

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier, Centre
de Recherche en Santé Humaine

EFFET DES EFFLUENTS MUNICIPAUX DE L'ÎLE DE MONTRÉAL SUR LA
FONCTION IMMUNITAIRE DU QUEUE À TACHE NOIRE (*NOTROPIS
HUDSONIUS*) (*IN SITU*) ET DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL (*ONCORHYNCHUS
MYKISS*) (EN LABORATOIRE).

Par
Régina Escarné

Mémoire présenté pour l'obtention
du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en Sciences Expérimentales de la Santé

Président du jury et
Examineur interne

Dr. Daniel Oth, INRS-Institut Armand
Frappier, Centre de Recherche en Santé
Humaine

Examineur externe

Dr. François Gagné, Centre St-Laurent,
Environnement Canada

Directeur de recherche

Dr. Michel Fournier, INRS-Institut Armand
Frappier, Centre de Recherche en Santé
Humaine

Codirecteur de recherche

Dr. Daniel Cyr, INRS-Institut Armand
Frappier, Centre de Recherche en Santé
Humaine

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce projet de recherche. De façon particulière j'aimerais remercier pour leur aide et conseils:

- le Dr. Michel Fournier et le Dr Daniel Cyr, mes co-directeurs, en particulier pour encadrement,
- le Dr. David Marcogliese du Centre St-Laurent, Environnement Canada, pour son aide et sa contribution à la logistique du projet,
- le Dr. Pauline Brousseau pour ses conseils en immunotoxicologie.
- le Dr. Ken Finnsen, le Dr. Andrew Rooney et le Dr. Sébastien Sauvé, stagiaires post-doctoraux, pour leurs encouragements et leurs aide technique.
- Mesdames Marlène Fortier, Julie Dufresne et Martin Poirier, pour leur aide technique très appréciée,
- le Dr. P. Cejka et le personnel de l'usine de traitement des eaux usées de la Communauté Urbaine de Montréal pour nous avoir gracieusement donner des échantillons d'effluents.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.....	ii
Liste des abréviations.....	v
Liste des figures.....	vi
Sommaire.....	viii
Introduction.....	1
Revue de littérature	
Chapitre 1. Le système immunitaire du poisson.....	3
1.1. Introduction.....	3
1.2. Cellules et organes hématopoïétiques.....	3
1.3. Immunité non spécifique.....	5
1.4. Immunité humorale.....	7
1.5. Immunité à médiation cellulaire.....	8
Chapitre 2. Biomarqueurs immunologiques.....	10
2.1. Paramètres concernant l'immunité spécifique.....	10
2.2. Paramètres concernant l'immunité non spécifique.....	11
Chapitre 3. Le pathogène <i>Aeromonas salmonicida</i>	13
3.1. Historique du pathogène.....	13
3.2. La furonculose: caractéristiques de la maladie.....	13
Chapitre 4. Facteurs modulateurs du système immunitaire.....	14
4.1. Les métaux lourds.....	14
4.2. Les pesticides.....	14
4.3. Les composés chimiques organiques.....	15
4.4. Les pluies acides.....	17
4.5. Les déversements d'huile.....	17
4.6. La température.....	17
4.7. La radiation.....	18
4.8. Les médicaments.....	18

Chapitre 5. Les effluents municipaux.....	19
5.1. Les effluents municipaux de l'île de Montréal.....	19
5.2. Traitements des effluents de l'île de Montréal.....	19
5.3. Situation problématique en temps de pluies.....	22
5.4. Les composés chimiques présents dans les effluents.....	22
5.5. Projet et hypothèses de recherche.....	23
Contribution personnelle à l'Article 1.....	27
Article 1.....	28
Contribution personnelle à l'Article 2.....	43
Article 2.....	44
Discussion et Conclusion générale.....	74
Liste des références.....	78

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac:	anticorps
APEO:	alkylphénol polyéthoxylate
BPC:	biphényl polychloré
Con A:	concanavaline A
CRP:	protéine C réactive
CUM:	communauté urbaine de Montréal
HAP:	hydrocarbure aromatique polycyclique
HSP:	“heat shock protein”
IFN:	interféron
Ig:	immunoglobuline
IL:	interleukine
LPS:	lipopolysaccharide
NK:	cellule “natural killer”
PCDD:	dibenzodioxine polychlorée
PCDF:	dibenzofurane polychloré
PFC:	“plaque forming cells”
PHA:	phytohemagglutinine
PWM:	mitogène pokeweed
Tc:	cellule T cytotoxique
TCDD:	tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
Th:	cellule T auxiliaire
Thtr:	cellule T impliquée dans l'hypersensibilité de type retardé
UVB:	rayon ultraviolet B

LISTE DES FIGURES

PREMIÈRE PARTIE

Figure 1: Cartographie du réseau de transport des eaux usées de l'île de Montréal.

Figure 2: Cartographie des différentes stations d'échantillonnage en amont et en aval du lieu de déversement des effluents municipaux de l'île de Montréal.

DEUXIÈME PARTIE

ARTICLE 1

Figure 1: Cartographie du réseau de transport des eaux usées de l'île de Montréal.

Figure 2: Phagocytose chez les Queues à Tache Noire capturés aux cinq stations d'échantillonnage. Les données sont exprimées en moyenne \pm erreur type. * et ** indiquent une différence significative (déterminée par ANOVA, $P < 0,05$) comparativement au site de référence.

ARTICLE 2

Figure 1: Phagocytose chez les Truites Arc-en-ciel exposées à quatre concentrations d'effluents pour une période de 15 jours. Les données sont exprimées en moyenne \pm erreur type ($n=15$). * indique une différence significative (déterminée par ANOVA, $P < 0,05$) par rapport au groupe témoin \square , ** indique une différence significative (déterminée par ANOVA, $P < 0,05$) par rapport au groupe témoin \blacksquare .

Figure 2: Réponse proliférative des lymphocytes stimulés avec (a) Con A, (b) PHA et (c) PWM chez les Truites Arc-en-ciel exposées aux quatre concentrations d'effluents municipaux pour une période de 15 jours. Les données sont exprimées en

moyenne \pm erreur type (n=15). * indique une différence significative (déterminée par ANOVA, $P < 0,05$) par rapport au groupe témoin.

Figure 3: Résistance bactérienne chez les Truites Arc-en-ciel suite à une période d'exposition de 15 jours aux quatre concentration d'effluents municipaux (n=15).

Figure 4: Phagocytose chez les Truites Arc-en-ciel exposées à quatre concentrations d'effluents pour une période de 45 jours. Les données sont exprimées en moyenne \pm erreur type (n=15). * indique une différence significative (déterminée par ANOVA, $P < 0,05$) par rapport au groupe témoin \square , ** indique une différence significative (déterminée par ANOVA, $P < 0,05$) par rapport au groupe témoin \blacksquare .

Figure 5: Réponse proliférative des lymphocytes stimulés avec (a) Con A, (b) PHA et (c) PWM chez les Truites Arc-en-ciel exposées aux quatre concentrations d'effluents municipaux pour une période de 45 jours. Les données sont exprimées en moyenne \pm erreur type (n=15). * indique une différence significative (déterminée par ANOVA, $P < 0,05$) par rapport au groupe témoin.

Figure 6: Résistance bactérienne chez les Truites Arc-en-ciel suite à une période d'exposition de 45 jours aux quatre concentration d'effluents municipaux (n=15).

Figure 7: Effets de l'exposition aux effluents municipaux sur l'activité hépatique 5'-deiodinase chez la Truites Arc-en-ciel. Les données sont exprimées en moyenne \pm erreur type (n=5). Les groupes traités ne sont pas significativement différents du groupe témoin.

SOMMAIRE

Les effluents municipaux de l'Île de Montréal sont acheminés à l'est de l'île jusqu'à l'usine de traitement des eaux usées, puis déversés dans le Fleuve St-Laurent à l'Îles aux Vaches. Toutefois, même après traitement, ces effluents contiennent des contaminants pouvant exercer un effet sur la compétence immunitaire des poissons. Ceci est d'autant plus grave en temps de pluie où 25% des effluents sont déversés dans le fleuve sans traitement.

Le but de l'étude consiste à déterminer si des poissons recueillis en aval de la source présentent des altérations dans leur réactivité immunitaire. Nous avons donc tenté de déterminer *in situ* l'effet de tels contaminants sur la réponse immunitaire du Queue à Tache Noire (*Notropis hudsonius*), un mené fourrageur présent dans des sites en amont et en aval du site de déchargement en question, soit aux Îles de la Paix (site de référence, environ 90 km en amont du site de déchargement), à l'Île de Dorval (environ 70 km en amont du site de déchargement, aux Îles de Boucherville (4 km en amont du site de déchargement), à l'Îlet Vert (4 km en aval) et à l'Île St-Ours (40 km en aval). Les poissons ont été capturés par seinage à ces différents sites. Le rein a été prélevé et la réactivité immunitaire a été déterminée par le test de phagocytose. Nous avons, par la suite, déterminé de manière plus contrôlée en laboratoire, en utilisant un système fermé *in vitro*, l'effet de l'exposition à des échantillons de ces effluents à court et à long terme sur la réactivité immunitaire de la Truite Arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), un poisson dont le système immunitaire est bien connu. Pour ce faire, nous avons établi quatre groupes de 30 poissons que nous avons exposés à des dilutions d'effluents de 0.001/30, 0.01/30, 0.1/30, 1/30, et un groupe témoin non exposé, pour une période de temps de 15 et 45 jours. La réactivité immunitaire a été déterminée chez 15 poissons de chaque groupe par des tests de phagocytose et de transformation lymphoblastique. Le restant des poissons a été exposé à *Aeromonas salmonicida* afin de détecter la susceptibilité d'infection causée par la bactérie.

Les résultats montrent une augmentation de l'activité phagocytaire chez les Queues à Tache Noire capturés à 40 km en aval du site de décharge. Toutefois, les

poissons vivant juste en face du site de déversement ne présentent aucune augmentation significative d'activité phagocytaire. Ce phénomène est également constaté lors des expériences de laboratoire effectuées à court terme chez les truites exposées aux dilutions de 0.001/30 et de 0.01/30 d'effluents municipaux, représentant les concentrations des effluents présents aux environs de l'Île St-Ours. Le nombre de lymphocytes augmente en présence de Con A chez les poissons exposés aux fortes concentrations, alors qu'il diminue en présence de PHA, et ce pour toutes les dilutions, suggérant qu'en présence de contaminants les cellules immatures sont rapidement sujettes à une immunosuppression. À long terme, il semble que l'activité phagocytaire diminue chez les poissons exposés aux faibles concentrations, mais augmente chez ceux exposés aux fortes concentrations. En outre, le nombre de lymphocytes stimulés avec le PWM baisse chez les Truites exposées à la dilution de 1/30. Par ailleurs, dans le groupe témoin se montre le plus sensible face à l'infection à *Aeromonas salmonicida*, démontrant ainsi une corrélation de type inverse, soit un accroissement de la résistance bactérienne avec l'augmentation des concentrations d'effluent. Ceci peut être expliqué par la stimulation de la réactivité immunitaire par certains contaminants présents dans les effluents ou par la charge bactérienne de ces mêmes effluents.

Pour conclure, cette étude est la première, à notre connaissance, à démontrer l'effet immunomodulateur des différentes concentrations d'effluents municipaux de l'Île de Montréal et ce aussi bien *in situ* avec des poissons sauvages qu'en laboratoire avec des poissons d'élevage.

INTRODUCTION

L'environnement aquatique représente la destination finale de la plupart des produits chimiques naturels ou fabriqués par l'homme. Sur l'Île de Montréal (Québec, Canada), les effluents municipaux sont traités et relargués à un seul site à l'est de l'île. Par conséquent, la charge de contaminants rejetés dans l'écosystème aquatique du Fleuve St-Laurent à cet endroit devrait être assez importante.

Les poissons constituent une source importante de nourriture dans la chaîne alimentaire. Ils sont fréquemment exposés dans leur environnement à une grande variété d'agents potentiellement toxiques. Par ailleurs, ils sont capables d'accumuler des quantités appréciables de contaminants. À titre d'exemple, la demi-vie biologique du Mercure organique est de 120 jours pour la Perche de mer (*Serranus serranus*), 600 jours pour le Flet (*Pleuronectes flesus*), le Brochet (*Exocoetis lucius*) et l'Anguille (*Anguilla vulgaris*) (Giblin et Massaro, 1973).

Avec les années, les poissons sont devenus des sentinelles de l'environnement. Plusieurs études ont démontré l'effet des produits chimiques contenus dans les effluents de pâte et papier sur la fonction immunitaire des poissons *in vitro* et *in situ* (Hardig *et al.*, 1988; Fournier *et al.*, 1998). Depuis, des améliorations ont été faites à cet égard. Toutefois, les effluents municipaux détiennent également un grand nombre de substances chimiques capables de moduler les fonctions physiologiques, métaboliques, telles que la croissance et la reproduction chez les poissons (Jobling *et al.*, 1996).

L'altération de la réponse immunitaire est reflétée par des changements entraînant une plus grande susceptibilité face à des maladies, des infections virales et des formations de tumeurs. Il y a donc un grand intérêt à étudier les effets de contaminants sur les fonctions immunitaires des poissons, en particulier en ce qui concerne les effluents municipaux, car même après traitement ces effluents sont rejetés dans l'environnement aquatique et font donc partie par la suite de l'eau potable consommée par la population. En étudiant donc l'effet de ces contaminants

sur les fonctions immunitaires des poissons, nous pouvons avoir une meilleure compréhension sur l'effet de ces contaminants sur les fonctions immunitaires des vertébrés supérieurs, incluant les humains.

Pour cette raison, dans un premier temps, nous avons étudié *in situ* l'effet des effluents municipaux de l'île de Montréal sur la réactivité immunitaire du le Queue à Tache Noire (*Notropis hudsonius*), une espèce endémique du fleuve. Par la suite, nous avons établi un système fermé en laboratoire, afin de pouvoir étudier et confirmer des effets similaires chez la Truite Arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), une espèce disponible, sensible face aux contaminants et dont le système immunitaire est bien caractérisé (Braun-Nesje, Kaplan et Seljelid, 1982).

REVUE DE BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le système immunitaire du poisson

1.1. Introduction

Les poissons constituent le groupe le plus ancien et le plus diversifié des vertébrés. Leur système immunitaire s'est considérablement diversifié au cours de l'évolution et semble être associé à leur phylogénie. En effet, les groupes primitifs possèdent un système immunitaire très simple, comparativement aux téléostéens plus avancés qui présentent des structures et des réponses immunitaires complexes se rapprochant de celles des vertébrés supérieurs (Borysenko, 1976). Le système immunitaire est considéré une cible importante quant à l'étude des effets toxiques. Les cellules immunocompétentes sont nécessaires pour la protection de l'hôte. Leur prolifération ainsi que leur différenciation est donc primordiale pour l'obtention d'une réponse immunitaire optimale. Par conséquent, l'exposition à des toxiques peut engendrer une plus grande susceptibilité à des maladies.

1.2. Cellules et organes hématopoïétiques

Durant l'évolution des poissons, les organes lymphoïdes se sont développés et sont devenus progressivement plus complexes. Toutefois, même les téléostéens les plus avancés ne possèdent pas de moëlle osseuse ou de ganglions lymphatiques. Les cellules impliquées dans les fonctions immunitaires sont des leucocytes provenant du rein, de la rate, du thymus et d'autres organes hématopoïétiques (Corbel 1975). Chez les mammifères, le thymus représente l'organe lymphoïde primaire, alors que chez les téléostéens supérieurs, comme la Truite et la Perchaude (*Perca fluviatilis*), le rein

constitue l'organe hématopoïétique le plus actif (Anderson et Zeeman, 1995). Il n'est donc pas surprenant que ce dernier ressemble physiquement à la moëlle osseuse des mammifères. Toutefois, son rôle de filtration, surtout celui de la partie antérieure, se rapproche de celui des ganglions lymphatiques: implication dans le phénomène de rétention des antigènes (Ellis, 1980).

Les leucocytes comprennent les lymphocytes, les granulocytes, les monocytes et leurs précurseurs (Ellis, 1977). La morphologie des lymphocytes est similaire chez tous les vertébrés. Néanmoins, il existe plusieurs variations de taille d'une espèce à l'autre. Chez les mammifères, les lymphocytes mesurent moins de $8\mu\text{m}$ de diamètre. Chez la Plie Rouge (*Pleuronectes platessa*) le diamètre est aux environs de $4,5\ \mu\text{m}$ (Ellis, 1976), alors que chez la Carpe (*Cyprinus carpio*) il peut atteindre $10\mu\text{m}$ (Bayne, 1986). Les lymphocytes sont divisés en deux sous-populations: les lymphocytes B qui mûrissent en cellules plasmiques produisant des anticorps spécifiques, et les lymphocytes T qui contribuent à la régulation des fonctions des lymphocytes B. Les cellules T se subdivisent en cellules T auxiliaires (Th) et T cytotoxiques (Tc). Les premiers favorisent les fonctions effectrices des lymphocytes B ou des lymphocytes Tc, tandis que les deuxièmes sont capables de lyser des cellules reconnues par leur récepteur (Janeway et Travers, 1997).

Une évaluation morphométrique effectuée par Alvarez *et al.* (1998) démontre l'effet des changements saisonniers sur le nombre de lymphocytes présents dans le thymus, la rate et le rein antérieur de la Truite Brune (*Salmo trutta*). Selon cette étude, la rate et le rein possèdent un nombre très élevé de lymphocytes durant le printemps et l'automne. Les granulocytes sont des leucocytes possédant des granules dans leur cytoplasme. Chez la Carpe (*Cyprinus carpio*), quatre types ont été trouvés: les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles et les hétérophiles (Temmink et Bayne, 1987). Les monocytes représentent 3 à 8% des leucocytes. Il s'agit de cellules immatures qui se différencient en macrophages (Gottlieb et Waldman, 1972). Ces derniers mesurent de 10 à $12\ \mu\text{m}$ chez la Truite Arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Braun-Nesje, Kaplan et Seljelid, 1982). Ils sont importants dans la capture et le traitement des antigènes dans la série des événements aboutissant à la formation d'anticorps. Ils peuvent relâcher des facteurs pouvant faciliter la coopération entre

les lymphocytes T et les lymphocytes B. Lorsque l'antigène pénètre l'organisme, il est internalisé par le macrophage puis apprêté (découpé en peptides). Les peptides résultant de cette dégradation de protéines sont réexprimés à la surface du macrophage, attachés aux molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité reconnu par les cellules Th. Par la suite, les Th présentent l'antigène sous sa forme native aux cellules B. Ces dernières sont alors stimulées à produire des anticorps (Janeway et Travers, 1997). Les macrophages sont impliqués également dans la production des facteurs de défense non spécifique du complément et d'interférons. Ils répondent aux facteurs libérés par les lymphocytes (Ellis, 1977).

1.3. Immunité non spécifique

Les mécanismes de défense non spécifique sont primordiaux chez les poissons. Ce genre de défense doit agir rapidement, même à de basses températures. En effet, les poissons dépensent davantage d'énergie pour ce genre de défense naturelle que pour des mécanismes spécifiques utilisés par les vertébrés supérieurs (Weeks *et al.*, 1989).

Comparativement aux mammifères terrestres, les surfaces de l'épiderme des poissons sont composées de cellules vivantes plutôt que de couches de peau morte, comme les humains ou la plupart des autres animaux terrestres. Par conséquent, l'environnement aquatique influence la façon dont ils se défendent contre les microorganismes envahisseurs. Ces derniers, une fois en contact avec l'hôte, deviennent pris au piège par le mucus visqueux présent, qui contient des enzymes lytiques. Les agresseurs peuvent alors être détruits par digestion enzymatique dans la couche muqueuse. Les débris résultants sont rejetés dans l'eau (Weeks *et al.*, 1989).

La barrière suivante est constituée par les cellules épidermales qui recouvrent les écailles. Celle-ci est pratiquement impénétrable. Toutefois, les poissons sont vulnérables dans les régions qui n'ont pas d'écailles ou de mucus. Ils font alors appel aux autres défenses non spécifiques (Weeks *et al.*, 1989).

Parmi les défenses non spécifiques les deux plus importantes sont la phagocytose et l'inflammation. Celles-ci sont médiées par les phagocytes mononucléés (les macrophages) et les leucocytes polymorphonucléés (les neutrophiles). La première réponse consiste en l'ingestion et la destruction des corps étrangers. La deuxième est accompagnée par l'infiltration des cellules phagocytaires aux sites d'infection (Weeks *et al.*, 1989).

Les macrophages présents dans la couche subdermale des tissus phagocytent les bactéries, ou les autres agresseurs particuliers, dans des vacuoles intracellulaires (ou "lysosomes") puis relâchent des enzymes destructives pour la digestion des pathogènes (Ellis, Munroe et Roberts, 1976). Les neutrophiles en circulation dans les tissus ont une courte durée de vie. Ils sont capables de détruire des corps étrangers en relarguant des substances réactives une fois en contact avec l'envahisseur. Ces cellules provoquent alors une réponse inflammatoire qui attire davantage des cellules phagocytaires, incluant d'autres neutrophiles, aux sites d'invasion (Finn, 1970). La phagocytose et l'inflammation peuvent aussi être stimulées par des produits de sécrétion lymphocytaires, tels que des anticorps opsonisants spécifiques et des médiateurs solubles (ou "lymphokines") (Weeks *et al.*, 1989).

Tout comme les mammifères, les poissons sont capables de produire des cytokines. Les chercheurs décrivent plusieurs interleukines qui portent des messages intracellulaires spécifiques. L'interleukine 2 (IL-2) connue pour la stimulation de l'activité des lymphocytes T en est une (Graham et Secombes, 1990). Les interférons (IFN) sont des molécules spécifiques produites lors d'une infection virale. Cette protection non spécifique permet la suppression de la prolifération du virus en question. De Kinkelin, Dorson et Hattenberger-Baudouy. (1982) démontrent que la Truite Arc-en-ciel et la Carpe produisent des IFNs suite à l'injection de rhabdovirus.

Les protéines C-réactives (CRP) et les protéines du choc thermique ("heat shock proteins", HSP) font partie des autres facteurs solubles présents dans le sérum des poissons. Le niveau de ces glycoprotéines augmente habituellement durant l'inflammation. Chez la Truite Arc-en-Ciel, les CRP sont constituées de deux sous-unités (Murai *et al.*, 1990). Les niveaux de CRP doublent, voire même triplent, suite à une infection bactérienne.

Le complément agit comme un récepteur à l'antigène et augmente par le fait même l'activité des mécanismes non spécifiques. Le système du complément de la Truite Arc-en-ciel est comparable à celui des mammifères. Nonaka *et al.* (1981) en ont décrit les deux voies d'activation connues: la voie classique et la voie alterne.

D'autres substances, telles que les lysosymes, les agglutinines, les précipitines et les lysines font aussi partie de la défense naturelle des poissons (Fletcher, 1982).

1.4. Immunité humorale

L'immunité humorale est caractérisée par la production d'anticorps qui réagissent spécifiquement avec des antigènes. Suite à une stimulation antigénique, les cellules B prolifèrent et se différencient en cellules plasmiques qui synthétisent et sécrètent des anticorps. Certaines cellules B se différencient en cellules mémoire qui procurent une réponse plus rapide lors d'une seconde exposition au même antigène. Chez les mammifères, selon la structure et la fonction, les immunoglobulines (Ig) se divisent en cinq classes: IgM (chaîne lourde *mu*, large molécule d'Ig apparaissant la première lors d'une réponse humorale), IgG (chaîne lourde *gamma*, Ig légère, la plus abondante dans le plasma sanguin), IgA (chaîne lourde *alpha*, Ig qui prédomine dans les sécrétions), IgE (chaîne lourde *epsilon* impliqué dans les allergies) et IgD (chaîne lourde *delta*, retrouvé sur la membrane des lymphocytes B) (Janeway et Travers, 1997). Le rôle majeur des anticorps est de protéger l'hôte de maladies infectieuses et inclut, par le fait même, les fonctions suivantes: neutralisation de virus, opsonisation et lyse par le complément (Weeks *et al.*, 1989).

Les chercheurs savent depuis des années que les poissons produisent des anticorps en réponse à des antigènes (Finstad et Good, 1966). Les anticorps des poissons sont des immunoglobulines de classe "IgM-like". La plupart des espèces possèdent ces molécules sous forme tétramérique. Chaque sous-unité est formée de deux chaînes légères et de deux chaînes lourdes (Shelton et Smith, 1970; Acton *et al.*, 1971; Clem et McLean, 1975; Sanchez, Dominguez et Coll, 1989). La présence des

autres classes d'Ig (IgA, IgD, IgG et IgE) n'a pas encore été démontrée chez les téléostéens (Zeeman et Brindley, 1981: 1, Weeks *et al.*, 1989).

Les pisciculteurs utilisent ce principe de l'immunité spécifique afin de protéger leurs poissons contre des maladies. Des bactéries produites commercialement, dans le but de vacciner les poissons d'élevage, sont administrées par immersion (dans un bain) ou injection à un grand nombre de jeunes salmonidés afin de prévenir la maladie entérique causée par *Yersinia ruckeri* et la furonculose causée par *Aeromonas salmonicida*. Les bactéries rentrent par les branchies et autres surfaces, puis sont internalisées et transportées aux organes immunopoiétiques (Zapata *et al.*, 1987). La technique de PFC ("Plaque Forming Cells") est un comptage qui reflète la capacité de produire des anticorps et donc d'évaluer l'efficacité de la vaccination. L'utilisation de cette technique et d'autres tests *in vitro* démontrent que les cellules productrices d'anticorps sont localisées principalement dans le rein antérieur et la rate. Les leucocytes produisant ces anticorps sont les lymphocytes et les cellules plasmiques (Rijkers, Van Oosterom et Van Muiswinkel, 1981).

1.5. Immunité à médiation cellulaire

L'immunité à médiation cellulaire est caractérisée par la sensibilisation des cellules T suite à la présentation d'un antigène, ainsi que par la différenciation et la prolifération des lymphocytes T en cellules effectrices, de régulation et de mémoire. La sensibilisation est assistée par les macrophages et autres cellules accessoires qui possèdent des déterminants antigéniques à leur surface pour la présentation aux cellules T. Les macrophages sont nécessaires pour la fonction des cellules T, surtout pour les Th, les Ts et les cellules impliquées dans l'hypersensibilité de type retardée (Thtr). Certaines cellules effectrices dites "cellules T cytotoxiques" (Tc) peuvent lyser des cellules tumorales en relâchant des lymphotoxines. Des cellules mémoire sont produites pour chaque type de cellule T et sont stimulées par des antigènes. Ceci est la base de la réponse immunitaire secondaire (Weeks *et al.*, 1989).

Chez les oiseaux et les mammifères, la réponse immunitaire humorale et à médiation cellulaire sont dues à la stimulation et à l'interaction des lymphocytes B et T. Les poissons possèdent deux groupes de lymphocytes agissant de façon similaire aux lymphocytes B et T des vertébrés supérieurs.

Ceci a été démontré, dans un premier temps, par la présence de réactions immunologiques dites "haptén carrier effects" chez plusieurs espèces marines (Yocum, Cuchens et Clem, 1975; Stolen et Makela, 1980). D'autre part, les lymphocytes de poissons sont composés d'au moins deux populations stimulées soit par des mitogènes de cellules T (phytohemagglutinine (PHA) et concanavaleine A (ConA)) ou par des mitogènes de cellules B (lipopolysaccharide (LPS)).

La présence de cellules T chez les poissons est indiquée également par des exemples de rejets de greffe et de réactions d'hypersensibilité de type retardé. La première transplantation impliquant des écailles a été effectuée en 1957 par Hildermann sur le Carassin Doré (*Carassius auratus*). Depuis, plusieurs autres études ont rapporté ce phénomène de rejet de greffes d'écailles, de peau et même de nageoires (Botham, Grace et Manning, 1980; McKinney, McLeod et Sigel, 1981). Dans presque tous les cas, une réponse secondaire caractéristique est observée lors d'une seconde greffe provenant du même donneur: le rejet s'effectue beaucoup plus rapidement que la première fois. Des phénomènes d'hypersensibilité de type retardée à l'antigène de *tuberculine* sont aussi observés chez la Lamproie et la Truite Arc-en-ciel (Corbel, 1975; Bartos et Sommer, 1981).

Chapitre 2. Biomarqueurs immunologiques

2.1. Paramètres concernant l'immunité non spécifique

L'interaction des contaminants présents dans l'environnement avec les tissus lymphoïdes peut modifier la fonction immunitaire du poisson et engendrer par le fait même une immunosuppression, une prolifération cellulaire incontrôlable et des changements dans les mécanismes de défense contre des pathogènes. Des paramètres immunologiques sont utilisés fréquemment dans des expériences de laboratoires et de terrain dans le but d'analyser l'effet de plusieurs toxiques sur la réponse immunitaire.

Des expériences concernant l'immunité non spécifique sont nombreuses et sont effectuées depuis des années chez le poisson. La détermination de leucocrites (niveaux de leucocytes sanguins) (Pickering et Pottinger, 1988), d'hématocrites (niveaux d'érythrocytes sanguins) (Wells et Weber, 1991), de comptages cellulaires (Tana et Nikunen, 1986), d'activité cytotoxique naturelle (cellules NK; "natural killer") et d'activité lysosyme font partie de ces tests permettant d'analyser la santé des poissons.

La phagocytose représente un important paramètre dans ce genre d'immunité. En effet, la fonction des macrophages constitue un indicateur sensible quant aux effets de certains toxiques présents dans l'environnement aquatique. Ces cellules phagocytaires isolées à partir d'organes hématopoïétiques sont incubées avec des bactéries *E.coli* tuées avec de la formaline ou des particules artificielles telles que des billes de latex fluorescentes (Ziegenfus et Wolke, 1991). Weeks et Warinner (1984) démontrent que le pourcentage d'activité phagocytaire des macrophages diminue significativement chez deux poissons d'estuaires (*Leiostomus xanthurus* et *Trinectes maculatus*) en présence de contaminants. En outre, une baisse d'activité phagocytaire corrélée à une infection de parasites marins est observée chez la Truite Arc-en-ciel par Mustafa et son équipe (2000).

La flambée oxydative est également communément étudiée. Les xénobiotiques présents dans les effluents induisent une augmentation de la flambée

oxydative chez les phagocytes de Poisson-chat. Cette induction d'activité est associée au dommage peroxidatif du rein antérieur et des branchies (Fatima *et al.*, 2000).

2.2. Paramètres concernant l'immunité spécifique

Un certain nombre d'expériences ont été effectuées dans le but de déterminer la sensibilité aux toxiques de l'immunité spécifique humorale. L'avantage de mesurer la concentration d'anticorps réside dans la facilité d'effectuer des prélèvements sanguins sans tuer l'animal. Anderson, Dixon et Van Ginkel (1984) observent une réduction de cellules productrices d'anticorps suite à une immunisation chez la Truite Arc-en-ciel exposée à du phénol, de la formaline ou des solutions de détergents.

La réaction lymphocytaire mixte est la prolifération lymphocytaire observée quand des lymphocytes T allogéniques sont mélangés ensemble *in vitro*. Cette réaction et d'autres tests portant sur les lymphocytes T cytotoxiques procurent de l'information sur différents aspects de l'immunité à médiation cellulaire (Stites *et al.*, 1982). Néanmoins, la technique la plus appliquée chez toutes les espèces animales est la transformation lymphoblastique. Elle permet de mesurer, *in vitro*, la prolifération des lymphocytes. La transformation lymphoblastique mesure une des premières étapes de la réponse cellulaire face à des stimuli. Suite à l'immunisation, se fait l'induction de la prolifération ou l'expansion clonale des lymphocytes. Ce phénomène peut également être déclenché par des mitogènes, c'est-à-dire des agents induisant la mitose cellulaire (ex: la phytohemagglutinine (PHA), la concanavaline A (Con A), les lipopolysaccharides (LPS), etc.). La PHA et la Con A activent spécifiquement les cellules T (Janossy et Greaves 1971), les LPS stimulent les lymphocytes B (Anderson, Sjoberg et Moller, 1972) alors que le pokeweed mitogen (PWM) induit préférentiellement la prolifération des cellules B, mais aussi celle de lymphocytes T (Stockman *et al.*, 1971). Cette division cellulaire rapide peut être détectée en observant et en comptant le nombre de cellules ayant incorporé de la thymidine ^3H (marquée radioactivement) dans l'ADN dupliqué. L'index d'activation

est la proportion déterminée par l'incorporation relative des nucléotides marqués radioactivement de la culture stimulée par les mitogènes comparé à la culture non stimulée (Stites *et al.*, 1982). Cette technique est utilisée en médecine humaine dans le but d'évaluer l'immunité cellulaire dans les cas d'immunodéficience, d'autoimmunité, de maladies infectieuses et de cancer (Stites *et al.*, 1982). Elle est également utilisée pour des fins de surveillance d'activités immunosuppressives chez les invertébrés, les poissons, les oiseaux, les reptiles, les amphibiens et les mammifères (Weeks *et al.*, 1989). Faisal *et al.* (1991) ont, par cette approche, démontré une suppression de réponse à la Con A et au PHA, et inversement une stimulation de réponse face à LPS et au PWM chez des Spots (*Leiostomus xanthurus*) exposés à des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Enfin, puisque le but ultime de la réactivité immunitaire spécifique (humorale et/ou cellulaire) est d'assurer une résistance à des pathogènes, il s'avère important de tester ce paramètre. Pour ce faire, les poissons sont exposés à des bactéries, des virus ou des parasites afin de déterminer l'efficacité de la réponse immunitaire. L'étude de Luster *et al.* (1993) démontre que la résistance de l'hôte est en corrélation avec les paramètres testés. Toutefois, la capacité de résistance, face à un agent infectieux, dépend du degré d'immunosuppression et de la quantité d'agents administrés.

Chapitre 3. Le pathogène *Aeromonas salmonicida*

3.1. Historique du pathogène

Aeromonas salmonicida constitue le plus vieux pathogène de poisson décrit. La bactérie a été isolée de la truite pour la première fois par Emmerich et Weibel (1894). L'origine du pathogène demeure toutefois incertaine. Il est caractérisé comme l'agent étiologique de la furunculose. Cette maladie associée au début aux élevages intensifs de salmonidés a été par la suite retrouvée en milieu naturel (Fish, 1937). Depuis, elle demeure une des maladies les plus importantes en aquiculture.

3.2. La furunculose: caractéristiques de la maladie

Cette maladie tient son nom de la présence de furoncles dans la musculature. La forme subaiguë ou chronique est caractérisée par une lethargie, une exophthalmie, des nageoires saignantes, de multiples hémorragies dans les muscles et le foie, et un gonflement de la rate. La forme aiguë de la furunculose est caractérisée par des ulcères rougeâtres, une perte d'appétit, de la lethargie, des hémorragies à la base des nageoires, des parois abdominales, des viscères, du coeur et un gonflement de la rate (MacCarthy et Roberts, 1980). Le processus pathologique en tant que tel est favorisé par la présence d'agents stressants (surpopulation, augmentation de la température, réduction du taux d'oxygène dissous dans l'eau). Les souches de *A. salmonicida* peuvent survivre plusieurs jours et ce dans divers milieux aquatiques (eau douce, saumâtre, salée) (MacCarthy, 1977).

Chapitre 4. Facteurs modulateurs du système immunitaire

4.1. Les métaux lourds

Le système immunitaire agit de façon ordonnée. Toutefois, le maintien de cette homéostasie peut être interrompu par des agents toxiques environnementaux. Des métaux lourds tels que le Cuivre, le Plomb, le Cadmium, l'Aluminium, le Mercure, l'Arsenic et le Sélénium présents dans l'environnement aquatique peuvent affecter la santé des poissons (Voccia *et al.*, 1994; Voccia *et al.*, 1996; Sanchez-Dardon *et al.*, 1999). Travaillant avec la Truite Arc-en-ciel, Thuvander, Norrgren et Fossum (1987), remarquent une augmentation de phagocytose en présence de faibles doses d'Arsenic, mais une diminution, en présence de fortes doses. Ces premiers observent également un accroissement du nombre d'anticorps sériques suite à une exposition de Cadmium chez la Truite (Thuvander, 1989). Le même toxique, étudié par Elsasser, Roberson et Hetrick (1986), provoque une baisse de la réponse phagocytaire chez la Truite Arc-en-ciel et une diminution de la réponse lymphoblastique chez le Carassin doré (Murad et Houston, 1988). Le même phénomène est induit par le Mercure chez le Téléostéen *Barbus conchoni* (Gill et Pant, 1985). Le Sélénium, pour sa part, constitue un micronutriment nécessaire au système immunitaire du poisson. L'absence ou la déficience en Sélénium dans la nourriture de l'animal contribue à une faible teneur en peroxidases et conséquemment à une perte de compétence du système immunitaire (Felton, Wenjuan et Matthews, 1990).

4.2. Les pesticides

L'utilisation de pesticides (insecticides, herbicides, fongicides) pour l'agriculture, la protection des forêts et les programmes de santé publique est

fréquente. Environ 73% des pesticides vendus au Québec et contenant 153 ingrédients actifs sont utilisés en agriculture (Anonyme, 1999). Des niveaux sublétaux de pesticides peuvent s'accumuler dans l'organisme des poissons via l'eau ou la nourriture. Par leur nature, ces toxiques sont souvent persistants dans l'environnement aquatique. Plusieurs études démontrent leurs effets sur la fonction immunitaire. Le Malathion engendre une réduction du nombre de lymphocytes chez le Poisson-chat (*Ictalurus punctatus*) (Areechon et Plum, 1990). Wester, Canton et Dormans (1988) observent une nécrose thymique chez le Medaka japonais (*Oryzias latipes*) exposé à du Méthylbromure. Par ailleurs, Siwicki et son équipe (1990) démontrent une diminution de l'activité phagocytaire, neutrophilique et lysosyme chez la Carpe exposée à du Trichlorphon. Les effets directs des herbicides (ex.: Atrazine) peuvent être détectés chez les poissons lors des expériences de laboratoire (Cossarini-Dunier *et al.*, 1988), mais les effets indirects peuvent être davantage ravageurs en réduisant les populations de zooplanctons et de phytoplanctons. Des études ont également été effectuées sur d'autres pesticides tels que l'Endrine, la Dieldrine, le Diazinon, le Lindane, le Mirex, le Tributylétain, l'Atrazine, etc. Les résultats varient selon l'espèce étudiée et les conditions expérimentales utilisées (Zeeman et Brindley, 1981; Anderson et Zeeman, 1995; Voccia *et al.*, 1999).

4.3. Les composés chimiques organiques.

Les biphényles polychlorés (BPCs) font partie des toxiques les plus répandus et persistants. Ils ont été bannis depuis 1977, mais jusqu'à cette date ils étaient couramment utilisés dans les équipements électriques, tels que les condensateurs et les transformateurs. De petites quantités de BPCs peuvent se dissoudre dans l'eau, se liant ainsi aux particules organiques et aux sédiments. Ces composés sont bioaccumulés par les poissons et les mammifères et par conséquent engendrent de sérieux problèmes; des cancers, des retards du développement, des pertes de mémoire et des habiletés physiques, ainsi qu'une diminution d'efficacité du système immunitaire (Barron, Yurk et Crothers, 1994; Harper *et al.*, 1995; Jacobson et Jacobson, 1997). Malgré le fait que l'utilisation des BPCs est interdite, ils sont

toujours présents dans la chaîne alimentaire. Presque 455 millions de kilogrammes ont été produits et 30% relâchés dans l'environnement jusqu'à date. Ce qui n'a pas été proprement détruit jusqu'à aujourd'hui continue d'être relâché dans l'environnement par des fuites, des déversements et des incinérations. Les dibenzodioxines polychlorées (PCDDs) et les dibenzofuranes polychlorées (PCDFs) sont retrouvées en tant que traces de contaminants dans plusieurs produits commerciaux. Elles sont liposolubles et persistantes dans l'environnement aquatique. De nombreuses études montrent les effets immunosuppresseurs de ces substances chimiques industrielles sur la réponse immunitaire des poissons (Anderson et Zeeman, 1995). Par exemple, Mayer et ses collègues (1985) ont remarqué une augmentation de la susceptibilité face à des infections bactériennes chez la Truite exposée à de l'Aroclor 1254 et 1260.

Les dioxines sont des composés organiques contenant du Chlore. Elles ne sont pas produites délibérément, mais sont plutôt des impuretés et des sous-produits dans la fabrication des pesticides, des agents de conservation, des désinfectants et des pâtes et papiers. En plus du fait d'être relarguées dans les eaux, elles sont également relâchées dans l'environnement sous forme de cendres et de gaz lors de l'incinération de papiers, de plastiques, de bois et d'essence contenant du Plomb. Ces contaminants sont extrêmement toxiques. Le 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) représente la dioxine la plus toxique. Elle peut causer des cancers (Safe et Zacharewski, 1997), avoir des effets sur la reproduction (Cummings, Metcalf et Birnbaum, 1996) et sur le système immunitaire (Spitsbergen *et al.*, 1986).

Les HAPs sont formés à partir de charbon, d'huile, de gaz, de poubelles et d'autres substances organiques incomplètement brûlées. Émis par les volcans, les incendies de forêt et les tuyaux d'échappement des automobiles, ils s'attachent aux particules de poussières et se déposent éventuellement sur le sol et dans l'eau. Weeks et Warinner (1986) ont détecté une suppression de la réponse des macrophages chez le Spot exposé à des HAPs.

Le phénol et autres cyclohexanes sont retrouvés dans les effluents d'industries de pâte et papier et de peinture. Anderson et son équipe (1990), démontrent dans leur

étude effectuée sur la Truite Arc-en-ciel que les cellules productrices d'anticorps diminuent en nombre, une fois exposées au phénol.

4.4. Les pluies acides

Les émissions d'effluents acides dans les eaux et dans l'air par les industries changent l'environnement aquatique de façon indirecte en détruisant le phytoplancton, le zooplancton et en agissant directement sur l'épiderme des animaux. Les métaux lourds, tel que décrit précédemment, deviennent alors plus disponibles pour la Perche et la Truite Arc-en-ciel vivant dans des eaux acidifiées (Hall *et al.*, 1988). Les truites habitants dans ce type d'environnement possèdent de hauts niveaux d'hématocrites et de concentration d'hémoglobine (Giles, Majewski et Hobden, 1984). Finalement, la survie des poissons est compromise dans ces eaux. Les Salmonidés sont souvent retrouvés dans des rivières atteintes par les pluies acides. Toutefois, ces poissons ont un meilleur taux de survie quand le pH de l'eau se situe entre 5 et 9 (Mayer, Multer et Schreiber, 1984).

4.5. Les déversements d'huile

Les dommages causés par les déversements d'huiles brutes (pétrole brute) sont dépendants de la température, du courant de l'eau et des efforts de nettoyage afin de remédier à la situation. Carls *et al.* (1998) ont signalé le développement d'immunosuppression caractérisée dans ce cas-ci par une diminution du nombre de cellules inflammatoires chez le Hareng (*Clupea pallasii*) exposé à ce type d'huile.

4.6. La température

La température affecte également la réponse immunitaire humorale et à médiation cellulaire (Bly et Clem, 1991). Selon Schneider et Ambrosius (1987) les lymphocytes B de la Carpe ne sont pas dépendants de la température tandis que les lymphocytes T le sont extrêmement. D'après leur étude, le nombre de lymphocytes T décroît aux basses températures et s'accroît aux hautes températures. Le groupe de Morvan, Deschau et Troutaud (1996) observent chez cette même espèce de poisson une baisse de la production d'anticorps, à faible température.

4.7. La radiation

Les rayons ultraviolets B (UVB) pénètrent dans l'eau et peuvent, tout comme chez les mammifères, affecter la santé des poissons ainsi que leur système immunitaire. Chez le Gardon (*Rutilus rutilus L.*), les UVB suppriment l'activité cytotoxique des granulocytes du rein antérieur et la prolifération des lymphocytes de la rate (Jokinen *et al.*, 2000).

4.8. Les médicaments

Les médicaments (produits chimiques et antibiotiques) sont utilisés fréquemment en aquaculture pour le traitement de maladies infectieuses. Certains de ces médicaments sont immunosuppresseurs. Par exemple, l'Oxytetracycline, utilisée dans la prévention de maladies bactériennes, affecte la réponse lymphoblastique chez la Carpe (Grondel *et al.*, 1987) et diminue le nombre de PFC chez la Truite Arc-en-ciel (Siwicki, Anderson et Dixon, 1989). D'autres agents, tel que l'Éthylmercure de phosphate et le vert de Malachite, utilisés respectivement contre les maladies affectant les branchies et les infections fongiques, sont déjà retirés du marché à cause de leur potentiel cancérigène (Anderson et Zeeman, 1995).

Chapitre 5. Les effluents municipaux

5.1. Les effluents de l'Île de Montréal

La Communauté Urbaine de Montréal (CUM) traite quotidiennement environ 2 500 000 m³ d'effluents (ou plus de 1 350 litres/personne/jour). Les réseaux de drainage sont développés en un système séparatif, soit deux égouts collecteurs séparés, dans la partie ouest de l'île (1/3 du territoire). Il s'agit d'un premier égout collecteur sanitaire captant les eaux usées résidentielles, industrielles, commerciales et institutionnelles en plus d'un second égout collecteur pluvial servant à capter les eaux de pluie. L'autre partie du territoire dépend de réseaux de drainage développés en un système unitaire (combiné) constitué d'un seul égout collecteur recevant, à la fois, les eaux usées des bâtiments et les eaux pluviales. La station d'épuration de la CUM est située à l'extrémité est de l'île. Les eaux usées sont acheminées jusqu'à la station via les intercepteurs nord, sud-ouest et sud-est (89,5 km de longueur totale). Suite à un traitement physico-chimiques, les eaux traitées sont déversées dans le fleuve St-Laurent au sud-est de l'Île aux Vaches via un "émissaire" de 4,4 km (Boulay et Boulay, 1999) (Figure 1).

5.2. Traitement des effluents de l'île de Montréal

Les eaux usées rendues à la station d'épuration sont relevées au niveau du sol grâce à des motopompes, puis déversées dans un canal périphérique. Par la suite, se fait le dégrillage. Ceci consiste en l'enlèvement des grosses matières solides, tels que les roches, les bouts de bois, les contenants de plastique et les chiffons. Les eaux sont ensuite dirigées vers les déssableurs. Les particules lourdes sont alors déposées dans un bassin. Ces sables contiennent 97-98% de matières organiques. Ils sont acheminés vers le système de traitement, suite à quoi ils sont transportés ailleurs pour enfouissement.

Afin de procéder à la réduction de la quantité de phosphore contenue dans les eaux usées, l'ajout de chlorure ferrique ou d'alun est nécessaire. Ces derniers agissent comme des flocculants permettant ainsi de former des amalgames facile à décanter. De plus, l'ajout d'un aide coagulant tel qu'un polymère anionique facilite également ce processus. Par conséquent, les eaux sont transportées vers les décanteurs où elles y séjournent pour environ deux heures. Ceci donne le temps aux matières en suspension et aux floccs formés par les produits chimiques de se déposer au fond des décanteurs, formant ainsi des boues. Ces dernières sont amenées vers les réservoirs d'emmagasinement et les écumes vers le site de traitement physico-chimique, où environ 50% des coliformes sont retirées. Suite à ce procédé les eaux des décanteurs sont rejetées, via "l'émissaire" de la station d'épuration, dans le chenal de navigation du Fleuve St-Laurent en face de l'Île aux Vaches (Boulay et Boulay, 1999).

Les boues et les écumes sont également traitées. Dans un premier temps, elles sont emmagasinées, puis pompées à travers des trémis vers des homogénéisateurs. Après un conditionnement à l'aide d'un polymère cationique, favorisant la séparation des solides et de l'eau, les boues sont déshydratées (à environ 32% de siccité). À ce stade elles sont appelées des "gâteaux". Dans un deuxième temps, les "gâteaux" formés sont transportés aux incinérateurs. Les cendres produites sont refroidies puis emmagasinées jusqu'à enfouissement. Chaque incinérateur contient un système de traitement de gaz post-combustion. Un système d'épuration de type humide permet d'enlever 99% des particules solides et de condenser l'humidité des gaz, éliminant de cette façon la majeure partie des gaz acides et des métaux volatils.

Les écumes sont mélangées aux boues avant le processus de déshydratation. Elles constituent, pour leur part, des produits difficiles à traiter étant donné leur composition en gras, en huiles et solides de diverses natures (Boulay et Boulay, 1999).

5.3. Situation problématique en temps de pluie

Le volume d'eau capté par les égouts est 50 fois plus élevé en temps de pluie qu'en temps sec. Or, la station d'épuration de la CUM ne peut traiter que 75% de ce volume excédentaire. En conséquence, dans de tels cas, une partie des eaux usées est rejetée directement dans le fleuve sans traitement. Ces eaux de débordement peuvent alors causer de graves problèmes pour la faune et la flore aquatiques. Un plan d'action concernant l'élimination de ces eaux de débordement n'a pas encore été mis en place (Boulay et Boulay, 1999).

5.4. Les composés chimiques présents dans les effluents et leurs effets sur la réactivité immunitaire

Les effluents municipaux (résidentiels, industriels, commerciaux et institutionnels) contiennent un grand nombre de composés chimiques pouvant être néfastes à la santé de la faune et flore aquatiques. Ils contiennent, entre autre, des métaux (aluminium, cadmium, fer, mercure, plomb, etc.), des BPCs, des HAP, des pesticides (organophosphorés et organochlorés), des herbicides, des médicaments, etc. Certains d'entre-eux sont des substances oestrogéniques. Ces substances dites des xénoestrogènes perturbent le système endocrinien en mimant complètement ou partiellement l'action d'hormones spécifiques telles que les oestrogènes, en bloquant et par le fait même en prévenant et modifiant la liaison de l'hormone à son récepteur, en modifiant la production d'hormones naturelles et finalement en interférant avec la fabrication et la fonction des récepteurs hormonaux.

Ces modulateurs endocriniens proviennent de nombreux produits chimiques fabriqués par l'homme à des fins spécifiques, tels que les pesticides et les plastiques ou des sous-produits engendrés suite à des procédés manufacturiers. Ils peuvent aussi provenir de produits pharmaceutiques, tels que les pilules contraceptives contenant de l'éthinyl oestradiol (Purdom *et al.*, 1994). Les effluents contiennent aussi d'autres xénoestrogènes tels les nonylphénols et les alkylphénols polyéthoxylates (APEOs).

Introduits en 1940, ils représentent le deuxième groupe le plus important de surfactants non ioniques dans la production industrielle. Ils sont présents dans les détergents, les peintures, les cosmétiques, les herbicides et autres produits commerciaux. Des 300 000 tonnes produites annuellement dans le monde entier, 60% d'entre elles sont rejetées dans l'environnement aquatique après traitement ou non des eaux usées (Naylor *et al.*, 1992). Des conditions anaérobiques engendrent l'accumulation de ces substances dans les boues d'épandage et les sédiments de rivières. Il n'est donc pas étonnant que ces contaminants aient été détectés dans l'eau potable (Clark *et al.*, 1992).

Les hormones contrôlent de façon équilibrée la croissance, la reproduction, le développement sexuel, neurologique et le système immunitaire. En provoquant un déséquilibre hormonal, les xénoestrogènes peuvent donc moduler de nombreux autres systèmes sous le contrôle du système endocrinien. Chez les mammifères, des preuves expérimentales et cliniques supportent l'hypothèse que les hormones sexuelles stéroïdes influencent le développement et la fonction du système immunitaire (Grossman, 1984). En effet, l'oestradiol stimule l'involution du thymus. En outre, la présence de récepteurs oestrogéniques a été détectée dans les thymocytes et les lymphocytes (Jakob *et al.*, 1992). Conséquemment, les produits chimiques oestrogéniques présents dans les effluents municipaux sont susceptibles d'affecter le système immunitaire des organismes exposés.

5.5. Projet et hypothèses de recherche

Le but de cette étude est de déterminer les effets de l'exposition aux contaminants pouvant être présents dans les effluents municipaux de l'Île de Montréal. Les effets seront évalués sur la fonction immunitaire d'une espèce de poisson représentative de la faune aquatique locale. Le Queue à Tache Noire a été choisi à cette fin. En effet, ce Méné fourrageur appartenant à l'ordre des *Cyprinidés* et mesurant 2,5 à 3,0 pouces (64-76 mm) représente un poisson important dans l'écosystème aquatique; il est très répandu en Amérique du Nord. Au Canada, cette

espèce se rencontre dans les masses d'eaux de toutes les provinces, sauf dans les Maritimes, Terre-Neuve et en Colombie-Britannique. Il se nourrit de plancton, des larves d'insectes, d'algues et de plantes aquatiques. Il constitue lui même la proie de nombreux prédateurs aquatiques et terrestres (poissons, oiseaux et mammifères). Il peut être retrouvé facilement étant donné son faible taux de migration (Scott et Crossman, 1973). Finalement, en plus d'être présent dans tous les sites d'échantillonnage envisagés pour ce projet, sa taille est assez adéquate permettant ainsi le prélèvement du rein. Les poissons ont été capturés en amont et en amont du site de relargage dans le fleuve des effluents municipaux. Les îles de la Paix constituent le site de référence, l'île de Dorval et les îles de Bouchervilles se situent en aval de l'émissaire, tandis que l'îlet Vert et l'île St-Ours sont localisés respectivement à 4 km et 40 km en aval de "l'émissaire" (Figure 2).

Pour le volet des expositions en laboratoire, la Truite Arc-en-ciel a été choisie à cause de sa disponibilité et sa sensibilité face aux contaminants, ainsi que pour son système immunitaire mieux caractérisé (Braun-Nesje, Kaplan, et Seljelid, 1982; Griffin, 1984; Tillitt, Giesy et Fromm, 1988; DeKoning et Kaattari, 1991).

Afin de déterminer l'effet des effluents municipaux sur la fonction immunitaire, les réponses immunitaires non spécifique et spécifique ont été évaluées. Pour ce faire, la phagocytose et la transformation lymphoblastique ont été choisies. En premier lieu, des Queues à Tache Noire ont été capturées aux différents sites mentionnés plus haut et la fonction immunitaire étudiée. La méthodologie détaillée concernant cette expérience effectuée *in situ* est décrite dans le deuxième article du mémoire.

En deuxième lieu, des Truites Arc-en-ciel ont été exposées à différentes dilutions d'effluents municipaux (groupe témoin; 0,001/30; 0,01/30; 0,1/30 et 1/30 (dilution d'effluent au site de déchargement)) pendant des périodes de 15 et de 45 jours. Suivant ces expositions, la compétence immunitaire des poissons a aussi été évaluée. Par la suite, des sous-groupes de poissons exposés préalablement aux différentes concentrations d'effluents mentionnées ci-haut ont été infectés par *Aeromonas salmonicida* et suivis pour une période additionnelle de 15 jours. Les

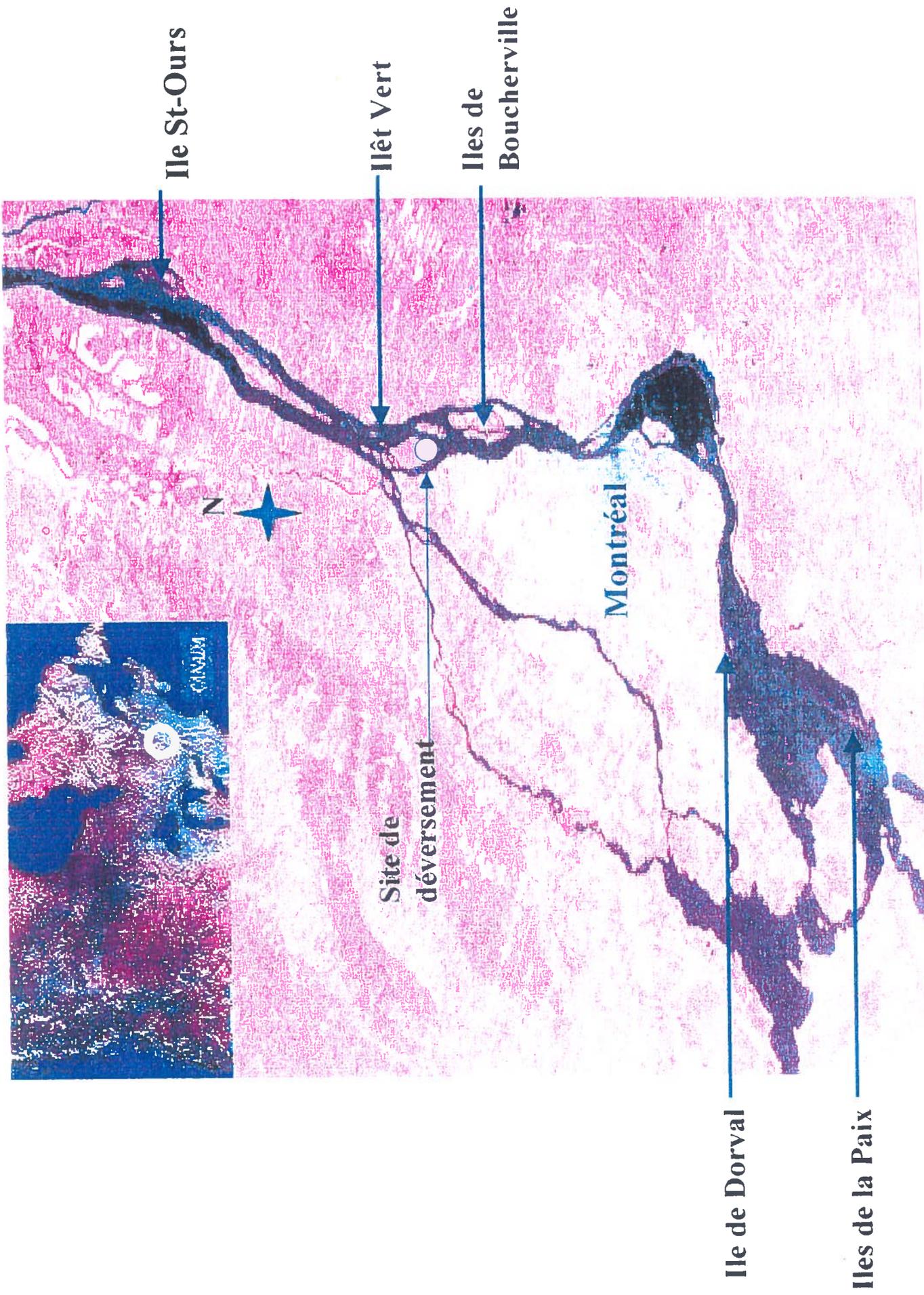


Figure 2: Cartographie des différents sites d'échantillonnage en amont et en aval du lieu de déversement des effluents municipaux de l'île de Montréal.

résultats concernant ces expériences sur la truite arc-en-ciel sont présentés dans le premier article.

DEUXIÈME PARTIE

CONTRIBUTION PERSONNELLE À L'ARTICLE 1

L'article 1 vise à comprendre les effets des effluents de l'Île de Montréal sur la compétence immunitaire du Queue à Tache Noire (*Notropis hudsonius*). Ma contribution personnelle a été de rédiger la section Introduction, d'aider à capturer les poissons à l'Île de Dorval, l'Île de Boucherville et l'Îlet Vert, de déterminer la compétence immunitaire de ces poissons en effectuant les suspensions cellulaires, en déterminant la viabilité des cellules et en mettant la méthode de phagocytose au point chez le Queue à Tache Noire, ceci ayant été fait pour la première fois chez cette espèce. De plus, j'ai effectué la collecte des données (analyses effectuées en utilisant le FACScan), la compilation et l'interprétation des résultats (les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le programme Sigmastat version 3.0). De plus, j'ai effectué la rédaction des sections Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion, et Références.

N.B. Cet article représente ma contribution personnelle et sera complété en utilisant d'autres résultats d'immunotoxicologie, de parasitologie et de biologie moléculaire. Selon la nature et l'amplitude des résultats ajoutés l'ordre des auteurs pourrait être modifié.

ARTICLE 1:

Effets des effluents municipaux de l'Île de Montréal sur la compétence immunitaire du Queue à Tache Noire (*Notropis Hudsonius*)

Résumé

Cette étude porte sur l'effet des contaminants présents dans les effluents municipaux de l'Île de Montréal sur la compétence immunitaire du Queue à Tache Noire (*Notropis hudsonius*). Des poissons ont été capturés à cinq sites différents en amont et en aval du site de décharge des effluents, soit aux Iles de la Paix (site de référence), à l'Île de Dorval, aux Iles de Boucherville, à l'Îlet Vert (4 km en aval) et à l'Île St-Ours (40 km en aval). Des prélèvements de reins ont été effectués et la réactivité immunitaire non-spécifique a été déterminée via le test de phagocytose. Une augmentation significative du nombre de macrophages chez les poissons provenant de tous les sites comparativement au site de référence a été remarquée. Toutefois, le pourcentage d'activité phagocytaire n'a augmenté que pour les Queues à Tache Noire capturés à l'Île de Dorval et à l'Île St-Ours. Les captures de l'Îlet Vert, l'endroit le plus proche du site de décharge ont montré un pourcentage d'activité phagocytaire plus bas que celui de l'Île St-Ours, situé à 35 km plus loin. Ceci peut refléter une immunosuppression de la part des poissons vivants dans un environnement présentant une concentration plus élevée de contaminants, comparativement à ceux vivants dans des eaux polluées davantage diluées où la réponse immunitaire est plus active.

ASSESSMENT OF MUNICIPAL EFFLUENT IN PROXIMITY OF MONTREAL ISLAND ON IMMUNOLOGICAL FUNCTION IN THE SPOTTAIL SHINER (NOTROPIS HUDSONIUS).

¹Escarné, R., ¹Cyr, D., ²Marcogliese, D., and ^{1*}Fournier, M.

¹INRS-Institut Armand-Frappier, 245 Hymus Boul. Pointe Claire, Quebec, Canada, H9R 3G6.

²St-Lawrence Center, Environment Canada, 105 McGill St., 7th Floor. Montreal, Quebec, Canada, H2Y 2E7

*Corresponding author, ¹INRS-Institut Armand-Frappier, 245 Hymus Boul. Pointe Claire, Quebec, Canada, H9R 3G6

Key words: municipal effluents, xenoestrogens, immunotoxicity.

ABSTRACT

A large number of chemicals present in municipal effluents pose a threat to fish health. This study focuses on the effects of such contaminants present in Montreal Island effluents on the immune function of the spottail shiner (*Notropis hudsonius*). Fish were captured at five different sites located upstream and downstream of the municipal discharge area: Îles de la Paix (reference site, 90km upstream), Dorval Island (70km upstream), Îles de Boucherville (4km upstream), Ilôt Vert (4km downstream) and Île St-Ours (40km downstream). Fish kidneys were collected and non specific immune function was determined by phagocytosis of fluorescent latex beads. Analyses were done using a FACScan. A significant increase was observed in fish macrophage numbers at all sites compared to the the control site. The percentage of phagocytic activity was significantly increased for fish captured at Dorval and Île St-Ours only. Ilôt Vert, the nearest point to the discharge area showed a percentage of phagocytosis and a phagocytic activity lower than those of Île St-Ours, located at 40km downstream. This may reflect an immunosuppression in fish living in an environment with a higher concentration of contaminants as opposed to fish living in more diluted waters where the immune response is enhanced in presence of pathogens.

INTRODUCTION

Municipal sewage effluents contain a large number of chemical substances known to disturb several fundamental physiological and metabolic functions, as well as growth, reproduction and behavioral capabilities in fish (Burgess et al. 1995). This may lead to long term consequences for survival of fish populations. On the Island of Montreal (Quebec, Canada), municipal effluents are channeled towards a single treatment plant located in the east-end of the island. Therefore, the effluents are released only at one site, resulting in a much higher load at the given site on the St-Lawrence River. These municipal effluents contain a number of complex mixtures coming from industrial and domestic discharges. Thus, it is important to determine the impact of these contaminants on the fauna of the St-Lawrence.

Recent evidence suggests that a wide number of these chemicals present in effluents are capable of modifying endocrine function in numerous fish species. These contaminants are referred to as endocrine disrupting chemicals (EDCs) (Flouriot *et al.* 1995; Nimrod and Benson 1996). In oviparous vertebrates, vitellogenin (Vtg), a glycoposphoprotein, is synthesized in female liver and cleaved, by the maturing oocytes, into yolk protein subunits, phosvitin (mol.wt. 35,000) and lipovitellin (mol.wt. 140,000), along with other minor products (Wiley and Wallace 1981). Vtg synthesis is controlled by β -estradiol (E2) produced by the ovary (Wahli *et al.* 1981). E2 regulates target gene expression by binding to the estrogen receptor (ER). This E2/ER complex interacts with small DNA sequences, known as estrogen responsive elements (ERE) present in the 5' regulatory region of genes that modulate transcriptional activity (Beato 1989). Although Vtg is a female-specific protein, male fish produce Vtg if exposed to estrogens (Pelissero *et al.* 1993). Therefore if males are exposed to chemical estrogens, Vtg will be synthesized. In fact, just like natural estrogens these so-called xenoestrogens are small molecules with similar activity to E2. They exert their action by binding to the ER and regulate the synthesis of Vtg (Sumpter and Jobling 1995).

It was initially thought that ethinyl estradiol, found in sewage treatment works and originating from use of contraceptive pills was responsible for such actions. However, more recent studies put the blame on alkylphenolic chemicals, such as

alkylphenol poly ethoxylates (APEOs), originating primarily from the use of detergents, paints, cosmetics, herbicides, and many other formulated products (White *et al.* 1994). From 300 000 tons produced annually world-wide, 60% of these APEOs end up in the aquatic environment after sewage treatment works. It is therefore not surprising that such chemicals have been detected in drinking water (White *et al.* 1994).

Fish are vulnerable to invasive agents. Fortunately, there are nonspecific defense mechanisms ready to fight the invasive agents. Phagocytosis represents one of these mechanisms where tissue macrophages engulf and destroy foreign particles (Corbel 1975).

In the present study, spottail shiners were captured at five sites upstream and downstream to the municipal discharge area each receiving different concentrations of effluent: Îles de la Paix (reference site, 90km upstream), Dorval Island (70km upstream), Îles de Boucherville (4 km upstream), Ilôt Vert (4km downstream) and Île St-Ours (40km downstream). The aim of the study was to determine the effect of xenoestrogens on the immunological function of the spottail. The spottail shiner was selected due to its importance in the ecosystem. In fact, it is found in all the studied sites, it serves as food for larger fish, and can be easily studied due to its low rate of migration and its big enough size allowing kidney samples to be taken.

MATERIALS AND METHODS

Study site

We established three sampling sites upstream and two downstream to the municipal discharge area each receiving different concentrations of effluent: Iles de la Paix (reference site), Dorval Island, Iles de Boucherville, Iles de Contrecoeur (40km downstream from the discharge site) and Ilôt Vert (4km downstream from the discharge site). Spottail shiners were captured with a foot seine. The fish were kept alive in river water to which was added 0.1% NaCl, and transported to the laboratory where they were measured, weighed and pithed before organ collection.

Determination of immune function

Preparation of Cell Suspensions

The kidney was removed aseptically using forceps and placed in a Petri dish containing 1mL of sterile RPMI 1640 (Bio Media, Drummondville, Quebec, Canada) supplemented with heparin (10 U/ml) (ORGANON Teknika, Toronto, Ontario, Canada), HEPES (20 mM), Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 mg/ml) (Bio Media, Drummondville, Quebec, Canada) and 5% (v/v) Fetal Bovine Serum (Bio Media, Drummondville, Quebec, Canada). Cell suspensions were obtained by gentle dissociation of kidney in the Petri dishes. The suspension was then transferred in a 15ml 17 x 120 mm polypropylene conical tube (Sarstedt, Newton, NC, USA) where supplemented RPMI was added to a final volume of 5 ml. The cells were washed once and adjusted to 5×10^6 cells/ml with supplemented RPMI.

Determination of Viability

Viability was determined by trypan blue stain exclusion (0.4%; GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA). The number of viable and dead cells was determined microscopically with a hemacytometer (Bright-line, Horsham, PA, USA).

Phagocytosis

A 200 μL volume of each cell suspension was prepared at 10^6 cells/ml in a 12 x 75 mm polypropylene round-bottom culture tube (Simport, Beloeil, Quebec, Canada). The cells were incubated at 19°C for 1h. Fluorescent latex beads ($d= 1,716 \mu$) were added to the cells at a 100:1 ratio (beads:cell). The cells were then incubated at 19°C for 18h. Following the incubation period, 0.5 ml of supplemented RPMI with 0.5% formalin (SIGMA Chemical Co., St-Louis, USA) was added and then layered over a 5% gradient of bovine serum albumin (BSA) (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO, USA) prepared in supplemented RPMI. The gradient suspension was centrifuged at 1000 RPM for at 4°C for 8 min to remove free beads. The cell pellets were then resuspended in 0.5 mL of 0.5% formalin in Phosphate Buffered Saline (PBS) (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada). Analyses were done using a FACScan (counting 15 000 events) (Becton Dickinson, San Diego, California, USA). The percentage of cells containing one or more beads represent the percentage of macrophages present. The percentage of cells containing three or more beads represent the phagocytic activity of the macrophages. Lymphocytes were used as negative control.

Statistical Analyses

The data were tested for normality, homogeneity of variance and analyzed using One Way ANOVA. Significance was concluded at $P < 0.05$.

RESULTS and DISCUSSION

The number of macrophages assessed by phagocytosis of one or more fluorescent beads was significantly increased in spottail shiners captured at all sites except the reference site (Fig.1 and Fig. 2). Although Dorval Island is located upstream of the municipal discharge area, the phagocytic activity is significantly higher than that of the reference site. One can assume that other unknown factors may be implicated (e.g. parasites). Nonetheless, this level of phagocytic activity is lower than that of Île St-Ours, a phenomenon which is expected. In fact, the percentage of phagocytosis reached the highest values with spottail shiners captured at Île St-Ours (28.58%). Furthermore, active phagocytosis (cells engulfing 3 or more beads) was significantly increased for fish captured at Dorval Island and Île St-Ours only. Once again, Île St-Ours showed the highest phagocytic activity (11.85%). Although, Ilôt Vert is the nearest to the discharge area (4km downstream) the percentage of phagocytosis as well as the phagocytic activity are lower than those of Île St-Ours which is located 40km from the discharge area. The lower activity observed in fish captured from Ilôt Vert may reflect immunosuppressive effects. Our previous field studies in 1998 indicated that male spottail shiners (*Notropis hudsonius*) sampled from Îles de la Paix, Boucherville, Ilôt Vert and Île St-Ours had measurable levels of hepatic Vtg mRNA (data not shown). In addition, these levels were much higher downstream from the MUC wastewater treatment plant's point of discharge.

Furthermore, fish captured at Île St-Ours showed a higher Vtg mRNA expression than those captured at Ilôt Vert. This is in accordance with the present immunological results. Furthermore, it could be due to an effect related to the presence of estrogens. It is known that hormones can directly or indirectly affect the immune system. In mammals,

both clinical and experimental evidence support the hypothesis that sex steroids influence the immune system, that is to say its development and function (Grossman 1984). In fact, E2 stimulates the involution of the thymus. It decreases the number of immature thymocytes and increases the number of mature lymphocytes (Okuyama *et al.* 1992). In addition, estrogen receptors have been found in both thymocytes and lymphocytes (Jakob *et al.* 1992). Therefore, the chemicals present in municipal effluents that mimic the effects of such hormones can adversely affect the immune system of fish.

In conclusion, this study demonstrates that the immune function of the spottail shiner is indeed altered by the presence of municipal effluent contaminants. A significant increase in macrophage numbers was observed at all sites compared to the control site. The percentage of phagocytic activity was significantly increased for fish captured at Île St-Ours.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Pauline Brousseau, Dr. Andrew Rooney, Dr. Ken Finnsen and Miss. Marlène Fortier for their technical help.

REFERENCES

- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell*. **56** (3): 335-344
- Burgess, R. M., Ho, K. T., Tagliabaue, M. D., Kuhn, A., Comeleo, R., Comeleo, P. Modica, G., and Morrison, G. E. (1995). Toxicity characterization of an industrial and municipal effluent discharging to marine environment. *Mar. Poll. Bull.* **30** (8): 524-535.
- Corbel, M. J. (1975). The immune Response in Fish. A review. *J. Fish. Biol.* **7**, 539-543.
- Flouriot G, Pakdel F, Ducouret B, Valotaire Y. (1995) Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenine gene expression. *J. Mol. Endocrinol.* **15**(2):143-151.
- Grossman, C. J. Regulation of the immune system by sex steroids. (1984). *Endocr. Rev.* **5** (3): 435-455.
- Jakob, F., Tony, H.P., Schneider, D., and Thole, H.H. (1992). Immunological detection of the estradiol receptor protein in cell lines derived from the lymphatic system and the haematopoietic system: variability of specific hormone binding in vitro. *J. Endocrinol.* **134** (3): 397-404.

- Sumpter, J.P., and Jobling, S. (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health. Perspect.* **103** (suppl. 7): 173-178.
- Nimrod, A. C. and Benson, W.H. (1996) Estrogenic responses to xenobiotics in channel catfish *Ictalurus Punctatus*. *Marine. Environ. Research.* **42**(1-4), 155-160.
- Okuyama, R., Abo, T., Seki, S., Ohteki, T., Sugiura, K., Kusumi, A., and Kumagai, K. (1992) Estrogen administration activates extrathymic T cell differentiation in the liver. *J. Exp. Med.* **175** (3):661-669.
- Pelissero, C., Flouriot, G., Foucher, J. L., Bennetau, B., Dunogues, J., Le Gac, F., Sumpter, J. P. J.(1993) Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes; an in vitro test for the estrogenic potency of chemicals. *Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **44**, (3): 263-272.
- Wahli, W., Dawid, I.B., Ruffel, G.U., and Weber, R. (1981) Vitellogenesis and the vitellogenin gene family. *Science* **212** (4492): 298-304.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P., and Parker, M.G. (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology.* **135** (1): 175-182.

Wiley, H.S., and Wallace, R.A. (1981) The structure of vitellogenin. Multiple forms of the yolk proteins. *J.Biol.Chem.* **256** (16): 8626-8634.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Regional map of the five study sites.

Figure 2. Phagocytosis in spottail shiner captured at five study sites. Data are expressed as mean \pm SEM. * and ** indicate a significant difference ($P < 0.05$) from reference site, determined by ANOVA.

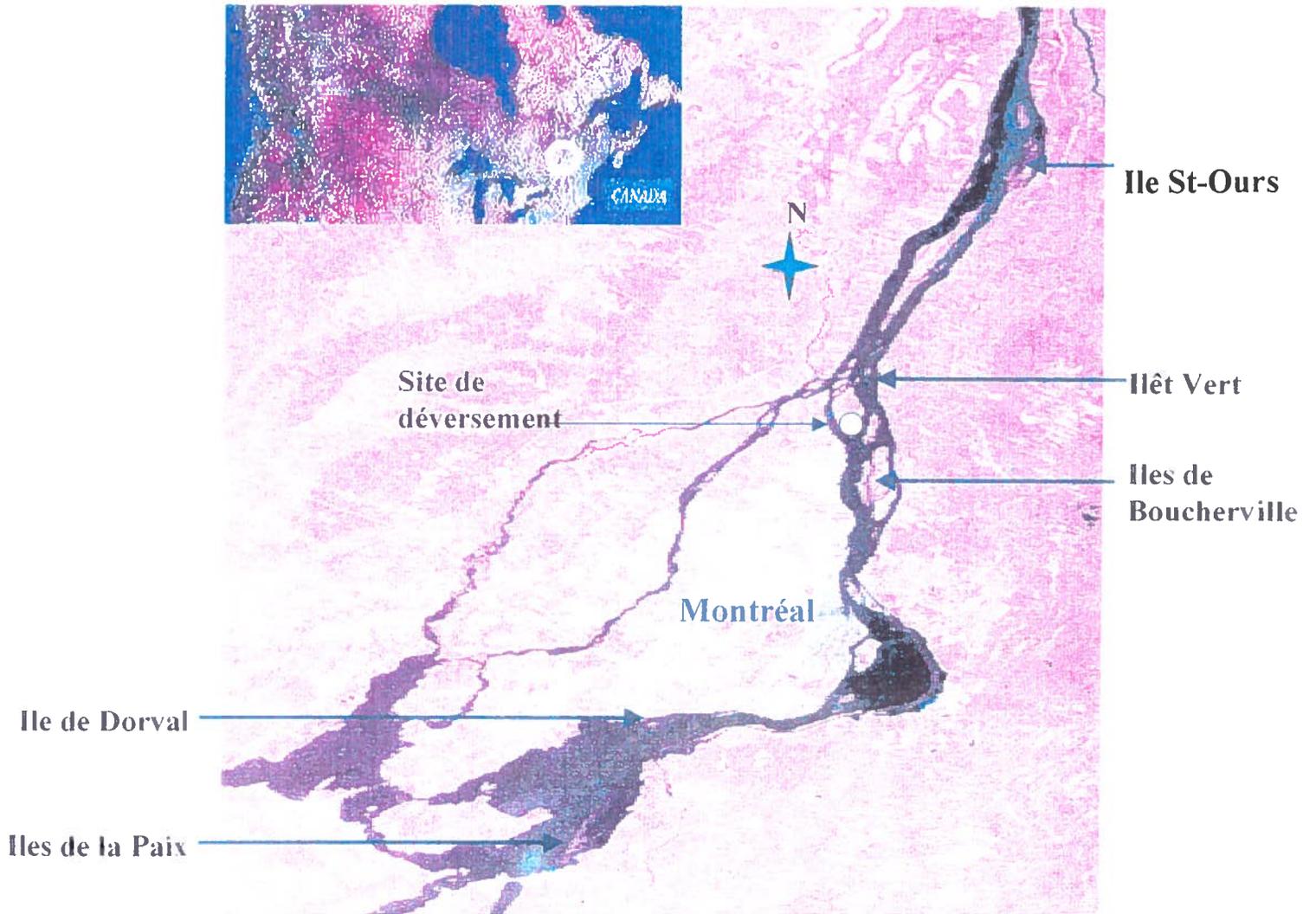


Figure 1

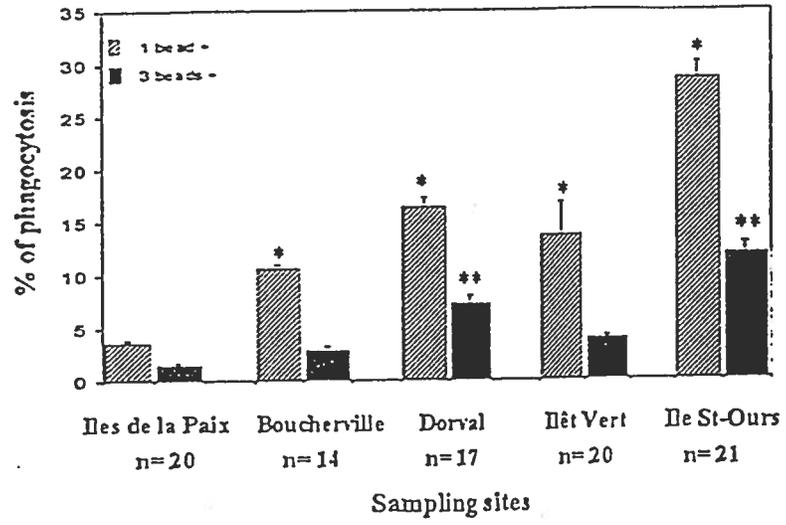


Figure 2

CONTRIBUTION PERSONNELLE À L'ARTICLE 2

L'article 2 vise à comprendre les effets des effluents municipaux sur la compétence immunitaire et la fonction thyroïdienne de la Truite Arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Ma contribution personnelle a été de rédiger le volet immunologique de la section Introduction, d'effectuer l'exposition des poissons aux différentes dilutions d'effluents municipaux pour la première expérience de 15 jours, de faire les suspensions cellulaires, de déterminer la viabilité des cellules ainsi que d'effectuer les tests immunologiques (phagocytose, transformation lymphoblastique) et les tests de résistance bactérienne pour les deux expériences (de 15 et de 45 jours). L'exposition des poissons aux différentes dilutions d'effluents municipaux pour la deuxième expérience (de 45 jours) a été effectuée par Martin Poirier, étudiant en Maîtrise à l'Université du Québec, INRS-Institut Armand Frappier, Centre de recherche en Santé Humaine. J'ai également effectué la collecte des données, la compilation et l'interprétation des résultats (les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le programme Sigmastat version 3.0) pour les deux expériences. De plus, j'ai effectué la rédaction du volet immunologique des sections Matériel et Méthodes, Résultats, Discussion et Références.

N.B. Cet article a déjà été soumis au Journal of Toxicology and Environmental Health.

ARTICLE 2:

Effets des effluents municipaux sur la compétence immunitaire et la fonction thyroïdienne de la Truite Arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Résumé

Le but de cette étude a été de déterminer l'effet des effluents municipaux de l'île de Montréal sur la compétence immunitaire de la Truite Arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) *in vitro*. Pour ce faire, cinq groupes de 30 jeunes poissons ont été exposés à des dilutions de 0.001/30, 0.01/30, 0.1/30 et 1/30 d'effluents pour une durée de 15 et de 45 jours. La compétence immunitaire a été déterminée chez 15 poissons de chaque groupe. Le restant des truites a été exposé à *Aeromonas salmonicida* afin de détecter la susceptibilité d'infection causée par la bactérie en question. En ce qui concerne la réponse immunitaire, des tests de phagocytose et de transformation lymphoblastique ont été effectués. Suite à l'exposition de 15 jours, le nombre de macrophages, ainsi que le pourcentage d'activité phagocytaire, se sont vus accroître chez les poissons exposés aux dilutions d'effluent de 0.001/30 et de 0.01/30. Le nombre de lymphocytes stimulés en présence de Con A a augmenté chez les truites exposées aux dilutions de 0.1/30 et de 1/30 alors que les cellules stimulées avec la PHA ont montré une diminution significative comparativement au témoin et ce pour toutes les dilutions utilisées. Suite à l'exposition de 45 jours, l'activité phagocytaire a diminué chez les poissons exposés à la dilution de 0.01/30, tandis qu'elle a augmenté chez les truites exposées aux fortes dilutions, suggérant qu'une exposition prolongée à de faibles concentrations d'effluents provoque une baisse d'activité phagocytaire alors qu'elle engendre une hausse en présence de fortes concentrations. De plus, à long terme, les lymphocytes stimulés en présence de PWM montrent une diminution de cette activité chez les truites exposées à la dilution de 1/30. Finalement, dans les deux cas (15 et 45 jours) le groupe témoin s'avère être le plus sensible à la présence de *A. salmonicida*, avec environ 70% des poissons infectés. Les effluents municipaux n'ont aucune influence sur le statut thyroïdien.

**EFFECTS OF MUNICIPAL SEWAGE EFFLUENT ON IMMUNE AND
THYROID FUNCTION OF RAINBOW TROUT (ONCORHYNCHUS MYKISS)**

¹Escarné, R. R. F., ¹Finnson, K.W., ¹Cyr, D.G., ²Marcogliese, D. J., and ^{1*}Fournier, M.

¹INRS-Institut Armand-Frappier, 245 Hymus Boul. Pointe-Claire, Quebec, Canada, H9R 3G6

²St-Lawrence Center, Environment Canada, 105 McGill St., 7th Floor, Montreal, Quebec, Canada, H2Y 2E7

*Corresponding author, INRS-Institut Armand-Frappier, 245 Hymus Boul. Pointe-Claire, Quebec, Canada, H9R 3G6

Key words: deiodinase, immunotoxicity, municipal effluents, thyroid hormones, rainbow trout

ABSTRACT

Municipal sewage effluents contain a complex mixture of chemical substances known to disturb immune and endocrine functions. The aim of this study was to determine the effect of municipal sewage effluents on immune and thyroid function of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Five groups of 30 juvenile rainbow trout were exposed to 0.001/30, 0.01/30, 0.1/30 and 1/30 dilutions of Montreal municipal effluent for a period of either 15 or 45 days. Immunological function was assessed on 15 trout from each group and the remaining fish were challenged with *Aeromonas salmonicida*, a bacteria which causes furunculosis. These fish were returned to aquaria and monitored for 15 days for the appearance of red sores. Phagocytosis by kidney macrophages was measured by flow cytometry using fluorescent latex beads. Proliferative responses to concanavalin A (Con A), phytohemagglutinin (PHA) and pokeweed mitogens (PWMs) by kidney lymphocytes were determined by [³H]-thymidine incorporation into replicating DNA. Thyroidal status was assessed by measuring hepatic T₄ 5'-deiodinase activity. For the 15 day exposure, both number and phagocytic activity of macrophages were significantly increased in trout exposed to lower levels of effluent (0.001/30 and 0.01/30) relative to the control group. However, this response was not observed in trout exposed to higher effluent concentrations (0.1/30 and 1.0/30) suggesting a possible immunosuppressive effect. Con A stimulation of lymphocyte proliferation was increased in trout exposed to 0.1/30 and 1/30 effluent concentrations. In comparison, PHA stimulation of lymphocyte proliferation was decreased in trout exposed to all effluent concentrations relative to the control group. PWM stimulation of lymphocyte proliferation was not significantly different among all groups tested. These data suggest that certain sub-populations of T-lymphocytes are stimulated while others are suppressed by effluent exposure, even at low effluent concentrations. For the 45-day exposure group, both number and phagocytic activity of macrophages were significantly decreased in trout exposed to 0.01/30 effluent dilution. However, phagocytic activity was significantly higher in trout exposed to 0.1/30 and 1/30 dilutions. Neither Con A nor PHA stimulation of lymphocyte proliferation was significantly different among all groups tested. However, cells stimulated with PWM were significantly lower in trout exposed to 1/30 effluent dilution. These results differ from that of the 15-day exposure indicating that the overall immune response of trout to municipal sewage effluent depends on effluent concentration and exposure time. Control trout were more sensitive to *A. salmonicida* exposure and resistance increased with increasing effluent concentrations in both 15- and 45-day exposure groups. Hepatic T₄ 5'-deiodinase activity in control and effluent exposed trout were not significantly different. This study is the first documented evidence of *in vitro* alteration of immune function in fish caused by municipal effluents.

INTRODUCTION

There has been a considerable effort over the past few years to limit the dumping of organic matter into aquatic ecosystems around the island of Montreal (Quebec, Canada). A number of measures have been taken in order to channel municipal effluents towards a treatment plant localized in the east end of the island. Nonetheless, these contaminants are now concentrated and released at only one site, resulting in a much higher load at the given site on the St-Lawrence River. These municipal effluents contain a number of complex mixtures coming from industrial and domestic discharges. It is known that aquatic pollution causes immunotoxicity to fish (Luebke *et al.* 1997). Many studies have shown that pulp mill effluents impair immune function *in vitro* and *in vivo*. Hardig *et al.* (1988) have shown that long-term exposure to kraft paper mill effluents affected the red blood cell count, the ion balance and the vertebral structure of fourhorn sculpin (*Myoxocephalus quadricornis*). Fournier *et al.* (1998) showed a decrease in phagocytic activity and oxidative burst in mummichog (*Fundulus heteroclitus*) captured downstream from a bleached kraft pulp mill. Andersson *et al.* (1988) observed an alteration in white blood cell count in perch (*Perca fluviatilis*) exposed to the same type of effluents. Although these studies have demonstrated the effect of such effluents on the immune function of fish, whether these or other effects are mediated by municipal effluents is unknown. To our knowledge, this is the first *in vitro* study conducted to evaluate the effects of municipal effluents on immune competence of trout.

Utilization of functional immunological tests for the evaluation of fish health are now growing in use. Immunocompetence can be readily assessed using a number of

immunological parameters as biomarkers of toxicity (Brousseau *et al.* 1999). Fish are vulnerable to invasive agents. Fortunately, there are nonspecific defense mechanisms prepared to fight the invasive agents. Phagocytosis is one of the mechanisms where tissue macrophages engulf and destroy foreign particles (Corbel 1975). Nonspecific defense mechanisms are extremely important and must respond quickly in trout, because fish have fewer complex specific immune capabilities than higher vertebrates (Anderson and Zeeman 1995). However, fish also possess specific defense mechanisms (Warr *et al.* 1976) mediated by T-lymphocytes. These immunocompetent cells require continued proliferation in order to protect the host against pathogens (Brousseau *et al.* 1999). Thus phagocytosis and lymphocyte proliferation are important parameters for assessing immune function in fish.

Thyroxine (T_4) is the main thyroid hormone (TH) secreted from the fish thyroid and is a common index of fish thyroidal status. However, much of the control of the fish thyroid system also occurs in liver and other tissues where T_4 is converted to either bioactive 3,3',5-triiodothyronine (T_3) or inactive 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T_3 ; rT_3) (Eales and Brown, 1993). These extrathyroidal conversions are catalyzed by a family of independently-regulated microsomal deiodinases. Deiodinase assays have been evaluated as potential biomarkers for exposure to chemicals that directly or indirectly disrupt TH homeostasis or thyroidal status (Eales *et al.*, 1999).

We measured phagocytosis, lymphocyte proliferation and hepatic deiodinase activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to the following sewage effluent dilutions: 0.001/30, 0.01/30, 0.1/30 and 1/30 (dilution present at the municipal discharge area) for either 15 or 45 days. We also assessed functional immunity in trout

by challenging a second subgroup with *Aeromonas salmonicidae*, a bacteria known to cause furunculosis. Rainbow trout were a suitable model species for this study because of its sensitivity to contaminants and its well-characterized immune (Braun-Nesje *et al.* 1982; Tillit *et al.* 1988) and thyroidal system (Eales and Brown, 1993; Eales *et al.*, 1999).

MATERIALS AND METHODS

Animals and Exposure Conditions

Juvenile rainbow trout, weighing an average of 10g, were acclimated for one week in 120L glass aquaria containing chlorine free tap water, under static conditions at 15°C. The fish were kept in a photoperiod of 12h light/12h dark.

For the 15 and 45 day exposure, 30 fish per group were exposed under the same static conditions to the following sewage effluent dilutions: 0.001/30, 0.01/30, 0.1/30 and 1/30. The control consisted of a non-exposed group. We based this dilution factor on coliform levels at the discharge site exposed directly to the effluent and on the calculations done by the biologists and engineers at the Montreal Urban Community (MUC) water treatment facility. The effluent sample was collected by the MUC water filtration plant during peak output (mid-day) one day prior to the experiments. The effluent was aliquoted and frozen at -20°C. Each morning, fish were fed 1% body

weight of Trout Chow G1.5 (Menerie Gaetan Thibodeau, Quebec, Canada) and 50% of the water, including effluent, was renewed.

Preparation of Cell Suspensions

After the 15 and 45 day exposure, 15 fish per group were anesthetized (MS-222; 100 µg/l), measured and weighed (Tables 1 and 2). The kidney was removed aseptically using forceps and placed in a Petri dish containing 1 ml of sterile RPMI 1640 (Bio Media, Drummondville, Quebec, Canada) supplemented with heparin (10 U/ml) (Organon Teknika, Toronto, Ontario, Canada), HEPES (20 mM), Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 mg/ml) (Bio Media,) and 5% (v/v) Fetal Bovine Serum (Bio Media). Cell suspensions were obtained by gentle dissociation of kidney in the Petri dishes. The suspension then was transferred to a 17 x 120 mm-15 ml polypropylene conical tube (Sarstedt, Newton, NC, USA) and RPMI was added to obtain a final volume of 5 ml. The cells were washed once and adjusted to 5×10^6 cells/ml with supplemented RPMI.

Determination of Viability

Viability was determined by trypan blue stain exclusion (0.4%; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). The number of viable and dead cells was determined microscopically with an hemocytometer (Bright-line, Horsham, PA, USA).

Phagocytosis

A 200 μ l volume of each cell suspension was prepared at 10^6 cells/ml in a 12 x 75 mm polypropylene round-bottom culture tube (Simport, Beloeil, Quebec, Canada). The cells were incubated at 19°C for 1h. Fluorescent latex beads ($d= 1.716 \mu$ m) were added to the cells at a 100:1 ratio (beads:cell). The cells were then incubated at 19°C for 18h. Following the incubation period, 0.5 ml of supplemented RPMI with 0.5% formalin (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO, USA) was added and layered over a 5% gradient of bovine serum albumin (BSA) (Sigma Chemical Co.) prepared in supplemented RPMI. The gradient suspension was centrifuged at 1000 RPM at 4°C for 8 min to remove free beads. The cell pellets were then resuspended in 0.5 ml of 0.5% formalin in Phosphate Buffered Saline (PBS) (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada). Analyses were done using a FACScan (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) counting 15 000 events. The percentage of cells containing one or more beads represent the percentage of macrophages present. The percentage of cells containing three or more beads represent the phagocytic activity of the macrophages. Lymphocytes were used as negative control.

Mitogenic Assay

Preliminary tests were done allowing us to determine the optimal concentration of mitogens needed to obtain a maximum stimulation index by kidney lymphocytes (data not shown). We used these same concentrations for the present mitogenic assays. In 96 well flat bottomed microplates (Sarstedt, Newton, NC, USA) 100 μ l of 5×10^6 kidney

cells/ml were incubated with 10 µg/ml of concanavalin A (Con A) or 20 µg/ml of phytohemagglutinin (PHA) or 200 µg/ml of Pokeweed mitogen (PWM) (Sigma Chemical Co). Control groups consisted of cells incubated with supplemented RPMI. All samples were tested in triplicate. Supplemented RPMI used for these assays contained 0.004 µl/ml of 2-mercaptoethanol (Sigma Chemical Co.). The cells were incubated for 96 h. At 18 h before harvest 0.5 µCi/well of [³H]-methyl thymidine (ICN Biomedicals, Costa Meca, CA, USA) was added to each well. The cells were harvested with a semiautomatic cell harvester (Skatron Instruments AS, Lier, Norway). Radioactivity was determined by liquid scintillation counting (LKB Wallac 1217 Rackbeta scintillation counter) and the data expressed as Stimulation Indexes (SI).

Bacterial Resistance

The remaining 15 fish per group from the prior exposure to effluent experiment were anesthetized with MS-222 (100 µg/l) and exposed for 7 min to water containing *Aeromonas salmonicida* (10⁸ bacteria/ml). The fish were monitored for 15 days for the appearance of red sores and death due to infection.

Hepatic Microsome Preparation

Livers were removed, frozen in liquid nitrogen and stored at - 80 C prior to microsome preparation. Frozen livers were pooled in triplicate and added to 4 vol (w/v) of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH=7.2) containing 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA and 10 mM

dithiothreitol (DTT; Sigma). Livers were homogenized by three strokes of a motorized pestle (Dynamix, Fisher Scientific) and the resulting homogenates added to plastic centrifuge tubes. The crude homogenate was centrifuged (Beckman L8-80 Ultracentrifuge; Ti-80 rotor) at 730 g for 20 min to obtain the crude nuclear pellet. The postnuclear supernatant was centrifuged at 25 200 g for 20 min to obtain the crude mitochondrial/lysosomal pellet. The post mitochondrial/lysosomal supernatant was centrifuged at 110 000g for 67 min to obtain the microsomal pellet. Microsomal pellets were resuspended in 1 ml of Tris-HCl (pH=7.2) buffer and stored at -80 C.

Deiodinase Assay

The deiodinase assay was based on the procedure of Eales *et al.* (1999). Microsomal fractions were thawed on ice and diluted 1:10 with 0.1 M sodium phosphate buffer (pH=7.2) containing 2mM EDTA and 10 mM DTT to obtain a final microsomal protein concentration of ~ 0.3 mg/ml. A volume of 500 μ l of the diluted microsomal fraction was added to 16 x 100 mm glass incubation tubes and equilibrated on an Orbitron Rotator (Boekel Scientific, Feasterville, PA) at 12 C for 30 min in darkness. Control tubes received 500 μ l of sodium phosphate buffer alone. The reaction was started by adding 20 μ l of [3',5'-¹²⁵I]T₄ (100 000 cpm; final conc. = 1 or 1000 nM) previously dissolved in 0.1N NaOH. The reaction was stopped after 60 min by adding 1 ml of chloroform/methanol (2:1 v/v). Tubes were vortexed and centrifuged at 3000 rpm for 5-10 min. A 250- μ l aliquot of the supernatant was added to Sephadex LH-20 (Pharmacia, Baie d'Urfé, Quebec, Canada) minicolumns containing 750 μ l of 1.0 N HCl. Columns

were swirled and drained and radioiodide collected with 3 ml of 0.1 N HCl. The radioiodide fraction was counted in a gamma counter (Packard System, Mississauga, Ontario, Canada). Deiodination rate was determined by subtracting the cpm of control tubes (- microsome) from cpm of experimental tubes (+ microsome). Deiodination activity was expressed as fmol of T₄ deiodinated . min⁻¹. mg protein⁻¹. Protein concentration was determined using the BioRad protein assay (BioRad, Mississauga, Ontario, Canada).

Statistical Analyses

The data were tested for normality, homogeneity of variance and analysed using One Way ANOVA. Significance was established at $P < 0.05$.

RESULTS

Immune competence after a 15 day exposure to municipal effluents

Phagocytosis:

The number of macrophages assessed by the phagocytosis of one or more fluorescent beads was significantly increased in trout exposed to 0.001/30 and 0.01/30 effluent. No effect was observed at other concentrations. Active phagocytosis (cells engulfing 3 or more beads) was also significantly increased at the same exposure doses (Fig.1).

Mitogenic Assay:

There was a significant increase in the percent response of lymphocytes stimulated with Con A for the 0.1/30 and 1/30 effluent dilutions. Con A activation in cells collected from the two lower exposure doses were not different from controls (Fig. 2a). PHA stimulation of lymphocyte proliferation was significantly decreased in trout exposed to effluent (0.001/30, 0.01/30, 0.1/30 and 1.0/30) relative to the control group. Cells stimulated with PWM showed no significant difference among all groups tested (Fig. 2c).

Bacterial Resistance:

Control trout were the most sensitive to *Aeromonas* exposure. By day 15, 73% of control fish displayed sores or had succumbed to the disease. The levels decreased to 33% in trout exposed to 0.001/30 effluent dilution. At higher effluent concentrations, between 6-13% of the fish displayed signs of disease (Fig. 3).

Immune competence after a 45 day exposure to municipal effluents*Phagocytosis:*

The number and phagocytic activity of macrophages were significantly lower in trout exposed to 0.01/30 effluent dilution. However, the phagocytic activity was increased in trout exposed to 0.1/30 and 1/30 dilutions (Fig. 4).

The number and phagocytic activity of macrophages were significantly lower in trout exposed to 0.01/30 effluent dilution. However, the phagocytic activity was increased in trout exposed to 0.1/30 and 1/30 dilutions (Fig. 4).

Mitogenic Assay:

No significant differences were found in cells stimulated with Con A or PHA at any given effluent concentration (Fig. 5a and 5b). However, cells stimulated with PWM showed a significant decrease in trout exposed to 1/30 effluent dilution (Fig. 5c).

Bacterial Resistance:

Once again, control trout were the most sensitive to *Aeromonas* exposure. By day 7, 70% of control fish had succumbed to the infection. The levels were lower (6.6%) in trout exposed to 1/30 effluent dilution (Fig. 6).

No significant differences were found in trout weight or length of the treated groups versus the control group (Table 1 and Table 2).

Thyroidal status

Figure 7 shows the effects of municipal sewage effluent exposure on hepatic 5'-deiodinase activity. Both high K_m ($T_4 = 1000$ nM) and low K_m ($T_4 = 1$ nM) activity in control and effluent exposed trout were not significantly different.

DISCUSSION

The aim of this study was to determine *in vitro* the effect of municipal sewage effluent on the immune and thyroid function of rainbow trout. The results obtained for the 15 day exposure period indicate a significant increase in number and phagocytic activity for trout exposed to lower (0.001/30 and 0.01/30) but not at higher effluent concentrations. This effect in which lower exposure doses can stimulate phagocytosis, while higher concentrations do not, is intriguing and has been observed *in vitro* where cells exposed to low levels of contaminants have increased phagocytic activity (Rougier *et al.* 1994). To evaluate lymphocyte competence, we used three separate activators of cell proliferation: Con A, PHA (T lymphocyte stimulator) and PWM (preferentially B lymphocyte stimulator). Our results indicate a significant increase of lymphocytes stimulated with Con A for trout exposed to higher (0.1/30 and 1/30) but not lower effluent concentrations. In contrast, cells activated with PHA showed a significant decrease in proliferation in effluent exposed groups relative to the control group. These data suggests that certain sub-populations of T lymphocytes are stimulated while others are suppressed by effluent exposure, even at the low effluent concentrations. Other populations, such as those stimulated by PWM appeared to be unaffected by effluent exposure. Arkoosh *et al.* (1996) obtained the similar results from English sole (*Pleuronectes vetulus*). Although leukocyte proliferation of splenocytes was observed, cells obtained from contaminated fish had an augmented response to Con A but showed no change in response to PWM. This suggests that the effluent effects are selectively targeting certain populations of immune cells (Arkoosh *et al.* 1996).

We also measured functional immunity by challenging the exposed fish to *A. salmonicida*, a common contaminant of fish and seafood. This fish pathogen is a known causative agent of furunculosis. The sub-acute or chronic form of this disease is recognized by the presence of lesions resembling boils in the musculature, blood-shot fins and multiple hemorrhages in the muscles and other tissues (Ferguson 1989). This procedure allowed us to determine whether the contaminants found in municipal effluents interfere with host resistance to pathogens. Although trout were directly exposed to *A. salmonicida* in water rather than by injection, the optimal bacterial dosage was difficult to establish. Nevertheless, our results indicate that control trout were most sensitive to *Aeromonas* exposure, and that resistance to bacterial infection increased with increasing levels of effluent exposure in both 15- and 45-day exposure groups. It is possible that the increased immune response to effluent exposure provides a secondary protection against *A. salmonicida* infection.

Following the 45 day exposure period, the number and phagocytic activity of macrophages were significantly lower in trout exposed to 0.01/30 effluent dilution, suggesting that a longer exposure period to low effluent doses provokes a suppression in phagocytosis while a shorter exposure period to the same dose stimulates macrophage activity. This is in agreement with a number of studies done where decreased phagocytic activity was associated with the presence of contaminants (Voccia *et al.* 1996). Although there was no effect observed for the higher concentration after 15 days of exposure, a significant increase was detected in trout exposed for 45 days to the higher doses. A similar stimulation phenomenon was observed by Weeks and Warinner (1984) in spot (*Leiostomus xanthurus*) captured from polluted waters. Furthermore, our results indicate

a significantly reduced mitogenic response of trout lymphocytes activated with PWM at the highest effluent dose (1/30). However, no changes were found in cells activated with Con A or PHA. These data differ from that of 15-day exposure trout indicating that the overall immune response in trout to municipal sewage effluent may depend on both effluent concentration and exposure time.

Municipal sewage effluent did not appear to influence thyroidal status, based on measurements of hepatic T_4 5'-deiodinase activity. However, although deiodinase activity is a reliable indicator of thyroidal status in fish (Eales and Brown, 1993), there is no single biomarker that examines all facets of fish thyroid function (Eales *et al.*, 1999). Therefore, we can not rule out the possibility that municipal sewage effluent exposure influenced thyroidal status at another endpoint of thyroid function (e.g. post-receptor effect of T_3).

In conclusion, this study demonstrates that phagocytic activity and lymphocyte proliferation responses in trout are altered by exposure to municipal sewage effluent and that resistance to bacterial infection increases with higher levels of effluent exposure. However, responses differed with time of exposure to the effluent. Additional studies using multiple exposure times would also be invaluable for further assessing the effects of municipal sewage effluents on immune and non-immune systems.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Montreal Urban Community (CUM) for their help and for generously providing the municipal sewage effluent necessary for the present study.

REFERENCES

- Anderson, D. P. and Zeeman, M. G. (1995). Immunotoxicology in Fish, Ch.12 In: Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. Rand, G., Ed., Taylor and Francis, Washington, D.C. pp.371-404.
- Andersson, T., Förlin, L., Hardig, J., and Larson, A. (1988). Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft pulp mill effluents. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **45**, 1525-1536.
- Arkoosh, M. R., Clemons, E., Huffman, P., Sanborn, H. R., Casillas, E., and Stein, J. E. (1996). Leuproliferative response of splenocytes from English Sole (*Pleuronectes velutus*) exposed to chemical contaminants. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 1154-1162.
- Braun-Nesje, R., Kaplan, G., and Seljelid, R. (1982). Rainbow trout macrophages *in vitro*: morphology and phagocytic activity. *Devel. Comp. Immunol.* **6**, 281-291.
- Brousseau, P., Payette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boermans, H., Flippe, D., and Fournier, M. (1999). *Manual of Immunological Methods*. CRC Press, NY. 141pp.
- Corbel, M. J. (1975). The immune response in fish: a review. *J. Fish. Biol.* **7**, 539-543.

- Eales, J.G. and S.B. Brown. (1993). Measurement and regulation of thyroidal status in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. Volume 3. pp. 299-347.
- Eales, J.G., Brown, S.B., Cyr, D.G., Adams, B.A. and K.R. Finnson. (1999). Deiodination as an index of chemical disruption of thyroid hormone homeostasis and thyroidal status in fish. In: *Environmental Toxicology and Risk Assessment: 8th Volume*, ASTM STP 1364, D.S. Henshel, M.C. Black and M.C. Harrass, Eds. American Society for Testing and Materials, West Conshohacken, PA. 495pp.
- Ferguson, H. W. (1989). *Systemic Pathology of Fish*. Iowa State University Press. Ames, Iowa. 263pp.
- Fournier, M., Lacroix, A., Voccia, I., and Brousseau, P. (1998). Phagocytic and metabolic Activities of macrophages from mummichog naturally exposed to pulp mill effluents in the Miramichi River. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40, 177-183.
- Hardig, J., Andersson, T., Bengtsson, B. E., Forlin, L., and Larsson, A. (1988). Long-term effects of bleached kraft mill effluents on red and white blood cell status, ion balance, and vertebral structure in fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 15, 96-106.
- Luebke, R. W., Hodson, P. V., Faisal, M., Ross, P. S., Grasman, K. A., and Zelikoo, J. (1997). Aquatic pollution-induced immunotoxicity in wildlife species. *Fundam. Appl. Toxicol.* 37, 1-15.

- Rougier, F., Troutaud, D., Ndoye, A., and Deschaux, P. (1994). Non-specific immune response of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) following copper and zinc exposure. *Fish and Shellfish Immunol.* 4, 115-127.
- Tillit, D. E., Giesy, J. P., and Fromm, P. O. (1988). In Vitro Mitogenesis of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 89A, 25-35.
- Voccia, I., Sanchez-Dardon, J., Dunier, M., Anderson, P., Fournier, M., and Hontela, A. (1996) In Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Bayne, C. J., and Secombes, C. J. (eds.) *Modulators of Immune Response*. SOS Publications, NJ. pp. 547-555.
- Warr, G. W., DeLuca, D., J. M., and Marchalonis, J. J. (1976). Phylogenetic origins of immune recognition: lymphocyte surface immunoglobulins in the goldfish, *Carassius auratus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 2476-2480.
- Weeks, B. A., and Warinner, J. E. (1984). Effects of toxic chemicals on macrophage phagocytosis in two estuarine fishess. *Mar. Environ. Res.* 14, 327-335.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Phagocytosis in rainbow trout exposed to four concentrations of municipal effluent for 15 days. Data are expressed as a mean \pm SEM (n=15). * indicates a significant difference ($P < 0.05$) from control \square ; ** indicates a significant difference from control \blacksquare , determined by ANOVA.

Figure 2. Proliferative response of lymphocytes stimulated with (a) Con A, (b) PHA and (c) PWM in rainbow trout exposed to four concentrations of municipal effluent for 15 days. Data are expressed as mean \pm SEM (n=15). * indicates a significant difference ($P < 0.05$) from control determined by ANOVA.

Figure 3. Bacterial resistance of trout following a 15 day exposure to four concentrations of effluent (n=15).

Figure 4. Phagocytosis in rainbow trout exposed to four concentrations of municipal effluent for 45 days. Data are expressed as a mean \pm SEM (n=15). * indicates a significant difference ($P < 0.05$) from control \square ; ** indicates a significant difference from control \blacksquare , determined by ANOVA.

Figure 5. Proliferative response of lymphocytes stimulated with (a) Con A, (b) PHA and (c) PWM in rainbow trout exposed to four concentrations of municipal effluent for 45 days. Data are expressed as mean \pm SEM (n=15). * indicates a significant difference ($P < 0.05$) from control determined by ANOVA.

Figure 6. Bacterial resistance of trout following a 45 day exposure to four concentrations of effluent (n=15).

Figure 7. Effects of sewage effluent exposure on trout hepatic 5'-deiodinase activity. Data are expressed as a mean \pm SEM (n=5). Differences among control and effluent exposed groups were not significant.

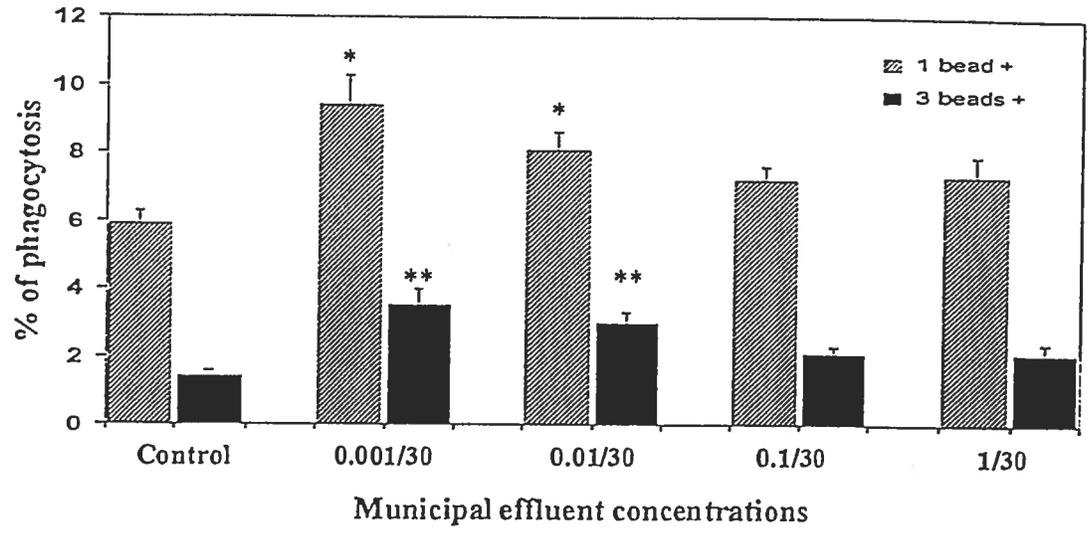


Figure 1

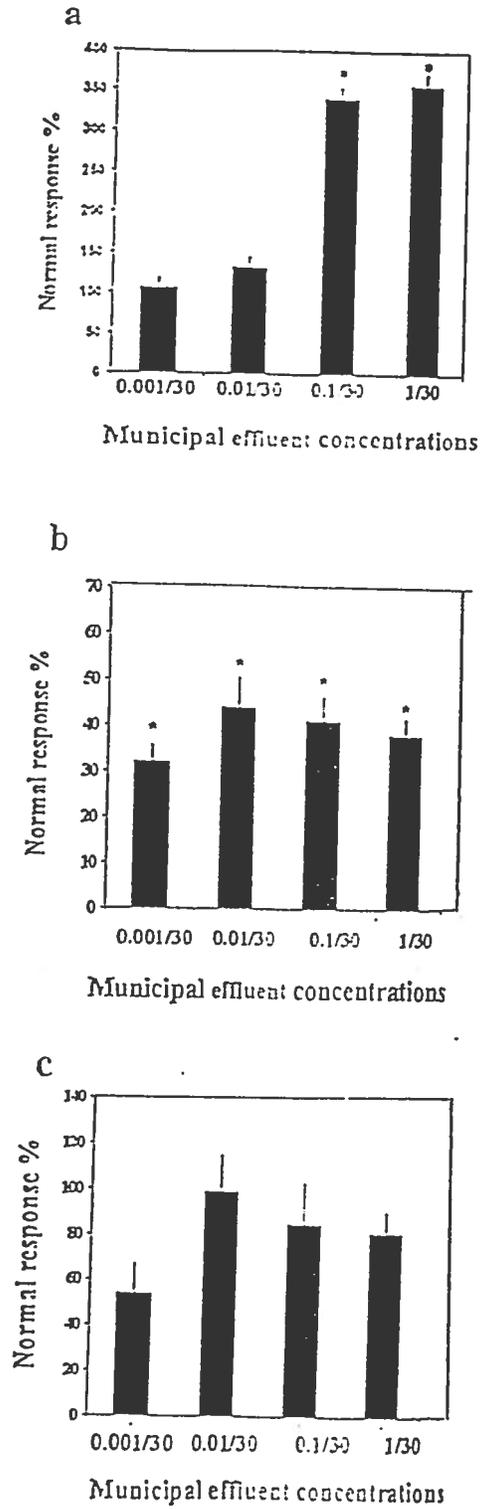


Figure 2

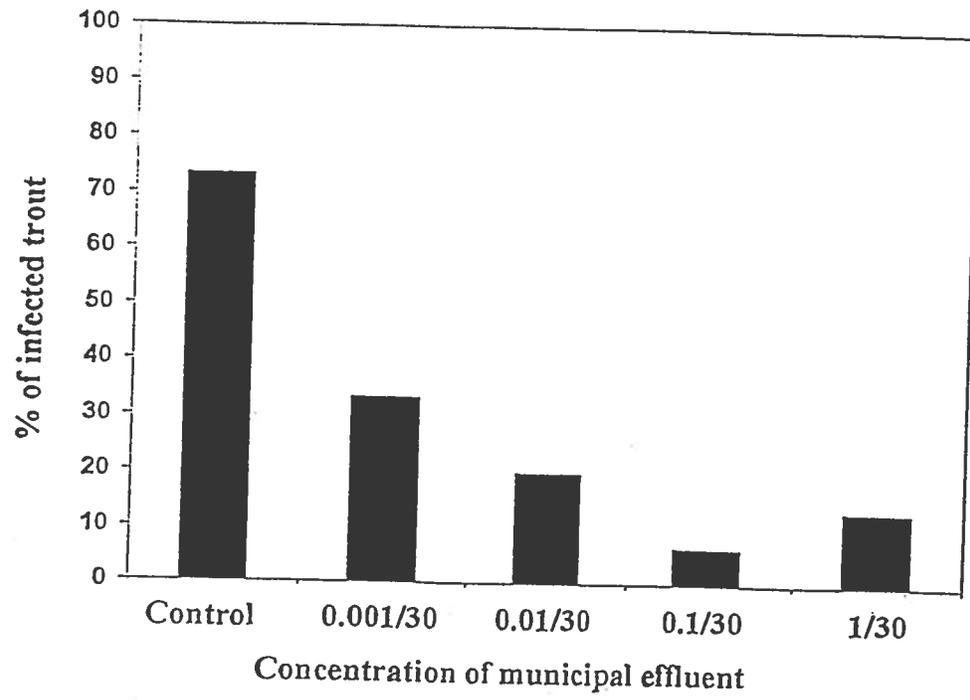


Figure 3

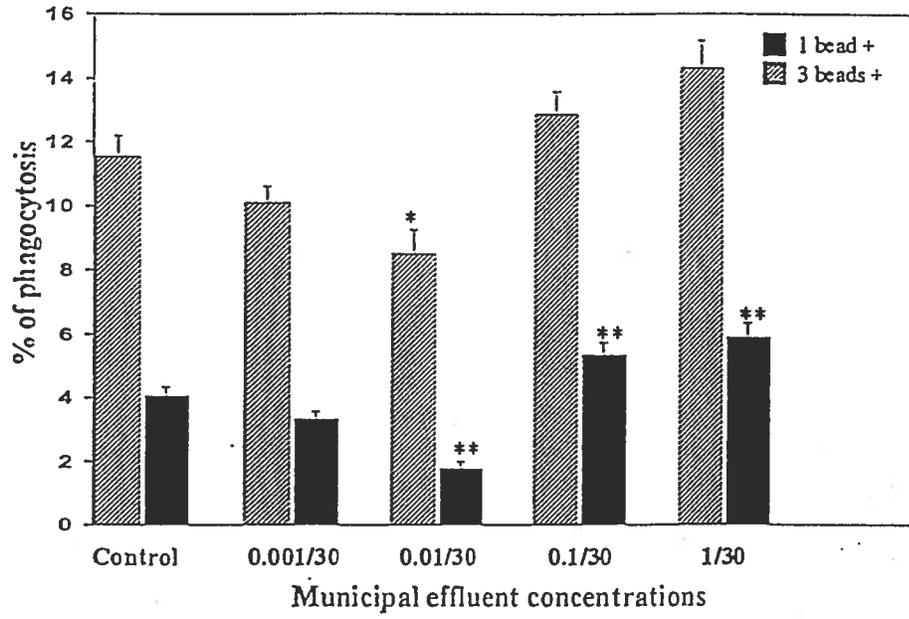


Figure 4

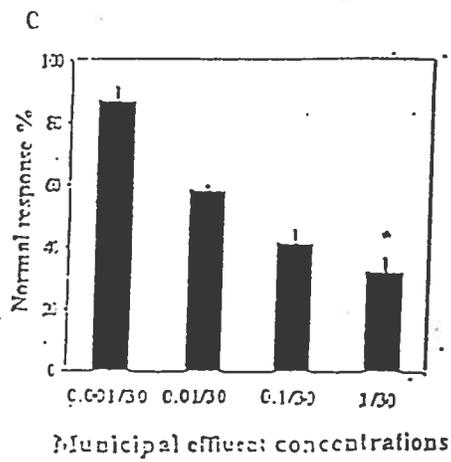
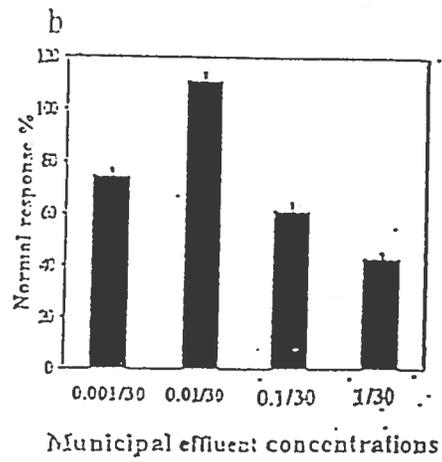
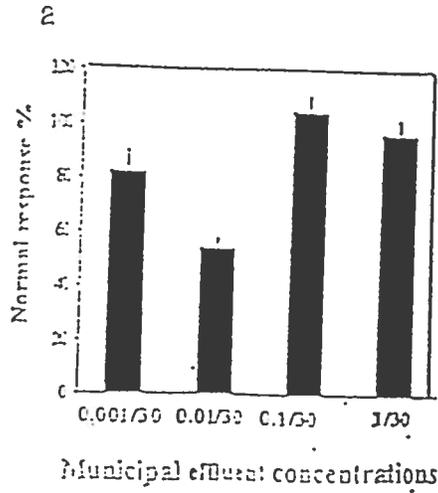


Figure 5

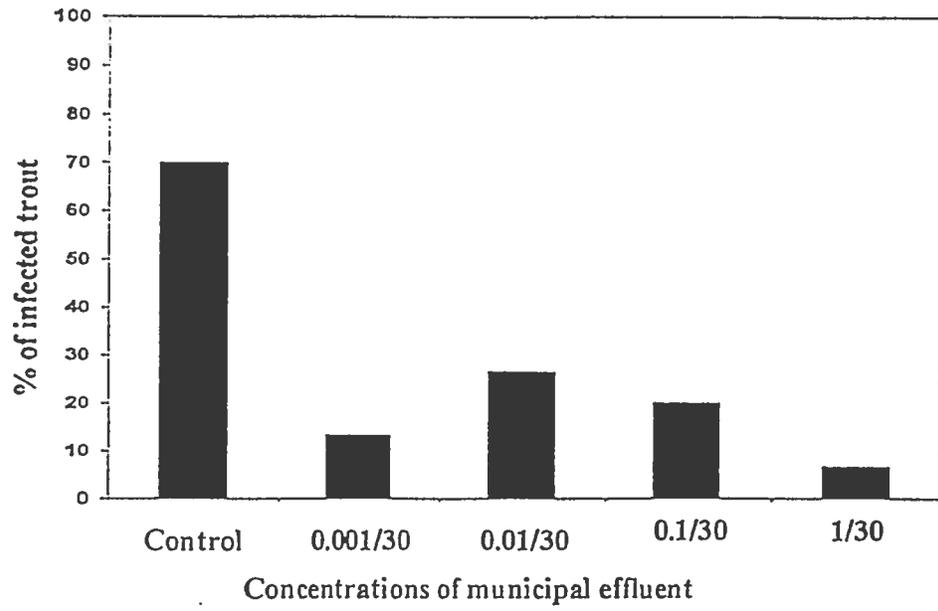


Figure 6

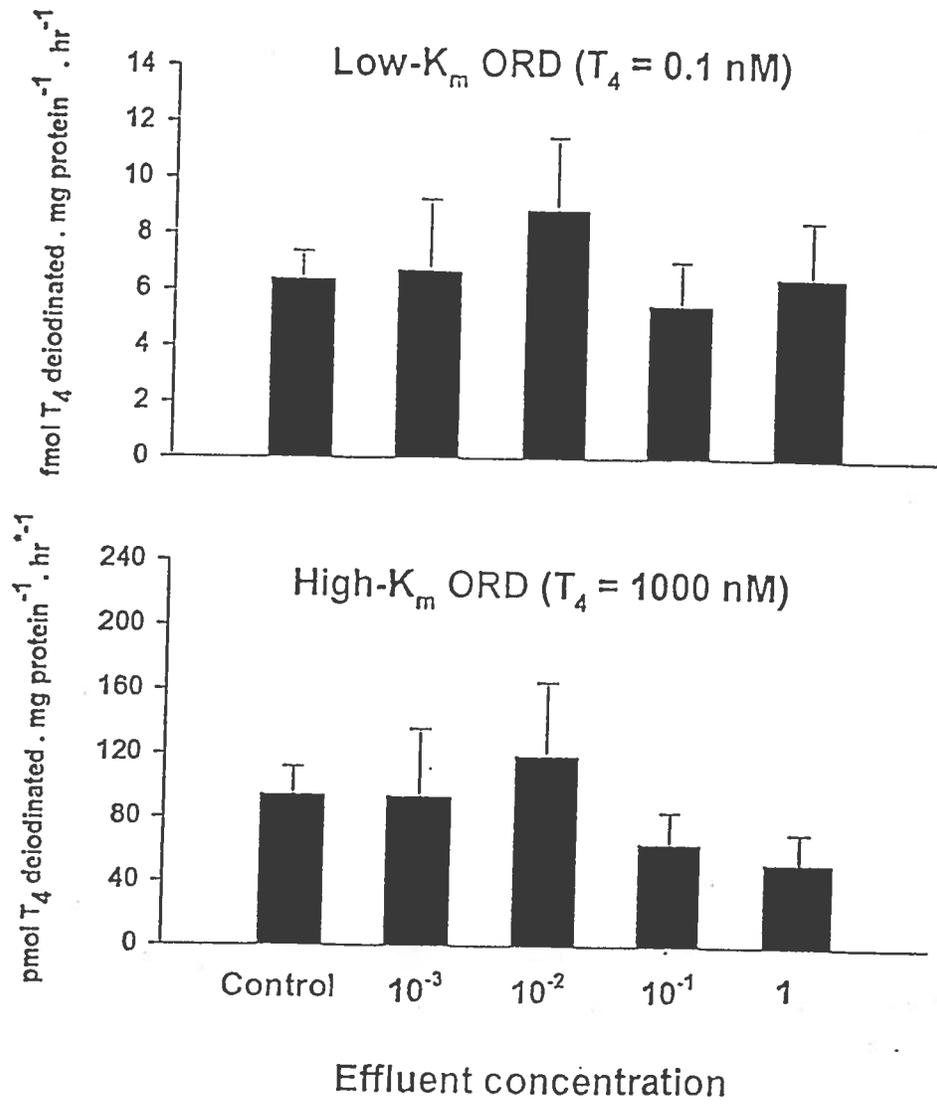


Figure 7

Table 1. Measured weights and lengths of rainbow trout exposed to four concentrations of municipal effluent for 15 days.

Control		0.001/30		0.01/30		0.1/30		1/30						
n	Weight (g)	Length (cm)	n	Weight (g)	Length (cm)	n	Weight (g)	Length (cm)	n	Weight (g)	Length (cm)			
15	14.80±1.51	N.D.	15	17.31±1.81	N.D.	15	16.40±1.24	10.74±1.63	15	15.71±1.30	10.52±1.84	15	13.70±0.84	9.79±1.45
				N.S.			N.S.			N.S.			N.S.	

N.D.: not determined

N.S.: not significantly different from the control group ($P > 0.05$, One way ANOVA, Dunnett's test)

Table 2. Measured weights and lengths of rainbow trout exposed to four concentrations of municipal effluent for 45 days.

Control		0.001/30		0.01/30		0.1/30		1/30											
n	Weight (g)	n	Length (cm)	n	Weight (g)	n	Length (cm)	n	Weight (g)	n	Length (cm)								
15	6.48±0.87	15	7.46±0.30	15	7.83±0.71	15	7.72±0.29	15	8.29±1.06	15	7.95±0.33	15	7.67±0.65	15	8.02±0.23	15	9.19±1.09	15	8.49±0.34
	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.		N.S.		N.S.		N.S.		N.S.		N.S.		N.S.

N.D.: not determined

N.S.: not significantly different from the control group ($P > 0.05$, One way ANOVA, Dunnett's test)

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les poissons offrent un avantage supplémentaire comparativement aux mammifères en ce qui concerne l'étude immunotoxicologique. Ils sont facilement maniables en laboratoire et sur le terrain. Par conséquent, ils peuvent être exposés à une panoplie de toxiques dans des situations bien définies et sous des conditions naturelles. Ils sont davantage diversifiés morphologiquement que les mammifères et les résultats obtenus peuvent fournir des points de références pour d'autres vertébrés.

La présente étude vise à déterminer l'effet des contaminants présents dans les effluents de l'Île de Montréal sur la réactivité immunitaire de deux espèces de poissons *in situ* et en laboratoire. Les paramètres immunologiques choisis, nous permettant de déterminer de tels effets, sont la phagocytose et la transformation lymphoblastique; la première caractérisant la réponse des macrophages et la seconde, celle des lymphocytes.

D'après les résultats obtenus, le pourcentage de cellules phagocytaires s'avère être significativement augmenté chez les Queues à Tache Noire capturées à l'Île de Boucherville, l'Île de Dorval, l'Îlet Vert et l'Île St-Ours comparativement à celui du site de référence (Article 1). La concentration de coliformes totaux à l'Îlet Vert oscillent entre 300 000 et un million de colonies par 100 ml, ce qui est énorme. Malgré le fait que l'Îlet Vert représente le site le plus proche de l'émissaire où les effluents sont rejetés, les poissons provenant de l'Île St-Ours détiennent le plus haut nombre de cellules phagocytaires, comparativement au site de référence. De plus, l'activité phagocytaire s'accroît significativement chez les poissons venant de l'Île de Dorval. Ce phénomène est à la fois inattendu et intrigant, étant donné que l'Île de Dorval est située en amont du site de déchargement des effluents municipaux. Une explication plausible pour l'augmentation de l'activité des phagocytes des poissons provenant de cette île est la présence d'autres facteurs non connus qui peuvent avoir provoqué cet effet sur la phagocytose, par exemple une infection parasitologique (Oleinik et Ieshko, 1990). De plus amples études devraient être effectuées à cet égard. Toutefois, l'activité phagocytaire des poissons venant de cette île est plus

faible que celle des poissons venant de l'Île St-Ours (11,85 %). Ce qui veut dire que les contaminants présents dans les effluents ont bien un effet sur l'activité phagocytaire. Néanmoins, l'Ilôt Vert ne présente aucune activité différant de manière significative du site témoin. Ceci pourrait être expliqué par un effet immunosuppresseur déclenché par la présence de hauts niveaux de contaminants dans le milieu environnant (De Swart *et al.*, 1996; Van Loveren *et al.*, 2000). En effet, ce type de réponse est perçu également *in vitro* en laboratoire, lors des expériences effectuées sur les Truites Arc-en-ciel. Par ailleurs, d'autres facteurs confondants peuvent rentrer en compte et par le fait même diminuer l'activité phagocytaire. Étant donné la proximité de cette île au site d'émissaire, la sédimentation des métaux lourds à cet endroit peut être une cause probable. L'accumulation de tels contaminants peut engendrer une baisse de la réponse phagocytaire (Elsasser, Roberson et Hetrick, 1986).

Une augmentation du nombre de cellules ainsi que de l'activité phagocytaire est observée chez les Truites exposées pour une période de temps de 15 jours à des dilutions d'effluent municipaux de 0,001/30 et de 0,01/30. Or, ces dilutions sont représentatives des concentrations d'effluents retrouvés aux alentours de l'Île St-Ours. Ces résultats concordent donc avec les expériences effectuées *in situ* chez les Queues à tache noire. De plus, les Truites exposées à une dilution de 0,1/30, représentant la concentration d'effluent retrouvée à l'Ilôt Vert, ne montrent aucune augmentation significative de phagocytose comparativement au témoin. Toutefois, les Truites exposées à ces mêmes dilutions pendant 45 jours présentent des réponses différentes. En présence de la dilution de 0,01/30, une diminution du nombre et de l'activité des cellules phagocytaires est observée, alors que pour les autres dilutions (0,1/30 et 0,01/30) l'activité phagocytaire est augmentée. Par ailleurs, une absence de réponse significative est notée chez les truites exposées aux fortes concentrations d'effluents pendant une période de temps de 15 jours, alors qu'une augmentation significative est présente chez les poissons exposés à ces mêmes concentrations pendant 45 jours. Ceci suggère qu'une courte période d'exposition en présence de faibles concentrations d'effluents engendrerait une stimulation des phagocytes, tandis qu'une période d'exposition prolongée induirait l'effet inverse.

Pour ce qui est de l'activité proliférative des lymphocytes, une augmentation significative s'observe en présence de Con A et ce pour les truites exposées aux dilutions d'effluents de 0,1/30 et 1/30 pendant 15 jours, tandis qu'une suppression de l'activité lymphocytaire est notée en présence de PHA pour toutes les dilutions d'effluents utilisées. Une explication possible de ce phénomène réside dans la différence de sensibilité à la stimulation mitogénique des différentes sous-populations de lymphocytes T. En effet, la Con A stimule les cellules matures (Moller *et al.*, 1978), alors que la PHA, les cellules immatures. Or, la présence de xénoestrogènes dans les effluents municipaux peut jouer un rôle crucial dans ces constatations. L'oestradiol en stimulant l'involution du thymus et diminuant le processus de différenciation des lymphocytes, contribue à l'augmentation de la proportion de lymphocytes plus matures (Okuyama *et al.*, 1992).

Suivant la période d'exposition de 45 jours, l'activité lymphocytaire décroît en présence de PWM uniquement chez les poissons exposés à la forte concentration, soit de 1/30. Étant donné que le PWM agit préférentiellement sur les lymphocytes B (Stockman *et al.*, 1971), nous pouvons supposer qu'une période d'exposition prolongée en présence de fortes concentrations d'effluents engendre un plus grand effet sur les lymphocytes B que sur les lymphocytes T. Des expériences supplémentaires auraient pu être effectués à cet égard. En effet, il aurait été possible de déterminer les types cellulaires affectés en marquant les cellules par des colorants fluorescents couplés à des anticorps spécifiques et en les analysant par cytométrie de flux.

Suivant l'exposition à *Aeromonas salmonicida* les truites témoins maintenues préalablement dans les aquariums pendant 15 et 45 jours montrent une prévalence d'infections de plus de 70% des poissons. Ce taux est diminué chez les poissons exposés aux diverses dilutions d'effluent et semble, de plus, être inversement corrélé avec la dilution. L'augmentation de l'activité phagocytaire suivant l'accroissement des concentrations d'effluents provoquerait possiblement une meilleure résistance contre l'infection bactérienne. Le phénomène n'est toutefois pas nouveau. En effet, la présence de faibles concentrations de contaminants, tels certains métaux lourds, peut

stimuler la réactivité immunitaire et par conséquent la protection contre des infections bactériennes (MacFarlane, Bullock et McLaughlin, 1986).

Or, suite à un changement du système immunitaire l'organisme tente de rétablir une réactivité immunitaire normale ou de se débarrasser de cette modification en faisant appel à des mécanismes compensatoires. Toutefois cette activité compensatoire peut engendrer davantage de déséquilibre. Ceci peut engendrer une plus grande susceptibilité aux infections lors d'expositions à des pathogènes (tel que le cas présent concernant l'infection à *A. salmonicida*), des périodes de rétablissement plus longues, un affaiblissement des mécanismes d'immunosurveillance et une baisse de réponse face à des antibiotiques ou à des vaccinations.

La plupart des modifications et des compensations sont reliées. Si, par exemple, l'immunité à médiation cellulaire est supprimée par un toxique quelconque, l'animal peut augmenter son immunité humorale ou non-spécifique afin de compenser pour la suppression qui vient de se produire. Il peut donc y avoir augmentation de la prolifération cellulaire ou de la fonction des macrophages, tel que décrit plus haut (Voccia *et al.*, 1999).

En conclusion, plusieurs facteurs peuvent entrer en compte lors de la modification de l'environnement immédiat dans lequel vivent les poissons. Le type de contaminants présents dans les effluents, les masses d'eaux environnantes et les conditions atmosphériques peuvent changer la concentration finale des contaminants présents dans les effluents de manière saisonnière et par conséquent avoir un effet modulateur différent sur la fonction immunitaire. Une augmentation de l'activité phagocytaire est observée chez les Queues à Tache Noire capturés à 40 km en aval du site de déchargement des effluents municipaux. Ce phénomène est également constaté chez les Truites exposées à court terme, en laboratoire, aux dilutions de 0,001/30 et 0,01/30 d'effluents, qui représentent les dilutions des effluents présents aux environs de l'Île St-Ours. Toutefois, en tenant compte que l'expérience effectuée à long terme se rapproche des conditions retrouvées dans le fleuve, l'activité phagocytaire ainsi que la prolifération des lymphocytes sont supprimées chez les poissons vivants à proximité du site de décharge des effluents municipaux.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- ACTON, R. T., Weinheimer, P. F., Hall, S. J., Niedermeier, W., Shelton, E. et Bennett, J. C. 1971. "Tetrameric Immune Macroglobulins in Three Orders of Bony Fishes". Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., vol. 68, no. 1, p. 107-111.
- ALVAREZ, F., Razquin, B. E., Villena, A. J. et Zapata, A. G. 1998. "Seasonal Changes in the Lymphoid organs of Wild Brown Trout, *Salmo trutta L.*: A Morphometrical Study". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 64, no. 3, p. 267-278.
- ANDERSON, D. P., Dixon, O. W. et Van Ginkel, F. W. 1994. "Suppression of Bath Immunization in Rainbow Trout by Contaminant Bath Pretreatments". Dans Chemical Regulation of Immunity in Veterinary Medecine. M. Kende, J. Gainer et M. Chirigos (éd.). New-York: Alan R. Liss, Inc.
- ANDERSON, D. P., Dixon, O. W. et Van Muiswinkel, W. B. 1990. "Reduction in the Numbers of Antibody-Producing Cells in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Exposed to Sublethal Doses of Phenol Before Bath Immunization". Aqua. Toxicol. Risk Assessment, vol. 13: ASTM STP 1096, W. G. Landis et W. A. H. Van der Schalie (éd.). Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- ANDERSON, D. P. et Zeeman, M. G. 1995. "Immunotoxicology in Fish". Ch. 12. Dans Environmental Fate and Risk Assessment. G. Rand (éd.). Washington, D. C.: Taylor and Francis.
- ANDERSON, J., Sjoberg, O. et Moller, G. 1972. "Introduction of Immunoglobulin and Antibody Synthesis *In Vitro* by Lipopolysaccharides". Eur. J. Immunol., vol 2, no. 4, p. 349-353.

- ANONYME. 1999. "Rapport sur l'état du St-Laurent: La contribution des activités agricoles à la détérioration du St-Laurent. Rapport technique". Equipe fédérale-provinciale SOE, composée par des représentants d'Environnement Canada, Ministère des Pêches et Océans du Canada et le Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec, Sainte-Foy.
- AREECHON, N. et Plum, J. A. 1990. "Sublethal Effects of Malathion on Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*". Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 44, no. 3, p. 435-442.
- BARRON, M. G., Yurk, J. J., Crothers, D. B. 1994. "Assessment of Potential Cancer Risk from Consumption of PCBs Bioaccumulated in Fish and Shellfish". Environ. Health. Perspect., vol. 102, no. 6, p. 562-567.
- BARTOS, J. M. et Sommer, C. V. 1981. "In Vivo Cell Mediated Immune Response to *M. Tuberculosis* and *M. Salmoniphilum* in Rainbow Trout. (*Salmo gairdneri*)". Devel. Comp. Immunol., vol. 5, no. 1, p. 75-83.
- BAYNE, C. J. 1986. "Pronephric Leucocytes of *Cyprinus carpio*: Isolation, Separation and Characterization". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 12, no. 1, p. 141-151.
- BLY, J. E. et Clem, L. W. 1991. "Temperature Mediated Processes in Teleost Immunity: In Vitro Immunosuppression Induced by In Vivo low Temperature in Channel Catfish". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 28, no. 3, p. 365-377.
- BORYSENKO, M. 1976. "Phylogeny of Immunity: An Overview". Immunogenetics., vol. 3, no. 1, p. 305-314.
- BOTHAM, J. W., Grace, M. F. et Manning, M. J. 1980. "Ontogeny of First Set and Second Set Alloimmune Reactivity in Fish". Dans Phylogeny of Immunological

- Memory. M. J. Manning (éd.). New-York: Elsevier/North-Holland Biochemical Press.
- BOULAY, P. et Boulay, J. 1999. "Procédé de traitement. Station d'épuration des eaux usées". Communauté Urbaine de Montréal. Une publication du Service de l'Environnement.
- BRAUN-NESJE, R., Kaplan, G. et Seljelid, R. 1982. "Rainbow Trout Macrophages *In Vitro*: Morphology and Phagocytic Activity". Devel. Comp. Immunol., vol. 6, no. 2, p. 281-291.
- CARLS, M. G., Marty, G. D., Meyers, T. R., Thomas, R. E. et Rice, S. D. 1998. "Expression of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus in Prespawning Pacific Herring (*Clupea pallasii*) exposed to Weathered Crude Oil". Can. J. Fish. Aqua. Sci., vol. 5, no. 10, p. 2300-2309.
- CLARK, L.B., Rosen, R. T., Hartman, T. G., Louis, J. B., Suffet, I. H., Lippincott, R. L. et Rosen, J. D. 1992. "Determination of Alkylphenol Ethoxylates and their Acetic Acid Derivatives in Drinking Water by Particle Beam Liquid Chromatography/Mass Spectrometry". Intern. J. Environ. Anal. Chem., vol. 47, no. 1, p. 167-180.
- CLEM, L. W. et McLean, W. E. 1975. "Phylogeny of Immunoglobulin Structure and Function. VII. Monomeric and Tetrameric Immunoglobulins of the Margate, a Marine Teleost Fish". Immunol., vol. 29, no. 4, p. 791-799.
- CORBEL, M. J. 1975. "The Immune Response in Fish: A Review". J. Fish. Biol., vol. 7, no. 1, p. 539-543.
- COSSARINI-DUNIER, M., Demael, A., Riviere, J. L. et Lepot, D. 1988. "Effects of Oral Doses of the Herbicide Atrazine on Carp (*Cyprinus carpio*)". Ambio., vol. 17, no. 1, p. 401-405.

- CUMMINGS, A. M., Metcalf, J. L., Birnbaum, L. 1996. "Promotion of Endometriosis by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Rats and Mice: Time-Dose Dependence and Species Comparison". Toxicol. Appl. Pharmacol., vol. 138, no. 1, p. 131-139.
- DeKINKELIN, P., Dorson, M. et Hattenberger-Baudouy, A. M. 1982. "Interferon Synthesis in Trout and Carp After Viral Infection". Devel. Comp. Immunol., suppl. 2, p. 167-174.
- DeKONING, J. et Kaattari, S. 1991. "Mitogenesis of Rainbow Trout Peripheral Blood Lymphocytes Requires Homologous Plasma for Optimal Responsiveness". In Vitro Cell. Dev. Biol., vol. 27A, no. 5, p. 381-386.
- De SWART, R. L., Ross, P. S., Vos, J. G. et Osterhaus, A. D. 1996. "Impaired Immunity in Harbour Seals (*Phoca vitulina*) Fed Environmentally Contaminated Herring". Vet. Q., vol.18, suppl. 3, p. S127-128.
- ELLIS, A. E. 1976. "Leucocytes and Related Cells in the Plaice, *Pleuronectes platessa*". J. Fish. Biol., vol. 8, no. 1, p. 143-156.
- ELLIS, A. E. 1977. "The Leucocytes of Fish: A Review". J. Fish. Biol., vol. 11, no. 1, p. 453-491.
- ELLIS, A. E. 1980. "Antigen-Trapping in the Spleen and the Kidney of the Plaice, *Pleuronectes platessa L*". J. Fish. Dis., vol. 3, no. 1, p. 413-426.
- ELLIS, A. E., Munroe, A. L. S. et Roberts, R. J. 1976. "Defense Mechanisms in Fish. I. A Study of the Phagocytic System and the Fate of Intraperitoneally Injected Particulate Material in the Plaice (*Pleuronectes platessa*)". J. Fish. Biol., vol., no. 1, 8, p. 67-82.

- ELSASSER, M. S., Roberson, B. S. et Hetrick, F. M. 1986. "Effects of Metals on the Chemiluminescent Response of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Phagocytes". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 12, no. 1, p. 243-250.
- EMMERICH, R. et Weibel, C. 1894. "Ueber eine durch Bakterien erzeugte Seuche unter den Forellen". Arch. Hyg. Bakt., vol. 21, p. 1-21. *Sité par* MacCarthy, D. H. et Roberts, R. J..1980.
- FAISAL, M., Marzouk, M. S. M., Smith , C. L. et Hugget, R. J. 1991. "Mitogen Induced Proliferative Responses of Lymphocytes from Spot (*Leiostomus xanthurus*) Exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Contaminated Environments". Immunopharmacol. Immunotoxicol., vol. 13, no. 3, p. 311-327.
- FATIMA, M., Ahmad, I., Sayeed, I., Athar, M. et Raisuddin, S. 2000. "Pollutant-Induced Over-Activation of Phagocytes is Concomitantly Associated with Peroxidative Damage in Fish Tissues". Aquatic Toxicol., vol. 49, no. 4, p. 243-250.
- FELTON, S. P., Wenjuan, J. et Matthews, S. B. 1990. "Selenious Concentrations in *Coho Salmon* Outmigrant Smolts and Returning Adults: A Comparison of Wild Versus Hatchery-reared Fish". Dis. Aquat. Org., vol. 9, no.1, p. 157-161.
- FINN, J. P. 1970. "The Protective Mechanisms in Diseases of Fish". Vet. Bull., vol. 40, no. 2, p. 873-882.
- FINSTAD, J. et Good, R. A. 1966. "Phylogenetic Studies of Adaptive Immune Responses in Lower Vertebrates". *Dans* Phylogeny of Immunity. R. T. Smith, P. A. Meacher et R. A. Good (éd.). Gainesville: University of Florida Press.
- FISH, F.F. 1937. "Furonculosis in Wild Trout". Copeia., vol. 1, no. 1, p. 37-40.

- FLETCHER, T. C. 1982. "Non-Specific Defence Mechanisms in Fish". Devel. Comp. Immunol., suppl. 2, p. 123-132.
- FOURNIER, M., Lacroix, A., Voccia, I., and Brousseau, P. 1998. "Phagocytic and Metabolic Activities of Macrophages from Mummichog Naturally Exposed to Pulp Mill Effluents in the Miramichi River". Ecotoxicol. Environ. Saf., vol. 40, no. 3, p. 177-183.
- GIBLIN, F. J. et Massaro, E. J. 1973. "Pharmacodynamics of Methyl Mercury in the Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*): Tissue Uptake, Distribution and Excretion". Toxicol. Appl. Pharmacol., vol. 24, no. 1, p. 81-91.
- GILES, M. A., Majewski, H. S. et Hobden, B. 1984. "Osmoregulatory and Hematological Responses of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) to Extended Environmental Acidification". Can. J. Fish. Aquat. Sci., vol. 41, no. 11, p. 1686-1694.
- GILL, T. S. et Pant, J. C. 1985. "Mercury-Induced Blood Anomalies in the Fresh Water Teleost *Barbus cochonius*". Water Air Soil Pollut., vol. 24, no. 2, p. 165-171.
- GOTTLIEB, A. A. and Waldman, S. R. 1972. "The Multiple Functions of Macrophages in Immunity". Dans Macrophages and Cellular Immunity. A. Laskin et H. Lechevalier(éd.). Londres: Butterworth.
- GRAHAM, S. and Secombes, C. J. 1990. "Do Fish Lymphocytes Secrete Interferon- γ ?". J. Fish. Biol., vol. 36, no. 1, p. 563-573.
- GRIFFIN, B. R. 1984. "Random and Directed Migration of Trout (*Salmo gairdneri*) Leukocytes: Activation by Antibody, Complement, and Normal Serum Components". Devel. Comp. Immunol., vol. 8, no. 3, p. 589-97.

- GRONDEL, J. L., Nouws, J. F. M., Delong, M., Schutte, A. R. et Driessens, F. 1987. "Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Oxytetracycline in Carp *Cyprinus carpio* L. Following Different Routes of Administration". J. Fish. Dis., vol. 10, no. 1, p. 153-163.
- GROSSMAN, C. J. 1984. "Regulation of the Immune System by Sex Steroids". Endocr. Rev., vol. 5, no. 3, p. 435-455.
- HALL, L.W. Jr., Busshong, S. J., Ziegenfuss, M.C., Hall, W. S. et Herman, R. L. 1988. "Concurrent Mobile On-site and *In situ* Striped Bass Contaminant and Water Quality Studies in the Choptank River and Upper Chesapeake Bay". Environ. Toxicol. Chem., vol. 7, no. 10, p. 815-830.
- HARDIG, J., Andersson, T., Bengtsson, B. E., Forlin, L., and Larsson, A. 1988. "Long-term Effects of Bleached Kraft Mill Effluents on Red and White Blood Cell Status, Ion Balance, and Vertebral Structure in Fish". Ecotoxicol. Environ. Saf., vol. 15, no. 1, p. 96-106.
- HARPER, N., Connor, K., Steinberg, M. et Safe, S. 1995. "Immunosuppressive Activity of Polychlorinated Biphenyl Mixtures and Congeners: Non-additive (Antagonistic) Interactions". Fundam. Appl. Toxicol., vol. 27, no. 1, p. 131-139.
- HILDERMANN, W. H. 1957. "Scale Homotransplantation in Goldfish (*Carassius auratus*)". Ann. N.Y. Acad. Sci., vol. 64, no. 6, p. 775-783.
- JACOBSON, J. L., Jacobson, S. W. 1997. "Evidence for PCBs as Neurodevelopmental Toxicants in Humans". Neurotoxicol., vol. 18, no. 2, p. 415-424.
- JAKOB, F., Tony, H. P., Schneider, D. et Thole, H. H. 1992. "Immunological Detection of the Estradiol Receptor Protein in Cell Lines Derived from the Lymphatic

System and the Haematopoietic System: Variability of Specific Hormone Binding *In Vitro*". J. Endocrinol., vol. 134, no. 3, p. 397-404.

JANEWAY, C. A. et Travers, P. (éd.). 1997. Ch. 8. "La réponse immune humorale". Immunobiologie. 2e édition. Paris: DeBoeck et Larcier.

JANOSSY, G. et Greaves, M. F. 1971. "Lymphocyte Activation. I. Response of T and B Lymphocytes to Phytomitogens". Clin. Exp. Immunol., vol. 9, no. 4, p. 483-498.

JOBLING, S., Sheahan, D., Osborne, J. A., Matthiessen, P. et Sumpter, J. P. 1996. "Inhibition of Testicular Growth in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Estrogenic Alkylphenolic Chemicals". Environ. Toxicol. Chem., vol. 15, no. 2, p. 194-196.

JOKINEN, E. I., Salo, H. M., Markula, S. E., Aaltonen, T. M. et Immonen, A. K. 2000. "Effects of Ultraviolet Light on Immune Parameters of the Roach". Toxicol. Letters., vol. 112-113, p. 303-310.

LeMORVAN, C., Deschaux, P. et Troutaud, D. 1996. "Effects and Mechanisms of Environmental Temperature on Carp (*Cyprinus carpio*) Anti-DNP Antibody Response and Non-specific Cytotoxic Cell Activity: A kinetic Study". Devel. Comp. Immunol., vol. 20, no. 5, p. 331-340.

LUSTER, M. I., Portier, C., Pait, D. G., Rosenthal, G. J., Germolec, D. R., Corsini, E., Blaylock, B. L., Pollock, P., Kouchi, Y., Craig, W., *et al.* 1993. "Risk Assessment in Immunotoxicity: II. Relationships Between Immune and Host Resistance Tests". Fundam. Appl. Toxicol., vol. 21, no. 1, p. 771-82.

- MacCARTHY, D. H. 1977. "Some Ecological Aspects of Bacterial Fish Pathogens, *Aeromonas salmonicida*". Dans Aquatic Microbiology, SAB Symposium. F. A. Skinner et J. M. Shewan (éd.). Londres: Academic Press.
- MacCARTHY, D. H. et Roberts, R. J. 1980. "Furunculosis of Fish: The Present Status of our Knowledge". Dans Advances in Aquatic Microbiology, vol. 2. M. R. Droop et H. W. Jannasch. Londres: Academic Press.
- MacFARLANE, R. D., Bullock, G. L. et McLaughlin, J. J. A. 1986. "Effects of Five Metals on Susceptibility of Striped Bass to *Flexibacter columnaris*". Trans. Am. Fish. Soc., vol. 115, no. 2, p. 227-231.
- MAYER, K. S., Mayer, F. I. et Witt, A. Jr. 1985. "Waste Transformer Oil and PCB Toxicity to Rainbow Trout". Trans. Am. Fish. Soc., vol. 114, no. 6, p. 869-886.
- MAYER, K. S., Mutter, E. P. and Schreiber, R. K. 1984. "Acid Rain: Effects on Fish and Wildlife". Washington, D. C. U. S. Fish & Wildlife Leader 1. *Sité par* Anderson, D. P. et Zeeman, M. G. 1995.
- McKINNEY, E. C., McLeod, T. F. et Sigel, M. M. 1981. "Allograph Rejection in Holostean Fish, *Lepisosteus platyrhincus*". Devel. Comp. Immunol., vol. 5, no. 1, p. 65-74.
- MOLLER, G., Hammarstrom, L., Moller, E., Persson, U., Smith, E., Waterfield, D. et Waterfield, E. 1978. "Lymphocyte activation by Con A". Haematologia., vol. 12, no. 1, p. 37-45.
- MURAD, A. et Houston, A. H. 1988. "Leukocytes and Leukopoietic capacity on Goldfish, *Carassius auratus*, Exposed to Sublethal Levels of Cadmium". Aquat. Toxicol., vol. 13, no. 2, p. 141-154.

- MURAI, T., Kodama, H., Naiki, M., Mikami, T et Izawa, H. 1990. "Isolation and Characterization of Rainbow Trout C Reactive Protein". Devel. Comp. Immunol., vol. 14, no.1, p. 49-58.
- MUSTAFA, A., MacWilliams, C., Fernandez, N., Matchett, K., Conboy, G. A. et Burka, J. F. 2000. "Effects of Sea Lice (*Lepeophtheirus salmonis* Kröyer) Infestation on Macrophage Functions in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.)". Fish. Shellfish. Immunol., vol. 10, p. 47-59.
- NAYLOR, G. C., Mierure, J. P., Weeks, J. A., Castaldi, F. J. et Romano, R. R. 1992. "Alkylphenol Ethoxylates in the Environment". J. Am. Oil. Chemists Soc., vol. 69, no. 2, p. 695-703.
- NONAKA, M., Yamaguchi, N., Natsuume-Sakai, S. et Takahashi, M. 1981. "The Complement System of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). I Identification of the Serum Lytic System Homologous to Mammalian Complement". J. Immunol., vol. 126, no. 4, p. 1489-1494.
- OKUYAMA, R., Abo, T., Seki, S., Ohteki, T., Sugiura, K., Kusumi, A et Kumagai, K. 1992. "Estrogen Administration Activates Extrathymic T cell Differentiation in the Liver". J. Exp. Med., vol. 175, no. 3, p. 661-669.
- OLEINIK, E.K. et Ieshko, E.P. 1990. "The Immunological Reaction of Fishes to Parasite Infection under Different Temperature Conditions". Parazitologia., vol. 24, no. 3, p.216-219.
- PICKERING, A. D., et Pottinger, T. G. 1988. "Lymphocytopenia and the Overwinter Survival of Atlantic Salmon, *Salmo salar* L". J. Fish. Biol., vol. 32, no. 5, p. 689-697.

- PURDOM, C. E., Hardiman, P. A., Bye, V. J., Eno, N.C., Tyler, C. R. et Sumpter, J. P. 1994. "Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works". Chem. Ecol., vol. 8, no. 1, p. 275-285.
- RIJKERS, G. T., Van Oosterom, R., Van Muiswinkel, W. B. 1981. "The Immune Response of Cyprinid Fish. Oxytetracycline and the Regulation of Humoral Immunity in Carp (*Cyprinus carpio*)". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 2, no. 3, p. 281-290.
- SAFE, S. H. et Zacharewski, T. 1997. "Organochlorine Exposure and Risk for Breast Cancer". Prog. Clin. Biol. Res., vol. 396, p. 133-145.
- SANCHEZ, C. Dominguez, J. et Coll, J. 1989. "Immunoglobulin Heterogeneity in the Rainbow Trout *Salmo gairdneri Richardson*". J. Fish. Dis., vol. 12, no. 1, p. 459-465.
- SANCHEZ-DARDON, J., Voccia, I., Hontela, A., Chilmonczyk, S., Dunier, M., Boermans, H., Blakley, B., Fournier, M. 1999. "Immunomodulation by Heavy Metals Tested Individually or in Mixtures in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Exposed *In vivo*". Env. Tox. Chem., vol. 18, no. 7, p. 1492-1497.
- SCHNEIDER, B. et Ambrosius, H. 1987. "The Influence of Environmental temperature on the Lymphocyte Population in Carp (*Cyprinus carpio L.*)". Biomed. Biochem. Acta., vol. 46, no. 1, p. 135-141.
- SCOTT, W. B. et Crossman, E. J. 1973. "Freshwater Fishes of Canada". Fisheries Research Board of Canada (Bulletin 184), Ottawa.
- SHELTON, E. et Smith, M. 1970. "The Ultrastructure of Carp (*Cyprinus carpio*) Immunoglobulin: A Tetrameric Macroglobulin". J. Mol. Biol., vol. 54, no. 3, p. 615-617.

- SIWICKI, A. K., Anderson, D. P. et Dixon, O. W. 1989. "Comparisons of Nonspecific and Specific Immunomodulation by Oxolinic Acid Oxytetracycline and Levamisole in salmonids". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 23, no. 1, p. 195-200.
- SIWICKI, A. K., Cossarini-Dunier, M., Studnicka, M. et Damael, A. 1990. "In Vivo Effect of the Organophosphorus Insecticide Trichlorphon od Immune Response of Carp (*Cyprinus carpio*): Effect of High Doses of Trichlorphon on Nonspecific Immune Response". Ecotoxicol. Environ. Saf., vol. 19, no. 1, p. 99-105.
- SPITSBERGEN, J. M., Shar, K. A., Kleeman, J. M. et Peterson, R. E. 1986. "Interactions of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) with Immune Responses of rainbow Trout". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 12, no. 1, p. 263-280.
- STITES, D. P., Stobo, J. D., Fudenberg, H.H et Wells, J. V. 1982. Basic and Clinical Immunology. Californie: Lange Medical Publications.
- STOLEN, J. et Makela, O. 1980. "Cell Collaboration in a Marine Teleost. A Determination of Specificity in the Carrier Effect". Immunol. Letters., vol. 1, p. 341-345.
- STOCKMAN, G. D., Gallagher, M. T., Meim, L. R., South, M. A. et Trentin, J. T. 1971. "Differential Stimulation of Mouse Lymphoid Cells by Phytohaemagglutinin and Pokeweed Mitogen". Proc. Soc. Exp. Biol. Med., vol. 136, no. 3, p. 980-982.
- TANA, J. et Nikunen, E. 1986. "Physiological Responses of Rainbow Trout in a Pulp and Paper Mill Recipient During Four Seasons". Ecotoxicol. Environ. Safety., vol. 12, no. 1, p. 22-34.

- TEMMINK, J. H. M. et Bayne, C. J. 1987. "Ultrastructural Characterization of Leucocytes in the Pronephros of Carp (*Cyprinus carpio L.*)". Devel. Comp. Immunol. 11, no. 1, p. 125-137.
- THUVANDER, A. 1989. "Cadmium Exposure of Rainbow Trout, *Salmo gairdneri Richardson*: Effects on Immune Functions". J. Fish. Biol., vol. 35, no. 4, p. 521-529.
- THUVANDER, A., Norrgren, L. et Fossum, C. 1987. "Phagocytic Cells in Blood from rainbow Trout, *Salmo gairdneri Richardson* Characterized by Flow Cytometry and Electron Microscopy". J. Fish. Biol., vol. 31, no. 1, p. 197-208.
- TILLIT, D. E., Giesy, J. P. et Fromm, P. O. 1988. "*In Vitro* Mitogenesis of Peripheral Blood Lymphocytes from Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*)". Comp. Biochem. Physiol., vol. 89A, no. 1, p. 25-35.
- VAN LOVEREN, H., Ross, P. S., Osterhaus, A. D. et Vos, J. G. 2000. "Contaminant-Induced Immunosuppression and Mass Mortalities Among Harbor Seals". Toxicol. Lett., vol. 112, p. 319-324.
- VOCCIA, I., Blakley, B., Brousseau, P. et Fournier, M. 1999. "Immunotoxicity of Pesticides: A Review". Toxicol. Industrial Health, vol. 15, no. 1, p. 119-132.
- VOCCIA, I., Krzystyniak, K., Dunier, M., Flipo, D., Fournier, M. 1994. "*In vitro* Mercury-Related Cytotoxicity and Functional Assay of Immune Cells of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)". Aquatic Toxicology, vol. 29, no. 1, p. 37-48.
- VOCCIA, I., Sanchez-Dardon, J., Dunier, M., Anderson, P., Fournier, M., Hontela, A. 1996. *In vivo* Effects of Cadmium Chloride on the Immune Response and Plasma Cortisol of Rainbow Trout. Dans Modulators of Immune Response: The Evolutionary Trail, vol 2. J. Stolen *et al.*, (éd.). Fair Haven: SOS Publications.

- WEEKS, B. A., Anderson, D. P. DuFour, A. P., Fairbrother, A. Goven, A. J., Lahvis, G. P. et Peters, G. 1989. "Immunological Biomarkers to Assess Environmental Stress". Ch. 5. Dans Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. R. J. Huggett, R. A. Kimerle, P. M. Mehrle et H. L. Bergman (éd.). Londres: Lewis Publishers.
- WEEKS, B. A. et Warinner, J. E. 1984. "Effects of Toxic Chemicals on Macrophage Phagocytosis in Two Estuarine Fishes". Mar. Environ. Res., vol. 14, no. 1, p. 327-335.
- WEEKS, B. A. et Warinner, J. E. 1986. "Functional Evaluation of Macrophages in Fish from Polluted Estuary". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 12, no. 1, p. 313-320.
- WELLS, R. M. G. et Weber R. E. 1991. "Is there an Optimal Haematocrit for Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)? An Interpretation of Recent Data Based on Blood Viscosity Measurements". J. Fish. Biol., vol. 38, no. 1, p. 53-65.
- WESTER, P. W., Canton, J. H. et Dormans, J. A. M. A. 1988. "Pathological Effects in Freshwater Fish *Poecilia reticulata* (Guppy) and *Ozyrias latipes* (Medaka) Following Methylbromide and Sodium Bromide exposure". Aquat. Toxicol., vol. 12, no. 4, p. 323-344.
- YOCUM, D., Cuchens, M. et Clem, L.W. 1975. "The Hapten-Carrier Effect in Teleost Fish". J. Immunol., vol. 114, no. 3, p. 925-927.
- ZAPATA, A. G., Torroba, M., Alvarez, F., Anderson, D. P., Dixon, O.W. and Wisniewski, W. 1987. "Electron Microscopic Examination of Antigen Uptake by Salmonid Gill Cells After Bath Immunization with a Bacterin". J. Fish. Biol., vol. 31, no. 1, p. 209-217.

ZEEMAN, M. G. et Brindley, W. A. "Effects of Toxic Agents Upon Fish Immune Systems: A Review". *Dans Immunologic Considerations in Toxicology.*, vol. 2, Ch. 1. R. P. Sharma (éd.). Floride: CRC Press Boca Raton.

ZIEGENFUSS, M. C. et Wolke, R. E. 1991. "The Use of Fluorescent Microspheres in the Study of Piscine Macrophage Agregate Kinetics". *Devel. Comp. Immunol.*, vol. 15, no. 2, p. 165-171.