{-2}] \sim 62 \mu M$ ) non contaminée. La veille, des bouteilles en plastique HDPE (High Density Polyethylene) de 1 L étaient remplies avec des sédiments contaminés et de l'eau reconstituée dans un rapport sédiments:eau de  $\sim 1:2$ . Ces bouteilles étaient maintenues à 10 °C dans un incubateur. Ensuite, des proies étaient ajoutées dans les bouteilles (une proie par 5 mL de sédiments) et laissées à 10 °C pendant deux semaines pour que les proies atteignent un état stationnaire dans leurs concentrations en métaux (temps déterminé à l'aide d'expériences préliminaires non discutées ici). Après ces deux semaines, les proies étaient maintenues par groupe de trois ou quatre dans des contenants en polystyrène de 30 mL avec 10 mL de sédiments et 20 mL d'eau reconstituée non contaminés, pendant 24 h à 10 °C, pour vider leur tube digestif en contenu contaminé.

### 3.4 Fractionnement subcellulaire des proies contaminées

Quatre ou cinq réplicats de 20 *C. riparius* ou *T. tubifex* contaminés au Ni ou au Tl servaient au fractionnement subcellulaire. Après dépuration pendant 24 h, ils étaient placés dans des tubes de microcentrifugation en polypropylène de 1,5 mL et congelés à -80 °C. Le jour du fractionnement, les échantillons étaient décongelés et homogénéisés manuellement dans du tampon TRIS 25 mM à pH 7,4. Trois aliquotes étaient prélevées de chaque échantillon dans le but de connaître la quantité totale de Ni ou de Tl dans les homogénats avant le fractionnement. Ensuite, une série de traitements (selon le protocole de Bonneris et al. (2005), illustré à la figure 9) a permis d'obtenir cinq fractions : la première fraction est un culot de protéines dénaturées par la chaleur (HDP; Heat Denatured Proteins) ; la deuxième fraction est un surnageant de protéines stables à la

chaleur (HSP; Heat Stable Proteins), contenant entre autres la métallothionéine ; la troisième fraction est un culot d'organites contenant les mitochondries, microsomes et lysosomes ; la quatrième fraction contient le culot de granules et autres particules résistantes au NaOH ; la dernière fraction contient les débris cellulaires.



**Figure 9.** Protocole utilisé pour séparer les proies en 5 fractions opérationnellement définies : granules, débris cellulaires, organites, protéines dénaturées par la chaleur (HDP), protéines stables à la chaleur (HSP).

Les aliquotes et les fractions ont alors été acidifiées à l'acide nitrique et la quantité de  $^{63}\text{Ni}$  et  $^{204}\text{Tl}$  a été mesurée avec un compteur à scintillation. Les mesures radioactives étaient ensuite transformées en quantité totale de Ni et de Tl à l'aide de l'activité spécifique des deux métaux (rapport métal radioactif / métal total) mesurée chez les proies. Ces activités spécifiques ont été déterminées à l'aide d'un compteur à scintillation et d'un spectromètre de masse quadripolaire à source plasma. Il est à noter que le protocole utilisé est opérationnel, et que nous n'avons pas vérifié la composition des

fractions. Par exemple, le contenu de certains organites s'est probablement retrouvé dans les fractions cytosoliques, puisque la technique d'homogénéisation représente un compromis entre l'intégrité des organites et l'efficacité du bris des cellules. Par contre, les vitesses de centrifugation employées sont celles utilisées abondamment en biologie cellulaire pour isoler les différentes parties d'une cellule. La méthode d'isolement des granules est similaire à celle utilisée par Silverman et al. (1983) ; ces chercheurs ont confirmé la présence de granules isolées à l'aide de leur technique. Cependant, nous avons vérifié la répétitivité des résultats obtenus par ce protocole. La spéciation du Tl dans les différentes fractions n'a pas été mesurée.

### **3.5 Mesures de l'efficacité d'assimilation du Ni et du Tl chez *Sialis velata***

Il y avait quatre groupes de cinq ou six *S. velata* ayant chacun une diète différente : 1) *C. riparius* contaminés au Ni, 2) *C. riparius* contaminés au Tl, 3) *T. tubifex* contaminés au Ni et 4) *T. tubifex* contaminés au Tl. Chaque *S. velata*, n'ayant pas mangé depuis plusieurs jours, était placé la veille de l'expérience dans un contenant en plastique HDPE de 30 mL avec 10 mL d'eau du lac St-Joseph. Le lendemain, les *S. velata* recevaient une ou deux proies contaminées (sans contenu intestinal contaminé). Ces proies étaient ingérées en moins de 15 minutes et l'eau était alors remplacée. Une proie non contaminée, mais de l'autre espèce que celle de sa diète contaminée, était ensuite donnée aux prédateurs. Le lendemain, les fèces de *S. velata* étaient récoltées et observées au binoculaire pour vérifier que les restants non digérés de la proie non contaminée s'y retrouvaient (les soies pour les *T. tubifex* et la capsule céphalique pour les *C. riparius*) et ainsi s'assurer qu'aucune nourriture contaminée ne restait dans le tube digestif. Les fèces étaient ensuite récupérées dans des fioles à scintillation en verre et digérées à l'acide nitrique pour mesurer le Ni et le Tl radioactif. Une fois les intestins vidés de leur contenu radioactif, les *S. velata* étaient placés dans 3,75 mL d'EDTA pendant 10 minutes, pour enlever le peu de métal qui pourrait être lié à la surface de leur corps. L'EDTA était ensuite récupéré pour analyse radioactive. L'eau dans lequel baignait le prédateur était acidifiée à l'acide nitrique pour récupérer le peu de métal qui aurait pu être lié aux parois

Efficacité d'assimilation de *Sialis velata* pour le nickel et le thallium présents chez ses proies; importance de la distribution subcellulaire des métaux chez les proies

des contenants. Par la suite, l'eau était analysée. Les *S. velata* étaient digérés à l'acide nitrique et analysés. Les mesures de  $^{63}\text{Ni}$  et  $^{204}\text{Tl}$  ont été transformées en quantité totale de Ni et de Tl. L'efficacité d'assimilation (EA) se calculait alors par un bilan de masse :

$$EA = \frac{M_{Sialis}}{M_{Sialis} + M_{Eau} + M_{EDTA} + M_{Fèces}} \times 100$$

où M est la quantité de métal : dans *S. velata* ( $M_{Sialis}$ ) après dépuration ; dans l'eau de dépuration ( $M_{Eau}$ ) ; dans l'EDTA de rinçage ( $M_{EDTA}$ ) ; ou dans les fèces ( $M_{Fèces}$ ). L'efficacité d'assimilation calculée de cette manière donne une valeur minimale, puisque cette équation ignore le métal qui peut être perdu physiologiquement durant la dépuration. La spéciation du Tl n'a pas été mesurée chez les organismes.

Les analyses statistiques effectuées lors des comparaisons sont détaillées dans la section 2.8 de l'article.

## 4. Résultats et discussion

### 4.1 Concentrations totales du Ni et du Tl chez *C. riparius* et *T. tubifex*

Les sédiments contaminés en Ni contenaient  $\sim 16 \mu\text{mol Ni g}^{-1}$  de poids sec, et après deux semaines d'exposition les proies contenaient  $\sim 0,8$  (*C. riparius*) et  $\sim 0,3$  (*T. tubifex*)  $\mu\text{mol Ni g}^{-1}$  de poids sec. Ces valeurs sont environ du même ordre de grandeur que celles obtenues pour *C. riparius* exposés à des sédiments de rivière ( $\sim 2 \mu\text{mol g}^{-1}$  de poids sec, Bervoets et al. 2004) ; *T. tubifex* exposés à des sédiments contaminés artificiellement en Ni ( $\sim 3 \mu\text{mol g}^{-1}$  de poids sec, Gillis et al. 2004) ; et l'amphipode *Hyaella azteca* ( $0,2 \mu\text{mol Ni g}^{-1}$  de poids sec, Borgmann et al. 2001) exposé à des sédiments naturels ayant environ la même concentration en Ni que les nôtres. Donc, les concentrations de Ni dans nos proies sont réalistes par rapport à celles déjà rapportées chez des invertébrés d'eau douce. Le pourcentage de proies non retrouvées dans les sédiments après leur contamination était de 22 à 55 % chez *C. riparius* et 0 % chez *T. tubifex*. Il est donc possible que des effets toxiques soient survenus chez l'insecte, mais aucun contrôle n'a été fait pour vérifier cette hypothèse.

On a mesuré une concentration de  $\sim 5 \text{ nmol Tl g}^{-1}$  de poids sec dans les sédiments. Les proies exposées pendant deux semaines à ces sédiments contenaient  $\sim 3 \text{ nmol Tl g}^{-1}$  de poids sec chez *C. riparius* et  $\sim 1,5 \text{ nmol Tl g}^{-1}$  de poids sec chez *T. tubifex*. Nous n'avons trouvé aucune mesure de Tl qui a été effectuée chez ces deux espèces auparavant. Notons tout de même que la concentration maximum de Tl mesurée chez l'amphipode *Hyaella azteca* exposé à des sédiments du Lac Ontario ( $\sim 5 \text{ nmol g}^{-1}$  de poids sec, Borgmann et al. 1998) était semblable aux nôtres. Le pourcentage de *C. riparius* non retrouvés dans les sédiments était de 24 à 46 % ; celui de *T. tubifex* était près de 0 %. L'hypothèse d'effets toxiques chez *C. riparius* n'a pas été vérifiée.

## 4.2 Répartition subcellulaire du Ni et du Tl chez les deux types de proies

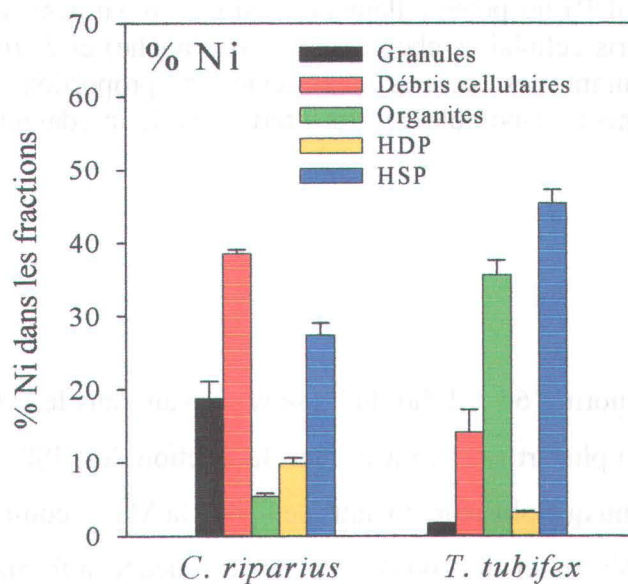
Les résultats du fractionnement des métaux au niveau subcellulaire sont présentés en termes de pourcentages dans les figures 10 à 13. Comme dans l'étude de Wallace et al. (2003), on interprète les fractions subcellulaires opérationnelles de la section 3.4 comme des entités qui sont : de détoxification (protéines stables à la chaleur (HSP), granules), de stockage (granules), et sensibles ou potentiellement sensibles aux métaux (protéines dénaturées par la chaleur (HDP), organites). Il a été mentionné à la section 1.3 que la fraction des organites comprenait également des lysosomes, dont leur rôle est de détoxifier les métaux et qui sont alors insensibles à ces derniers. Donc, le métal présent dans la fraction des organites peut être considéré comme **potentiellement** dommageable pour l'animal et son vrai danger pour l'animal dépendrait de la proportion que représentent les lysosomes. Il est difficile d'attribuer une fonction à la fraction des débris cellulaires, car elle contient probablement divers composés y compris des cellules non brisées et des membranes cellulaires. De ces fractions, nous regroupons la fraction des HSP et celle des HDP comme celles étant dans le cytosol (Vijver et al. 2004, Wallace et Lopez 1996, Wallace et Luoma 2003, Wallace et al. 2003, Wang et Rainbow 2006).

### 4.2.1 Le Ni

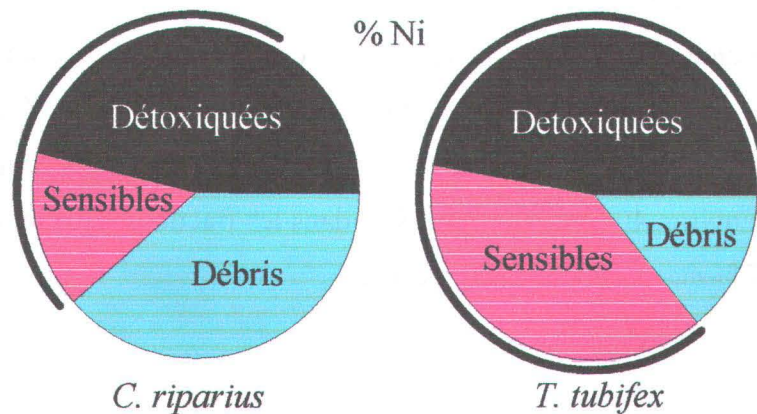
Le Ni accumulé dans les cellules de *C. riparius* avait une proportion de  $37 \pm 2$  % dans le cytosol, en grande partie dans la fraction des HSP ( $\sim 30$  % ; Figure 10). Une proportion semblable,  $39 \pm 1$  %, était dans les débris cellulaires. Il y avait presque autant de Ni dans la fraction des granules que dans celle des HSP. Environ 15 % de la quantité de Ni était situé dans les fractions pouvant avoir un effet toxique à l'animal et  $\sim 46$  % se trouvait sous forme détoxiquée (Figure 11).

Chez *T. tubifex*, le cytosol de ces oligochètes contenait la moitié du Ni avec  $49 \pm 2$  %, presque entièrement dans la fraction des HSP (Figure 10). Comme pratiquement pas de

Ni était « séquestré » dans les granules (< 2%), le *T. tubifex* se « défendrait » contre le Ni principalement à l'aide de la métallothionéine (MT) compris dans la fraction des HSP (en présument que le Ni associé aux lysosomes était peu important). Ce résultat est intéressant, puisque le Ni ne fait pas partie des métaux ayant une forte affinité pour la MT riche en soufre. Environ 40 % du Ni était situé dans les fractions pouvant être sensibles aux métaux et ~47 % était déttoxiqué (Figure 11).



**Figure 10.** Distribution subcellulaire du Ni chez *C. riparius* et *T. tubifex* (n = 4 ou 5; Moyenne  $\pm$  Écart-type). Les différences entre les fractions pour un type de proie donné sont toutes significatives ( $p < 0.05$ ). Pour une fraction donnée, toutes les valeurs variaient significativement ( $p < 0.05$ ) entre les deux types de proies.

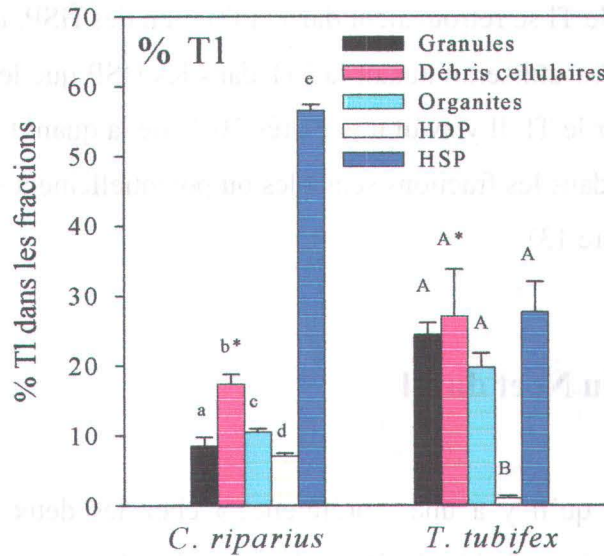


**Figure 11.** Distribution du Ni entre les fractions détoxiquées (HSP et granules), sensibles (HDP) ou potentiellement sensibles (organites) aux métaux, ainsi que les débris cellulaires chez *C. riparius* (gauche) et *T. tubifex* (droite). La ligne entourant les cercles représente la proportion du Ni qui est potentiellement disponible au transfert vers le prédateur (HDP, HSP et organites).

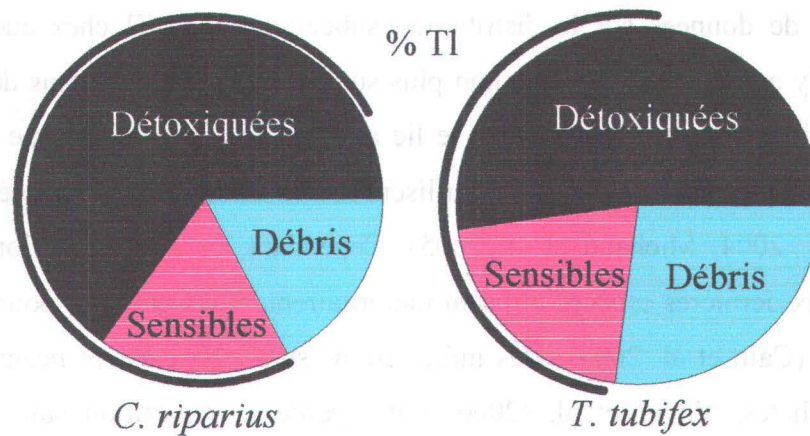
#### 4.2.2 Le Tl

Chez *C. riparius*, la majorité ( $64 \pm 1$  %) du Tl se retrouvait dans le cytosol (Figure 12). De cette partie du Tl, la plupart se retrouvait dans la fraction des HSP, comprenant entre autres la MT. Il est connu que plusieurs métaux se lient à la MT, y compris l'Ag, le Cd, le Cu, le Hg, et le Zn (Vijver et al. 2004). Cependant, aucune information n'existe sur l'affinité du Tl pour la MT ; bien que le Tl ait une forte affinité pour les groupes sulfhydriques et que la MT est riche en ces groupes (Galván-Arazate et Santamaria 1998, Roesijadi 1992). Une faible proportion ( $< 10$  %) du Tl se retrouvait détoxiquée dans la fraction des granules. À peu près 20 % du Tl se retrouvait dans les parties pouvant être sensibles et ~65 % était sous forme détoxiquée (Figure 13).





**Figure 12.** Distribution subcellulaire du Tl chez *C. riparius* et *T. tubifex* (n = 4 ou 5; Moyenne ± Écart-type). Les différences significatives entre les fractions pour un type de proie donné sont indiquées par différentes lettres (p < 0.05). Pour une fraction donnée, toutes les valeurs variaient significativement (p > 0.05) entre les deux types de proies à l'exception de la fraction des débris cellulaires (\*).



**Figure 13.** Distribution du Tl entre les fractions détoxiquées (HSP et granules), sensibles (HDP) ou potentiellement sensibles (organites) aux métaux, ainsi que les débris cellulaires chez *C. riparius* et *T. tubifex*. La ligne entourant les cercles représente le Tl qui est potentiellement disponible au transfert vers le prédateur (HDP, HSP et organites).

Il y avait  $29 \pm 5$  % du Tl qui était dans le cytosol des cellules de *T. tubifex* (Figure 12). Des proportions égales de Tl se retrouvaient dans la fraction des HSP, des granules et des organites. Donc, *T. tubifex* utiliserait autant la MT dans les HSP que les granules comme méthode pour détoxiquer le Tl. Il y avait à peu près 20 % de la quantité de Tl qui pouvait être toxique, étant situé dans les fractions sensibles ou potentiellement sensibles et ~52 % qui était détoxiqué (Figure 13).

### 4.2.3 Détoxification du Ni et du Tl

Nos résultats suggèrent qu'il y a une « préférence » chez les deux types de proies à utiliser la MT pour détoxiquer le Ni plutôt que les granules (lysosomes non compris). Le Ni présent dans la fraction des HSP était probablement lié à des protéines de détoxification comme la MT, comme c'est le cas pour le Cd (Giguère et al. 2003). Les HSP était également importantes pour lier le Tl. Cependant, *T. tubifex* avait autant de Tl dans la fraction des HSP que dans les granules.

Il n'existe pas de données sur la distribution subcellulaire du Tl chez aucun animal aquatique. Il n'y a pas d'informations non plus sur la présence de Ni dans des granules d'insectes, ni si la MT chez les insectes se lie au Ni. Des insectes, comme *Hexagenia limbata*, *Baetis* spp. et *Epeorus albertae*, utilisent la MT comme moyen de détoxiquer le Cd (Cain et al. 2004, Michaud et al. 2005). Cependant, cela diffère selon le métal, puisque les deux dernières espèces utilisent majoritairement les granules pour séquestrer le Cu et le Zn (Cain et al. 2004). Des informations sur le Ni existent néanmoins chez d'autres oligochètes. Vijver et al. (2006) ont regardé la répartition subcellulaire de différents métaux chez un oligochète terrestre, *Aporrectodea caliginosa*. La fraction des granules était très importante pour lier le Ni (~85%). Ce résultat pour le Ni diffère grandement du nôtre, cependant il faut mentionner que le protocole de fractionnement utilisé dans cette étude diffère également du nôtre. Leur première centrifugation était effectuée à une vitesse de 10 000 x g (800 x g dans notre étude), signifiant que des lysosomes se sont probablement retrouvés dans la fraction des granules. Ceci présume

que le contenu en Ca des particules de petite taille, qui n'auraient pas sédimenté à 800 x g, était assez élevé pour résister à la digestion au NaOH (Figure 9). Dans une étude en laboratoire de Steen Redeker et al. (2007) sur *T. tubifex*, ~24 % du Cd était dans la fraction des granules et ~6 % dans celle des HSP. Wallace et al. (1998) ont trouvé que chez l'oligochète aquatique *Limnodrilus hoffmeisteri* présent à un site contaminé au Cd, celui-ci était également présent dans la fraction des granules en plus grande proportion que dans la fraction des HSP. Par contre, ils mentionnent qu'à un site non-contaminé, *L. hoffmeisteri* avait peu (2%) de Cd associé aux granules. La proportion du Cd associée aux granules peut donc varier en importance chez une même espèce de Tubificidae selon son historique d'exposition au Cd. Chez des organismes autres que les insectes et les oligochètes, nous savons que le Ni peut se retrouver en grande partie dans la fraction des granules chez les tête-de-boules (D. Lapointe, INRS-ETE, non publié). Nott et Nicolaidou (1994) ont également détecté du Ni (sans qu'il soit quantifié) dans des granules de glandes digestives du gastropode *Cerithium vulgatum*. Le Ni a déjà été retrouvé dans la fraction des HSP chez la perchaude, mais en faible proportion étant plutôt situé dans la fraction des HDP (Giguère et al. 2006). Le Ni n'est pas un métal considéré comme ayant une grande affinité pour la MT, mais il induirait la production de MT dans l'intestin du grand corégone exposé à une diète de 1 mg Ni g<sup>-1</sup> (Ptashynski et al. 2002).

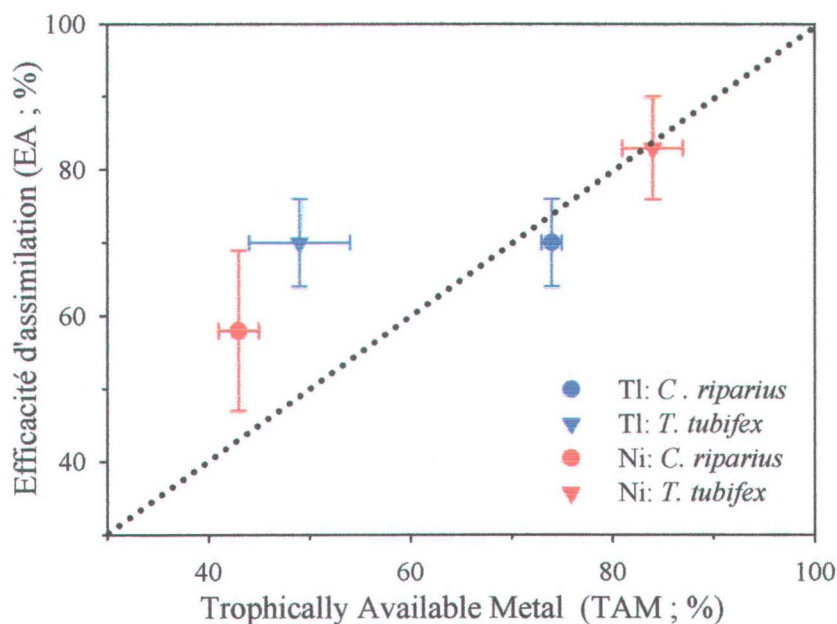
La proportion de Ni et de Tl qui est dite « détoxiquée » est assez semblable chez les deux espèces (45 à 65 %; Figure 11 et 13). Donc, environ la moitié de la quantité de métaux accumulés n'aurait pas d'effets toxiques sur ces animaux. Entre 15 et 40 % du Ni et du Tl était dans les fractions sensibles ou potentiellement sensibles et donc pouvait possiblement exercer des effets toxiques chez ces deux espèces. On ne connaît toujours pas l'effet que peuvent avoir les métaux contenus dans la fraction des débris cellulaires, ceux-ci étant constitués d'un mélange de membranes, noyaux et cellules intactes.

### 4.3 Effacité d'assimilation de *Sialis velata* pour le Ni et le Tl selon le type de proie

Il y a peu d'informations dans la littérature sur la facilité du transfert du Ni et du Tl dans une chaîne alimentaire aquatique. Dans le cas du transfert entre l'insecte *C. riparius* et l'insecte prédateur *S. velata*, nos résultats montrent que les deux métaux sont très facilement transférables entre ces deux niveaux trophiques, puisque les efficacités d'assimilation sont supérieures à 50 %. On retrouve la même tendance lorsque *S. velata* ingère *T. tubifex*. Nos résultats suggèrent que dans la nature le Ni et le Tl seront transférés efficacement le long des chaînes trophiques et qu'ils pourront s'accumuler et exercer des effets aux sommets des chaînes alimentaires aquatiques. Ceci dit, la réalisation de ce potentiel dépendrait de l'importance du transfert trophique (par rapport à la prise en charge à partir de l'eau) pour ces deux métaux, ainsi que du taux de perte physiologique à chaque niveau trophique.

Pour expliquer la facilité avec laquelle *S. velata* assimilait le Ni et le Tl, nous avons utilisé des données concernant leurs distributions subcellulaires chez ses proies. Selon Wallace et Luoma (2003) et plusieurs autres auteurs, la somme des pourcentages des fractions subcellulaires desquelles le consommateur peut assimiler la totalité du métal (HDP + HSP + organites) se nomme TAM pour « Trophically Available Metal ». La proportion de Ni qui était présente dans le TAM chez *C. riparius* ( $43 \pm 2$  %) est semblable au pourcentage qui était assimilé par *S. velata* ( $58 \pm 11$  %), quoiqu'il n'y ait pas une relation 1:1 entre les deux (Figure 14). Cette relation est plus étroite chez *T. tubifex* avec 84 % du Ni dans la partie TAM et une efficacité d'assimilation de 83 %. Dans le cas du Tl chez *C. riparius*, l'efficacité d'assimilation du Tl ( $70 \pm 3$  %) et la valeur du TAM ( $74 \pm 1$  %) sont très proches de la relation 1:1. Cependant, ce n'est pas le cas pour le Tl chez *T. tubifex*, pour qui l'efficacité d'assimilation ( $70 \pm 6$  %) est plus élevée que le TAM ( $49 \pm 7$  %). Il y a donc une légère sous-estimation de la quantité de métal biodisponible pour le prédateur dans deux cas sur quatre. Le TAM indique donc la quantité minimum de Ni et de Tl pouvant être transférée au prédateur.

Nous pouvons tester l'hypothèse que les débris cellulaires étaient également assimilés par le prédateur et inclure le pourcentage de métal de cette fraction dans le TAM. Dans ce cas, la relation entre le TAM et le pourcentage d'efficacité d'assimilation est en dessous de 1:1, exception de *T. tubifex* contaminés au T1 où la relation est près de 1:1 (résultats non illustrés). Cependant, il est possible qu'une partie des métaux présents dans les débris cellulaires chez les proies ait été assimilée par *S. velata*, car ce prédateur garde la nourriture jusqu'à un jour dans son tractus digestif. Ceci peut résulter à une digestion plus complète des proies que celle qui existe chez les animaux étudiés auparavant.



**Figure 14.** Relation entre les efficacités d'assimilation (EA) du Ni (symboles rouges) et du Tl (symboles bleus) par le prédateur *S. velata* et les proportions de Ni et de Tl dans ses proies qui sont théoriquement disponibles pour la prise en charge (TAM ; n = 4 ou 5; Moyenne  $\pm$  Écart-type). La ligne pointillée représente une relation 1:1.



## 5. Conclusion

### 5.1 Synthèse des résultats

Chez les deux espèces de proies, le Ni et le Tl se retrouvaient en plus grande proportion dans la fraction des protéines stables à la chaleur (HSP) contenant les métallothionéines (MT). Cependant, le pourcentage de Tl dans la fraction des granules était également important chez *T. tubifex*. Le pourcentage de Ni et de Tl n'a pas été mesuré dans les lysosomes seuls. Il en ressort néanmoins que les MT doivent être une méthode importante de détoxification de ces deux métaux chez ces invertébrés, ce qui n'avait jamais été observé auparavant. Moins de la moitié de la quantité de Ni et de Tl présente chez ces proies se retrouvait liée aux protéines dénaturées et aux organites et pouvait avoir des effets toxiques à l'organisme.

La moitié et plus du Ni et du Tl se retrouvait dans des fractions dites biodisponibles pour le prédateur. Pour le Ni, une plus forte proportion de ce métal dans le TAM était associée à une plus importante assimilation par le prédateur (Figure 14). Par contre, pour le Tl, l'efficacité d'assimilation de ce métal ne variait pas entre les deux types de proies malgré une différence dans leur valeur du TAM. De plus, nous retrouvons dans deux des quatre cas que le TAM sous-estime l'efficacité d'assimilation par *S. velata* (Figure 14) et donc la proportion de Ni et de Tl qui était réellement disponible pour ce prédateur. L'efficacité d'assimilation de ces métaux étant élevée, le Ni et le Tl pourraient potentiellement être facilement transférés le long des chaînes alimentaires.

D'après notre étude, le fractionnement subcellulaire des métaux chez les proies serait un bon indice de l'efficacité du transfert minimum du Ni et du Tl d'un niveau trophique à un autre, bien que la détermination des fractions biodisponibles pour le prédateur reste à être plus approfondie.

## 5.2 Perspectives

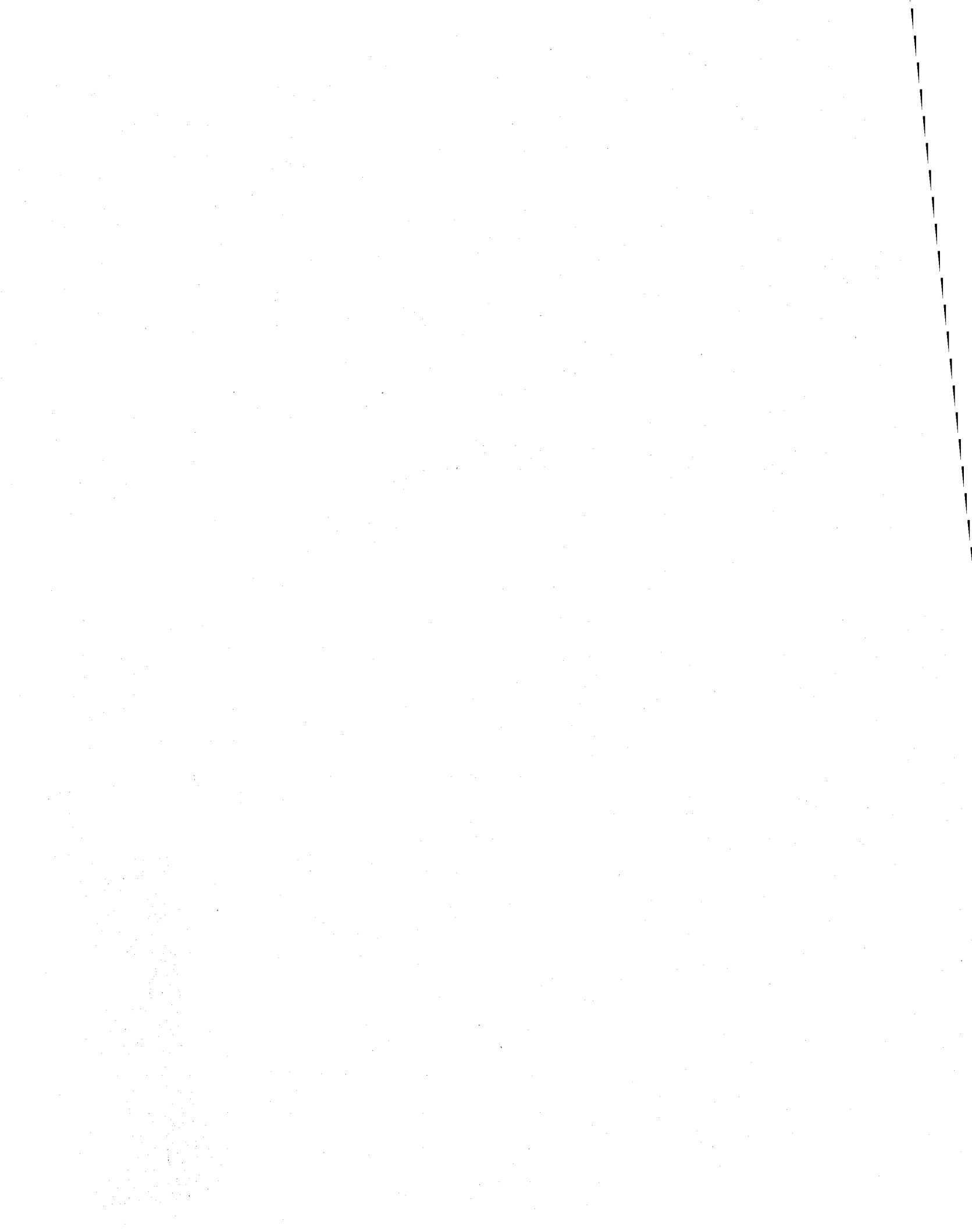
En faisant cette étude, bien des questions sont survenues et n'ont pas encore trouvé réponses. Par exemple, il serait intéressant de connaître la principale voie d'exposition du Ni et du Tl chez les proies *C. riparius* et *T. tubifex*. Il n'a pas encore été établi que ces deux métaux entraient dans ces animaux principalement par leur nourriture (les sédiments) ou par l'eau. Dans notre étude, le transfert trophique du Ni et du Tl s'avérait être très efficace, mais nous ne savons guère si le prédateur perd facilement les métaux qu'il a accumulés. Un prédateur qui assimile efficacement un métal venant de ces proies pourrait ne pas avoir une grande concentration de ce métal dans son corps s'il y a une perte physiologique rapide. Le Tl est perdu facilement chez certaines algues (Hassler et al. 2007). Il serait donc utile d'établir un modèle cinétique de bioaccumulation du Ni et du Tl chez les deux espèces de proies en tenant compte des deux voies d'entrées possibles et les pertes de ces métaux, tout comme celui qui a été testé pour *S. velata* (Croisetière et al. 2006).

Nous avons vu que le Tl est un métal de chimie fort complexe à cause de ses deux états d'oxydation. Il serait intéressant de déterminer si la spéciation du Tl a des conséquences pour son accumulation chez les proies et pour son transfert des proies vers le prédateur.

Lors du fractionnement subcellulaire, il a fallu faire un compromis entre l'efficacité d'homogénéisation des proies et l'intégrité des organites. Il serait donc utile de connaître la composition exacte de la fraction des débris cellulaires pour mieux interpréter les résultats, ainsi que la pureté de toutes les autres fractions. En même temps, le contenu de la fraction des granules et des organites pourrait également être observé et analysé pour connaître le type de granules utilisés chez les proies pour séquestrer les métaux, ainsi que le rôle des lysosomes dans le stockage du Ni et Tl. Des changements dans la série de centrifugation pourraient être apportés pour isoler les lysosomes servant au stockage des métaux ou les regrouper avec les granules. De plus, aucune étude n'a été effectuée sur l'affinité du Tl pour la métallothionéine (MT) et d'avantage d'informations sont requises sur celle entre le Ni et le MT.



Il nous manque aussi des mesures sur le terrain du Ni et du Tl chez les animaux aquatiques. Nous avons très peu de connaissances sur l'exposition à ces métaux des animaux occupant des habitats différents.



## 6. Liste des références

- Amerind Publishing Co., 1980. Aquatic Oligochaeta worms: Taxonomy, ecology and faunistic studies in the U.S.S.R. 211 pp.
- Bervoets, L., Giovanna, M., De Cooman, W., Goddeeris, B., Blust, R., 2004. Caged midge larvae (*Chironomus riparius*) for the assessment of metal bioaccumulation from sediments in situ. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 443-454.
- Blackmore, G., Wang, W.-X., 2004. The transfer of cadmium, mercury, methylmercury, and zinc in an intertidal rocky shore food chain. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 307, 91-110.
- Bonneris, E., Giguère, A., Perceval, O., Masson, S., Hare, L., Campbell, P.G.C., 2005. 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. *Environmental Pollution* 135, 195-208.
- Bonnet, C., 2000. Développement de bioessais sur les sédiments et applications à l'étude, en laboratoire, de la toxicité de sédiments dulçaquicoles contaminés. Thèse de doctorat, Université de Metz, Metz, France, 250 pp.
- Borgmann, U., Norwood, W.P., Reynoldson, T.B., Rosa, F., 2001. Identifying cause in sediment assessments: bioavailability and the Sediment Quality Triad. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58, 950-960.
- Borgmann, U., Cheam, V., Norwood, W.P., Lechner, J., 1998. Toxicity and bioaccumulation of thallium in *Hyalella azteca*, with comparison to other metals and prediction of environmental impact. *Environmental Pollution* 99, 105-114.
- Butler, M.G., Anderson, D.H., 1990. Cohort structure, biomass, and production of a merovoltine *Chironomus* population in a Wisconsin bog lake. *Journal of the North American Benthological Society* 9, 180-192.
- Cain, D.J., Luoma, S.N., Carter, J.L., Fend, S.V., 1992. Aquatic insects as bioindicators of trace-element contamination in cobble-bottom rivers and streams. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49, 2141-2154.

- Cain, D.J., Luoma, S.N., Wallace, W.G., 2004. Linking metal bioaccumulation of aquatic insects to their distribution patterns in a mining-impacted river. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1463-1473.
- Campbell, P.G.C., 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. – In: Tessier, A. and Turner, D.R. (eds.): *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. - John Wiley & Sons Ltd; New York, N.Y., p. 45-102.
- Canterbury, L.E., 1978. Studies of the genus *Sialis* (Sialidae: Megaloptera) in eastern North America. Thèse de doctorat, University of Louisville, Louisville, Kentucky, 93 pp.
- Chapman, P.M., Allen, H.E., Godtfredsen, K., Zraggen, M.N., 1996. Evaluation of bioaccumulation factors in regulating metals. *Environmental Science and Technology* 30, 448-452.
- Charbonneau, P., Hare, L., 1998. Burrowing behavior and biogenic structures of mud-dwelling insects. *Journal of the North American Benthological Society* 17, 239-249.
- Chau, Y.K., Kulikovskiy-Cordeiro, O.T.R., 1995. Occurrence of nickel in the Canadian environment. *Environmental Reviews* 3, 95-120.
- Cheam, V., Lechner, J., Desrosiers, R., 1998. Laser-induced fluorescence determination of thallium in sediments. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 360, 81-85.
- Cheam, V., 2001. Thallium contamination of water in Canada. *Water Quality Research Journal of Canada* 36, 851-878.
- Cheung, M., Wang, W.-X., 2005. Influence of subcellular metal compartmentalization in different prey on transfer of metals to a predatory gastropod. *Marine Ecology Progress Series* 286, 155-166.
- Croisetière, L., Hare, L., Tessier, A., 2006. A field experiment to determine the relative importance of prey and water as sources of As, Cd, Co, Cu, Pb, and Zn for the alderfly *Sialis velata*. *Environmental Science and Technology* 40, 873-879.
- Croteau, M.N., Hare, L., Tessier, A., 1998. Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. *Environmental Science and Technology* 32, 1348-1353.

- Elliott, J.M., 1996a. British freshwater Megaloptera and Neuroptera: a key with ecological notes. Freshwater biological association, Ambleside, U.K., Scientific publication no. 54, 72 pp.
- Elliott, J.M., 1996b. Temperature-related fluctuations in the timing of emergence and pupation of Windermere alder-flies over 30 years. *Ecological Entomology* 21, 241-247.
- Environnement Canada, 1994. Le nickel et ses composés – LSIP1. Cat No. En 40-215/43F.
- Environnement Canada, 1997. Méthodes d'essai biologique: essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*) dans les sédiments. Cat No. En 49-24/1-32F.
- Evans, E.D., Neunzig, H.H., 1996. Megaloptera and aquatic Neuroptera. In: An introduction to the aquatic insects of North America. 3<sup>rd</sup> edition. R.W. Merritt et K.W. Cummins (Eds), Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa, pp. 298-308.
- Galván-Arzate, S., Santamaria, A., 1998. Thallium toxicity. *Toxicology Letters* 99, 1-13.
- Gauthier, C., Couture, P., Pyle, G.C., 2006. Metal effects on fathead minnows (*Pimephales promelas*) under field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 353-364.
- Giguère, A., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Perceval, O., Pinel-Alloul, B., Pellerin, J., 2003. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 64, 185-200.
- Giguère, A., Campbell, P.G.C., Hare, L., Couture, P., 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 77, 178-189.
- Gillis, P.L., Dixon, D.G., Borgmann, U., Reynoldson, T.B., 2004. Uptake and depuration of cadmium, nickel, and lead in laboratory-exposed *Tubifex tubifex* and corresponding changes in the concentration of a metallothionein-like protein. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 76-85.

- Hare, L., 1992. Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation and toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 22, 327-369.
- Hare, L., Campbell, P.G.C., 1992. Temporal variations of trace metals in aquatic insects. *Freshwater Biology* 27, 13-27.
- Hare, L., Tessier, A., Borgmann, U., 2003. Metal sources for freshwater invertebrates: pertinence for risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment* 9, 779-793.
- Hassler, C.S., Chafin, R.D., Klinger, M.B., Twiss, M.R., 2007. Application of the biotic ligand model to explain potassium interaction with thallium uptake and toxicity to plankton. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 1139-1145.
- Hopkin, S.P., 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Elsevier Applied Science, London, U.K., 366 pp.
- Jaques, A.P., 1987. Summary of emissions of antimony, arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, manganese, mercury and nickel in Canada. Direction des programmes industriels, Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 44 pp.
- Kajak, Z., Prus, P., 2004. Influence of the population density and the amount of food on *Chironomus plumosus* (L.) and Tubificidae. Laboratory experiments. *Polish Journal of Ecology* 52, 47-53.
- Lazim, M.N., Learner, M.A., 1986. The life-cycle and productivity of *Tubifex tubifex* (Oligochaeta; Tubificidae) in the Moat-Feeder stream, Cardiff, South Wales. *Holarctic Ecology* 9, 185-192.
- Lin, T.-S., Nriagu, J., 1999. Thallium speciation in the Great Lakes. *Environmental Science and Technology* 33, 3394-3397.
- Lin, T.-S., Nriagu, J.O., Wang, X.-Q., 2001. Thallium concentration in lake trout from Lake Michigan. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 67, 921-925.
- Locklin, J.L., Arsuffi, T.L., Bowles, D.E., 2005. Life history of *Sialis* (Megaloptera: Sialidae) in a lentic and lotic ecosystem in Central Kansas. *American Midland Naturalist* 155, 50-62.

- Meyer, J.S., Adams, W.J., Brix, K.V., Luoma, S.N., Mount, D.R., Stubblefield, W.A., Wood, C.M., 2005. Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms. SETAC Press, Pensacola, Florida, USA, 303 pp.
- Michaud, A.L., Hare, L., Campbell, P.G.C., 2005. Exchange rates of cadmium between a burrowing mayfly and its surroundings in nature. *Limnology and Oceanography* 50, 1707-1717.
- Munger, C., Hare, L., Tessier, A., 1999. Cadmium sources and exchange rates for *Chaoborus* larvae in the field. *Limnology and Oceanography* 44, 1763-1771.
- Muysen, B.T.A., Brix, K.V., Deforest, D.K., Janssen, C.R., 2004. Nickel essentiality and homeostasis in aquatic organisms. *Environmental Reviews* 12, 113-131.
- Nott, J.A., Nicolaidou, A., 1994. Variable transfer of detoxified metals from snails to hermit crabs in marine food chains. *Marine Biology* 120, 369-377.
- Nriagu, J.O., 1998. Thallium in the environment. John Wiley & Sons, New-York, USA, 284 pp.
- Nriagu, J.O., Pacyna, J.M., 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333, 134-139.
- Pacyna, J.M., Scholtz, M.T., Li, Y.-F., 1995. Global budget of metal sources. *Environmental Reviews* 2, 145-159.
- Penry, D.L., 1998. Applications of efficiency measurements in bioaccumulation studies: definitions, clarifications, and a critique of methods. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 1633-1639.
- Ptashynski, M.D., Pedlar, R.M., Evans, R.E., Baron, C.L., Klaverkamp, J.F., 2002. Toxicology of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology* 58, 229-247.
- Pyle, G.G., Rajotte, J.W., Couture, P., 2005. Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 287-312.
- Reinfelder, J.R., Fisher, N.S., 1991. The assimilation of elements ingested by marine copepods. *Science* 251, 794-796.

- Reinfelder, J.R., Fisher, N.S., Luoma, S.N., Nichols, J.W., Wang, W.-X., 1998. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: A critique of the kinetic model approach. *Science of the Total Environment* 219, 117-135.
- Ristola, T., 2000. Assessment of sediment toxicity using the midge *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). Biology, University of Joensuu, Joensuu, Finland, 101 pp.
- Ristola, T., Pellinen, J., Ruokolainen, M., Kostamo, A., Kukkonen, J., 1999. Effect of sediment type, feeding level, and larval density on growth and development of a midge (*Chironomus riparius*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 756-764.
- Roesijadi, G., 1992. Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 22, 81-114.
- Ross, H.H., 1937. Studies of Nearctic aquatic insects. I. Nearctic alder flies of the genus *Sialis*. *Illinois Natural History Survey Bulletin* 21, 56-77.
- Roy, I., Hare, L., 1999. Relative importance of water and foods as cadmium sources to the predatory insect *Sialis velata* (Megaloptera). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 1143-1149.
- Silverman, H., Steffens, W.L., Dietz, T.H., 1983. Calcium concretions in the gills of freshwater mussel serve as a calcium reservoir during periods of hypoxia. *Journal of Experimental Zoology* 227, 177-189.
- Smith, D.G., 2001. Pennak's freshwater invertebrates of the United States: Porifera to Crustacea, 4<sup>th</sup> Edition. John Wiley and Sons, New-York, N.Y. 638 pp.
- Steen Redeker, E., van Campenhout, K., Bervoets, L., Reijnders, H., Blust, R., 2007. Subcellular distribution of Cd in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*, implications for trophic availability and toxicity. *Environmental Pollution* 148: 166-175.
- Sullivan, P.A., Robinson, W.E., Morse, M.P., 1988. Isolation and characterization of granules from the kidney of the bivalve *Mercenaria mercenaria*. *Marine Biology* 99, 359-368.
- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M., Usseglio-Polatera, P., 2002. Invertébrés d'eau douce : systématique, biologie, écologie. CNRS Éditions, Paris, France. 587 pp.



- Twinning, B.S., Twiss, M.R., Fisher, N.S., 2003. Oxidation of thallium by freshwater plankton communities. *Environmental Science and Technology* 37, 2720-2726.
- Twiss, M.R., Twinning, B.S., Fisher, N.S., 2004. Bioconcentration of inorganic and organic thallium by freshwater phytoplankton. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 968-973.
- Twiss, M.R., Twinning, B.S., Fisher, N.S., 2003. Partitioning of dissolved thallium by seston in Lakes Erie and Ontario. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60, 1369-1375.
- Vijver, M.G., Van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., Van Straalen, N.M., Peijnenburg, W.J.G.M., 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: A review. *Environmental Science and Technology* 38, 4705-4712.
- Vijver, M.G., Van Gestel, C.A.M., Van Straalen, N.M., Lanno, R.P., Peijnenburg, W.J.G.M., 2006. Biological significance of metals partitioned to subcellular fractions within earthworms (*Aporrectodea caliginosa*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 807-8174.
- Wallace, W.G., Lee, B.-G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series* 249, 183-197.
- Wallace, W.G., Lopez, G.R., 1996. Relationship between subcellular cadmium distribution in prey and cadmium trophic transfer to a predator. *Estuaries* 19, 923-930.
- Wallace, W.G., Lopez, G.R., 1997. Bioavailability of biologically sequestered cadmium and the implications of metal detoxification. *Marine Ecology Progress Series* 147, 149-157.
- Wallace, W.G., Lopez, G.R., Levinton, J.S., 1998. Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. *Marine Ecology Progress Series* 172, 225-237.

Efficacité d'assimilation de *Sialis velata* pour le nickel et le thallium présents chez ses proies; importance de la distribution subcellulaire des métaux chez les proies

- Wallace, W.G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Marine Ecology Progress Series* 257, 125-137.
- Walshe, B.M., 1947. Feeding mechanisms of *Chironomus riparius* larvae. *Nature* 160, 474.
- Wang, W.-X., Fisher, N.S., 1999. Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: a synthesis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2034-2045.
- Wang, W.-X., Rainbow, P.S., 2006. Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms. *Environmental Chemistry* 3, 395-399.
- Warren, L., Tessier, A., Hare, L., 1998. Modeling cadmium accumulation by benthic invertebrates in situ: the relative contribution of sediment and overlying water reservoirs to organism cadmium concentrations. *Limnology and Oceanography* 43, 1442-1454.
- World Health Organization, 1996. Thallium. *Environmental Health Criteria* 182. Geneva, Switzerland.

**DEUXIÈME PARTIE : ARTICLE**



# Nickel and thallium transfer from prey to predator

*Julie Dumas and Landis Hare<sup>1</sup>*

Institut National de la Recherche Scientifique – Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE), Université du Québec, 490 rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9

For submission to Environmental Pollution as an article

Running head: Ni and Tl transfer and subcellular distribution

---

<sup>1</sup> Corresponding author (landis@ete.inrs.ca)

## Résumé de l'article

L'accumulation du nickel et du thallium chez les animaux aquatiques a été peu étudiée, même si ces métaux sont présents à des concentrations potentiellement nocives dans certains lacs. Pour mesurer l'accumulation et le transfert de ces contaminants le long de chaînes alimentaires, nous avons exposé deux types d'invertébrés, un insecte (*Chironomus riparius*) et un ver (*Tubifex tubifex*), à des sédiments contaminés par ces métaux en laboratoire. Nous avons alors mesuré la distribution subcellulaire du Ni et du Tl chez ces invertébrés pour mieux connaître la probabilité qu'ils aient des effets toxiques et qu'ils soient transférés à des maillons supérieurs des chaînes trophiques. Les deux espèces ont détoxiqué au moins la moitié du Ni et du Tl accumulés, étant situés dans les fractions qui ont un rôle connu de détoxification des métaux. Nous avons estimé qu'une grande partie du métal présent chez ces animaux (43-84 %) pouvait être disponible pour le transfert vers les prédateurs selon un indice souvent utilisé dans la littérature. Pour tester cette prédiction, nous avons nourri un prédateur, l'insecte *Sialis velata*, avec ces invertébrés et nous avons mesuré l'efficacité avec laquelle l'insecte assimile le Ni et le Tl venant de chaque type de proie. La majorité des deux métaux traces (58-83 %) était assimilée par le prédateur, ce qui suggère que ces contaminants pourraient être facilement transférés le long de chaînes alimentaires et que les modèles décrivant la bioaccumulation du Ni et du Tl chez les animaux aquatiques devraient considérer la nourriture comme source de ces métaux. La proportion de métaux qui pourrait potentiellement être disponible pour le consommateur et le pourcentage réellement assimilé par *S. velata* correspondaient à une relation 1:1 dans deux cas sur les quatre combinaisons proie-métal étudiées. Pour les deux autres cas, les résultats du fractionnement sous-estimaient les efficacités d'assimilation mesurées chez le prédateur. Une certaine quantité de métaux présente dans la fraction des débris cellulaires ou les granules pourrait donc être assimilable pour les prédateurs.

## Abstract

The accumulation of nickel and thallium by aquatic animals has been little studied despite the fact that these metals are present at potentially harmful concentrations in some lakes. To measure the propensity of animals for accumulating and transferring these contaminants along food chains, we exposed two types of invertebrates, an insect (*Chironomus riparius*) and a worm (*Tubifex tubifex*), to these metals spiked into sediment. We then measured the subcellular distribution of Ni and Tl in these invertebrates to better understand the likelihood of these metals having toxic effects and of being transferred to higher trophic levels. In both species, at least half of their Ni and Tl was present in fractions that are purportedly “detoxified” (granules and metal-binding proteins), which leaves room for toxic effects to occur. Furthermore, based on information in the literature, we estimate that much of the metal in these animals (43-84 %) is available for transfer to a predator. To test this prediction, we fed these invertebrates to a predator, the alderfly *Sialis velata*, and measured the efficiency with which this insect assimilated Ni and Tl from each prey type. The majority of both trace metals (58-83 %) was assimilated by the predator, which suggests that these contaminants would be easily transferred along aquatic food chains and that models describing Ni and Tl accumulation by aquatic animals should consider food as a source of these metals. The proportion of metal that could potentially be taken up by a consumer and the actual percentage assimilated by *S. velata* fell on a 1:1 line for 2 of the 4 prey-metal combinations, whereas in 2 cases results for prey fractionation underestimated assimilation efficiencies measured for the predator. Metal present in the cellular debris and granules could be partially available for the predator.

**Keywords:** Nickel; Thallium; Subcellular partitioning; Trophic transfer; Detoxification

## 1. Introduction

Canada is the second largest source of the world's nickel (Ni; Chau and Kulikovsky-Cordeiro 1995). Canadian lakes located in regions where Ni is mined and smelted can be heavily contaminated with this trace metal (Gunn 1995, Pyle et al. 2005), and animals living in such lakes suffer the consequences (Borgmann et al. 2001). Likewise, the trace metal thallium (Tl) can be released by the smelting of sulfidic ores but is also a product of coal burning and cement manufacturing (Nriagu and Pacyna 1988, Pacyna and Pacyna 2001, Lis et al. 2003). The concentrations of Tl in trout from Lake Michigan are reported to be of concern for humans consuming these fish (Lin et al. 2001).

Despite their potential for toxic effects, the accumulation of Ni and Tl by aquatic animals has been little studied. Even less information is available on their propensity for being transferred from prey to predators along aquatic food chains. In laboratory experiments, aquatic animals are often exposed to these metals in water only (Ni: Pane et al. 2003, Keithly et al. 2004; Tl: Zitko and Carson 1975, Pickard et al. 2001), despite the fact that food can be a major source of their trace metals (Hare et al. 2003, Meyer et al. 2005).

To fill some of these knowledge gaps, we studied the transfer of Ni and Tl from two common aquatic invertebrates to a widespread predatory insect. As prey, we chose two widespread invertebrates that are used in sediment toxicity tests as well as being members of two of the dominant groups living in freshwater sediments: insects (*Chironomus riparius*; Diptera, Chironomidae) and worms (*Tubifex tubifex*; Oligochaeta, Tubificidae). Our predator of choice, *Sialis velata* (Insecta, Megaloptera), accumulates many trace metals mainly from its prey (Croisetière et al. 2006), which include both chironomids and oligochaetes. Larvae of the genus *Sialis* burrow in the sediment of lakes (Charbonneau and Hare 1998) and rivers throughout the Holarctic region (Elliott 1996).

To determine if Ni and Tl are readily transferred along food chains, we measured the efficiency with which *S. velata* accumulates these metals from the two prey types. To



explain its propensity for assimilating these metals, we also measured Ni and Tl distributions in prey cells because the manner in which metals are detoxified and stored in cells is reported to influence their transfer to higher trophic levels (Wallace and Lopez 1996, 1997, Wallace and Luoma 2003, Seebaugh et al. 2006, Wang and Rainbow 2006).

## 2. Materials and methods

All labware for metal analyses was soaked for 1 d in 10 % HNO<sub>3</sub>, rinsed 6 times with ultrapure water and dried in a laminar flow hood.

### 2.1. Field techniques and prey rearing

*Sialis velata* larvae, water and sediment were collected from Lake St. Joseph (46°53' N, 71°38' W), a Canadian Shield lake located near Quebec City, QC, Canada. This lake is distant from industrial emissions and contains low concentrations of metals (Cd, Cu, and Zn) in sediment, water and larvae of *S. velata* (Hare and Campbell 1992, Warren et al. 1998). Sediments and *S. velata* were collected at a depth of ~5 m using an Ekman grab. Sediments were sieved in the field (1 mm mesh-aperture net) to extract *S. velata* and larvae were transported to the laboratory in plastic bags containing lakewater and some sediment. In the laboratory, unsieved sediment and lakewater for prey exposure were stored at 4 °C until use, whereas individual *S. velata* were held in 20 mL of non-aerated lakewater (changed once per week) in 30 mL polystyrene vials, in the dark, at 10 °C.

*Chironomus riparius* larvae to be used as prey for *S. velata* were obtained by the Centre d'Expertise et d'Analyse Environnementale du Québec (Québec, Canada) and were cultured continuously in glass aquaria containing ~3 cm depth of fine clean sand and ~8 L of reconstituted water ([Ca<sup>2+</sup>] 0.8 mM, [Cl<sup>-</sup>] 0.95 mM, [K<sup>+</sup>] 50 µM, [Mg<sup>2+</sup>] 0.25 mM, [Na<sup>+</sup>] 1 mM, [SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>] 0.62 mM). A second prey species, *Tubifex tubifex* (purchased from Aquatic Research Organisms, Hampton, VA, USA), was held in glass aquaria containing ~3 cm of sediment and ~8 L of reconstituted water. For both prey species, half of the water in their aquaria was changed twice weekly after which fish food (Aquatox;

Aquatic Eco-Systems Inc., Apopka, FL, USA) was added (0.5 and 1 g, respectively). Prey were cultured at room temperature at an 18:6 light:dark ratio.

## 2.2. Sediment spiking for prey metal exposure

Sediment from Lake St. Joseph was spiked with a solution containing 1 mCi of  $^{204}\text{TlCl}_3$  (Isotope products, Valencia, CA, USA) and 0.4 mg of  $\text{TlNO}_3$  to obtain a nominal total Tl concentration of  $8 \text{ nmol g}^{-1}$  dry wt; this Tl concentration has been reported from Tl-contaminated Canadian lakes (Cheam et al. 1998). Likewise, we added 5 mCi of  $^{63}\text{NiCl}_2$  (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) and 1.456 g of  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  to a separate batch of sediment to obtain a nominal total Ni concentration of  $10 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$  dry wt; this Ni concentration has been reported from contaminated lakes located near Sudbury, Ontario (Borgmann et al. 2001). These spiked sediments were mixed for 10 min each day over 3 d then held at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  for a minimum of 2 weeks prior to use; experiments using these contaminated sediments were carried out over the following 3 (Ni) or 12 (Tl) months. To measure the total Ni and Tl concentrations in spiked sediments,  $\sim 100 \text{ mg}$  subsamples were frozen at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ , freeze-dried, weighed and digested in 2.5 mL of 70 %  $\text{HNO}_3$  for 5 d followed by the addition of 2 mL of 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 1 d. These digests were diluted with ultrapure water to a final volume of 50 mL and total Ni and Tl concentrations were measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (Thermo Electron Corp., model X7) using external calibration with standards and rhodium as an internal standard.

## 2.3. Prey metal-exposure

Prey were acclimated for 1-2 d, at  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ , in a plastic basin containing sand (*C. riparius*) or sediment (*T. tubifex*) and reconstituted water ( $[\text{Ca}^{+2}] \sim 80 \text{ } \mu\text{M}$ ,  $[\text{Cl}^{+2}] \sim 95 \text{ } \mu\text{M}$ ,  $[\text{K}^{+1}] \sim 5 \text{ } \mu\text{M}$ ,  $[\text{Mg}^{+2}] \sim 25 \text{ } \mu\text{M}$ ,  $[\text{Na}^{+2}] \sim 100 \text{ } \mu\text{M}$ ,  $[\text{SO}_4^{+2}] \sim 62 \text{ } \mu\text{M}$ ). Following acclimation, prey were exposed at  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  to Ni or Tl in 1-L high-density polyethylene bottles (HDPE; Nalgene, New York, NY, USA) containing spiked sediment (5 mL per individual) and reconstituted water (10 mL per individual; prepared 1 d in advance) until they attained a steady state in their metal concentrations ( $\sim 14 \text{ d}$ ; data not shown). Contaminated prey were then held in groups of 3-4 in polystyrene vials (30 mL) containing uncontaminated

Lake St. Joseph sediment (10 mL) and reconstituted water (20 mL) for 24 h, at 10 °C, to eliminate their contaminated gut contents. Groups of prey were used for subcellular fractionation, given to *Sialis velata* to measure assimilation efficiencies, or used to determine metal specific-activities in animals.

#### 2.4. Subcellular fractionation

Depurated prey (20 pooled individuals) were placed in preweighed 1.5 mL polypropylene microcentrifuge tubes (Fisher Scientific, Ontario, Canada), weighed and then stored at -80 °C. Just prior to fractionation, prey samples were thawed on ice, transferred to a glass potter and homogenized by 25 turns of a round glass pestle in 25 mM TRIS buffer at a pH of 7.4. The tissue to buffer ratio was 1:8 for *C. riparius* and 1:4 for *T. tubifex*. Homogenates were transferred back into their original microcentrifuge tubes and weighed. Three 30- $\mu$ L aliquots were removed from each sample to measure metal concentrations in the homogenate. Aliquots were placed on pre-weighed pieces of Teflon sheeting, weighed, and frozen in 1.5 mL polypropylene microcentrifuge tubes at -80 °C for later analysis.

Homogenates were reweighed and fractionated according to the scheme shown in Fig. 1 so as to obtain 5 fractions: heat denatured proteins (HDP); heat stable proteins (HSP) such as the metallothionein (MT); organelles (mitochondria, microsomes and lysosomes); granules (and other NaOH resistant particles); and cellular debris including cell membranes and unbroken cells (Wallace et al. 2003, Campbell et al. 2005, Wang and Rainbow 2006). The purity of these operationally-defined fractions was not verified. The 50 000 and 100 000 x g centrifugation was carried out using a Beckman TL-100 centrifuge with a TLA-100.3 rotor, whereas for the other centrifugations we used a Sorvall RC 5C Plus with an HB-4 rotor. Supernatants were weighed, acidified and held at 4 °C until analysis. Pellets and aliquots were freeze-dried (FTS Systems, New-York, NY, USA) and weighed. By comparing metal burdens in the homogenate with the sum of those measured in the various fractions, we determined that metal losses during the fractionation procedure were very small ( $6 \pm 2$  % for Ni and  $4 \pm 4$  % for Tl).

### 2.5. Efficiency of Ni and Tl assimilation by the predator

*Sialis velata* were starved for 3 d in 30-mL HDPE vials containing 10 mL of lakewater and then offered 1-2 live contaminated prey of a given type. After 1 h, prey that had not been ingested were removed and the water was renewed. Predators that did not ingest prey were excluded from the experiment. To ensure that contaminated prey had been defecated, the following day we offered the predator one uncontaminated prey (of the other species) ; once the uncontaminated prey had been observed in the predator's feces, it was counted for radioactivity. Each predator was then held for 10 minutes in 3.75 mL of EDTA (0.1 mM), to remove metal bound to its surface, then weighed and counted for radioactivity (as was the EDTA). The water in which the predator had been depurated was acidified (to remove metal bound to the surface of the vials) and counted for radioactivity as well.

Assimilation efficiencies (AE) were calculated using a mass-balance approach:

$$AE = \frac{M_{Sialis}}{M_{Sialis} + M_{Water} + M_{EDTA} + M_{Feces}} \times 100$$

where M is the metal burden in either *S. velata*, water, EDTA or feces. AEs calculated in this manner are likely minima, because they ignore physiological metal losses during depuration.

### 2.6. <sup>63</sup>Ni and <sup>204</sup>Tl analyses

Samples for <sup>63</sup>Ni analysis were acidified with 0.2 mL of 70 % HNO<sub>3</sub> (3 d at 20 °C for solid samples) and diluted with ultrapure water to a total volume of 3.75 mL. Likewise, samples containing <sup>204</sup>Tl were acidified in 0.4 mL of 70 % HNO<sub>3</sub> and diluted to a total volume of 2.1 mL. Acidified samples were transferred to 20 mL glass scintillation vials (VWR International, Québec, Canada) containing either 10 mL (<sup>63</sup>Ni) or 15 mL (<sup>204</sup>Tl) of scintillation liquid (Ultima Gold LLT, Perkin Elmer, Woodbridge, ON, Canada). Sample radioactivity was measured in a Wallac 1114 liquid scintillation counter

and counting efficiencies were corrected for the addition of HNO<sub>3</sub>. We did not measure Tl speciation in our study.

### 2.7. Ni and Tl specific activities in animals

Sediment was eliminated from the guts of metal-contaminated prey by holding 3-4 individuals for 1 d in polystyrene vials (30 mL) containing uncontaminated sediments (10 mL) and reconstituted water (20 mL) followed by 1 d in 30 mL of reconstituted water. Individuals were then placed on a preweighed piece of Teflon sheeting in 1.5 mL polypropylene microcentrifuge tubes and frozen at -80 °C for later analysis. Depurated prey were freeze-dried and digested in 100 µL of 38 % trace-metal free grade HCl for 3 d followed by 40 µL of 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 d; digests were diluted with 900 µL of ultrapure water. Using 300 µL of the digestate, total Ni and Tl was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (Thermo Electron Corp., model X7) using external calibration with standards and rhodium as an internal standard. 500 µL of the digestate was used to analyse <sup>63</sup>Ni and <sup>204</sup>Tl by scintillation counting as described above. We presumed that Ni and Tl specific activities in prey were the same as those in the predator.

### 2.8. Statistical analyses

The proportions of Ni or Tl in various prey subcellular fractions were compared using a repeated-measures ANOVA or a Kruskal-Wallis test, followed by a Student-Newman-Keuls multiple comparisons test. Comparisons within a prey species and between prey species were made using a Student's t-test or a Mann-Whitney test, as were assimilation efficiencies by *S. velata*. All statistical tests were performed using SigmaStat (Systat Software Inc.). Error terms around means are reported as standard deviations throughout the text and all values for metal concentrations are in terms of dry weight.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Ni in sediments and prey

The Ni concentration in spiked sediments was ~16 µmol g<sup>-1</sup>, which is close to our nominal value of 10 µmol Ni g<sup>-1</sup>. Total steady-state Ni concentrations in prey exposed to

these sediments were similar at  $\sim 0.8$  (*C. riparius*) and  $\sim 0.3$  (*T. tubifex*)  $\mu\text{mol g}^{-1}$ . These Ni concentrations in prey are lower than the maxima reported for Ni in: *C. riparius* in contaminated sediments from rivers in Belgium ( $\sim 2 \mu\text{mol g}^{-1}$ ; Bervoets et al. 2004); *T. tubifex* in Ni-spiked field sediments ( $\sim 3 \mu\text{mol g}^{-1}$ ; Gillis et al. 2004); the trichopteran *Stenopsyche marmorata* in a contaminated Japanese river ( $\sim 3 \mu\text{mol g}^{-1}$ ; Tochimoto et al. 2003); but close to that in the crustacean *Hyalella azteca* in metal-contaminated sediments from Canadian lakes ( $\sim 0.7 \mu\text{mol g}^{-1}$ ; Borgmann 2003). The similarity of these maxima, suggests an upper limit for Ni concentrations in these freshwater benthic invertebrates. Indeed, Borgmann et al. (2001) have estimated that toxic effects would be experienced by 25% of the members of a *H. azteca* population if their internal Ni concentrations reached  $\sim 0.2 \mu\text{mol g}^{-1}$ . In our study, no *T. tubifex* died during the Ni exposures, whereas from 25-50% of the *C. riparius* were not recovered from Ni-contaminated sediment (in part due to adult emergence; we did not quantify insect mortality).

Within the cells of *C. riparius*, Ni was located in: debris > HSP > granules > HDP > organelles (Fig. 2). Ni in the cytosol (HSP and HDP) accounted for  $37 \pm 2 \%$  of the total. Assuming that Ni in the granules and HSP fractions has been detoxified (Wallace et al. 2003), then approximately half of the Ni ( $46 \pm 1 \%$ ) present wasn't toxic to this insect (Fig. 3). Ni that is theoretically available for transfer to the predator (HSP + HDP + organelles; Wallace et al. 2003) represented  $43 \pm 2 \%$  of the total (Fig. 3).

In *T. tubifex*, Ni was located in: HSP > organelles > debris > HDP > granules. Ni in the cytosol accounted for approximately half ( $49 \pm 2 \%$ ) of the total, which is significantly greater ( $p < 0.001$ ) than the corresponding figure for *C. riparius*. The detoxified portion comprised  $47 \pm 2 \%$  of the Ni present (Fig. 3), which is the same ( $p = 0.38$ ) as that in *C. riparius*. However, in *T. tubifex*, this likely represents a minimum value because a large proportion of the Ni in this worm was found in the organelles fraction ( $\approx 36 \%$ ), which includes lysosomes containing detoxified metal (Hopkin 1989, Wallace et al. 2003). The percentage of Ni that was potentially available for trophic transfer was  $84 \pm 3 \%$  (Fig. 3), which is significantly higher ( $p < 0.001$ ) than that for *C. riparius* (Fig. 4).

In both prey species, the HSP fraction appears to play an important role in detoxifying Ni (27% in *C. riparius* and 45 % in *T. tubifex*; Fig. 2) as it does for Cd in several types of invertebrates (Cain et al. 2004, Michaud et al. 2005). Nickel in the HSP fraction was likely bound in part to metallothionein-like proteins, as is the case for Cd (Giguère et al. 2003, Campbell et al. 2005), however, there is little information available on the affinity of this metal for such proteins. Granules were less important as a site for Ni detoxification (< 20%, Fig. 2) in our prey species, which contrasts with the results for an earthworm in which the majority of its Ni was reported to be associated with granules (Vijver et al. 2006). However, the subcellular fractionation protocol differed substantially between our study and that of Vijver et al. (2006); these authors centrifuged homogenates at 10 000 x g rather than 800 x g (as in our study ; Fig. 1). A higher centrifugation speed could result in small granules and lysosomes being sedimented, and those rich in Ca would be found in the granule fraction. Although Ni has been detected in phosphate granules in a marine gastropod (Nott and Nicolaidou 1994), the relative importance of these granules as a detoxification mechanism was not measured by the authors. Overall, detoxified metal (HSP + granules) represented approximately half of the Ni present in both of our prey species (Fig. 3), although this value is probably higher given the likely presence of detoxified Ni in lysosomes in the organelles fraction.

### 3.2. Tl in sediments and prey

The Tl concentration in spiked sediments was  $\sim 5 \text{ nmol g}^{-1}$ , which is somewhat lower than our nominal value of  $8 \text{ nmol Tl g}^{-1}$ . Total steady-state Tl concentrations in prey exposed to these sediments were  $\sim 3$  (*C. riparius*) and  $\sim 1.5$  (*T. tubifex*)  $\text{nmol g}^{-1}$ . Similar values ( $0.8 - 5 \text{ nmol g}^{-1}$ ) have been reported for Tl concentrations in the amphipod *Hyaella azteca* exposed to unspiked sediments from Lake Ontario (Borgmann et al. 1998). However, Borgmann et al. (1998) estimated that such values are well below the concentration at which toxic effects are likely to occur; for example, growth of *H. azteca* was reduced in 25% of individuals at a Tl concentration of  $\sim 200 \text{ nmol g}^{-1}$ . In our study, all *T. tubifex* survived Tl exposure, whereas 24-45 % of *C. riparius* were not recovered from the sediment (some emerged as adults and thus these losses might not be due to Tl toxicity).

In the cells of *C. riparius*, the majority of the Tl was located in the HSP fraction with the remaining fractions declining in the order: debris > organelles > granules > HDP (Fig. 2). Of the total,  $64 \pm 1$  % was located in the cytosol,  $65 \pm 1$  % was potentially detoxified and  $74 \pm 1$  % was theoretically available for assimilation by the predator (Fig. 3). These values are significantly higher ( $p < 0.02$ ) than the comparable figures for Ni in this species (Fig. 4).

In *T. tubifex*, Tl was distributed equally ( $p > 0.05$ ) among the granules, organelles, debris and HSP fractions (~25% each), whereas there was little Tl in the HDP fraction (Fig. 2). Of the total,  $29 \pm 5$  % was in the cytosol and  $49 \pm 7$  % should be available to the predator (Fig. 3); both of these percentages are significantly lower ( $p < 0.01$ ) than comparable figures for Ni in this species and Tl in *C. riparius* (Fig. 4). The detoxified portion represented  $52 \pm 5$  % of the total Tl burden (Fig. 3), which is similar ( $p = 0.055$ ) to the comparable figure for Ni in this species (Fig. 4).

In both prey species, a large proportion of their Tl was situated in the HSP fraction (Fig. 2), which suggests that Tl was bound in part to metallothionein. This possibility is supported by the affinity of Tl for sulfhydryl groups (Galvan-Arzate and Santamaria 1998), which are a key component of this metal-binding protein. The sum of the detoxified fractions (granules + HSP) accounted for the majority of the Tl present in both prey species (Fig. 3), which suggests that these invertebrates are able to detoxify this rare metal reasonably well. We know of no previous studies in which Tl has been measured in the subcellular fractions of animals.

### 3.3 Ni and Tl transfer from prey to predator

The predator *S. velata* assimilated the majority of the Ni and the Tl that was present in both prey types (Fig. 4). Likewise, copepods are reported to assimilate large proportions of the Tl present in their prey (40-50%; Twining and Fisher 2004). For Ni, the only previously published value for Ni assimilation by a consumer from its food was for marine bivalves consuming phytoplankton; as in our study, clams assimilated the



majority (61%) of the Ni present in their food, whereas oysters were much less efficient (17%) at assimilating this metal (Hédouin et al. 2007). Tl was transferred to the predator with equal efficiency from our two prey types ( $p = 0.791$ ), whereas Ni transfer was more efficient ( $p = 0.002$ ) from *T. tubifex* than from *C. riparius* (Fig. 4). Comparing the two metals, there was no significant difference ( $p = 0.056$ ) in the efficiency of assimilation if *C. riparius* was prey, whereas the predator assimilated Ni somewhat more efficiently ( $p = 0.013$ ) than it did Tl from the oligochaete *T. tubifex* (Fig. 4).

The extent to which our estimates of trophically available metal predict metal assimilation by the predator can be ascertained from Figure 4. Values for Tl in *C. riparius* and Ni in *T. tubifex* were very close to the 1:1 line, which suggests that these estimates of metal available for transfer to the predator are reliable. For the other metal-prey combinations, subcellular partitioning underestimated somewhat the assimilation efficiencies that we measured. Overall, our data suggest that cellular fractionation results indicate the minimum Ni and Tl likely to be assimilated by this predator. Metal included in the debris fraction could be partially assimilated by the predator because of the unbroken cells remaining in this fraction. The capacity of the digestive system of this predator to digest cellular membranes or granules and thereby release the metal bound to them is unknown.

The fact that the predator assimilated the majority of the Ni and Tl present in both prey species suggests that both of these metals could be readily transferred along food chains to top consumers and that food has the potential to be an important source of Ni and Tl for aquatic animals, as is the case for several other trace metals (Hare et al. 2003; Meyer et al. 2005). If this proves to be the case, then bioaccumulation models for Ni and Tl should include food as a route of entry to aquatic animals.

## Acknowledgements

Funding was provided by the Metals In The Human Environment - Research Network (MITHE-RN) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). We thank P. Couture and M. Twiss for their comments on the manuscript and the CEAEQ for *C. riparius* eggs. In addition, we appreciate the aid of M. Bordeleau, A. Chapaz, R. Couture, M. Dubois, S. Duval, P. Fournier, P. Marcoux, J. Orvoine, D. Ponton, I. Proulx, S. Prémont, L. Rancourt, and R. Rodrigue.

## References

- Bervoets, L., Giovanna, M., De Cooman, W., Goddeeris, B., Blust, R., 2004. Caged midge larvae (*Chironomus riparius*) for the assessment of metal bioaccumulation from sediments in situ. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 443-454.
- Borgmann, U., 2003. Derivation of cause-effect based sediment quality guidelines. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60, 352-360.
- Borgmann, U., Cheam, V., Norwood, W.P., Lechner, J., 1998. Toxicity and bioaccumulation of thallium in *Hyalella azteca*, with comparison to other metals and prediction of environmental impact. *Environmental Pollution* 99, 105-114.
- Borgmann, U., Norwood, W.P., Reynoldson, T.B., Rosa, F., 2001. Identifying cause in sediment assessments: bioavailability and the Sediment Quality Triad. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences* 58, 950-960.
- Cain, D.J., Luoma, S.N., Wallace, W.G., 2004. Linking metal bioaccumulation of aquatic insects to their distribution patterns in a mining-impacted river. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1463-1473.
- Campbell, P.G.C., Giguère, A., Bonneris, E., Hare, L., 2005. Cadmium-handling strategies in two chronically exposed indigenous freshwater organisms — the yellow perch (*Perca flavescens*) and the floater mollusc (*Pyganodon grandis*). *Aquatic Toxicology* 72, 83-97.
- Charbonneau, P., Hare, L., 1998. Burrowing behavior and biogenic structures of mud-dwelling insects. *Journal of the North American Benthological Society* 17, 239-249.
- Chau, Y.K., Kulikovskiy-Cordeiro, O.T.R., 1995. Occurrence of nickel in the Canadian environment. *Environmental Reviews* 3, 95-120.
- Cheam, V., Lechner, J., Desrosiers, R., 1998. Laser-induced fluorescence determination of thallium in sediments. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 360, 81-85.
- Croisetière, L., Hare, L., Tessier, A., 2006. A field experiment to determine the relative importance of prey and water as sources of As, Cd, Co, Cu, Pb, and Zn for the alderfly *Sialis velata*. *Environmental Science and Technology* 40, 873-879.

- Elliott, J.M., 1996. British freshwater Megaloptera and Neuroptera: a key with ecological notes. Freshwater Biological Association Scientific Publication 54, 1-68.
- Galván-Arzate, S., Santamaria, A., 1998. Thallium toxicity. Toxicology Letters 99, 1-13.
- Giguère, A., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Perceval, O., Pinel-Alloul, B., Pellerin, J., 2003. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. Aquatic Toxicology 64, 185-200.
- Gillis, P.L., Dixon, D.G., Borgmann, U., Reynoldson, T.B., 2004. Uptake and depuration of cadmium, nickel, and lead in laboratory-exposed *Tubifex tubifex* and corresponding changes in the concentration of a metallothionein-like protein. Environmental Toxicology and chemistry 23, 76-85.
- Gunn, J.M. 1995. Restoration and recovery of an industrial region. Progress in restoring the smelter-damaged landscape near Sudbury, Canada. Springer-Verlag, New York, NY, USA
- Hare, L., Campbell, P.G.C., 1992. Temporal variations of trace metals in aquatic insects. Freshwater Biology 27, 13-27.
- Hare, L., Tessier, A., Borgmann, U., 2003. Metal sources for freshwater invertebrates: pertinence for risk assessment. Human and Ecological Risk Assessment 9, 779-793.
- Hédouin, L., Pringault, O., Metian, M., Bustamante, P., Warnau, M., 2007. Nickel bioaccumulation in bivalves from the New Caledonia lagoon: seawater and food exposure. Chemosphere 66, 1449-1457.
- Keithly, J., Brooker, J.A., Deforest, D.K., Wu, B.K., Brix, K.V., 2004. Acute and chronic toxicity to cladoceran (*Ceriodaphnia dubia*) and an amphipod (*Hyaella azteca*). Environmental Science and Technology 23, 691-696.
- Lin, T.-S., Nriagu, J.O., Wang, X.-Q., 2001. Thallium concentration in lake trout from Lake Michigan. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 67, 921-925.
- Lis, J., Pasieczna, A., Karbowska, B., Zembruski, W., Lukaszewski, Z., 2003. Thallium in soils and stream of a Zn-Pb mining and smelting area. Environmental Science and Technology 37, 4569-4572.

- Meyer, J.S., Adams, W.J., Brix, K.V., Luoma, S.N., Mount, D.R., Stubblefield, W.A., Wood, C.M., 2005. Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms. SETAC Press, Pensacola, Florida, USA, pp. 303.
- Michaud, A.L., Hare, L., Campbell, P.G.C., 2005. Exchange rates of cadmium between a burrowing mayfly and its surroundings in nature. *Limnology and Oceanography* 50, 1707-1717.
- Pyle, G.G., Rajotte, J.W., Couture, P., 2005. Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 287-312.
- Nott, J.A., Nicolaidou, A., 1994. Variable transfer of detoxified metals from snails to hermit crabs in marine food chains. *Marine Biology* 120, 369-377.
- Nriagu, J.O., Pacyna, J.M., 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air and soils by trace metals. *Nature* 333, 134-139.
- Pacyna, J.M., Pacyna, E.G., 2001. An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environmental Reviews* 9, 269-298.
- Pane, E.F., Smith, C., McGeer, J.C., Wood, C.M., 2003. Mechanisms of acute and chronic waterborne nickel toxicity in the freshwater cladoceran, *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology* 37, 4382-4389.
- Pickard, J., Yang, R., Duncan, B., McDevitt, C.A., Eickhoff, C., 2001. Acute and sublethal toxicity of thallium to aquatic organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 66, 94-101.
- Seebaugh, D.R., Estephan, A., Wallace, W.G., 2006. Relationship between dietary cadmium absorption by grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and trophically available cadmium in amphipod (*Gammarus lawrencianus*) prey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 76, 16-23.
- Tochimoto, H., Maki, T., Afzal, M., Tanabe, S., 2003. Accumulation of trace metals in aquatic insect *Stenopsyche marmorata* Navas transferred in streams. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 256-264.

- Twining, B.S., Fisher, N.S., 2004. Trophic transfer of trace metals from protozoa to mesozooplankton. *Limnology and Oceanography* 41, 28-39.
- Vijver, M.G., van Gestel, C.A.M., van Straalen, N.M., Lanno, R.P., Peijnenburg, W.J.G.M., 2006. Biological significance of metals partitioned to subcellular fractions within earthworms (*Aporrectodea caliginosa*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 807-8174.
- Wallace, W.G., Lopez, G.R., 1996. Relationship between subcellular cadmium distribution in prey and cadmium trophic transfer to a predator. *Estuaries* 19, 923-930.
- Wallace, W.G., Lopez, G.R., 1997. Bioavailability of biologically sequestered cadmium and the implications of metal detoxification. *Marine Ecology Progress Series* 147, 149-157.
- Wallace, W.G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Marine Ecology Progress Series* 257, 125-137.
- Wang, W.-X., Rainbow, P.S., 2006. Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms. *Environmental Chemistry* 3, 395-399.
- Warren, L., Tessier, A., Hare, L., 1998. Modeling cadmium accumulation by benthic invertebrates in situ: The relative contribution of sediment and overlying water reservoirs to organism cadmium concentrations. *Limnology and Oceanography* 43, 1442-1454.
- Zitko, V., Carson, W.V., 1975. Accumulation of thallium in clams and mussels. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 14, 530-533.

### ***Figure captions***

**Fig. 1.** Protocol used to separate prey into 5 operationally defined fractions: granules, cellular debris, organelles, Heat-Denatured Proteins (HDP), and Heat-Stable Proteins (HSP).

**Fig. 2.** Subcellular partitioning of Ni (left panel) and Tl (right panel) in *C. riparius* and *T. tubifex* (means  $\pm$  SD, n = 4-5). Significant differences ( $p < 0.05$ ) among fractions for a given prey type are indicated by different letters. For a given metal and fraction, all values varied significantly between the two prey types with the exception of the cellular debris fraction for Tl (\*).

**Fig. 3.** Distribution of Ni (upper circles) and Tl (lower circles) among functionally-defined subcellular pools representing detoxified metal (HSP + granules) and subcellular fractions that are sensitive (HDP) or potentially sensitive (organelles) to the effects of metals as well as the debris fraction in *C. riparius* (on the left) and *T. tubifex* (on the right). The line outside each circle represents the proportion of metal that is potentially available for transfer to a predator.

**Fig. 4.** Relationship between the assimilation efficiencies (AE) of Ni and Tl by the predator *S. velata* and the proportion of Ni or Tl in its prey that is theoretically available for uptake (means  $\pm$  SD, n = 4-5). Dashed line represents a 1:1 relationship.

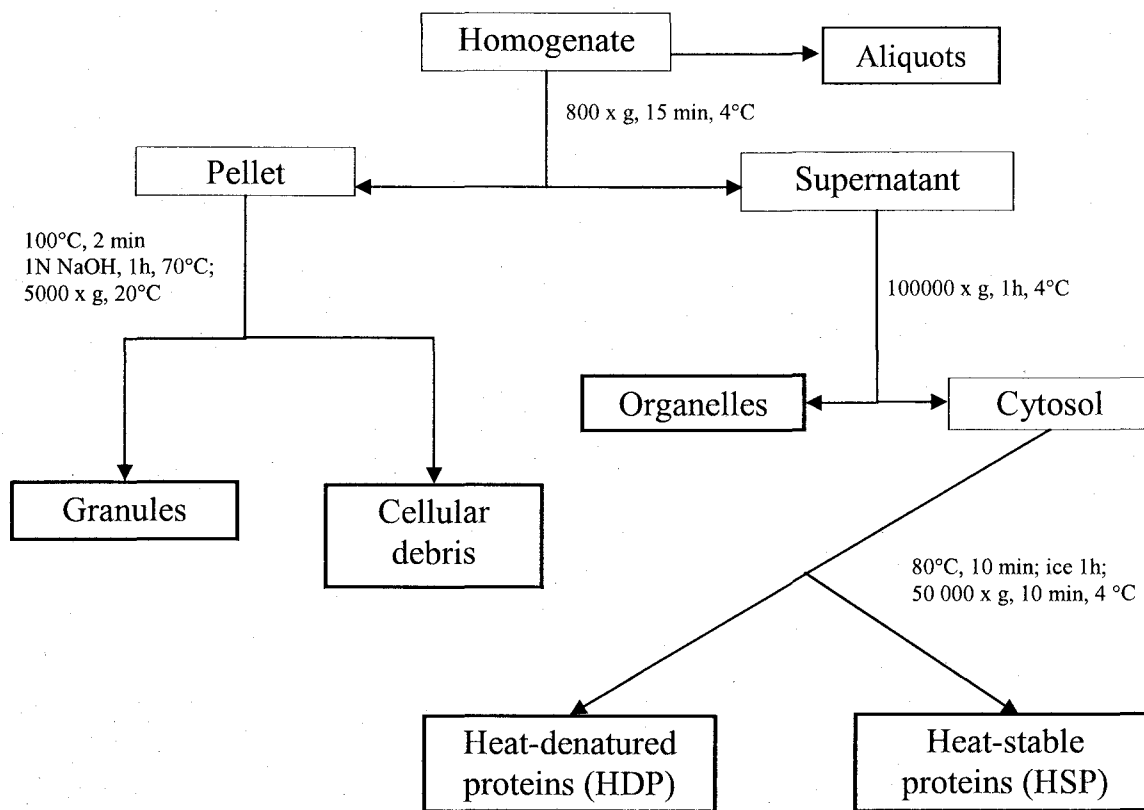


Figure 1. Dumas and Hare



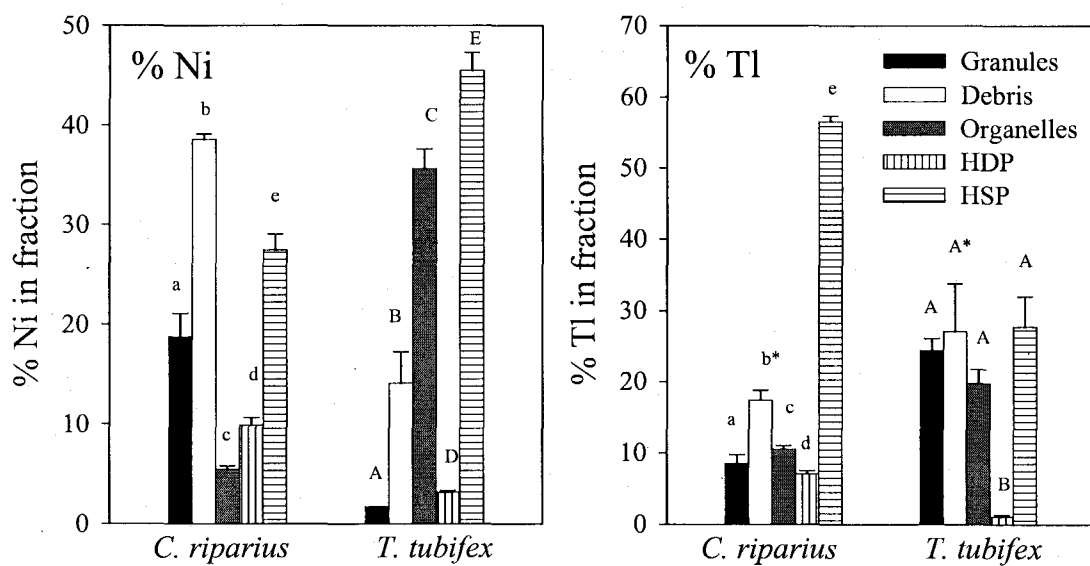


Figure 2. Dumas and Hare

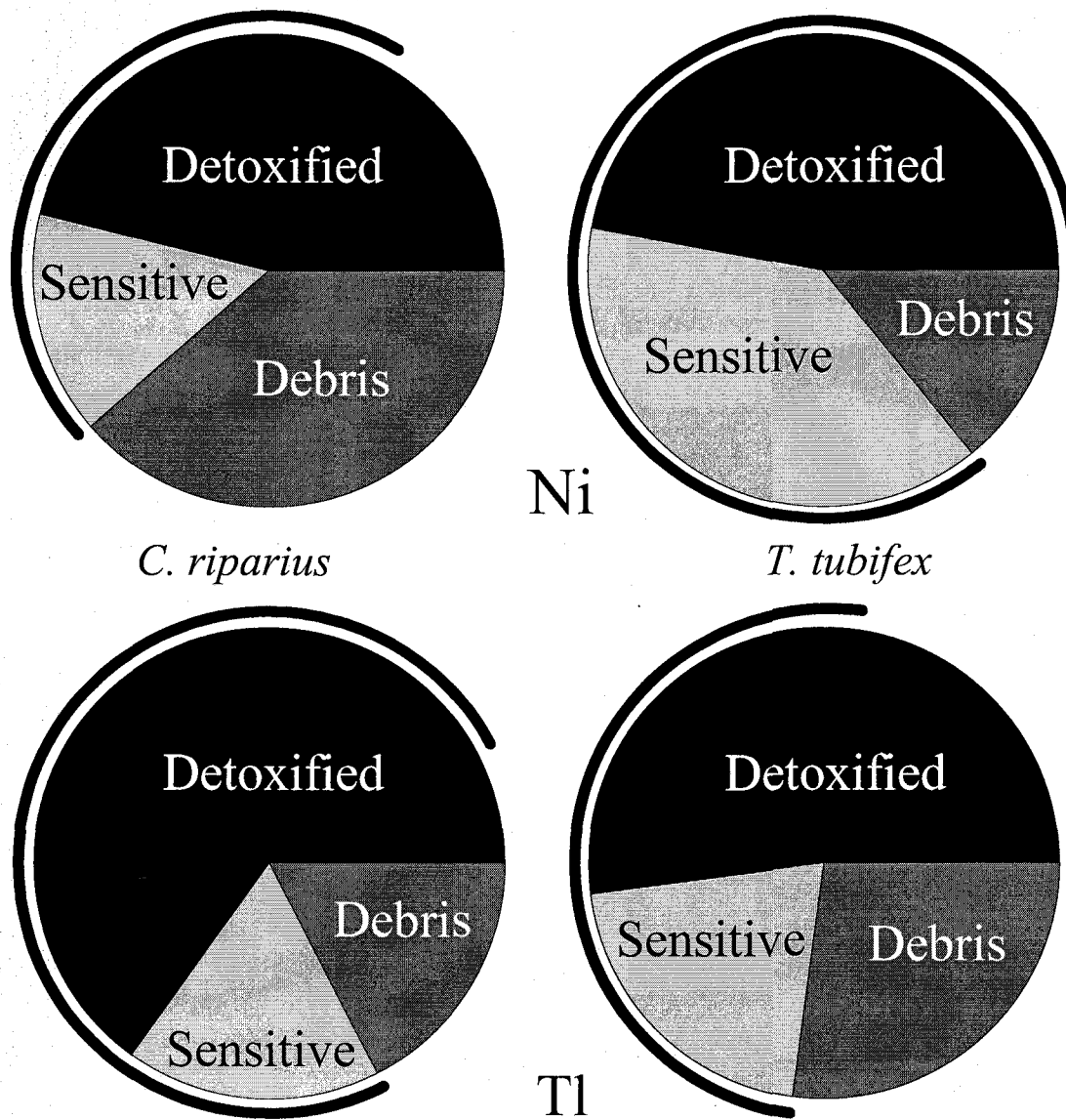


Figure 3. Dumas and Hare

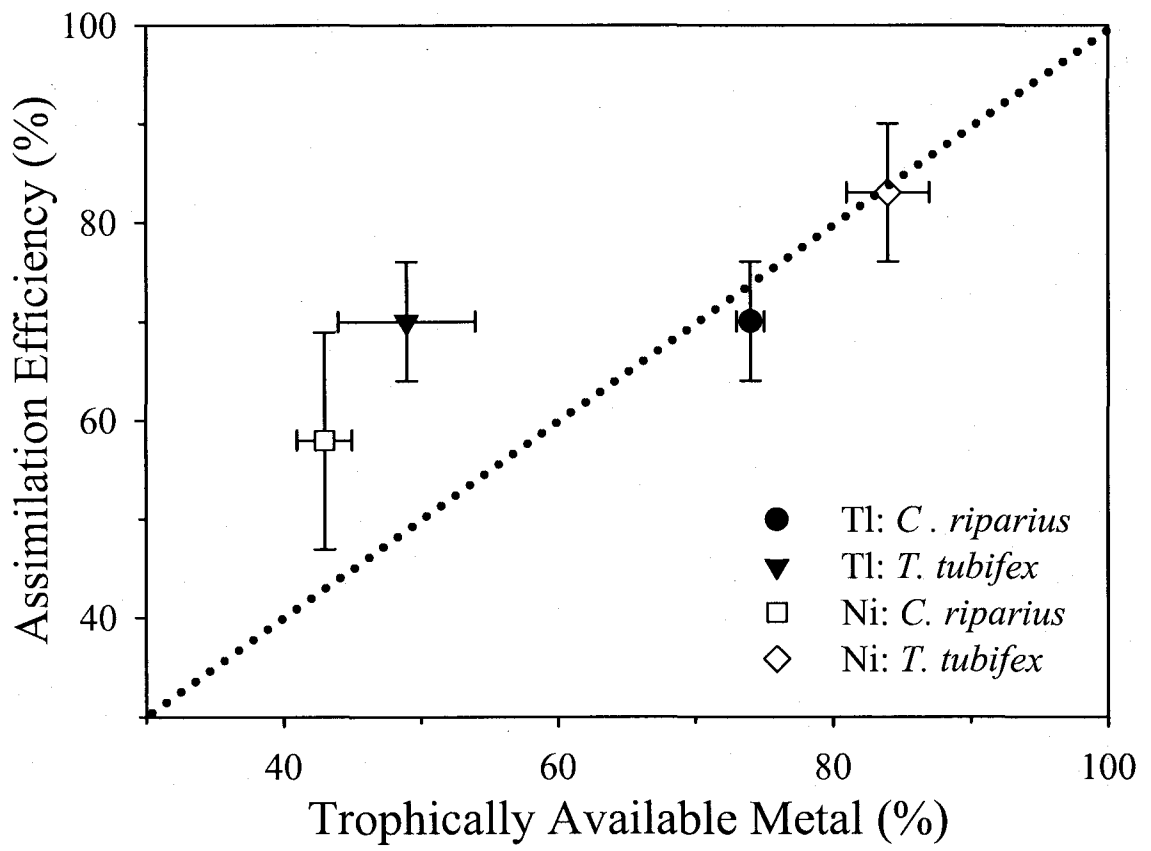


Figure 4. Dumas and Hare