



**Étude immunotoxicologique *in vitro* et *in vivo* chez la  
pygargue à tête blanche (*Haliaeetus leucocephalus*)  
et la crécerelle d'Amérique (*Falco sparverius*)**

**Par  
Mélanie Audet**







Université du Québec  
INRS (Institut Armand-Frappier, Santé humaine)

**Étude immunotoxicologique *in vitro* et *in vivo* chez la pygargue  
à tête blanche (*Haliaeetus leucocephalus*) et la crécerelle  
d'Amérique (*Falco sparverius*)**

Par  
Mélanie Audet

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

Jury d'évaluation

Président du jury  
et examinateur interne

Edouard Kouassi

Examineur externe

Judit Smits

Directeur de recherche

Michel Fournier



## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je veux remercier mon directeur de maîtrise, Dr Michel Fournier, pour le support, l'aide et l'amitié qu'il m'a apportés tout au long de ma maîtrise. Je veux également remercier Madame Marlène Fortier pour l'aide technique et le Dr Pauline Brousseau pour ses judicieux conseils. Je remercie mes collègues de laboratoire pour le coup de main donné lors de certaines manipulations.

Je remercie toute l'équipe du centre de recherche des oiseaux de proies du collègue Macdonald et plus particulièrement Monsieur Ian Richie pour sa précieuse aide pour les échantillons sanguins. Je remercie le Dr Bill Bowerman qui m'a permis de participer à l'échantillonnage des pygargues à tête blanche et Madame Amy Roe qui fut ma complice sur le terrain. Finalement, je remercie ma mère pour son appui et son aide lors des échantillonnages sur les poulets et mon père pour le soutien financier.



## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	Pages IV-V
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	Pages VI-VIII
SOMMAIRE	Pages IX-XI
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	Pages 1 à 2
<b><u>SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE</u></b>	
CHAPITRE 1 : La pygargue à tête blanche	
Historique	Pages 3 à 4
Premier signe d'une population malade	Page 4
Problématique actuelle	Pages 4 à 6
Effets des contaminants sur la pygargue à tête blanche	Pages 6 à 8
CHAPITRE 2 : Le système immunitaire	
Chez les oiseaux	
Généralités	Page 9
Thymus	Pages 9 à 10
Bourse de Fabricus	Page 10
Réponses immunitaires chez les oiseaux	Page 11
Marqueurs d'atteintes immunitaires	Pages 12 à 13
Phagocytose et hétérophile	Pages 13 à 15
Transformation lymphoblastique	Pages 15 à 16
CHAPITRE 3 : Les contaminants environnementaux	
Introduction	Page 17
Les biphényles polychlorés	
Généralités	Pages 17 à 18
Les BPC et les oiseaux	Pages 18 à 21
Les BPC et le système immunitaire	
Chez les mammifères	Pages 21 à 22
Chez les oiseaux	Pages 23 à 24



## Le dichlorodiphényldichloroéthane (DDT)

Généralités	Pages 24 à 25
Le DDT et les oiseaux	Pages 25 à 26
Le DDT et le système immunitaire	
Chez les mammifères	Page 27
Chez les oiseaux	Pages 27 à 29

## Le mercure

Généralités	Pages 29 à 30
Le mercure et les oiseaux	Pages 30 à 33
Le mercure et le système immunitaire	
Chez les mammifères	Pages 33 à 34
Chez les oiseaux	Pages 34 à 35

## CHAPITRE 4 : Autres facteurs influençant la réponse immunitaire

Âge	Pages 36 à 37
Sexe et poids	Pages 37 à 38
Parasites	Page 38

## SECTION 2 : ARTICLES

Chez la pygargue à tête blanche	Pages 39 à 56
---------------------------------	---------------

M. Audet, W.W. Bowerman, P. Brousseau, M. Fortier and M. Fournier

Assessment of phagocytic competence of heterophils from Bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) nestling in Great Lakes Basin.

Chez la crécerelle d'Amérique	Pages 57 à 68
-------------------------------	---------------

M. Audet, J. Smits, D. Bird, P. Brousseau and M. Fournier

Immunotoxicity of mercury on American kestrel (*Falco sparverius*) lymphocytes *in vitro*

## SECTION 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES

Synthèse de la contribution réelle	Pages 69 à 75
------------------------------------	---------------



**SECTION 4 : ANNEXES**

Liste des références

**Pages 76 à 84**

Appendice A

Adaptation et validation des méthodes

**Pages 85 à 91**Adaptation de la phagocytose chez le poulet et validation  
chez la crécerelle d'AmériqueAdaptation de la transformation lymphoblastique chez le  
pouletValidation de la transformation lymphoblastique chez la  
crécerelle d'Amérique

Appendice B

Expositions *in vivo* aux BPC chez 3 générations  
de crécerelle d'Amérique**Pages 92 à 97**

Méthodologie

Statistiques

Résultats

Discussion et conclusions



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Acidedésoxyribonucléique	ADN
Adulte	Ad
Aucun effet	≠
Biphényles polychlorés	BPC
Biphényles polychlorés totaux	BPCs
Concanavaline A	Con A
Concentration	[ ]
Concentration à laquelle 50% d'inhibition est observée	IC50
Chlorure de mercure	HgCl <sub>2</sub>
Désintégration par minute	DPM
Dichlorodiphényldichloroéthylène	DDE
Dichlorodiphényldichloroéthane	DDT
Deuxième génération	F1
Dose à laquelle 50% de mortalité est observée	DL <sub>50</sub>
Écart type	ET
Exposition orale	EO
Facteur de bioamplification	BMF
Figure	Fig
Gavage	G
Globule rouge de mouton	SRBC
Gramme	g
Heures	h
Immunoglobuline avec une chaîne lourde γ	IgG
Immunoglobuline avec une chaîne lourde μ	IgM
Index de stimulation	SI
Intra-péritonéale	i.p.
Jeune	Je
Jours	j
Lac Érié	LE
Lac Huron	LH
Lac Michigan	LM
Leucocytes polymorphonucléaires	PMN
Lower Peninsula	LP
Lymphocytes périphériques sanguins	PBLs
Millilitre	ml
Mercure	Hg
Méthylmercure	MHg, CH <sub>3</sub> HgCl
Minute	min
Myeloperoxidase	MPO
Nanogramme	ng
No observable adverse effect concentration	NOAEC
Partie par milliard	ppb
Partie par million	ppm



Phytohémagglutinine	PHA
Poids humide	ww
Pokeweed	PWM
Première génération	F0
Semaine	sem
Albumine serique de bovin	BSA
Sulfate de dextran	DXS
Transformation lymphoblastique	TF
Troisième génération	F2
Upper Peninsula	UP
Virus de la maladie de la bourse	IBDV
Voyager National Park	VNP



## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Marqueurs d'atteintes du système immunitaire	<b>Page 12</b>
Comparaison entre le contenu des granules des hétérophiles aviaires et des granules des neutrophiles de mammifères	<b>Page 14</b>
Distribution des nids de pygargues à tête blanche échantillonnés	<b>Page 20</b>
Valeur de la NOAEC pour les BPCs chez les œufs de pygargue à tête blanche, facteur de bioamplification (BMF) entre 2 chaînons et concentration en BPCs retrouvée chez les poissons des Grands Lacs	<b>Page 20</b>
Concentration en BPCs retrouvée dans le plasma d'aiglons à tête blanche échantillonnés dans différentes régions des États-Unis entre 1987 et 1993	<b>Page 21</b>
Valeur de la NOAEC pour le p,p'-DDE chez les œufs de pygargue à tête blanche, facteur de bioamplification (BMF) entre 2 chaînons et concentration en p,p'-DDE chez les poissons des Grands Lacs	<b>Page 26</b>
Concentration en p,p'-DDE retrouvée dans le plasma d'aiglons à tête blanche échantillonnés dans différentes régions des États-Unis entre 1987 et 1993	<b>Page 26</b>
Résumé des effets du DDT sur le système immunitaire	<b>Page 28</b>
Valeur de la NOAEC pour le mercure chez les œufs de pygargue à tête blanche, facteur de bioamplification (BMF) entre 2 chaînons et concentration en mercure chez les poissons des Grands Lacs	<b>Page 32</b>
Concentration en mercure retrouvée dans les plumes d'aigles et d'aiglons à tête blanche échantillonnés entre 1985-1989	<b>Page 33</b>
Concentration en p,p'-DDE et en BPCs retrouvées dans le plasma d'aiglons d'âges différents échantillonnés entre 1987 et 1993	<b>Page 37</b>
Concentration en p,p'-DDE et en BPCs retrouvées dans le plasma d'aiglons de sexes différents échantillonnés entre 1987 et 1993	<b>Page 38</b>



Distribution des nids des pygargues à tête blanche échantillonnés en 1999	<b>Page 43</b>
Dot-plot typique de la complexité cellulaire versus la taille obtenu en cytométrie de flux chez un échantillon sanguin d'aiglon	<b>Page 46</b>
Pourcentage d'hétérophiles et de lymphocytes de 60 aiglons dans 6 sites d'échantillonnage selon les données en cytométrie de flux	<b>Page 47</b>
Activité phagocytaire chez des hétérophiles et des lymphocytes d'aiglons en cytométrie de flux	<b>Page 48</b>
Activité phagocytaire chez des hétérophiles d'aiglons en fonction du site d'échantillonnage et du poids	<b>Page 49</b>
Activité phagocytaire chez des hétérophiles d'aiglons en fonction du sexe et de l'âge	<b>Page 50</b>
Activité phagocytaire chez des hétérophiles d'aiglons en fonction de la grosseur de la portée	<b>Page 51</b>
Effet de la concentration des mitogènes sur la prolifération lymphocytaire chez la crécerelle d'Amérique	<b>Page 63</b>
Réponse mitogénique suite à un traitement <i>in vitro</i> au méthylmercure et au chlorure de mercure chez la crécerelle d'Amérique	<b>Page 64</b>
Concentration à laquelle 50% d'inhibition de la réponse mitogénique est observée suite à une exposition <i>in vitro</i> au méthylmercure et au chlorure de mercure chez la crécerelle d'Amérique	<b>Page 65</b>
Activité phagocytaire chez des hétérophiles de poulet en fonction du temps d'incubation avec l'antigène. Analyse en cytométrie de flux suite à différentes périodes de fixation cellulaire	<b>Page 86</b>
Activité phagocytaire chez des hétérophiles de crécerelle. Analyse en cytométrie de flux suite à différentes périodes de fixation cellulaire	<b>Page 86</b>



Activité phagocytaire chez des hétérophiles de crécerelle et de poulet	<b>Page 87</b>
Courbe dose réponse de la transformation lymphoblastique chez le poulet domestique ( <i>Galus galus</i> )	<b>Page 90</b>
Activité phagocytaire pour des hétérophiles de trois générations de crécerelles d'Amérique dont la première génération fut exposée <i>in vivo</i> aux BPC	<b>Page 94</b>
Activité phagocytaire pour des hétérophiles de trois générations de crécerelles d'Amérique de sexe différent et dont la première génération fut exposée <i>in vivo</i> aux BPC	<b>Page 94</b>
Réponse mitogénique pour des lymphocytes de trois générations de crécerelles d'Amérique dont la première génération fut exposée <i>in vivo</i> aux BPC en présence d'un mitogène	<b>Page 95</b>
Réponse mitogénique pour des lymphocytes de trois générations de crécerelles d'Amérique dont la première génération fut exposée <i>in vivo</i> aux BPC en présence de deux mitogènes	<b>Page 95</b>



### **1<sup>er</sup> Volet**

Suite à la 2<sup>ième</sup> guerre mondiale, un déclin important des populations Nord américaines de pygargue à tête blanche fut observé. L'apparition de problèmes de productivité, de mortalité d'embryon, de stérilité d'adulte, de perte excessive de jeunes oisillons, de malformations et de difficultés dans l'établissement d'une paire d'adulte fut relevée par plusieurs équipes de recherche. Cependant, nous observons dans la littérature qu'aucune étude au niveau cellulaire n'est répertoriée sur ces populations. Étant un paramètre immunologique représenté dans la quasi-totalité du règne animal et un mécanisme de première ligne de défense, la phagocytose fut utilisée comme paramètre immunologique afin de comparer la compétence du système immunitaire de 6 populations d'aiglons à tête blanche nichant sur des sites autour des Grands Lacs et exposés *in situ* à différents contaminants environnementaux.

Pour ce faire, nous avons établi au sein de notre laboratoire les conditions optimales de la phagocytose à l'aide d'hétérophile aviaire (appendice A). Une incubation de 60 minutes avec l'antigène (billes de latex fluorescentes) permet d'obtenir une efficacité maximale de la phagocytose en cytométrie de flux chez le poulet domestique. La réponse phagocytaire n'est pas modifiée suite à 4 jours de fixation cellulaire chez le poulet et la crécerelle d'Amérique. Suite à la mise au point de la méthodologie, l'activité phagocytaire des 6 populations fut évaluée sur le terrain. Celle-ci n'est pas influencée par le site d'échantillonnage, le sexe de l'oiseau, son poids, son âge ainsi que la grosseur de la portée. Ces résultats suggèrent un état de santé généralement bon chez les aiglons nichant près des Grands Lacs.

### **2<sup>e</sup> Volet**

Au cours des dernières années, les niveaux de mercure dans l'Est de l'Amérique du Nord ont considérablement augmenté. Ce polluant environnemental affecte



plusieurs espèces d'oiseaux et plus particulièrement les oiseaux de haut niveau trophique comme les oiseaux de proies. Pour cette raison, le système immunitaire d'un rapace gardé en captivité, la crécerelle d'Amérique, fut examiné *in vitro* à l'aide de la transformation lymphoblastique afin de comprendre les effets néfastes auxquels sont exposés le système immunitaire des rapaces et de déterminer leur seuil de vulnérabilité.

Tout d'abord, les conditions optimales de la transformation lymphoblastique furent établies en utilisant le poulet comme modèle pour les espèces aviaires tandis que la crécerelle d'Amérique fut utilisée pour vérifier la validité des paramètres pour une espèce de rapace. Un temps total d'incubation de 88 heures permet d'obtenir un index de stimulation maximal tandis que les concentrations optimales des mitogènes

pour le poulet : 2  $\mu\text{g/ml}$  de Concanavaline A (Con A), 50  $\mu\text{g/ml}$  de Phytohémagglutinine (PHA) et 5  $\mu\text{g/ml}$  de Pokeweed (PWM)

pour la crécerelle : 25  $\mu\text{g/ml}$  de Con A, entre 5 et 25  $\mu\text{g/ml}$  de PHA et entre 5 et 10  $\mu\text{g/ml}$  de PWM

Suite à la mise au point de la méthodologie, les lymphocytes périphériques sanguins (PBLs) de crécerelles ont été exposés *in vitro* au méthylmercure ainsi qu'au chlorure de mercure à des concentrations se situant entre  $10^{-9}$  et  $10^{-4}$  M. À de fortes doses, ( $10^{-6}$  et  $10^{-5}$  M), les 2 formes de mercure ont démontré une diminution significative de la réponse mitogénique par rapport au témoin. De plus, aux doses de  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  M une inhibition quasi-totale (entre 91% et 98%) de la prolifération lymphocytaire est observée. Les concentrations auxquelles 50% d'inhibition de la réponse mitogénique est observée (IC50) pour le méthylmercure et pour le chlorure de mercure sont respectivement  $3.6 \times 10^{-6}$  M et de  $8.1 \times 10^{-6}$  M. De ce fait, la forme organique s'avère plus toxique que la forme inorganique pour la crécerelle d'Amérique. Les niveaux de mercure que nous observons dans les plumes des pygargues à tête blanche nichant autour des



Grands Lacs étant du même ordre de grandeur que ceux démontrés ici, nous permettent de croire que des signes d'immunosuppression pourraient être présents chez ces oiseaux de proies.

### 3<sup>e</sup> Volet

Les biphényls polychlorés (BPC) sont des contaminants environnementaux industriels qui sont persistants, lipophiliques, bioaccumulables et omniprésents à travers les écosystèmes aquatique et terrestre. Au cours des dernières années, la baisse de productivité d'aiglon à tête blanche autour des Grands Lacs fut attribuée à une forte exposition aux BPC chez ces rapaces.

Ainsi, 4 paires de crécerelles d'Amérique furent exposées, via la nourriture, à un mélange d'aroclor (1248:1254:1260) (appendice B). Ces oiseaux furent suivis pendant trois générations. Les crécerelles ont été sacrifiées à l'hiver 2000 et la phagocytose ainsi que la transformation lymphoblastique ont été effectuées. Aucune différence significative entre les 3 générations pour les deux paramètres immunologiques ne fut observée. Ainsi, nous pensons qu'un rétablissement des fonctions immunitaires est possible lorsque l'exposition aux BPC s'est effectuée depuis une longue période de temps (plus de 550 j).



## HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Au cours des dernières décennies, plusieurs études immunotoxicologiques *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées chez de nombreuses espèces de vertébrés et d'invertébrés exposées à certains polluants environnementaux tels les BPC, le DDT et les métaux lourds. En immunotoxicologie aviaire, la plupart des études ont utilisé le poulet domestique (*Galus galus*) comme modèle de laboratoire.

Ainsi, l'objectif principal de cette recherche est d'étudier le système immunitaire de 2 oiseaux de proie, la pygargue à tête blanche (*Haliaeetus leucocephalus*) et la crécerelle d'Amérique (*Falco sparverius*), afin d'évaluer l'état de santé de la pygargue à tête blanche naturellement exposée aux xénobiotiques environnementaux et d'établir les effets nocifs du mercure et des BPC sur le système immunitaire de la crécerelle d'Amérique.

Le premier volet de notre étude consiste à comparer la compétence immunitaire des pygargues à tête blanche naturellement exposées à différents niveaux de contaminants environnementaux. Pour ce faire, notre premier objectif a été d'adapter la phagocytose en cytométrie de flux chez une espèce aviaire en utilisant le poulet domestique comme modèle. Notre deuxième objectif est de valider cette technique avec un rapace gardé en captivité ; la crécerelle d'Amérique. Notre troisième objectif est d'échantillonner des aiglons répartis dans 6 régions différentes du Michigan et du Minnesota afin d'évaluer la phagocytose en cytométrie de flux pour chaque oisillon. Notre hypothèse était l'observation d'une différence significative dans la réponse phagocytaire entre les sites plus contaminés et ceux moins contaminés. Évidemment, l'effet de facteurs confondants tels que le poids, l'âge, le sexe des animaux et la grosseur de la portée devraient aussi être déterminés.

Le deuxième volet de notre étude a consisté à évaluer *in vitro* la sensibilité des rapaces à des substances immunologiques reconnues.

Finaleme<sup>nt</sup>, afin de tenter d'établir un parallèle avec les pygargues des Grands Lacs nous avons suivi la phagocytose et la transformation lymphoblastique chez trois générations de crécerelles d'Amérique exposées à des BPC. Des réponses comparables aux aiglons des Grands Lacs étaient postulées.

## SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

### CHAPITRE 1: LA PYGARGUE À TÊTE BLANCHE

#### 1.1 HISTORIQUE

La pygargue à tête blanche (*Haliaeetus leucocephalus*) est une espèce qui se retrouve couramment au Canada, aux États-Unis ainsi qu'au Mexique. C'est en 1782 que les États-Unis ont choisi cet oiseau comme emblème national pour son symbole de liberté et de puissance (Colborn, 1991). C'est au cours du dernier siècle que les populations Nord Américaines de pygargue à tête blanche ont éprouvé plusieurs fluctuations dans leurs effectifs. Tout d'abord, à la suite de la colonisation Européenne, les populations d'aigle à tête blanche ont subi un premier déclin important. La cause principale de ce déclin était la dégradation de leurs habitats causée par les diverses pratiques d'agriculture Lacs (Broley, 1958). Puis, l'arrivée au début du siècle d'une législation visant à protéger cette espèce permet à celle-ci d'augmenter le nombre d'oiseaux productifs.

Suite à la 2<sup>ème</sup> guerre mondiale un deuxième déclin de la population est observé autour des Grands Lacs résultant entre autres des effets néfastes des pesticides organochlorés. En effet, dans les années cinquante Broley remarque une diminution de 78% de la productivité d'aiglons autour des Grands Lacs (Broley, 1958). La cause majeure du deuxième déclin est attribuée à la présence de nombreux toxiques dans l'environnement dont le mercure, les BPC et le dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE), un métabolite de dégradation du dichlorodiphényldichloroéthane (DDT) utilisé comme pesticide et largement employé dans le contrôle des moustiques (Bowerman et al., 1995; Wiemeyer et al., 1984).

Étant persistants dans l'environnement, les organochlorés et le mercure ont tendance à s'accumuler dans les réserves lipidiques. Par conséquent, leur bioconcentration dans la chaîne alimentaire (Macek et Korn, 1970) expose les prédateurs de haut niveau trophique, comme la pygargue à tête blanche, à des niveaux élevés de ces contaminants. Ainsi, c'est en 1973 que l'aigle à tête blanche fut inscrit dans la liste des espèces menacées suite aux diverses pressions exercées sur lui ainsi que sur son habitat.

## **1.2 PREMIER SIGNE D'UNE POPULATION MALADE**

La mortalité directement causée par les contaminants environnementaux sur les populations de pygargues à tête blanche fut un facteur déterminant dans l'étude de l'état de santé de ces oiseaux. Également, l'arrivée de problèmes de malformations chez les oisillons a permis de sonner l'alarme chez les chercheurs. La première observation d'un problème de malformation chez les aiglons à tête blanche fut rapportée par Grier en 1968. Plus récemment, une autre équipe a noté des problèmes de becs croisés et de pattes déformées chez les populations nichant autour des Grands Lacs (Bowerman et al., 1994b). L'incidence d'aiglons possédant des malformations dans la région du Michigan pour la période de 1968 à 1995 a d'ailleurs été établie à 26.6 par 10 000. Ce taux passe de 12.5 pour la période entre 1968 et 1989 à 42.3 par 10 000 pour la période entre 1990 à 1995 (Bowerman, Best et Grubb, 1998). Ce phénomène semble donc augmenter avec les années. Ces effets tératogènes chez les aiglons à tête blanche seraient principalement dus aux dioxines et aux biphényles polychlorés (BPC) (Bowerman et al., 1994b; Giesy, Ludwig et Tillitt, 1994b; Ludwig et al., 1996).

## **1.3 PROBLÉMATIQUE ACTUELLE**

Depuis l'abolition de l'utilisation du DDT en 1970 au Canada et aux États-Unis, les populations de pygargue à tête blanche ont commencé à se rétablir dans certaines régions (Colborn, 1991; Grier, 1982). Malgré tout, nous avons observé au cours des dix dernières années que la productivité d'aiglons autour des Grands

Lacs s'avère toujours inférieure aux autres régions Nord Américaines (Bowerman et al., 1995). Une cause principale de cette différence est la présence d'une forte exposition aux BPC chez ces oiseaux de proie (Bowerman et al., 1995). En effet, Wiemeyer en 1984, démontre qu'une augmentation des niveaux de BPC et de p,p-DDE est directement corrélée à une diminution de productivité chez les pygargues à tête blanche. De plus, Bowerman et ses collaborateurs ont démontré que la contamination des proies par les BPC réduit la viabilité des œufs et cause des malformations comme le bec croisé chez les aiglons résidants près du littoral des Grands Lacs (Bowerman et al., 1994b). Il a également été établi qu'une exposition au DDE et aux BPC chez des aiglons nichant dans la région de la rivière Columbia au Canada cause une baisse de productivité chez ces rapaces (Anthony, Garret et Schuller, 1993). Plus récemment, une étude a démontré qu'une exposition aux BPC pendant la période d'accouplement et d'incubation des œufs chez la crécerelle d'Amérique provoquait des changements physiologiques importants dans l'œuf (Ferne et al., 2000).

Étant des oiseaux qui ont tendance à occuper des nids se trouvant à proximité des plans d'eau (Dzus et Gerrard, 1993), les pygargues à tête blanche dans la région des Grands Lacs possèdent un régime alimentaire principalement composé d'espèces aquatiques (Bowerman, 1993). En effet, la diète des oisillons est composée principalement de poissons (56%), d'oiseaux aquatiques (28%) et de mammifères (14%) (Bowerman, 1993). De ce fait, la teneur en contaminants chez la pygargue des Grands Lacs est surtout attribuable à une forte contamination des proies qui vivent autour des différents plans d'eau. En effet, à titre d'exemple, un très haut niveau de contamination par le mercure a été signalé chez des poissons du lac Michigan dont *Esox lucius* (Evans et al., 1991). Il a été également observé que les concentrations de BPC chez les salmonidés du lac Michigan sont restées similaires depuis les années 1980 (Smith, 1995). Toutefois, une récente étude démontre que les œufs des colonies de goéland argenté des Grands Lacs possèdent des niveaux de BPC qui ont rapidement diminué depuis l'abolition de ces contaminants par les manufactures et qu'une augmentation

graduelle et constante dans le nombre de nid actif autour des Grands Lacs et dans les terres du Michigan ainsi que celles du Minnesota a été observée entre 1980 et 1994 (Bowerman et al., 1994b; Bowerman et al., 1995).

Il est important de constater que les contaminants environnementaux sont seulement un facteur parmi plusieurs qui affecte les populations de pygargue à tête blanche. La structure et la biodisponibilité de l'habitat, la perturbation humaine, les routes migratoires, l'abondance des proies, la présence de parasites sont tous des éléments qui influencent la dynamique des populations de pygargue à tête blanche (Stuht, Bowerman et Best, 1999). Cependant, selon certains chercheurs le facteur principal qui influence le taux de reproduction des aigles à tête blanche le long du littoral des Grands lacs reste toujours la présence de contaminants environnementaux (Bowerman et al., 1995). Actuellement, nous savons que les pygargues à tête blanche possèdent un nid actif tous les 5 miles le long du littoral autour des Grands Lacs (Peakall et Fox, 1987). Également, le nombre de nids actifs dans la région du Michigan a augmenté de 500% entre 1961 et 1995 et le nombre d'aiglons par nid a également connu une importante augmentation de l'ordre 0.00 à 1.19 entre 1961 et 1995. Tout récemment une première victoire dans le rétablissement de la pygargue à tête blanche fut annoncée le 4 juillet 1999. En effet, son nom fut retiré de la liste des espèces menacées aux Etats-Unis (Skrief, 1999).

#### 1.4 EFFETS DES CONTAMINANTS SUR LA PYGARGUE À TÊTE BLANCHE

Étant un organisme terrestre, la pygargue à tête blanche peut potentiellement absorber des contaminants provenant de deux sources soit par absorption des vapeurs atmosphériques par les poumons et l'épiderme ou bien par assimilation des contaminants présents dans la nourriture. Ces polluants environnementaux une fois absorbés peuvent agir de trois façons différentes sur les populations d'aigle à tête blanche soit :

par mortalité directe; les oiseaux sont tués par effet direct de la toxicité des polluants (Garcelon et Thomas, 1997)

par effets sublétaux ; les oiseaux deviennent plus vulnérables aux autres facteurs environnementaux (Ludwig et al., 1996).

par diminution dans la quantité de nourriture ; disponibilité restreinte des proies entraînant des problèmes de subsistance et de reproduction (Gerrard et Bortolotti, 1988).

Suite à une exposition aux différents polluants environnementaux, plusieurs signes cliniques néfastes ont été observés chez la pygargue à tête blanche aux cours des dernières années. L'apparition d'un amincissement de la coquille des œufs, la diminution de productivité, la mortalité des embryons, l'arrivée de problèmes d'éclosion, les malformations, l'échec dans l'établissement d'une paire d'adulte, la stérilité et la perte excessive de jeunes oisillons sont tous des phénomènes qui ont été observés chez cette espèce (Colborn, 1991).

Malgré l'observation de nombreux signes cliniques néfastes chez cette espèce aviaire, aucune évidence d'un changement cellulaire n'a été définie chez ces populations. Pour cette raison, il devient intéressant d'étudier un marqueur biologique qui permettra d'entrevoir la compétence immunitaire de la pygargue. Toutefois, trois problèmes interfèrent en vue de l'accomplissement de ce but. Premièrement, il est pratiquement impossible d'utiliser l'aigle à tête blanche comme un animal de laboratoire. Deuxièmement, un ensemble de contaminants est présent en milieu naturel. Troisièmement, ces polluants possèdent des modes d'action très variés qui affectent une multitude de processus physiologiques selon l'espèce, la dose et le temps d'exposition (Colborn, 1991).

Pour toutes ces raisons, il est primordial

d'utiliser un test immunologique pouvant être effectué sur le terrain

d'avoir des niveaux de contamination des xénobiotiques  
d'importance sur les sites de nidification  
de bien connaître l'écologie de l'espèce à l'étude  
d'avoir une espèce d'oiseau de proie pouvant être utilisée comme  
animal de laboratoire

Ainsi, la crécerelle d'Amérique fut choisie comme modèle de laboratoire pour cette recherche. Cette espèce peut entreprendre avec succès une période d'accouplement entre deux périodes d'accouplement printanières consécutives à l'aide d'une stimulation par photopériode artificielle (Bird, Weil et Lague, 1980). Les premières recherches sur ces oiseaux comme modèle de laboratoire ont été d'utiliser cette espèce afin de prédire les effets néfastes du DDT sur la reproduction des oiseaux sauvages (Wiemeyer et Porter, 1970). Depuis ce temps, la crécerelle a été intensivement utilisée pour des études de laboratoire sur la toxicologie, le comportement et la physiologie des oiseaux (Bird, 1982). Des études antérieures ont également utilisé ces oiseaux comme modèle afin de prédire les effets des contaminants environnementaux sur la pygargue à tête blanche (Hoffman et al., 1995). Une très grande colonie de crécerelle d'Amérique a été établie au collège Macdonald de l'Université McGill (plus de 250 individus). Ces oiseaux ont été utilisés lors d'expérimentation en laboratoire.

## **CHAPITRE 2 : LE SYSTÈME IMMUNITAIRE**

### **2.0 CHEZ LES OISEAUX**

#### **2.1 GÉNÉRALITÉS**

La fonction du système immunitaire est de protéger l'individu ou l'animal contre des organismes et des substances étrangères. Chez les espèces aviaires, le poulet fut amplement utilisé comme modèle d'étude pour le système immunitaire des oiseaux. Comme l'humain, ces animaux possèdent une immunité non spécifique représentée principalement par deux types de réponses soit la phagocytose et les réactions inflammatoires, ainsi que l'immunité spécifique qui comprend l'immunité cellulaire et humorale. Ainsi, plusieurs organes interagissent dans la réponse immunitaire chez les espèces aviaires. Nous retrouvons entre autres le thymus, la bourse de Fabricus, la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. Toutefois, les deux organes centraux de ce système sont la bourse de Fabricus et le thymus. Ceux-ci possèdent des organisations similaires. Les cellules germinales se différencient donc en cellules matures à l'intérieur de l'organe pour ensuite entrer dans la circulation et se retrouver dans les tissus lymphoïdes et dans l'ensemble du corps de l'animal.

#### **2.2 THYMUS**

Chez le poulet le développement du thymus débute à partir du cinquième jour du développement embryonnaire et involue au cours de l'âge adulte. Les types cellulaires présents dans le thymus incluent entre autres des cellules épithéliales, des macrophages et des cellules myéloïdes. Les cellules épithéliales n'ont pas la capacité de phagocyter les antigènes contrairement aux macrophages qui eux

possèdent cette capacité (Frazer, 1973). Contrairement au mammifère, le thymus chez le poulet agit également comme organe lymphoïde périphérique (Wood et Linna, 1965 ; Sturkie, 1986).

La migration des cellules souches dans le thymus n'est pas un phénomène laissé au hasard. En effet, chez les poulets cette migration se fait en deux ou trois vagues successives (Roit, Brostoff et Male, 1997). Une fois arrivées dans le thymus, les cellules souches commencent leur différenciation en thymocytes. Une fois la différenciation terminée en cellules T matures, celles-ci quittent l'organe pour se retrouver dans la circulation sanguine, lymphatique ou dans les tissus lymphoïdes secondaires où elles peuvent être stimulées par l'antigène. Ainsi, la production des lymphocytes T est effectuée par le thymus.

### **2.3 BOURSE DE FABRICIUS**

La bourse de Fabricius est un organe lympo-épithélial située à la face dorsale du cloaque. Malgré son statut d'organe central, la bourse agit également comme organe périphérique. Ainsi, la lymphopoïèse des lymphocytes B s'effectue dans la bourse de Fabricius à partir de cellules précurseurs qui migrent du tissu hématopoïétique (moelle osseuse) vers la bourse par voie sanguine. La diversité des anticorps chez les oiseaux s'effectue donc en un site unique, la bourse de Fabricius. Contrairement à l'homme, la recombinaison des gènes n'a lieu que pendant une courte période de temps, au début du développement quand les cellules-souches colonisent la bourse, alors que chez l'homme ces recombinaisons ont lieu tout au long de la vie. Il a été remarqué que l'ablation de la bourse de Fabricius, lors de l'éclosion, diminue la capacité des oiseaux à induire la production d'anticorps mais a peu d'effet sur l'immunité à médiation cellulaire (Brown, King et Seal, 1999). Comme le thymus la bourse s'atrophie avec l'âge.

## 2.4 RÉPONSES IMMUNITAIRES CHEZ LES OISEAUX

L'immunité humorale et cellulaire, les fonctions des cellules T et B, chez les oiseaux sont très similaires de celles présentées chez les mammifères. La collaboration entre les cellules T et B lors d'une réponse immunitaire suit les mêmes règles que chez les mammifères. Les cellules T auxiliaires et suppressives influencent entre autres la production d'anticorps, la réponse cytotoxique et l'activation des macrophages. Toutefois, certaines différences entre les mammifères et les oiseaux ont été observées. Par exemple, aucune activation des cellules tueuses naturelles (NK) n'a été observée suite à une exposition à l'interleukine 2 (Fahey et York, 1987).

La classe des *Aves* possède entre autres quatre immunoglobulines soit la 7S Ig, la IgM, la IgD et de la IgA (Toivanen et Toivanen, 1987). L'immunoglobuline 7S Ig ressemble à l'IgG humain tandis que l'IgM chez le poulet s'avère semblable à celle des mammifères. Aucune preuve de la présence d'IgE chez les oiseaux n'est répertoriée dans la littérature. Les macrophages sont également des cellules très importantes dans la réponse immunitaire. Elles sont essentielles dans l'induction de l'immunité à médiation cellulaire car elles présentent l'antigène en association avec le complexe majeur d'histocompatibilité. Les macrophages permettent de protéger l'oiseau contre les agents pathogènes tout comme chez l'humain. Les éosinophiles ainsi que les basophiles sont aussi des cellules qui permettent de protéger l'oiseau contre les infections. Les thrombocytes aviaires possèdent des caractéristiques qui permettent la coagulation. De plus, ces cellules ont la capacité de phagocyter des éléments étrangers. Par contre, ce mécanisme est indépendant du complément contrairement aux hétérophiles et aux monocytes (Powell, 1987b).

## 2.5 MARQUEURS D'ATTEINTES IMMUNITAIRES

Chez la majorité des organismes vivants des atteintes du système immunitaire peuvent compromettre le rôle de ce système dans le maintien de l'intégrité des individus. Afin d'évaluer l'impact de facteurs biotiques (bactéries, virus etc.) et abiotiques (toxiques, radiations etc.) sur la compétence immunitaire, certains paramètres sont couramment utilisés comme marqueurs (Tableau 1). Parmi ces marqueurs, la phagocytose pour mesurer la compétence des macrophages et la transformation lymphoblastique pour évaluer la capacité de réponse primaire des lymphocytes sont les deux marqueurs les plus fréquemment utilisés en immunotoxicologie.

**Tableau 1** : Marqueurs d'atteintes du système immunitaire

Structure du système immunitaire	Organes lymphoïdes (rate, thymus,...) Leucocytes circulants (nombre total ou relatif) Protéines plasmatiques (totales ou spécifiques)
Immunité non spécifique	Phagocytose Réponse inflammatoire Cellules tueuses (NK, NCC)
Immunité spécifique	Réponse anticorps (taux d'anticorps circulants, nombre de cellules sécrétrices) Réponse cellulaire (rejet de greffes, mitogénèse)
Fonctions régulées par le système immunitaire	Sensibilité à des infections ou à des maladies Apparition de tumeurs

Source : Brousseau et al., 1997

Pour notre étude ces deux même marqueurs immunologiques ont été retenus afin de comprendre l'effet des polluants environnementaux sur les oiseaux de proies. Le choix de ces deux marqueurs réside dans le rôle central joué par ces 2 populations cellulaires dans toutes les réponses immunitaires. Il se justifie également par l'existence de méthodes éprouvées et reconnues (Brousseau et al., 1997). Il est aussi important de souligner la sensibilité de la phagocytose aux xénobiotiques de l'environnement et cela chez une grande variété d'espèces vertébrées et invertébrées (Brousseau et al., 2000; De Guise et al., 2000). Finalement, la phagocytose et la transformation lymphoblastique sont deux marqueurs du statu immunitaire qui peuvent être mesurés à partir de cellules périphériques, donc prélevés chez la plupart des organismes vivants grâce à des techniques non invasives.

## **2.5 PHAGOCYTOSE ET HÉTÉROPHILE**

La phagocytose est un mécanisme important pour l'ingestion, la digestion et l'élimination du matériel étranger. Ce processus de défense est probablement le plus répandu dans tout le règne animal (Rodriguez et al., 1999). Chez les oiseaux, plusieurs types cellulaires peuvent effectuer la phagocytose soit; les macrophages, les basophiles, les thrombocytes, les éosinophiles, les monocytes et les hétérophiles. Ainsi, les leucocytes polymorphonucléaires (PMN) sont des cellules phagocytaires impliquées dans la première ligne de défense contre l'invasion de micro-organismes (Slauson et Cooper, 1990). Chez les espèces aviaires, le leucocyte périphérique prédominant est l'hétérophile (Sturkie, 1986). Celui-ci a pour fonction de détruire et de phagocyter le matériel étranger (Tizard, 1992). Il joue donc un rôle primordial dans la défense naturelle contre les agents pathogènes (Powell, 1987a). Depuis plusieurs années, ce type cellulaire est considéré l'équivalent des neutrophiles chez les mammifères (Tizard, 1992). Il existe plusieurs similarités entre ces deux granulocytes toutefois il demeure également trois différences majeures.

1. La réponse inflammatoire dépendante des hétérophiles chez les espèces aviaires ressemble beaucoup plus à celle des reptiles qu'à celle des mammifères (Montali, 1988).
2. Le contenu des granules des hétérophiles s'avère différent de celui des neutrophiles (tableau 2). En effet, les granules d'hétérophiles ne contiennent pas de myéloperoxidase (MPO), de catalase et de phosphatase alcaline (Harmon, 1998).
3. Les hétérophiles n'augmentent pas leur production de peroxyde d'hydrogène ou d'anion superoxyde lorsqu'ils sont exposés à un stimulus de phagocytose (Penniall et Spritznagel, 1975). Ainsi, le processus d'action des hétérophiles est indépendant de l'oxygène (non-oxydatif) (Stabler et al, 1994).

Tableau 2 : Comparaison entre le contenu des granules des hétérophiles aviaires et des granules des neutrophiles de mammifères

Produits retrouvés dans les granules	Neutrophile	Hétérophile
Myeloperoxidase	+	-
Défensines	+	-
$\beta$ -Défensines	-	+
Cathepsine	+	+
Lysosyme	+	+
Catalase	+	-
Phosphatase acide	+	+
Phosphatase alcaline	+	-
$\beta$ -Glucuronidase	+	+
$\alpha$ -Glucosidase	+	+

Source : Harmon, 1998

+ = présent

- = absent

L'activation des hétérophiles est initiée par une procédure complexe qui inclut de l'adhésion, de la migration cellulaire, de la digestion de particules, de la

dégranulation, ainsi que de la synthèse de médiateurs (Kogut et al., 1998). Ces cellules phagocytaires vont donc agir tôt dans le développement de l'infection afin de restreindre l'activité bactérienne (Wells et al., 1998). Pour être phagocytées, les particules doivent d'abord se fixer à la surface du phagocyte. Toutefois, toutes les particules qui se fixent ne sont pas automatiquement ingérées. Les hétérophiles possèdent une collection de récepteurs de surface spécialisés qui sont fonctionnellement liés au système phagocytaire de la cellule. De ce fait, la phagocytose est un processus induit au cours duquel les récepteurs activés transmettent des signaux à l'intérieur de la cellule pour initier la réponse. Les inducteurs les mieux caractérisés sont les anticorps qui se fixent à la surface de l'antigène. Cette enveloppe d'anticorps est alors reconnue par des récepteurs spécifiques à la surface des hétérophiles. La fixation de particules recouvertes d'anticorps à ces récepteurs provoque un plissement de la membrane cellulaire des hétérophiles ce qui provoque la formation de pseudopodes qui englobent la particule et fusionnent à leurs extrémités pour former un phagosome (Kogut et al., 1998). Une fois internalisés, ceux-ci fusionnent avec les lysosomes pour former des phagolysosomes, dans lesquels le matériel ingéré est dégradé. Il est à noter que les substances réfractaires à la dégradation restent dans les phagolysosomes, où elles forment des corps résiduels. Nous savons également que les hétérophiles peuvent libérer du lysozyme qui provoque entre autres la destruction de la paroi bactérienne (Harmon, 1998). Finalement, la phagocytose s'avère très intéressante afin d'indiquer un état de santé générale de l'animal tout en épargnant la vie de celui-ci.

## **2.6 TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE**

L'immunité cellulaire requiert une continuelle prolifération et différenciation des cellules B ou T afin de protéger l'individu contre les agents pathogènes. Cette immunité cellulaire peut être évaluée à l'aide de la lymphoprolifération des cellules B ou T suite à une stimulation par un mitogène (Con A, PHA, PWM et LPS). Ce dernier a la capacité d'induire la mitose chez les leucocytes d'une multitude d'espèces animales. La phytohemagglutinine (PHA) et la concanavaline

(Con A) sont des lectines de plantes ayant la capacité d'induire la prolifération des cellules T, les lipopolysaccharides (LPS) induisent pour leur part la blastogénèse des cellules B tandis que le pokweed (PWM) induit la synthèse de l'ADN dans les cellules B et T. Plus particulièrement, la Con A et la PHA stimulent les lymphocytes T par un "cross-linking" indirect du complexe du récepteur pour le lymphocyte T (McKnight et al., 1994). Également, nous savons que la Con A et la PHA stimulent différentes sous-populations de cellules T (Bevan et Cohn, 1975; Shou, Schwartz et Good, 1976).

Récemment, certains chercheurs ont intensivement étudié l'élaboration d'un test pouvant être utilisé comme biomarqueur en immunologie qui reflète les effets causés suite à une exposition à des agents toxiques (Lucier et Thompson, 1987). La transformation lymphoblastique fut choisie comme test idéal par plusieurs auteurs car cette technique est non évasive et celle-ci permet également de détecter des effets causés suite à une exposition de faibles concentrations du toxique (Snyder et Valle, 1991). Ainsi, depuis plusieurs années, la réponse mitogénique suite à une stimulation par une lectine de plante est conventionnellement utilisée afin de mesurer l'immunité cellulaire chez les mammifères et les oiseaux (Lee, 1977; Omara et al., 1997; Bishop et al., 1998).

## **CHAPITRE 3 : LES CONTAMINANTS ENVIRONNEMENTAUX**

### **3.0 INTRODUCTION**

Depuis quelques décennies, l'activité humaine a perturbé l'environnement de façon marquée. Cette activité s'est manifestée, entre autres, par la perte d'habitats et d'espèces, par l'accélération des flux de substances naturelles et par la dispersion de composés xénobiotiques et toxiques dans l'environnement. Ainsi, le but de ce chapitre n'est pas de revoir de façon exhaustive l'ensemble des contaminants de l'environnement et de leurs effets toxiques mais plutôt de résumer les grandes lignes des polluants environnementaux les plus pertinents à cette étude soit : les BPC, le DDT et le mercure.

### **3.1 LES BIPHÉNYLES POLYCHLORÉS**

#### **3.1.1 GÉNÉRALITÉS**

Les biphényles polychlorés (BPC) sont des composés organochlorés polyvalents, très stables et persistants. Les BPC servent entre autres dans la fabrication de divers produits tels les plastiques, les peintures, les résines époxydes, les pesticides, applications qui favorisent leur libération dans l'environnement (Carignan, 1996). La toxicité de chacun varie considérablement en fonction de sa structure et de ses propriétés physico-chimiques. Les mélanges commerciaux de phényles polychlorés (aroclors) sont identifiés par un numéro à quatre chiffres dont les deux premiers codent leur teneur en biphényles et les deux derniers donnent leur pourcentage en chlore. La solubilité aqueuse et la lipophilicité des différents congénères de BPC varient selon le degré de substitution par le chlore. Ainsi, la solubilité aqueuse des mono- et des dichlorobiphényles est plus élevée (1mg/L) comparativement à celle des octa- et des décachlorobiphényles (10µg/L) tandis que la lipophilicité varie en sens inverse. De plus, la volatilité (pression partielle) des différents congénères diminue avec le degré de substitution. Étant

donc volatils, les BPC s'échappent dans l'atmosphère et sont transportés sur de grandes distances, ce qui explique leur présence dans les lacs du Bouclier canadien et les lacs arctiques. Plus particulièrement, il a été estimé que 60% des apports au lac Michigan (2 500 à 6 000 kg/an) proviendrait de l'atmosphère (Eisenreich, Looney et Thornton, 1981). Leur concentration dans l'air, l'eau et les sédiments lacustres a généralement décliné depuis les deux dernières décennies, ce qui reflète l'arrêt de leur production dans plusieurs pays. Leur importance provient entre autres de leur persistance et de leur potentiel de bioamplification dans les chaînes alimentaires.

### 3.1.2 LES BPC ET LES OISEAUX

La réponse toxique des BPC est assez bien documentée chez de nombreuses espèces aviaires. Par exemple, une exposition chronique via la nourriture de 5 mg/kg d'aroclor 1254 n'affecte pas la productivité des poulets (Platonow et Reinhart, 1973). L'apparition de malformation est plutôt observée chez ces animaux lorsque la concentration en aroclor 1254 est de l'ordre de 10mg/kg (poids humide) dans le sac vitellin. Une étude plus récente permet également de remarquer une diminution du poids des organes lymphoïdes lorsque l'on expose *in vivo* la crécerelle d'Amérique au BPC 126 à une concentration de 250 ng/g (Hoffman et al., 1996).

Chez la pygargue à tête blanche, plusieurs données sur l'effet des BPC sont également répertoriées dans la littérature. Ainsi, la valeur de la "no observable adverse effect concentration" (NOAEC) pour les BPCs est de 4.0 mg/kg pour les œufs d'aigle à tête blanche (tableau 3) (Bowerman et al., 1995). Une étude antérieure démontre des niveaux de 83 et 98 mg/kg (poids humide) de BPC dans des œufs prélevés sur des sites de nidification près de lac Michigan et Huron (Kublak et Best, 1993). Ces concentrations sont approximativement 20 fois supérieures à la NOAEC ce qui indique que l'exposition est supérieure au seuil de toxicité. En effet, il est possible d'observer des problèmes de malformations

comme le bec croisé chez des aiglons nichant dans la région des Grands Lacs (Bowerman et al., 1995). Schwartz et ses collaborateurs en 1993 ont également rapporté des concentrations de 71 ng/g de BPC 126 chez des embryons de pygargue à tête blanche possédant des malformations. Cette concentration est 10 fois supérieure à la dose à laquelle 50% de mortalité est observée ( $DL_{50}$ ) chez les œufs de poulets (Brunstrom et Andersson, 1988) et légèrement supérieure à la  $DL_{50}$  chez les œufs de crécerelle d'Amérique (Hoffman et al., 1995). Selon une étude antérieure, les concentrations des BPC dans le plasma d'aiglons à tête blanche sont 7.5 fois plus élevées chez les oisillons nichant près du littoral comparativement aux aiglons nichant à l'intérieur des terres (Bowerman et al., 1993). De plus, la relation entre la productivité et le niveau de contaminants suggère qu'un nid produisant 3 aiglons possède probablement des niveaux inférieurs de BPC et de DDE comparativement à un nid produisant un ou deux oisillons (Bowerman et al., 1995). Selon les données rapportés par Bowerman en 1993, les niveaux de contamination en BPCs retrouvés dans le plasma d'aiglons nichant dans les sites que nous avons échantillonnés au printemps 1999 sont présentés au tableau 4. Ces régions peuvent être classées selon l'ordre de contamination décroissant suivant pour les BPCs: lac Érié (LE), lac Michigan (LM), lac Huron (LH), Voyageur National Park (VNP), lower Peninsula (LP) et upper Peninsula (UP) (carte 1).

Finalement, plusieurs auteurs en sont venus à la conclusion que la présence des BPC dans la nourriture et dans les œufs de pygargue à tête blanche nichant autour des Grands Lacs est une cause majeure des effets néfastes observés sur ces oiseaux (Giesy, Ludwig et Tillitt, 1994ab).

Carte 1 : Distribution des nids de pygargues à tête blanche échantillonnés



Tableau 3 : Valeur de la NOAEC pour les BPCs chez les œufs de pygargue à tête blanche, facteur de bioamplification (BMF) entre 2 chaînons et concentration en BPCs retrouvée chez les poissons des Grands Lacs

Effet	BPCs
NOAEC, mg/kg œuf	4.0
BMF, poisson à l'œuf	28
[ ] chez les poissons du littoral, mg/kg	2.1
[ ] chez les poissons à l'intérieur des terres, mg/kg	0.2

Source : Bowerman et al., 1995

[ ] : concentration

Tableau 4 : Concentration en BPCs retrouvé dans le plasma d'aiglons à tête blanche échantillonnés dans différentes régions des États-Unis entre 1987 et 1993

Région	n	BPCs (ppb)	ET
VNP	21	47	4
LP	49	31	2
UP	64	28.5	3
LM	25	154	2
LH	12	105	3
LE	35	199	2

Source : Bowerman, 1993

lac Érié (LE), lac Michigan (LM), lac Huron (LH), Voyageur National Park (VNP), lower Peninsula (LP) et upper Peninsula (UP)

ppb : partie par milliard

ET : écart type

### **3.1.3 LES BPC ET LE SYSTÈME IMMUNITAIRE**

#### **3.1.3.1 CHEZ LES MAMMIFÈRES**

Les BPC ont été étudiés intensivement pour leurs propriétés immunotoxiques. Plusieurs évidences nous démontrent que le système immunitaire est une cible de toxicité pour ces substances. Dérivé d'une variété de modèle animal, principalement des rongeurs, nous observons entre autres une atrophie sévère des organes lymphoïdes primaires et secondaires, une réduction du nombre de lymphocytes circulants ainsi que de l'immunosuppression lorsque ces animaux sont exposés à ces xénobiotiques (Casarett et Doull's, 1996). Selon Kerkvliet en 1984, plusieurs aroclors engendrent une suppression de la réponse immunitaire ainsi qu'une diminution de la résistance de l'hôte. Toutefois, les études qui caractérisent l'action immunotoxique des BPC ont tout d'abord concentrées leurs efforts sur la réponse en anticorps (Casarett et Doull's, 1996). Ce paramètre est

de loin celui qui est le plus couramment affecté par l'exposition aux BPC (Casarett et Doull's, 1996). De ce fait, les effets sur la réponse d'anticorps ont été démontrés entre autres chez le lapin, la souris, le cochon et le singe Rhésus. Par exemple, une exposition de plusieurs mois à de l'aroclor 1254 chez le singe Rhésus provoque une suppression du nombre de cellules productrices d'anticorps et cela pour de faibles doses de BPC en réponse à une injection de globules rouges de mouton (Tryphonas et al., 1991).

Puisque dans notre étude, les 2 paramètres immunologiques d'intérêts sont la phagocytose et la transformation lymphoblastique, voici quelques exemples d'interactions entre les BPC et ces 2 paramètres. Tout d'abord, lorsque que l'on expose des rats à une combinaison d'aroclor 1254, 1242 et 1260 à des concentrations entre 0.01 et 0.5 µg/ml aucune suppression de la réponse phagocytaire en présence de billes de latex n'est observée chez des cellules de la rate, du péritoine ainsi que des cellules périphériques sanguines (Omara et al., 1998). Une autre étude mentionne qu'une exposition de 20 et 25 ppm au BPC 138 provoque une diminution significative de la lymphoprolifération mais qu'une exposition au BPC 153, 180 et 169 à des concentrations entre 5 et 25 ppm ne provoque aucune modification de la prolifération lymphocytaire (De Guise et al., 1998). De plus, cette étude nous rapporte qu'une exposition aux différents aroclors n'a présenté aucun effet sur la réponse phagocytaire. Selon Omara et ses collaborateurs en 1997, une exposition d'une combinaison d'aroclor 1254, 1242 et 1260 à des concentrations de 0.01 et 0.5 µg/ml engendre une augmentation de la lymphoprolifération chez des splénocytes ainsi que chez des PBL pour le rat. Finalement, la littérature nous mentionne qu'une diminution de la prolifération lymphocytaire chez des mammifères marins est observée lorsque les concentrations sanguines en BPC et en métabolite du DDT augmentent (Lahvis et al., 1995).

### 3.1.3.2 CHEZ LES OISEAUX

Chez les oiseaux, en laboratoire, il a été démontré qu'une exposition *in vitro* à l'aroclor 1254 chez le canard colvert provoque une augmentation de la prolifération lymphocytaire lorsque les oiseaux sont exposés à une dose de 250 ppm. Par contre, aucun effet n'est observé pour des concentrations de 100 et 500 ppm. Dans la même étude aucune différence dans le compte différentiel des leucocytes pour les 3 doses d'aroclor n'a été notée (Jefferson et al., 1997). À l'opposé, une étude démontre que la résistance de l'hôte suite à une exposition aux BPC est supprimée dans le cas d'une exposition au virus de l'hépatite chez le canard (Dean et Thurmond, 1987). Les différences entre ces 2 études seraient dues à des modes d'expositions différents.

Une récente série d'études en milieu naturel a démontré qu'une exposition prénatale aux contaminants organochlorés est associée à de l'immunosuppression chez des oisillons de goéland argenté (*Larus argentatus*) et de sterne caspienne (*Sterna caspia*) nichant dans des sites des Grands Lacs qui possèdent des hauts niveaux de contamination (Grasman, Scanlon et Fox, 1998). Chez les adultes, une exposition aiguë aux BPC et au TCDD provoque une suppression de l'immunité à médiation cellulaire tandis qu'on observe une atrophie du thymus et une suppression des fonctions des lymphocytes T suite à une exposition chronique aux BPC et au TCDD chez les oisillons. Ces atteintes peuvent provoquer une augmentation des infections et potentiellement induire de la mortalité chez les populations d'oiseaux qui se nourrissent de poissons (Luster, Blank et Dean, 1987; Thomas et Faith, 1985; Vos, 1989). Plus récemment, dans une étude portant sur plusieurs années (1992-1994) Grasman et ses collaborateurs ont mesuré les fonctions immunitaires cellulaires, dont la production d'anticorps chez les oisillons de goéland argenté et de la sterne caspienne nichant dans des sites des Grands Lacs possédants un gradient de contamination d'organochloré (Grasman et al., 1996). Les deux espèces ont présenté une forte relation entre le niveau de suppression de la réponse PHA (test de la peau) et le gradient de

contamination des organochlorés. La suppression s'avérait plus prononcée (30-45%) chez les oiseaux nichant près du lac Ontario et de la baie de Saginaw pour les deux espèces. Cette étude mentionne aussi que l'immunité à médiation cellulaire des oiseaux nichant autour des Grands Lacs est plus sensible aux BPC comparativement à la médiation humorale (Grasman et al., 1996).

Ainsi, les contaminants environnementaux peuvent rendre les oiseaux plus vulnérables aux infections. La présence d'une forte corrélation entre les niveaux de contamination des BPC dans les œufs de cormoran et l'infection aux yeux de ceux-ci fut observée (Ludwig et al., 1996). Il est également possible d'observer une augmentation de la mortalité chez des canards exposés aux BPC et au virus de l'hépatite comparativement aux canards n'ayant pas été exposés aux BPC (Friend et Trainer, 1970). Une corrélation positive est observée entre les niveaux d'exposition aux BPC et l'invasion de nématodes chez des goélands bourgmestre (Skaare et al., 2000). Pour la crécerelle d'Amérique, il est mentionné dans la littérature que les oisillons sont plus vulnérables aux BPC que les adultes mais moins sensibles que les embryons (Hoffman et al., 1996). Toutefois, nous observons que les crécerelles d'Amérique seraient une espèce relativement insensible aux effets des BPC suite à une exposition chronique (Elliott, Kennedy et Lorenzen, 1997). Toutes ces données nous démontrent que les BPC peuvent altérer la compétence immunitaire d'une multitude d'espèces dont les oiseaux.

## **3.2 LE DICHLORODIPHÉNYLDICHOROÉTHANE (DDT)**

### **3.2.1 GÉNÉRALITÉS**

Synthétisé dès 1873, le DDT ( $C_{14}H_9Cl_5$ ) est un exemple de pesticides organochlorés dont les propriétés insecticides ne furent découvertes qu'en 1939 (Carignan, 1996). Toutefois depuis 1972, l'Amérique du Nord ne produit plus ce pesticide organochloré. Par contre, celui-ci est toujours employé massivement dans plusieurs pays en voie de développement, surtout pour combattre les moustiques vecteurs de la malaria. Néanmoins, le DDT a récemment connu un recul à l'échelle mondiale (Banerjee, Ramachandran et Hussain, 1986). Son

importance et son intérêt toxicologique proviennent du fait qu'il est hydrophobe, lipophile, rémanent ( $t_{1/2}$  (dans le sol) = 13 années) et volatil. Ainsi, ce contaminant environnemental peut se retrouver dans une multitude d'écosystèmes pour une période prolongée.

### **3.2.2 LE DDT ET LES OISEAUX**

Les effets néfastes engendrés par le p,p'-DDE, un métabolite actif du DDT, sur la population Nord Américaine de pygargue à tête blanche sont apparus au cours des années soixante-dix. L'atteinte la plus couramment observée chez cette population aviaire est l'apparition d'une diminution de l'épaisseur de la coquille des œufs occasionnant une baisse du taux d'éclosions (Broley, 1958 : Bowerman et al., 1995). Depuis l'abolition de l'utilisation du DDT en Amérique, nous observons une augmentation du nombre de pygargues à tête blanche autour des Grands Lacs (Bowerman et al., 1995).

Selon une étude antérieure, il a été reporté que les œufs contenant moins de 3mg/kg (poids humide) possèdent une productivité près de la normale, qu'un amincissement modéré de la coquille survenait à des concentrations de 5.6mg/kg et que les œufs possédant plus de 15mg/kg n'étaient plus viables (Wiemeyer et al., 1984). Il a été également observé que la région du Michigan possédait certains œufs contenant plus de 15 mg/kg de p,p'-DDE par poids humide ce qui entraînait une réduction de plus de 75% de la reproductivité (Bowerman et al., 1995). De plus, un facteur de bioamplification de 22 entre les poissons des Grands Lacs et les œufs des aiglons ainsi qu'une valeur de NOAEC de 3.5 mg/kg dans les œufs de la pygargue à tête blanche furent observés (tableau 5) (Bowerman et al., 1995). Ces résultats indiquent que le DDE affecte encore aujourd'hui la reproduction de la pygargue à tête blanche malgré le bannissement de ce xénobiotique en Amérique du Nord depuis plusieurs années. Selon les données rapportées par Bowerman en 1993, les niveaux de contamination en p,p'-DDE retrouvés dans le plasma d'aiglons nichant dans les sites que nous avons

échantillonnés au printemps 1999 sont présentés au tableau 6. Ces régions peuvent être classées selon l'ordre décroissant de contamination à partir des données de 1993: LM, LH, LE, VNP, UP et LP.

Tableau 5 : Valeur de la NOAEC pour le p,p'-DDE chez les œufs de pygargue à tête blanche, facteur de bioamplification (BMF) entre 2 chaînons et concentration en p,p'-DDE chez les poissons des Grands Lacs

Effet	p,p'-DDE
NOAEC, mg/kg œuf	3.5
BMF, poisson à l'œuf	22
[ ] chez les poissons du littoral, mg/kg	0.3
[ ] chez les poissons à l'intérieur des terres, mg/kg	0.035

Source : Bowerman et al., 1995

Tableau 6 : Concentration en p,p'-DDE retrouvée dans le plasma d'aiglons à tête blanche échantillonnés dans différentes régions des États-Unis entre 1987 et 1993

Région	n	p,p'-DDE (ppb)	Écart-type
VNP	21	20	3
LP	49	10	2
UP	64	11	3
LM	25	35	2
LH	12	25	3
LE	35	22	3

Source : Bowerman, 1993

### **3.2.3 LE DDT ET LE SYSTÈME IMMUNITAIRE**

#### **3.2.3.1 CHEZ LES MAMMIFÈRES**

L'étude du DDT sur le système immunitaire s'est principalement dirigée vers l'immunité humorale mais quelques données existent également sur l'immunité cellulaire et la réponse de l'hôte (Voccia et al., 1999). Un résumé de quelques effets du DDT sur le système immunitaire des mammifères est présenté dans le tableau 7.

Il est également à noter que lorsque les contaminants environnementaux se lient aux protéines, ceux-ci sont considérés comme moins toxiques à cause de leur incapacité à traverser les membranes biologiques. Toutefois, d'un point de vue immunologique, la protéine liée peut augmenter la quantité de xénobiotiques disponibles pour que ceux-ci exercent leurs actions spécifiques dans l'organisme (Voccia et al., 1999). Ainsi, selon une étude sur le DDT et les macrophages chez le rat, le DDT lié à des lipoprotéines du sérum est plus rapidement absorbé par les cellules que le DDT libre ce qui cause une inhibition de la phagocytose par les macrophages (Kaminski et al., 1986).

#### **3.2.3.2 CHEZ LES OISEAUX**

La littérature nous rapporte très peu de données sur l'effet du DDT sur le système immunitaire des oiseaux. En effet, la majorité des études examinent plutôt l'effet du DDT sur la reproduction et la productivité des espèces aviaires. Toutefois, nous savons que suite à une exposition par voie orale de 100 ppm de DDT pour une durée de 40 jours chez le poulet, une diminution du poids des organes lymphoïdes (thymus, bourse de Fabricius et rate) est observée (Exon, Kerkvliet et Talcott, 1987). De plus, une exposition de 625 ppm pour une durée entre 6 à 8 semaines ne provoque aucun effet sur le titrage d'anti-*Salmonella pullorum* de même qu'une exposition entre 100 et 400 ppm pour une durée de 5 semaines sur le titrage d'anti-BSA chez le poulet (Exon Kerkvliet et Talcott, 1987). L'observation

Tableau 7 : Résumé des effets du DDT sur le système immunitaire

Espèces	Exposition	Effet	Références
Lapin	4-150 ppm pour 5 sem EO	≠ sur la production d'anticorps	Exon Kerkvliet et Talcott, 1987
Lapin	200 ppm pour 35 j EO	Suppression d'anti-Salmonella typhi et anti-ovalbumine IgM et IgG	Exon Kerkvliet et Talcott, 1987
Cochon	15 mg/Kg i.p.	≠ sur le titrage de anti-diphtheria	Gabliks, Askari et Yolen, 1973
Souris	0.1 DL <sub>50</sub> (30 mg/kg) G	≠ sur la production d'anticorps	Wiltrout, 1978
Rat	0.25 mg/kg pour 31j G	≠ sur la phagocytose par les neutrophiles	Kaliser, 1968
Rat	1, 5, 10 mg/kg i.p.	Diminution de la phagocytose par les macrophages du péritoine	Kaminski et al., 1982
Humain	10 µM <i>in vitro</i> exposition PMN	Diminution de la chemotaxis	Exon Kerkvliet et Talcott, 1987

≠ : aucun effet

EO : exposition orale

G : gavage

i.p. : intra-péritonéale

d'une suppression des niveaux d'IgM et d'IgG circulants chez le poulet est remarquée suite à une exposition au DDT (Subba Rao et Glick, 1977).

Ces études nous permettent de croire que le DDT peut provoquer des modifications du système immunitaire à plusieurs niveaux chez les espèces aviaires. Toutefois, il serait intéressant d'effectuer le dosage du métabolite actif chez une espèce aviaire de laboratoire dans différents tissus afin d'établir des comparaisons avec les niveaux retrouvés dans les milieux naturels. Pour l'instant nous savons que les niveaux de DDE retrouvés dans les milieux naturels mentionnent des concentrations maximales de l'ordre de 15 ppm dans les œufs des pygargues à tête blanche et une valeur de NOAEC de 3.5 ppm pour les œufs. À ce jour, il est difficile de prédire l'effet du DDT sur le système immunitaire d'animaux naturellement exposés selon les études répertoriées dans la littérature.

### **3.3 LE MERCURE**

#### **3.3.1 GÉNÉRALITÉS**

Le mercure est le premier polluant chimique pour lequel un lien direct fut établi entre sa présence en faibles concentrations, sa bioamplification dans la chaîne trophique, et un impact néfaste sur la santé humaine (maladie de Minamata, Carignan, 1996). Au cours des dernières années, il a été estimé que l'activité humaine avait doublé la quantité de mercure naturellement émis dans l'atmosphère. Ce xénobiotique se distingue des autres métaux traces par la volatilité de certaines formes sous lesquelles nous le rencontrons et par la biodisponibilité du méthylmercure (MHg), ce qui lui confère une toxicité particulièrement élevée. L'existence de formes gazeuses favorisent sa dispersion sur de longues distances dans l'atmosphère. La pollution des eaux par le mercure est surtout attribuable aux retombés atmosphériques et aux rejets directs par les industries et les effluents urbains (Carignan, 1996). En effet, nous observons dans l'Est de l'Amérique du Nord que l'augmentation des concentrations de mercure (Hg) dans les milieux aquatiques est principalement due aux dépôts

atmosphériques (Johnson, 1987). L'intérêt de ce contaminant provient principalement de la liposolubilité et de la persistance du méthylmercure dans les organismes. En effet, sa bioamplification est en partie due aux longs temps d'élimination par les organismes ; chez les poissons, par exemple, les demi-temps d'élimination atteignent de 600 à 1200 jours (Carignan, 1996). Finalement, le mercure organique (méthylmercure et phénylmercure) est environ 10 fois plus toxique que le mercure inorganique chez la plupart des organismes vivants (Carignan, 1996).

Au niveau de la santé humaine, les risques toxicologiques les plus importants concernent les populations riveraines qui consomment de grandes quantités de poissons. Le mercure méthylé peut susciter des problèmes neurologiques et plus particulièrement des retards du développement psychomoteur. En effet, le méthylmercure est complètement absorbé par le tractus gastro-intestinal et il peut passer la barrière du placenta ainsi que la barrière sang-cerveau (Rustam et al., 1974). Toutefois, au-delà de la santé humaine, ce contaminant peut affecter une multitude d'espèces fauniques dont les oiseaux.

### **3.3.2 LE MERCURE ET LES OISEAUX**

Certaines espèces d'oiseaux s'avèrent sensibles aux effets du mercure. Ainsi, ce contaminant peut modifier le comportement nuptial et engendrer des problèmes de reproduction chez le huard à collier (*Gavia immer*, Barr, 1986). Ce xénobiotique peut également susciter de la létalité, de la neurotoxicité et des problèmes de comportement chez l'autour des palombes (*Accipiter gentilis*, Borg et al., 1970) ainsi que chez la buse à queue rousse (*Buteo jamaicensis*, Fimreite et Karstad, 1971).

Étant un prédateur de niveau tertiaire dans la chaîne alimentaire, la pygargue à tête blanche s'avère susceptible de bioaccumuler plusieurs xénobiotiques dont le mercure. Afin de déterminer le niveau d'exposition aux métaux lourds chez

plusieurs espèces aviaires, l'utilisation des plumes est une méthode couramment utilisée chez les oiseaux (Braune et Gaskin, 1987). En effet, les plumes peuvent contenir de 49 à 93% de la charge corporelle pour les métaux et notamment pour le méthylmercure (Braune et Gaskin, 1987). De plus, les concentrations de mercure dans les plumes reflètent la concentration sanguine du mercure (Westermarck, Odsjo et Johnels, 1975) et/ou la concentration tissulaire (Braune et Gaskin, 1987) au moment du développement des plumes. Ces xénobiotiques s'accumulent donc au niveau du plumage et peuvent ainsi être éliminés de l'organisme lorsque l'oiseau remplacera ses plumes.

Des niveaux de l'ordre de 21.2 mg/kg ont été retrouvés dans les plumes des pygargues à tête blanche adultes dans la région de la lower Peninsula au Michigan, de l'ordre de 20.6 mg/kg dans la région de la upper Peninsula au Michigan, de l'ordre de 19.6 mg/kg dans la région du lac Michigan et Huron et de l'ordre de 12.9 mg/kg dans la région du lac Érié (tableau 8) (Bowerman et al., 1994a). Il est également possible d'observer que la concentration en mercure dans les plumes d'aiglons s'avère nettement inférieure à celle retrouvée chez les adultes (tableau 9). Toutefois, il a été établi dans la littérature que la concentration en mercure dans les plumes n'est pas corrélée à une baisse de productivité chez la pygargue à tête blanche nichant autour des Grands Lacs (Bowerman et al., 1994a). Une valeur théorique de NOAEC de 0.5mg de Hg/kg dans les œufs des aigles (Wiemeyer et al., 1984) et un facteur de bioamplification de 1 entre le poisson et l'œuf de la pygargue ont été proposés (tableau 8) (Bowerman et al., 1995). Finalement, selon une récente étude les niveaux actuels de mercure retrouvés dans l'eau des Grands Lacs est de 910 pg/L et de 54 pg/L pour le MHg (Nichols, Bradbury et Swartout, 1999).

La compréhension des effets néfastes du mercure sur les populations sauvages d'aiglons s'avère très complexe. En effet, lorsque nous nous retrouvons en milieu naturel il est possible d'observer une multitude d'interactions entre les différents polluants environnementaux. Ce phénomène est particulièrement

présent pour les régions des Grands Lacs où le p,p'-DDE et les BPC sont directement corrélés à des problèmes de reproduction chez la pygargue à tête blanche (Best et al., 1994). Ces contaminants peuvent donc masquer l'effet direct du mercure sur les oiseaux. D'autres facteurs peuvent également réduire l'effet du mercure sur la productivité et sur le système immunitaire des aiglons à tête blanche selon le cycle de vie de ces oiseaux. En effet, la diète des aiglons autour des Grands Lacs au printemps et à l'été est principalement composée d'une espèce de poisson, *Esox lucius*, qui s'avère très contaminée en mercure (Evans, Wilson et Creal, 1991). Par contre, durant cette période de l'année, nous apercevons un remplacement des plumes. Ainsi, ce mécanisme naturel permet de réduire les effets néfastes du mercure chez les jeunes oisillons.

Tableau 8 : Valeur de la NOAEC pour le mercure chez les œufs de pygargue à tête blanche, facteur de bioamplification (BMF) entre 2 chaînons et concentration en mercure chez les poissons des Grands Lacs

Effet	Mercure
NOAEC, mg/kg œuf	0.5
BMF, poisson à l'œuf	1.0
[ ] chez les poissons du littoral, mg/kg	0.2
[ ] chez les poissons à l'intérieur des terres, mg/kg	0.3

Source : Bowerman et al., 1995

Tableau 9 : Concentration en mercure retrouvée dans les plumes d'aigles et d'aiglons à tête blanche échantillonnés entre 1985-1989

Région	Hg (mg/kg)
Ad,LP	21
Ad,UP	21
Ad, LM	20
Ad, LH	20
Ad, LE	20
Ad,VNP	13
Je, toutes régions confondues	9

Source : Bowerman et al., 1994a

Ad : adulte

Je : jeune

### **3.3.3 LE MERCURE ET LE SYSTÈME IMMUNITAIRE**

#### **3.3.3.1 CHEZ LES MAMMIFÈRES**

Plusieurs recherches d'expositions *in vitro* étudiant l'effet des contaminants environnementaux sur les fonctions immunitaires ont été élaborées au cours des dernières années. Cependant, un nombre limité d'études sur le mercure font état dans la littérature et plus particulièrement chez les animaux autres que la souris et le rat.

D'un point de vue général, une concentration de 0.1 µg MHg/ml n'entraîne aucune suppression de la réponse phagocytaire lorsque des lymphocytes périphériques sanguins humains sont exposés à des billes fluorescentes de latex (Omara et al., 1998). Toutefois, une exposition à de très faibles doses de HgCl<sub>2</sub> (10<sup>-12</sup> M) induit une suppression significative de la phagocytose pour des globules rouges de mouton mais la viabilité cellulaire n'est pas modifiée pour des concentrations de HgCl<sub>2</sub> ≤ 10<sup>-6</sup> M chez l'humain (Contrino et al., 1988). Chez des

leucocytes de bovins, une exposition *in vitro* au  $\text{HgCl}_2$  à  $10^{-6}$  M provoque une réduction significative du pourcentage de neutrophiles ayant phagocytés 3 billes de latex et plus comparativement au groupe témoin (63% à 24%) (De Guise et al., 2000). Cette même étude rapporte également qu'une exposition entre  $10^{-5}$  M et  $10^{-7}$  M ne provoque aucun changement dans la réponse mitogénique chez des cellules sanguines mononucléaires de bovin.

Des études *in vivo* chez la souris démontrent que le mercure diminue la formation d'anticorps et qu'une exposition prolongée provoque le développement d'autoimmunité et réduit la résistance de l'animal aux maladies virales (Koller, 1975; Koller, Exon et Brauner, 1977). Également, une exposition au méthylmercure lors du développement embryonnaire chez des souris altère la réponse immunitaire primaire et secondaire (Ohi et al., 1976). De plus, suite à une exposition subchronique au chlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) chez le cochon à une concentration de 0.5 mg/kg, nous observons une diminution significative des cellules T et B dans les organes lymphoïdes, une diminution de la phagocytose par les macrophages du péritoine et une augmentation de l'infection par les larves d'*Ascaris* (Boroskova, Soltys et Benkova, 1995). Chez les rats, une exposition à 0.1 µg/ml de méthylmercure provoque de l'immunosuppression en inhibant la réponse mitogénique proliférative des cellules B et T dans les tissus lymphoïdes ainsi que chez les lymphocytes périphériques sanguins (Omara et al., 1997). Finalement, suite à une exposition au  $\text{HgCl}_2$  chez la souris, la lymphoprolifération est dose dépendante pour le mitogène PHA et PWM (Sharma et Gehring, 1979).

### **3.3.3.2 CHEZ LES OISEAUX**

Dans la littérature, très peu d'études font état de l'effet du mercure sur le système immunitaire des oiseaux. Nous savons par exemple qu'une exposition au chlorure de mercure chez le poulet provoque une diminution du nombre de leucocytes périphériques sanguins (Thaxton et al., 1974) et que ce xénobiotique peut provoquer une diminution de la réponse immunologique dans certains cas

(Thaxton et Parkhurst, 1973). Cependant, selon certains chercheurs, les aiglons ne seraient pas affectés suite à une exposition au mercure dans un milieu naturel car le remplacement des plumes chez ces oiseaux permettent une élimination rapide et efficace de ce xénobiotique (Sepulveda et al., 1999). Toutefois, ce contaminant pourrait nuire à la réponse immunitaire chez l'adulte car le remplacement des plumes s'effectue à un rythme beaucoup plus lent que chez les oisillons ce qui permettrait au mercure d'être biodisponible pour l'organisme sur une plus longue période de temps. Finalement, le mercure peut également s'accumuler au niveau de l'œuf (Sanpera C et al. 2000). Ainsi, le mercure devrait être pris en considération dans la compréhension de l'état de santé de la pygargue à tête blanche.

## **CHAPITRE 4 : AUTRES FACTEURS INFLUENÇANT LA RÉPONSE IMMUNITAIRE**

Quel que soit le contaminant considéré, il faut noter qu'il existe des différences de sensibilité entre les individus (âge, sexe, poids...) et entre les espèces (Revillard, 1994). Cette variabilité interindividuelle et l'intervention d'autres facteurs (proies, route migratoire, phénomène de compétition, parasite...) font que la compréhension des effets immunologiques observés chez des populations de pygargue à tête blanche est à l'heure actuelle un objectif de taille. Voici quelques exemples de variables pouvant interférer avec la réponse immunitaire de l'oiseau.

### **4.1 L'ÂGE**

L'âge peut-être un facteur important dans la compétence immunitaire. En effet, plusieurs études chez des espèces aviaires démontrent que l'oisillon est plus sensible aux effets des contaminants environnementaux comparativement à l'adulte pour le système immunitaire (phagocytose et transformation lymphoblastique) (Trust et al., 1994; Wells et al., 1998; Fairbrother et al., 1994). Par exemple, suite à une infection à la salmonelle, il a été démontré chez les poulets que l'index de phagocytose pour les oiseaux âgés entre 1 et 4 jours était similaire (Wells et al., 1998). Par contre, au septième jour l'index doublait (Wells et al., 1998). Ainsi, l'activité phagocytaire augmente avec l'âge lors de la première semaine de vie du poulet. Toutefois, il est à noter que le nombre de bactéries ingérées par les hétérophiles s'avère indépendant de l'âge. De plus, il est démontré chez la pygargue à tête blanche que l'aiglon âgé entre 58 et 68 jours possède une charge corporelle en BPC et en p,p'-DDE beaucoup plus importante que les aiglons moins âgés (tableau 10). Ainsi, l'âge influence le niveau de contamination de l'oiseau et le développement du système immunitaire ce qui peut engendrer une variabilité dans la compétence immunitaire.

Tableau 10 : Concentration en p,p'-DDE et en BPCs retrouvées dans le plasma d'aiglons d'âges différents échantillonnés entre 1987 et 1993

âge (jours)	n	BPCs (ppb)	p,p'-DDE (ppb)
25-35	48	43	10
36-46	22	41	11
47-57	26	39	11
58-68	22	124	18.5

Source : Bowerman, 1993

#### 4.2 SEXE ET POIDS DE L'ANIMAL

Pour ce qui est des variables sexe et poids, celles-ci pourraient également engendrer des réponses immunitaires différentes chez la pygargue à tête blanche. En effet, selon la littérature il existe tout d'abord des différences dans le compte différentiel de plusieurs types cellulaires selon le sexe de l'animal (Nirmalan et Robinson, 1971). Nous notons que les aiglons à tête blanche femelle possèdent une charge corporelle supérieure pour les BPC comparativement aux mâles (Tableau 11). De plus, les concentrations en mercure peuvent différer selon le sexe de l'animal. En effet, nous observons une charge corporelle en mercure plus élevée chez des pélicans mâles comparativement aux femelles (Donaldson et Braune, 1999). Pour ce qui est du facteur poids, nous pensons qu'un nid possédant un aiglon en dessous de la courbe poids versus âge (Bortolotti, 1984) serait plus vulnérable aux infections et par le fait même pourrait posséder un système immunitaire déficient. Un poids en dessous de la courbe peut également être observé lorsque le nid possède des triplets. De ce fait, nous pensons qu'un phénomène de compétition pour la nourriture peut s'installer entre les oisillons. Pour toutes ces raisons, le poids, le sexe, l'âge et la grosseur de la portée seront des variables étudiées lors de la comparaison de l'efficacité de phagocytose.

Tableau 11 : Concentration en p,p'-DDE et en BPCs retrouvées dans le plasma d'aiglons de sexes différents échantillonnés entre 1987 et 1993

Sexe	n	BPCs (ppb)	p,p'-DDE (ppb)
Mâle	56	53	13
Femelle	51	82	14

Source : Bowerman, 1993

#### 4.4 LES PARASITES

Selon la littérature, il est évident que les parasites peuvent agir sur la réponse immunitaire. Par exemple, lors d'une infection au virus Newcastle chez le poulet, seulement 25% des hétérophiles ont la capacité de phagocyter *Salmonella enteritidis* comparativement à 50% chez des oiseaux sains (Lam, Kabbur et Eiserich, 1996). L'infection semble donc posséder la capacité de désactiver la fonction phagocytaire des hétérophiles. De plus, chez la pygargue à tête blanche infectée nous observons que le nombre d'hétérophile dans le sang semble être plus élevé qu'un aigle non infecté (Stuht, Bowerman et Best, 1999). Également, chez la pygargue à tête blanche, *Leucocytozoon toddi* est le seul parasite observé dans les échantillons sanguins d'aiglons nichant au Michigan et au Minnesota au cours du printemps 1997 (Stuht, Bowerman et Best, 1999). Selon cette étude, les aiglons du Minnesota étaient tous parasités ainsi que 2 aiglons dans la upper Peninsula. De ce fait, afin d'améliorer la compréhension de l'état de santé de ces oiseaux de proies d'autres études seraient nécessaires afin d'établir le niveau de parasitisme des pygargues nichant autour des Grands Lacs et son impact sur la compétence immunitaire de ces oiseaux.

## RÉSUMÉ

Suite à la 2<sup>ième</sup> guerre mondiale, un déclin important des populations Nord américaines d'aigle à tête blanche fut observé. L'apparition de problèmes de productivité, de mortalité d'embryon, de stérilité d'adulte, de perte excessive de jeunes oisillons et de problèmes d'établissement d'une paire d'adulte furent relevés par plusieurs équipes de recherche. Par contre, aucune étude au niveau cellulaire n'est répertoriée dans la littérature sur ces populations. Étant un paramètre immunologique représenté dans la quasi-totalité du règne animal et un mécanisme de première ligne de défense, la phagocytose fut utilisée comme paramètre immunologique afin de comparer le système immunitaire de 6 populations d'aigle à tête blanche nichant dans des milieux possédant différents niveaux de contamination autour des Grands Lacs. Le sang fut collecté à partir de la veine branchiale à l'aide d'une seringue héparinée. Le poids, le sexe, l'âge ainsi que le nombre d'aiglons par nid fut notés. Les populations cellulaires ont été observées en cytométrie de flux suite à une lyse des globules rouges nucléés. Une incubation de 60 minutes avec des billes de latex fluorescentes fut effectuée afin d'observer l'activité phagocytaire. Un total de 2 populations a été déterminé selon un profile cytométrique de taille et de complexité cellulaire. Les hétérophiles et les lymphocytes représentent en générale 65% versus 9% du total des événements cytométriques. Ces valeurs ne sont pas significativement différentes entre les 6 sites d'échantillonnage. De plus, l'activité phagocytaire n'est pas influencée selon le site d'échantillonnage, le sexe de l'oiseau, son poids ainsi que le nombre d'aiglons par nid. Ces résultats suggèrent que la réponse immunitaire naturelle semble normale chez les aiglons nichant près des Grands Lacs.



## ABSTRACT

Phagocytosis was used to compare the health status of 60 nestling bald eagles in 6 regions around the Great Lakes with different levels of contamination. The blood was collected from the brachial vein. The sex, age, weight and number of eaglets per nest were noted. To determine the leucocyte cell population using flow cytometry, a lysing solution was used to rupture the nucleated red blood cells. For the phagocytosis assay, the heterophils cells were incubated 60 minutes with fluorescent latex beads to determine of the phagocytic capacity of heterophils, which was assessed using flow cytometry. The relative proportion of heterophils and lymphocytes in peripheral blood of bald eagle chick was determined by comparing the forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) that the leucocyte population produced on the cytometric profile. The relative proportional heterophils and lymphocytes was approximately 65% and 9% respectively, and this ratio was similar across the 6 sampling sites. The results for the phagocytosis response indicated no significant difference among the six sites, and no significant difference in the age of eaglets, their sex, weight, or the number of eaglets per nest. Data from this study suggest no signs of immunotoxicity of the nonspecific immune response in nestling bald eagle in the Great Lakes Basin.

**Assessment of phagocytic competence of heterophils from  
Bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) nestling  
in Great Lakes Basin**

**M. Audet<sup>1</sup>, W.W. Bowerman<sup>2</sup>, P. Brousseau<sup>1</sup>, M. Fortier<sup>1</sup>, and M. Fournier<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, Santé humaine, 245 Boul. Hymus, Pointe Claire, Québec, Canada

<sup>2</sup>Clemson Institute of environmental toxicology, Clemson University, South Carolina, USA

\*: Corresponding author:

Michel Fournier  
INRS-Institut Armand-Frappier  
245 Hymus Boul.  
Pointe-Claire, Qué  
Canada  
H9R 1G6  
Tel: (514)-630-8824  
Fax: (514)-630-8850  
E-mail: [Michel.fournier@inrs-iaf.quebec.ca](mailto:Michel.fournier@inrs-iaf.quebec.ca)

Keywords: Immunotoxicity, bald eagle, organochlorines, Great Lakes

## INTRODUCTION

The number of bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*) in North America after World War II declined primarily as a result of exposure to organochlorine pesticides. Dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE), a metabolic degradation product of dichlorodiphenyldichloroethane (DDT), industrial contaminants such as polychlorinated biphenyls (PCBs) have been identified as causative agents in this decline (Bowerman et al., 1995; Wiemeyer et al., 1984). Organochlorine compounds and polychlorinated biphenyls are persistent in the environment and tend to bioaccumulate in lipid reserves (Macek and Korn, 1970). Subsequently bioconcentration within the food chain exposes predators at the top of marine and estuarine food chain such as bald eagle, to elevated dietary levels of contaminants (Donaldson and Braune, 1999). In the Great Lakes Basin, it is estimated that DDT biomagnifies 630 times and PCB as much as 25 million times from the lake water to herring gull egg before it reaches the bald eagle (Norstrom et al., 1978). A multitude of clinical signs other than eggshell thinning has been associated with the loss of bald eagle productivity, including mortality of embryos, mortality of hatchlings, failure of eggs to hatch, failure to establish mature breeding, possible sterility in adults, and excessive mortality of young birds (Kozie, 1986; Broley, 1958). However, no specific evidence of adverse change at the cellular level has been defined on the bald eagle population near the Great Lakes (Colborn, 1991).

Polychlorinated biphenyls and organochlorine compounds are known to influence a variety of immune functions, such as phagocytosis. The first line of cellular defense in invertebrates and vertebrates is phagocytosis of foreign substances. Phagocytosis and processing of antigens are probably the most widespread defense mechanism in the entire animal kingdom (Rodriguez et al., 1999). In birds, it has been demonstrated that polymorphonuclear leukocytes called heterophils which are equivalent to mammalian neutrophils, play an important role in the innate host defense against infections (Wells et al., 1998). Considering the fact that phagocytosis is the first line of cellular defence, it is important to

establish the status of this immunological endpoint to understand the potential immunological effects of environmental xenobiotics. Moreover, this endpoint has been proven to be a good marker of immune competence in a wide variety of animals exposed to xenobiotics (Brousseau et al., 2000; De Guise et al., 2000).

The present study examined the possible immunotoxic effects of environmental xenobiotics on phagocytosis measured by flow cytometry for six subpopulations of nestling bald eagles in the Great Lakes Basin.

## **MATERIALS AND METHODOLOGY**

### **Study area**

The study has focussed on 6 subpopulations of bald eagles within the Great Lakes (Figure 1) in the USA. The sites were located in Michigan and Minnesota, allowing the sampling of nestling birds on Lakes Superior, Michigan, Erie and Huron as well as on a reference site in Voyageur National Park, Minnesota, which was remote from the Great Lakes.

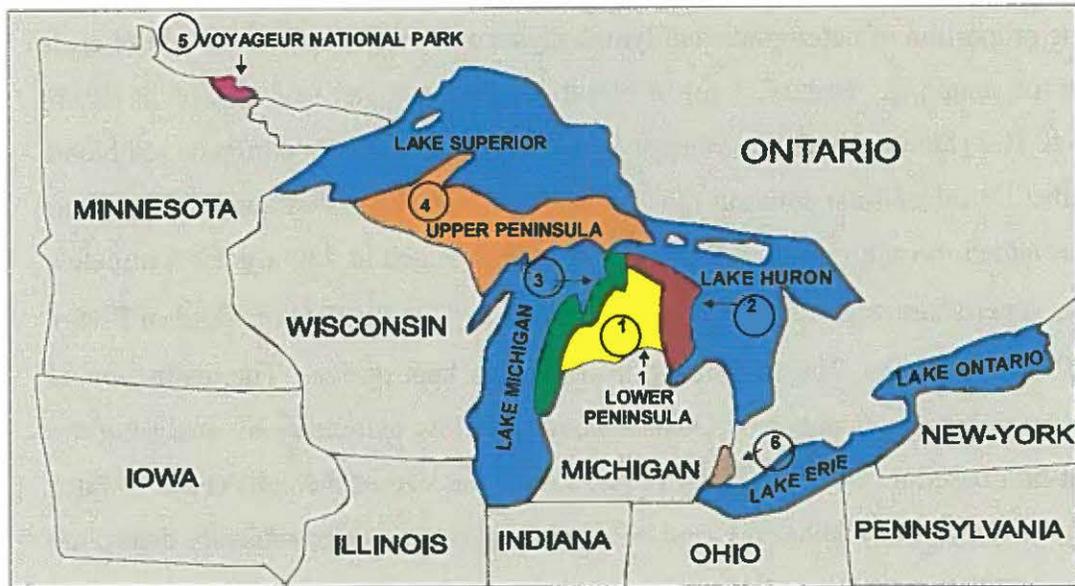


Figure 1: Distribution of eagle nests sampled. The location of the sampling sites were: the area around the lower Peninsula in Michigan, 1) Lower Peninsula (LP); the area around the lake Huron, 2) Lake Huron (LH); the area around the lake Michigan, 3) Lake Michigan (LM); the area around the upper Peninsula in Michigan, 4) Upper Peninsula (UP); the area in Minnesota, 5) Voyageur National Park (VNP); and the area around the lake Erie, 6) lake Erie (LE).

### Birds and sampling procedures

Eaglets between 3 and 10 weeks old were removed from the nest and lowered to the ground for sample collection and body measurements. Blood was collected from 60 nestling bald eagles. Aseptic techniques were used to collect blood from the brachial vein with heparinized glass syringes. Samples of whole blood were transferred to heparinized vacuum tubes (2 ml), kept on ice in coolers, and processed at the end of the day for the phagocytosis assay. The age and the sex of nestlings eagles were determined by measuring the eight primary feather and the foot pad of nestlings. By using these measurements in mathematical growth rate and sexual dimorphism equations, sex and age were determined (Bortolotti, 1984). Eaglets were banded and returned to the nest as quickly as possible. The number of eaglets per nest was also noted.

### **Determination of the proportion of heterophils and lymphocytes**

The proportion of heterophils and lymphocytes was determined at the end of each day of sampling. Briefly, 1 ml of blood from each eaglet was diluted in RPMI 1640 (1:3) and incubated in water at 41°C for 15 minutes. To eliminate red blood cells, 3.0 ml of lysis solution (NH<sub>4</sub>Cl (87%), NaHCO<sub>3</sub> (4%) and EDTA (9%)) was added to each tube for 10 minutes and centrifuged at 250 x g for 5 minutes. The supernatant was withdrawn and the cells were resuspended in 500µl of PBS + 0.5% of formalin. The suspension in tubes was kept on ice. The distinction of heterophils from lymphocytes was achieved by flow cytometry by analysing the dot-plot based on the complexity (SSC) versus the size of the cells (FSC). Gates can be drawn on lymphocytes and heterophils in order to electronically determine their relative proportion. A typical example is presented in Figure 2.

### **Determination of heterophil phagocytic activity**

The phagocytic activity of heterophils was determined using a flow cytometric method. Briefly, 1 ml of blood from each eaglet was diluted in RPMI 1640 (1:3) and incubated in water at 41°C for 15 minutes. After this incubation, 8,4µl of yellow-green fluorescent latex beads solution (Polysciences, Warrington, PA), diameter 1.716µ were mixed with the diluted blood in order to reach an approximate ratio of 100:1 microspheres per cell. After 60 minutes of incubation at 41°C, 3.0 ml of lysis solution was added to each tube for 10 minutes and the tubes were centrifuged at 250 x g for 5 minutes. The supernatant was withdrawn and the cells were resuspended in 500µl of PBS + 0.5% of formalin. The cells were layered on a 4% bovine serum albumin gradient and centrifuged at 150 x g for 8 minutes. The supernatant containing the free beads was withdrawn and a volume of 500µl + 0.5% of formalin was added to the remaining cells. Duplicates for each blood sample from each eaglet were performed. Finally, the cells were analysed by flow cytometry. The fluorescence of approximately 40,000 cells was read with a FACSan (Becton Dickinson, Rutherford, NJ) flow cytometer.

Heterophils were gated electronically for their complexity (SSC) and the size (FSC), and phagocytosis was evaluated as the percentage of cells that had phagocytosed three or more beads. This parameter was used as a measure of phagocytic activity. The lymphocytes used as negative control for phagocytosis were also gated and evaluated to monitor non specific adherence of beads on cell membranes. Typical example of histograms are presented in Figure 3.

### **Statistical Analysis**

The cytometric mean values of the percentage of heterophils and lymphocytes were evaluated by a one way analysis of variance (Anova). For the effect of the sampling site, age, weight and number of eaglets per nest, one way Anova was used. For the effect of the sex, t-test was used. The statistic package, Sigmastat (Jandel, Scientific Software, San Rafael, CA) was used for all the analysis. Differences were considered significant when  $p \leq 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Cellular populations**

The cytometric profile of the population of bald eagle blood is presented in Figure 2. This figure is a typical dot-plot of white blood cells based on the complexity (SSC) versus the size of the cells (FSC). Two populations can be distinguished as heterophils and lymphocytes (fig 2). Cell population A represents the heterophils, while cell population B represents lymphocytes. The heterophils are the phagocytic cells.

The proportion of heterophils and lymphocytes has been estimated for each eaglet in the 6 different sites. Heterophils and lymphocytes were present in proportion of 66% and 14% in the cytometric profile (Fig.2). We did not see a significant difference between the regions (Table 1).

### Determination of phagocytosis

White blood cell populations were defined based on their complexity and size. In Figure 3, the fluorescence (FL1) frequency distribution histogram of the leucocyte populations for the nestling bald eagle was obtained. There were several peaks of fluorescence in the cytometric analysis. Each peak represents different numbers of latex beads that have been phagocytosed by the heterophil. For this study, the phagocytic capacity was determined using the percentage of cells that had engulfed three beads or more.

### Phagocytosis

Phagocytosis was evaluated using leucocytes from nestling bald eagles naturally exposed to different environmental toxins. Phagocytosis was not affected significantly by sampling site, weight, sex, age or number of eaglets per nest for the successful nests (nests in which young were successfully raised).

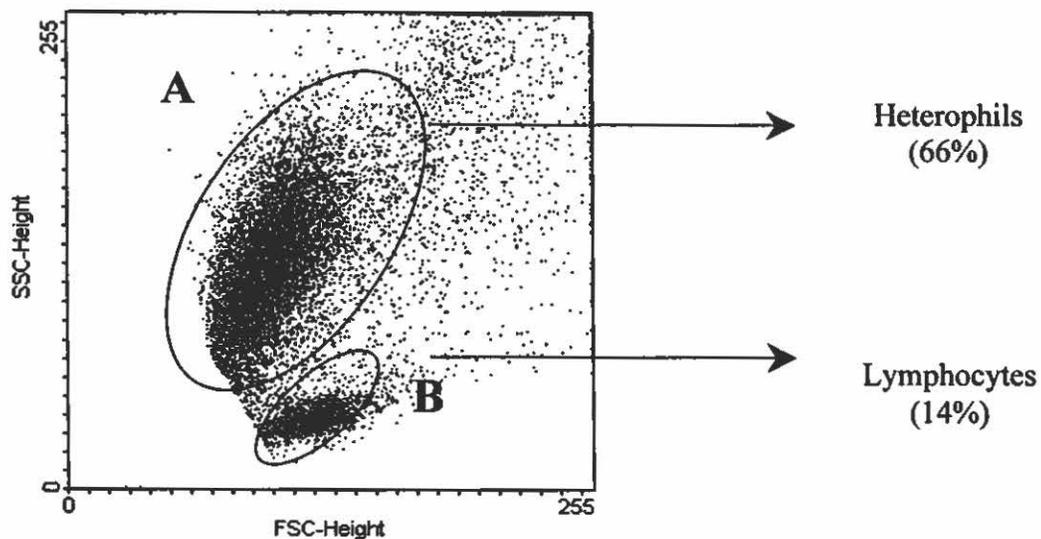


Figure 2: Typical Dot-plot of cell complexity and size obtained by flow cytometry assessment of leucocytes with a pattern typical of nestling bald eagles after a treatment with a lysis solution without fluorescent beads. Two different populations could be discriminated; the heterophils which perform phagocytosis, and the lymphocytes that were used as the negative control.

Region	n	Heterophils %		Lymphocytes %	
		Mean	± SD	Mean	± SD
Upper Peninsula	4	61	± 16	9	± 4
Lower Peninsula	30	68	± 7	10	± 4
Michigan lake	6	70	± 7	8	± 2
Huron lake	6	65	± 3	7	± 3
Voyager National Park	13	64	± 10	8	± 3
Erie lake	1	63	—	9	—
<b>Mean</b>	<b>60</b>	<b>65</b>	<b>± 3</b>	<b>9</b>	<b>± 1</b>

Table 1 : Mean values for the percentage of heterophils and lymphocytes in peripheral blood for 60 nestling bald eagles at 6 different sampling sites based upon cytometric analysis. No significant difference was observed. Anova  $p \leq 0.05$

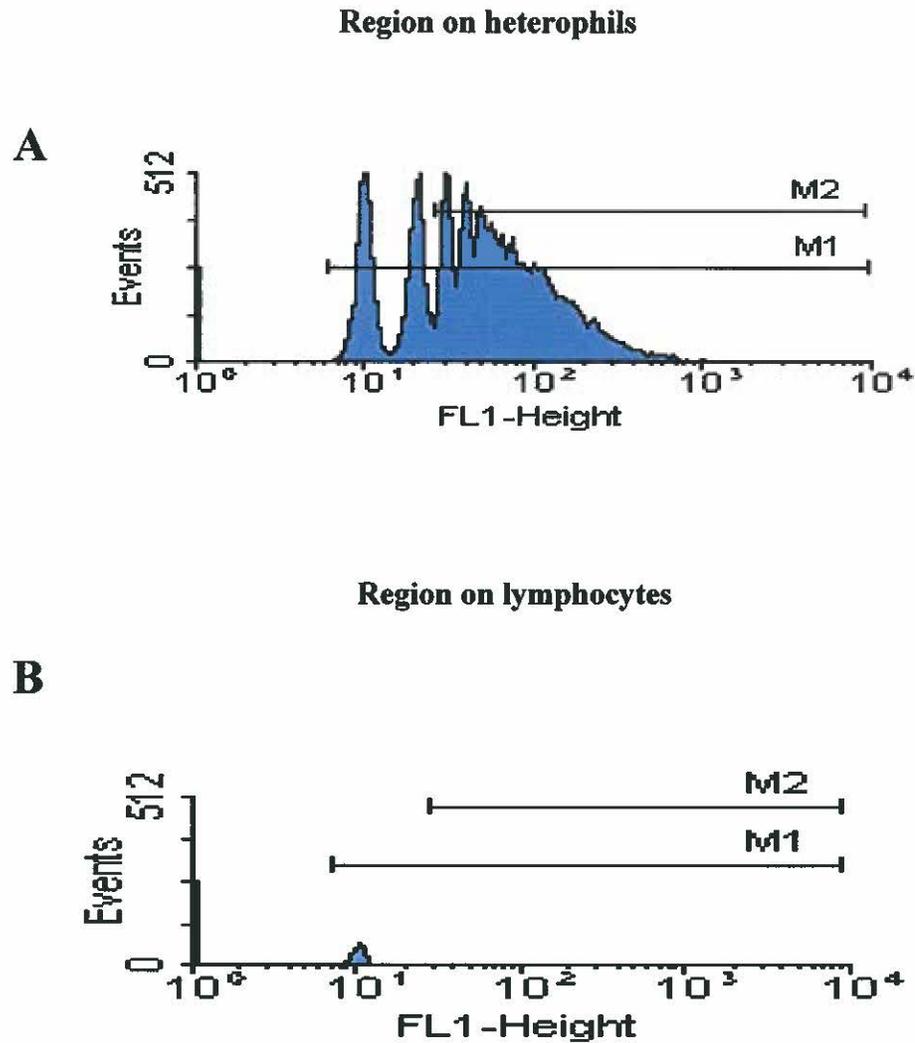


Figure 3 : Phagocytic activity of nestling bald eagle for (A) heterophils and (B) lymphocytes assessed using flow cytometry. The results are expressed as the percentage of cell that have phagocytosed three beads or more.

Events: Number of events (cells, debris) which pass in flow cytometer

FL1-Height: Fluorescence

M1: Number of cells that have engulfed one bead or more

M2: Number of cells that have engulfed three beads or more

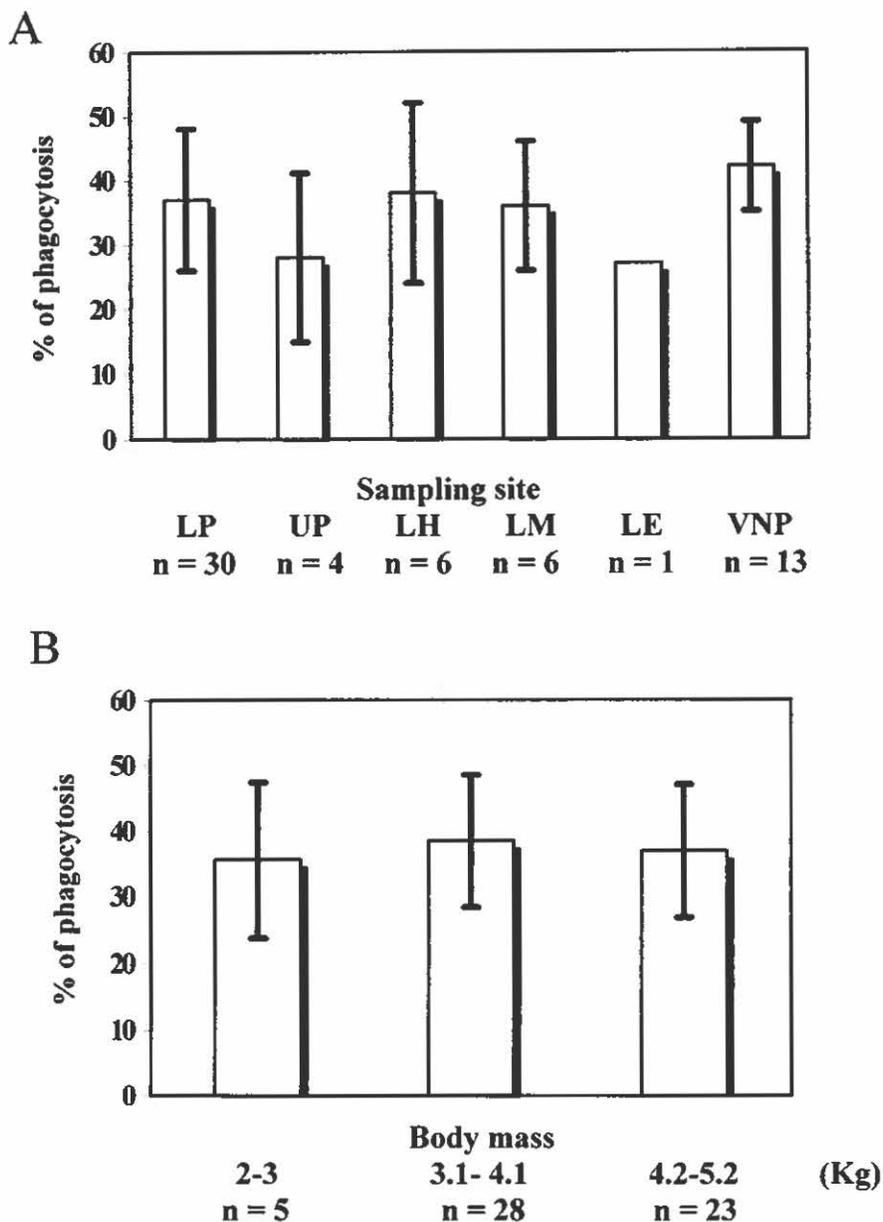


Figure 4: Phagocytic activity for heterophils of nestling bald eagle as a function of sampling site (A) and body weight (B). Percentage of phagocytosis are the mean  $\pm$  standard deviation. No statistically significant differences between the groups were observed ( $p \leq 0.05$ ).

LP: Lower peninsula; UP: Upper peninsula; LH: Lake Huron; LM: Lake Michigan; LE: Lake Erie; VNP: Voyager National Park

% of phagocytosis: Percentage of heterophil which phagocytosis three beads or more

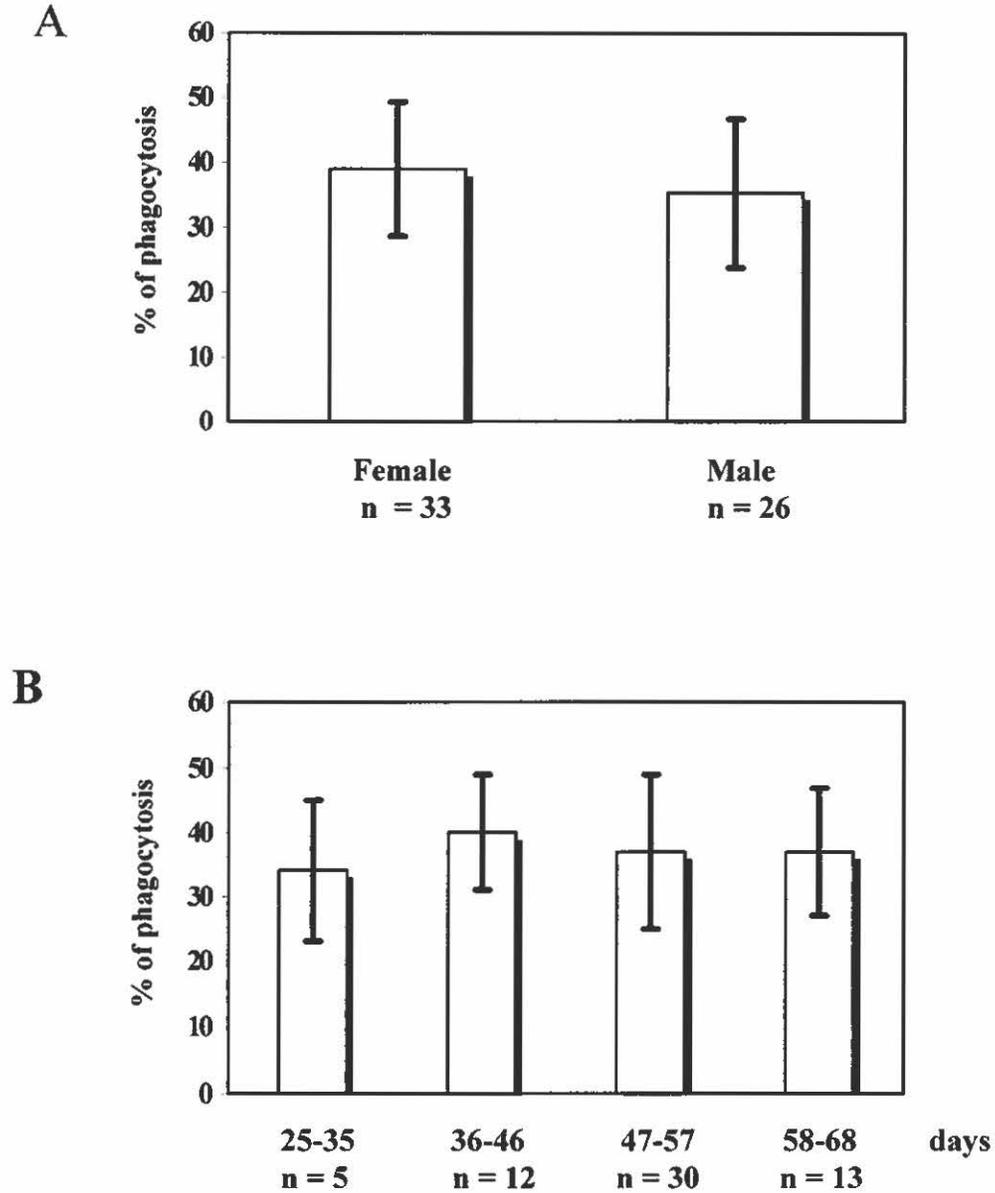


Figure 5: Phagocytic activity for heterophils of nestling bald eagle as a function of sex (A) and age (B). Data are the mean  $\pm$  standard deviation. No statistically significant differences between the groups were observed ( $p \leq 0.05$ ).

% of phagocytosis: Percentage of heterophil which phagocytosis three beads or more

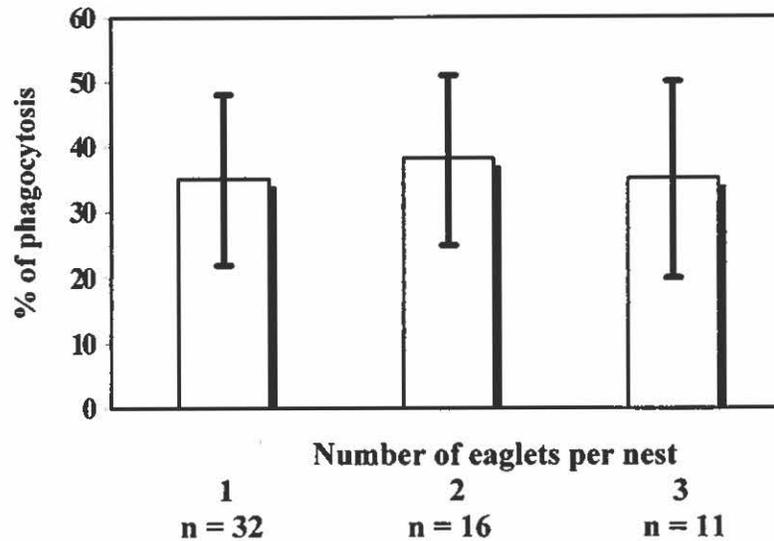


Figure 6: Phagocytic activity for heterophils that have phagocytosed at least 3 latex beads. Samples are taken from nestling bald eagles in 3 different groups. Percentage of phagocytosis is the mean  $\pm$  standard deviation. No statistically significant differences between the groups were observed ( $p \leq 0.05$ ).

## DISCUSSION

### Cytometric profile

In poultry science, it is well documented that many viruses and bacteria can produce alterations in the types of immune cells, in the relative number of immune cells and in their functions. Newcastle disease virus induced functional impairment in chicken heterophils (Lam et al., 1996), while *Salmonella enteritidis* increased the number of circulating heterophils (Kogut et al., 1995). However, very little information on the effect of environmental xenobiotics on avian leucocytes has been published.

Sturkie (1986) designed a study to assess changes in leukocyte numbers in birds in response to the release of adrenal corticoids induced by stress-related changes in the environment. In that study, it was shown that leukocytes of nestling bald

eagles contain two major cell types based on their size and complexity as characterised by flow cytometry. The major cell type is heterophils which have polymorphic nuclei, usually with two or three lobes with a diameter approximately 10-15µm (Powell and Lombardini, 1986). The second major cell is lymphocytes which have a narrow range in size and shape describe those and are generally smaller than heterophils (Sturkie, 1986). The data presented in figure 1 illustrate these two cell populations in the peripheral blood of nestling bald eagles. The population (A) which is heterogeneous in terms of complexity and which represent 66% of leucocytes are the heterophils and the second cell population (B) which is more homogeneous represents 14% of the cells populations. These cells are the lymphocytes. The relative proportions of heterophils and lymphocytes of nestling bald eagles were similar to those seen in ducks (Brousseau et al., 1999). The cytometric profile have permitted us to define with sufficient confidence the two major cell populations of the peripheral blood of bald eagle; heterophils and lymphocytes.

The results of the cytometric values for the percentage of heterophils and lymphocytes for nestling bald eagles in 6 sampling sites with different levels of contaminants are presented in Table 1. The percentages of heterophils and lymphocytes are approximately 65% and 9% respectively. No significant difference between the sites was noted in the relative proportion of both cell populations. These results indicate that the level of lymphocytes and heterophils in the peripheral blood of eaglets were not affected by the reported differences in contamination between sites (Bowerman et al., 1995).

Environmental contaminants are only one of many factors affecting Great Lakes bald eagles. The effects of diet, stress, parasite, circadian rhythm, habitat structure, human disturbance and prey abundance can change the number of bird leukocytes and exert an influence on health eagle population (Sturkie, 1986; Donaldson et al., 1999). Besch et al. (1967) have shown that physical restraint and the use of ACTH and other stressing agents produce an increase in the

relative number of heterophils in chickens. There is a prominent increase in heterophils and decrease in lymphocytes following injection of cortical hormones (Siegal and Ouellette, 1969). In studies on chickens (Rosolowska-Huszcz & al., 1991) the pineal gland appears to control, via melatonin, the daily rhythms of non-specific immunity, and total leukocyte number. With these considerations in mind, a combination of numerous factors, make difficult selecting a single end point as a marker of exposure or effect. The effects of these factors can be expressed in many ways, and their action is unlikely to target only one cell type, tissue, or organ system.

### **Phagocytosis**

Innate immunity acts as a first line of defence against infections agents, and attempts to eliminate most potential pathogens before significant infection occurs. Studies on mammals, birds and clams indicate an immunotoxic effect when animals are exposed to environmental contaminants. For example, at higher levels of exposure,  $10^{-6}$  and  $10^{-7}$  M, cadmium chloride, zinc chloride, mercuric chloride and methylmercury chloride cause a decrease in hemocyte phagocytic activity (Brousseau et al., 2000). Fournier et al. (2000) have shown that there was suppression of phagocytosis when mice are fed with highly contaminated blubber from beluga whale in the Saint-Lawrence. Knowles and Donaldson (1997) demonstrated that phagocytic potential of the macrophage was suppressed when turkey poults were fed with lead. There is ample evidence in many species, that immunosuppression occurs when animals are exposed to environmental contaminants.

For this study, phagocytosis, evaluated as the percentage of heterophils that had phagocytosed three or more beads, was not affected significantly by the sampling site, weigh, sex, age or number of eaglets per nest. Data from this study indicate a generally healthy innate immune status of eagle population of nestling bald

eagle near the Great Lakes for the successful nests (nests in which young were successfully raised).

In fact, gradual and consistent increases in the number of bald eagles breeding along the American Great Lakes and in the interior of Michigan and Minnesota have been observed between 1980 to 1994 (Bowerman et al., 1995). Overall, the number of breeding pairs in North America have increased since the ban of DDT and other organochlorine compounds in the 1970s (Bowerman et al., 1998). However, certain biases caused by our methods may have obscured some negative effects associated with contaminant exposure. Our method of using blood from nestling chicks to assess the potential effects of environmental contaminants on the phagocytosis of bald eagle is biased because only the successful nests are sampled. In a complementary study the phagocytic activity of captive American kestrels exposed to PCBs was similar to the results seen in this eagle study. Finally there are other parts of bald eagle immune system that were not examined at all.

## References

Besch EL, Smith AH, Burton RR, Sluka SJ. 1967. «Physiological limitations of animal restraint». Aerosp Med, vol. 38, no. 11, p. 1130-1134.

Bortolotti GR. 1984. «Criteria for determining age and sex of nestling bald eagles». J Field Ornithol, vol. 55, p. 450-457.

Bowerman WW, Giesy JP, Best DA et Kramer VJ. 1995. «A review of factors affecting productivity of bald eagles in the Great Lakes region : implications for recovery». Environ Health Perspect, vol.103, suppl. 4, p. 51-59.

Bowerman WW, Best DA et Grubb TG. 1998. «Trends of contaminants and effects in bald eagles of the Great Lakes basin». Environmental Monitoring Assessment, vol. 53, no. 1, p. 197-212.

Broley C. 1958. «The plight of the American bald eagle». Audubon Mag, vol. 60, no. 162, p. 163-171.

Brousseau P, Voccia I, Fournier M. 1999. Manual of immunological methods. Boca Raton : CRC Press.

Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Cyr D, Blakley B, Boermans H, Fournier M. 2000. «Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals». Toxicology, vol. 142, no. 2, p. 145-156.

Colborn T. 1991. «Epidemiology of Great Lakes bald eagles». J Toxicol Environ Health, vol. 33, no. 4, p. 395-453.

De Guise S, Bernier J, Lapierre P, Dufresne MM, Dubreuil P, Fournier M. 2000. «Immune function of bovine leukocytes after in vitro exposure to selected heavy Metals». Am J Vet Res, vol. 61, no. 3, p. 339-344.

Donaldson GM and Braune BM. 1999. «Sex-related levels of selenium, heavy metals, and organochlorine compounds in American white pelicans (*Pelecanus erythrorhynchos*)». Arch Environ Contam Toxicol, vol. 37, no. 1, p. 110-114.

Fournier M; Degas V; Colborn T; Omara FO; Denizeau F; Potworowski EF; Brousseau P. 2000. «Immunosuppression in mice fed on diets containing beluga whale blubber from the St Lawrence estuary and the Arctic populations». Toxicol Lett, vol. 112-113, p. 311-317.

Kogut MH, McGruder ED, Hargis BM, Corrier DE, DeLoach JR. 1995. «*In vivo* activation of heterophil function in chickens following injection with *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines». J Leukoc Biol, vol. 57, no. 1, p. 56-62.

Kozie K. 1986. «Breeding and feeding ecology of bald eagles in the Apostle Island National lake-shore». Mémoire de maîtrise, Madison, Université du Wisconsin.

Knowles SO and Donaldson WE. 1997. «Lead disrupts eicosanoid metabolism, macrophage function, and disease resistance in birds». Biol Trace Elem Res, vol.60, no. 1-2, p.13-26.

Lam KM, Kabbur MB et Eiserich JP. 1996. «Newcastle disease virus-induced functional impairments and biochemical changes in chicken heterophils». Vet Immunol Immunopathol, vol. 53, no. 3-4, p.313-327.

Macek KJ and Korn S. 1970. «Significance of the food chain in DDT accumulation by fish». J Fisheries Res Board Can, vol. 27, no. 8, p.1496-1498.

- Norstrom R, Hallett D and Sonstegard R. 1978. «Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and herring gulls (*Larus argentatus*) as indicators of organochlorine contamination in Lake Ontario». Fish Res Board Can, vol. 35, no. 22, p. 1401-1409.
- Powell PC and Lombardini F. 1986. «Isolation of very virulent pathotypes of Marek's disease virus from vaccinated chickens in Europe». Vet Rec, vol. 118, no. 25, p. 688-691.
- Rodriguez AB, Marchena JM, Nogales G, Duran J et Barriga C. 1999. «Correlation between the circadian rhythm of melatonin, phagocytosis, and superoxide anion levels in ring dove heterophils». J Pineal Res, vol. 26, no. 1, p. 35-42.
- Rosolowska-Huszcz D, Thaela MJ, Jagura M, Stepień D, Skwarło-Sonta K. 1991. «Pineal influence on the diurnal rhythm of nonspecific immunity indices in chickens». J Pineal Res, vol. 10, no. 4, p. 190-195.
- Siegal FP and Ouellette JJ. 1969. «Protecting pigeon-handlers». Lancet. Vol. 1, no. 7597, p. 733-734.
- Sturkie P. 1986. Avian physiology. New York: Springer-Verlag.
- Wells LL, Lowry VK, DeLoach JR et Kogut MH. 1998. «Age-dependent phagocytosis and bactericidal activities of the chicken heterophil». Dev Comp Immunol, vol. 22, no. 1, p. 103-109.
- Wiemeyer SN, Lamont TG, Bunck CM, Sindelar CR, Gramlich FJ, Fraser JD et Byrd Ma. 1984. «Organochlorine pesticide, polychlorobiphenyl, and mercury residues in bald eagle eggs –1969-1979--and their relationship to shell thinning and reproduction». Arch Environ Contam Toxicol, vol.13, no. 5, p. 529-549.

## RÉSUMÉ

Les niveaux de mercure dans l'Est de l'Amérique du Nord ont considérablement augmenté au cours des dernières années. Ce polluant environnemental affecte plusieurs espèces d'oiseaux et plus particulièrement les oiseaux de haut niveau trophique, les rapaces. Le système immunitaire d'un rapace gardé en captivité, la crécerelle d'Amérique, fut examiné *in vitro* à l'aide de la transformation lymphoblastique afin de comprendre les effets néfastes aux quels est exposé le système immunitaire de la pygargue à tête blanche. Le sang fut récolté à partir de la veine jugulaire de la crécerelle. Les lymphocytes sanguins périphériques (PBLs) ont été isolés et incubés pour une durée totale de 88 heures afin d'obtenir les concentrations optimales des mitogènes. Par la suite, les PBLs fut incubés avec du méthylmercure et du chlorure de mercure à des concentrations se retrouvant entre  $10^{-4}$  et  $10^{-9}$  M. Les résultats démontrent une réponse mitogénique optimale à des concentrations de 25 µg/ml de concanavaleine A (Con A), entre 5-25 µg/ml pour la phytohemagglutinine (PHA) et entre 5-10 µg/ml pour le pokeweed (PWM). À une dose d'exposition de  $10^{-6}$  M de chlorure de méthylmercure, nous avons observé une diminution significative de la réponse mitogénique par rapport au témoin tandis qu'une suppression significative de la lymphoprolifération est observée pour le chlorure de mercure à une dose de  $10^{-5}$  M. De plus, aux doses ( $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  M), nous observons une inhibition quasi-totale (entre 91% et 98%) de la prolifération lymphocytaire. Cette suppression peut-être attribuée à un phénomène de cytotoxicité ainsi qu'à une diminution de la viabilité cellulaire. La IC50 pour le méthylmercure est de  $3.6 \times 10^{-6}$  M et de  $8.1 \times 10^{-6}$  M pour le chlorure de mercure. Ainsi, la forme organique s'avère plus toxique que la forme inorganique pour la crécerelle d'Amérique. Les niveaux de mercure que nous observons dans les plumes des pygargues à tête blanche nichant autour des Grands Lacs étant du même ordre de grandeur que ceux démontrés ici, nous permettent de croire que des signes d'immunosuppression pourraient être présents chez ces oiseaux de proies.



## ABSTRACT

The level of mercury increases in eastern North America and affects the bird species. The immune system of adult American kestrel were examined *in vitro* with the mitogenic assay and mercury to try to understand the effect of this heavy metal on wild bald eagle population in North America. The blood was collected from the jugular vein of kestrel. Peripheral blood lymphocytes (PBLs) were isolated and incubated *in vitro* for 88 hours to find the optimum concentrations of mitogen. PBLs were also incubated *in vitro* with  $10^{-9}$  to  $10^{-4}$  M of methylmercury and mercury chloride. The results showed a greatest response with final concentrations of 25  $\mu\text{g/ml}$  of concanavalin A (Con A), between 5-25  $\mu\text{g/ml}$  of phytohemagglutinin (PHA) and between 5-10  $\mu\text{g/ml}$  of pokeweed (PWM) mitogen. At  $10^{-6}$  M of methylmercury a significant decrease in PBLs transformation lymphoblastic comparatively of the control group was observed. At  $10^{-5}$  M of mercuric chloride, we saw a significant decrease in PBLs transformation lymphoblastic comparatively of the control group. At higher dose ( $10^{-5}$  and  $10^{-4}$  M), an important suppression (between 91% and 98%) could be attributed to cytotoxicity and decreased cell viability. The IC50 for methylmercury is  $3.6 \times 10^{-6}$  M and  $8.1 \times 10^{-6}$  M for mercuric chloride. The organic form is more toxic than the inorganic form for the American kestrel. Finally, the reduced proliferation of kestrel cells exposed *in vitro* to mercury at concentration in the range of those observed in the feathers of Great Lakes bald eagle might provide a basis to support the hypothesis that contaminants induce immunosuppression in these animals.

# **Immunotoxicity of mercury on American kestrel (*Falco sparverius*) lymphocytes *in vitro***

**M. Audet<sup>1</sup>, J. Smits<sup>2</sup>, D. Bird, P. Brousseau<sup>1</sup>, and M. Fournier<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, Santé humaine, 245 Boul. Hymus, Pointe Claire, Québec, Canada

<sup>2</sup>Toxicology centre, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada

<sup>3</sup>Macdonald Raptor Research Centre, Macdonald Campus of McGill University, Ste. Anne de Bellevue, Québec

**\*: Corresponding author:**

**Michel Fournier**  
INRS-Institut Armand-Frappier  
245 Hymus Boul.  
Pointe-Claire, Québec  
Canada  
H9R 1G6  
Tel: (514)-630-8824  
Fax: (514)-630-8850  
E-mail: [Michel.fournier@inrs-iaf.quebec.ca](mailto:Michel.fournier@inrs-iaf.quebec.ca)

**Keywords:** Immunotoxicity, birds, metals

## INTRODUCTION

Mercury is an environmental contaminant which is persistent, lipophilic and bioaccumulates within food chains. Concentrations of this metal have increased in the aquatic environment throughout eastern North America primarily due to atmospheric deposition (Johnson 1987). Also, mercury is released from newly flooded areas (Carignan 1996). Some species of birds are sensitive to the adverse effects of mercury (Hg). In fact, toxic responses documented include lethality, neurotoxicity, altered nesting behaviour and reproductive failure in common loons and goshawk (Barr, 1986; Borg et al., 1970). For the immune system, both inorganic and organic mercury have been reported to suppress the immune response. Methylmercury suppressed both primary and secondary immune response in mice that have been exposed to methylmercury during embryonic development and up to 9 weeks of age (Ohi et al., 1976). Mitogen studies revealed that mercuric chloride inhibited stimulation of lymphocytes with PHA and PWM in mice (Gaworski and Sharma, 1978) and the methylmercury suppressed the lymphoproliferation of T and B cells (Omara et al., 1997). Phagocytosis studies revealed that mercuric chloride inhibited the neutrophils phagocytosis (De Guise et al., 2000). It has been well established that both organic and inorganic mercury impairs immunocompetence in mammals.

In avian immunology, the chicken (*Gallus gallus*) has been studied extensively as a model for immunotoxicity assessment (Baecher-Steppan et al., 1989; Poermadjaja and Frost, 2000). However, very little is known about the immune system of raptorial species such as the American kestrel. Kestrels have served as a model for predicting effects on eagles and other larger birds of prey, and have been found to be sensitive to several xenobiotics during their developmental stages (Hoffman et al., 1985).

Lymphoid cells from a variety of species can be stimulated *in vitro* to synthesise DNA and undergo blastogenic transformation upon exposure to a number of non-specific mitogens and specific antigens. These assays are applicable as biomarkers of exposure to a wide variety of toxicants (Snyder and Valle, 1991). Suppression of lymphocyte

proliferation by xenobiotics is believed to be predictive of impairment of host immunocompetence, and represents an immunotoxic effect from contaminant exposure (Luebke et al., 1997).

The present study reports the optimum conditions for lymphocyte transformation in American kestrels and examines possible *in vitro* immunotoxic effects of methylmercuric chloride ( $\text{CH}_3\text{HgCl}$ ) and mercury chloride ( $\text{HgCl}_2$ ) on mitogen stimulated lymphocyte proliferation.

## MATERIALS AND METHODOLOGY

### Blood collection

Birds used in this study were from a captive breeding colony of American kestrels, at the Avian Science Conservation Centre, McGill University. Sterile technique was used to collect blood (1 ml) from the jugular vein with heparinized glass syringes. The male and female kestrels were 2 to 6 years old ( $n = 17$ ).

### Preparation of peripheral blood lymphocytes

Blood was diluted 1:1 with sterile RPMI-1640 and layered over Ficoll paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) gradient and centrifuged at  $200 \times g$  at room temperature for 20 minutes. The peripheral blood lymphocytes (PBLs) layer was collected and the recovered cells were washed in RPMI-1640 and recovered by centrifugation at  $250 \times g$  for 10 minutes at room temperature. The cell pellet was recovered and then resuspended in supplemented RPMI-1640 (10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin) (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). The viability of peripheral blood lymphocytes were evaluated by the trypan blue exclusion test.

### **Preparation of mercury**

The xenobiotics used were mercuric chloride ( $\text{HgCl}_2$ ) and methylmercury chloride (MeHg). The mercuric chloride was prepared as a 0.1 M solution in distilled water and the methylmercury chloride was diluted in RPMI 1640 at 0.01 M for the stock solution. Six final concentrations ranged from  $10^{-9}$  to  $10^{-4}$  M.

### **Mitogenic assay**

#### **Optimum conditions**

Concanavalin A (Con A), phytohemagglutinin (PHA) and pokeweed (PWM) (Sigma, St-Louis, MO) were used to stimulate peripheral blood lymphocytes of American kestrels. Following concentrations were used to find the optimum concentrations (better stimulation index; SI) for the mitogenic assay:

Con A	1, 2, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$
PHA	2, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$
PWM	1, 2, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$

The mitogens were diluted in RPMI-1640 media (1mg/ml). The RPMI 1640 was supplemented with 10% fetal calf serum, 1% penstrep (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), 2.4g/L HEPES and 0.00002% of mercaptoethanol. The cells were cultured in triplicate for each concentration of mitogen in 96-well flat bottom Falcon polystyrene plates (Becton Dickinson). The proliferative response was expressed as the stimulation index (SI), which is the disintegration per minute (dpm) in mitogen-stimulated lymphocyte cultures divided by the mean dpm in unstimulated lymphocyte control cultures.

### **Lymphocyte proliferation with mercury**

Briefly, a concentration of  $2.5 \times 10^5$  cells per well were cultured in a sterile environment for 88 hours at  $41^\circ\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$  and pulsed for the last 16 hours with 0.5  $\mu\text{Ci}$  of [ $^3\text{H}$ ] thymidine (6.7 Ci/mmol; ICN, Mississauga, ON) in each well. The cells were harvested

with a Titertec cell harvester and the radioactivity was measured with a Beckman liquid scintillation counter (model LS1801). Results of mitogenic assay were expressed as the percentage of normal response for the proliferative lymphocyte response, which are the mean disintegrations per minutes (DPM) in mercury-stimulated lymphocyte cultures divided by the mean dpm in mitogen-stimulated lymphocyte cultures without mercuric mixtures and multiplied by 100.

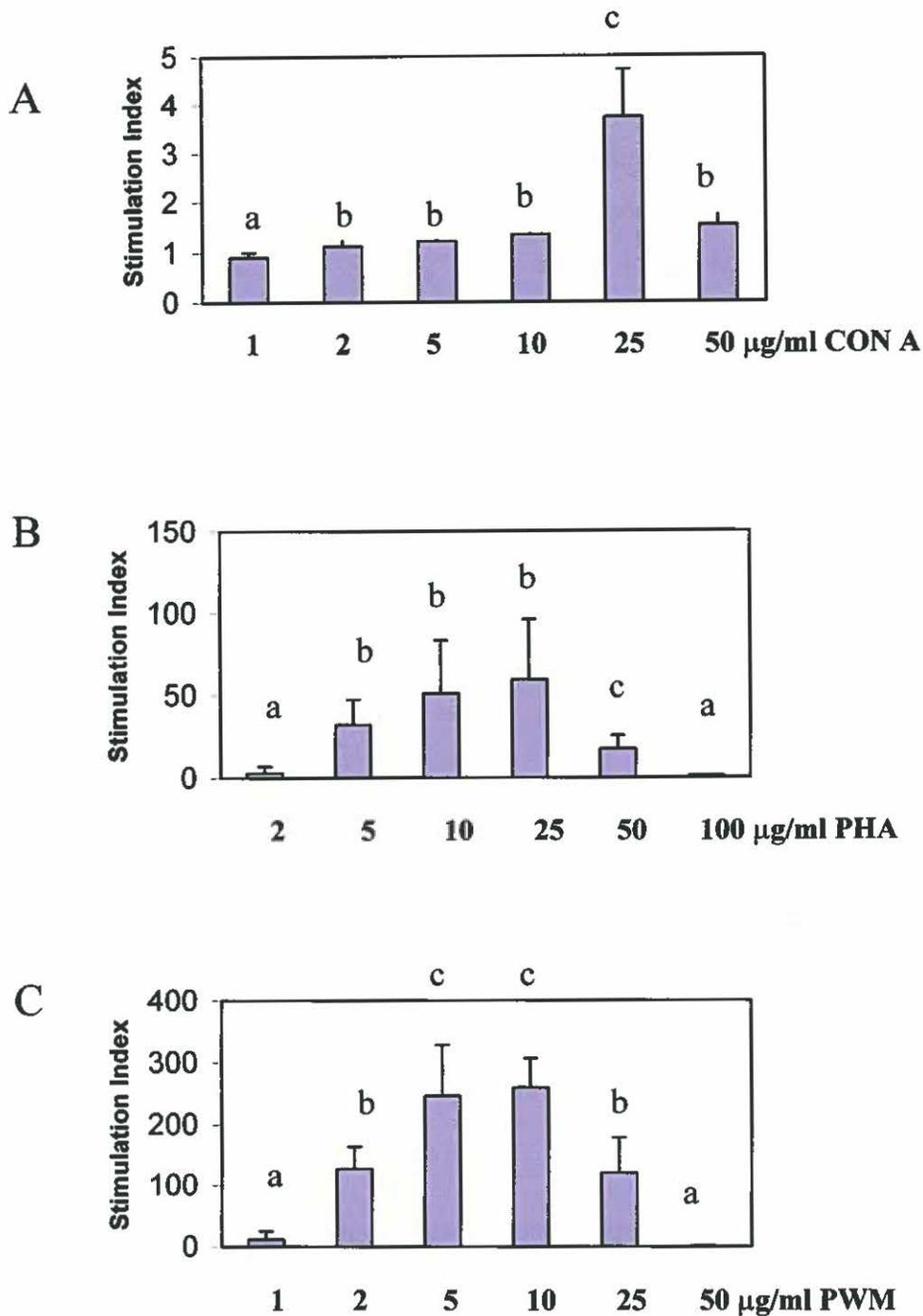
### **Statistical analysis**

All data for these studies were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. To determine the optimum mitogen dose, the stimulate index was analysed using one way ANOVA with Tukey test for PWM and a Kruskal-Wallis one way analysis of variance on ranks with Student-Newman-Keuls Method were used for PHA and Con A. The results for the lymphocyte mercury exposition were analysed using Kruskal-Wallis ANOVA on ranks with Dunn's Method. The statistical package SigmaStat (Jandel, Scientific Software, San Rafael, CA) was used for all the analyses. Significance was tested at  $p \leq 0.05$  for the Tukey test and Student-Newman-Keuls Method, and at  $p \leq 0.001$  for Dunn's method.

## **RESULTS**

### **Effect of mitogen doses**

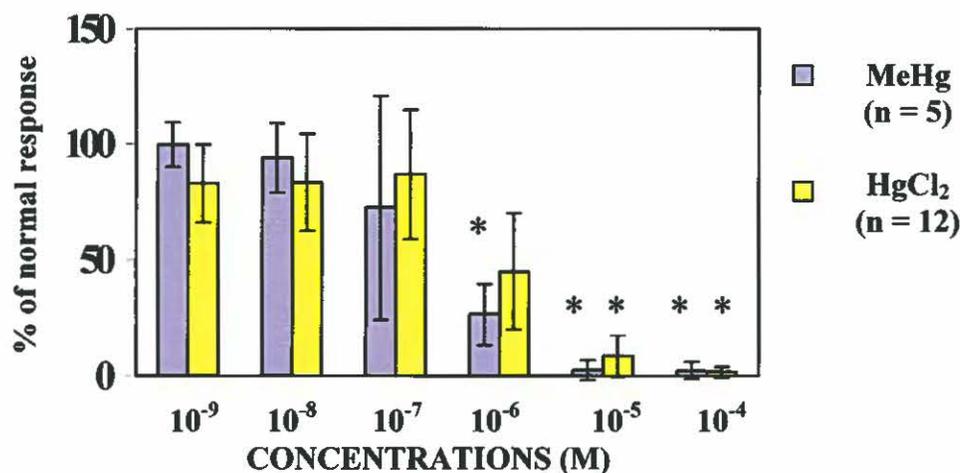
The effect of mitogen concentration response curves of ConA, PHA and PWM are presented in Figure 1. The optimum concentration of Con A producing maximum SI was at 25  $\mu\text{g/ml}$  but the SI values were relatively low. The optimum concentration of PHA was between 5 and 25  $\mu\text{g/ml}$ , and the SI values were higher than the SI values with Con A. The optimum concentration of PWM was between 5 and 10  $\mu\text{g/ml}$  and the SI values were higher than either Con A or PHA.



**Figure 1:** Effect of different concentrations of T cell mitogens, Con A (A) and PHA (B) and T and B cell mitogen, PWM (C), on peripheral blood lymphocytes response for American kestrels. Cell concentrations were  $2 \times 10^5$  per well, stimulation time was 88 hours with a final incubation of 16 hours with [ $^3\text{H}$ ] thymidine ( $n = 5$ ). Values with no common letters are significantly different ( $P \leq 0.05$ )

### Lymphocyte mitogenic responses

In order to evaluate the effects of heavy metals on cell proliferation, mitogen-induced DNA synthesis was evaluated in PBLs from American kestrels after exposure of 88 hours with different concentrations of methylmercury chloride (MeHg) and mercuric chloride ( $\text{HgCl}_2$ ). These results were expressed in % of normal response. As shown in Figure 2, the curves for MeHg and  $\text{HgCl}_2$  look similar. At  $10^{-6}$  M of  $\text{HgCl}_2$  and MeHg, the mitogenic responses were suppressed with by 55% and 74%, respectively when compare to normal response. Methylmercury significantly suppressed mitogenic assay at  $10^{-6}$  M, and while mercuric chloride caused suppression at  $10^{-5}$  M. At  $10^{-5}$  M and  $10^{-4}$  M of MeHg and  $\text{HgCl}_2$ , lymphoproliferation was inhibited, between 91% and 98% for mercuric compounds.



**Figure 2:** Mitogenic responses to pokeweed (PWM) in peripheral blood lymphocytes of American kestrels exposed *in vitro* with methylmercuric chloride and mercuric chloride for. Values are the means  $\pm$  standard deviation from two experiments run in triplicate. (\* significantly difference from control:  $P \leq 0.001$ )

The sensitivity of mitogenic stimulation to both forms of mercury was determined by the graphical representation of the concentration for each form of mercury which induced 50% suppression of the proliferative response (IC50). These results are presented in Table 1. Methylmercury induced 50% suppression at a lower concentration than did mercuric chloride (factor: 2.25).

**Table 1:** Concentration for two mercuric compounds which inhibits 50% of lymphoblastic transformation activity (IC50) of PBLs from kestrels following 88 h exposure in vitro<sup>a</sup>

Metals	IC50
MeHg	$3.6 \times 10^{-6}$ M
HgCl <sub>2</sub>	$8.1 \times 10^{-6}$ M
<b>Factor : 2.25</b>	

<sup>a</sup> The IC50 was determined by plotting the percentage of normal response for the lymphoblastic transformation, against the concentrations of MeHg or HgCl<sub>2</sub>.

## DISCUSSION

### Effect of mitogen doses

The optimum concentrations for the three mitogens that were used to stimulate proliferation of kestrel lymphocytes were different from those found in previous studies using avian lymphocytes. The optimum concentrations under these conditions were Con A 25 µg/ml, PHA between 5 to 25 µg/ml and PWM between 5 to 10 µg/ml. Others researchers found the optimum concentrations of ConA and PHA to be between 30-50 µg/ml, with 1 to 40 µg/ml proving optimal for PWM using chicken (*Galus galus*) lymphocytes (Barta, Barta and Pierson, 1992). Lee in 1974 found the optimum concentration of PHA to be 20 µg/ml for the chicken. For raptorial species, one study reported optimal mitogen concentrations for lymphocytes from bald eagles, red-tailed hawks, and great horned owls to be 25 µg, 10 µg, and 10 µg of PHA/well, respectively, and 2.5 µg, 10 µg and 10 µg of Con A/well (Redig et al., 1984). Previously, in this

laboratory optimum concentrations of mitogens were different for chickens and kestrels. All of these findings suggest substantial differences among avian species, and also between birds of the same species. However, the immune system of American kestrels could be different from chickens because kestrels are representatives of falconidae which are believed to have evolved at a different time than Galliformes in evolutionary terms.

### **Lymphocyte mitogenic responses**

It is well documented that mercury can bioaccumulate in the food chain and alter several aspects of immune function for human, mammalian, fish and bird species (Shenker & al., 1993; Ilback, 1991; Voccia & al., 1994; Gaworski and Sharma, 1978). However, nothing is known with regards to the effect of mercury on the immune system of raptor such as American kestrels.

The results in Figure 2 show that  $\text{HgCl}_2$  and MeHg suppress lymphocytes proliferation by 55% and 74%, respectively, compared to the normal response, suggesting different immunomodulatory effects of MeHg and  $\text{HgCl}_2$  on mature peripheral T and B cells in the American kestrel. Significant suppression of mitogenic proliferation occurred at concentration of  $10^{-6}$  and at  $10^{-5}$  M for methylmercury and mercuric chloride, respectively. This is likely due to the fact that inorganic mercury is considerably less toxic than the organic form. Also, at concentrations of  $10^{-5}$  and  $10^{-4}$  M, immunosuppression is likely attributable to direct cytotoxicity and decreased cell viability due to mercury toxicity. The concentration of mercuric compounds that induce 50% suppression (IC 50) of the lymphoblastic transformation is  $8.1 \times 10^{-6}$  M for  $\text{HgCl}_2$  and  $3.6 \times 10^{-6}$  M for MeHg. The methylmercuric chloride suppressed mitogenic activity 2.25 times more than mercuric chloride. Brousseau et al., (2000) observed the same pattern for phagocytosis in other species in this laboratory. It is important to note that the concentrations of mercury that caused decreased proliferation of kestrel lymphocytes *in vitro*, are in the range of those observed in the feathers of bald eagles in the Great Lakes. This observation provides a basis to support the hypothesis that contaminants may induce immunosuppression in these animals.

Acknowledgments. The authors wish to thank Ian Richie for doing managing, handling, and sampling the kestrels at the ASC.

## References

Baecher-Steppan L, Nakaue HS, Matsumoto M, Gainer JH and Kerkvliet NI. 1989. «The broiler chicken as a model for immunotoxicity assessment. 1. Standardization of in vitro immunological assays». Fundam Appl Toxicol, vol. 12, no. 4, p. 773-786.

Barr JF. 1986. «Population dynamics of the common loon (*Gavia immer*) associated with mercury-contaminated waters in northwestern Ontario». Occasional Paper, no. 56, Can Wildl Serv, Canada: Ottawa.

Barta O, Barta V and Pierson FW. 1992. «Optimum conditions for the chicken lymphocyte transformation test». Avian Dis, vol. 36, no. 4, p. 945-55.

Borg K, Erne K, Hanko E and Wanntrop H. 1970. «Experimental secondary methyl mercury poisoning in the goshawk (*Accipiter gentilis*)». Environ Pollut, vol. 1, p. 91-104.

Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Cyr D, Blakley B, Boermans H and Fournier M. 2000. «Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals». Toxicology, vol. 142, no. 2, p. 145-156.

Carignan, R. 1996. Introduction à l'écotoxicologie. Québec: Presses de l'Université de Montréal.

De Guise S, Bernier J, Lapierre P, Dufresne MM, Dubreuil P and Fournier M. 2000. «Immune function of bovine leukocytes after in vitro exposure to selected heavy Metals». Am J Vet Res, vol. 61, no. 3, p. 339-344.

Gaworski CL and Sharma RP. 1978. «The effects of heavy metals on [3H]thymidine uptake in lymphocytes». Toxicol Appl Pharmacol, vol. 46, no. 2, p. 305-313.

Hoffman DJ, Franson JC, Pattee OH, Bunck CM and Murray HC. 1985. «Biochemical and hematological effects of lead ingestion in nestling American kestrels (*Falco sparverius*)». Comp Biochem Physiol C, vol. 80, no. 2, p. 431-439.

Ilbek NG. 1991. «Effects of methyl mercury exposure on spleen and blood natural killer (NK) cell activity in the mouse». Toxicology, vol. 67, no. 1, p. 117-124.

Johnson MG. 1987. «Trace element loadings to sediments of fourteen Ontario Canada lakes and correlations with concentrations in fish». Can J Fish Aquat Sci, vol. 44, no. 1, p. 3-13.

Lee LF. 1974. «In vitro assay of mitogen stimulation of avian peripheral lymphocytes». Avian Dis, vol. 18, no. 4, p. 602-609.

Luebke RW, Hodson PV, Faisal M, Ross PS, Grasman KA and Zelikoff J. 1997. «Aquatic pollution-induced immunotoxicity in wildlife species». Fundam Appl Toxicol, vol. 37, no. 1, p. 1-15.

Ohi G, Fukuda M, Seto H and Yagyu H. 1976. «Effect of methylmercury on humoral immune responses in mice under conditions simulated to practical situations». Bull Environ Contam Toxicol, vol. 15, no. 3, p. 175-180.

Omara FO, Brochu C, Flipo D, Denizeau F and Fournier M. 1997. «Immunotoxicity of environmentally relevant mixtures of polychlorinated aromatic hydrocarbons with methylmercury on rat lymphocytes in vitro». Env Toxic Chem, vol. 13, no. 3, p. 576-581.

Poermadjaja B and Frost A. 2000. «Phagocytic uptake and killing of virulent and avirulent strains of *Pasteurella multocida* of capsular serotype A by chicken macrophages». Vet Microbiol, vol. 72, no. 1-2, p. 163-171.

Redig PT, Dunnette JL and Sivanandan V. 1984. «Use of whole blood lymphocyte stimulation test for immunocompetency studies in bald eagles, red-tailed hawks, and great horned owls». Am J Vet Res, vol. 45, no. 11, p. 2342-2346.

Shenker BJ, Mayro JS, Rooney C, Vitale L and Shapiro IM. 1993. «Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. IV. Alterations in cellular glutathione content». Immunopharmacol Immunotoxicol, vol. 15, no. 2-3, p. 273-290.

Snyder CA and Valle CD. 1991. «Lymphocyte proliferation assays as potential biomarkers for toxicant exposures». J Toxicol Environ Health, vol. 34, no. 1, p.127-139.

Voccia I, Krzystyniak K, Dunier M, Flipo D and Fournier M. 1994. «*In vitro* mercury-related cytotoxicity and functional impairment of the immune cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)». Aquat Toxicol, vol. 29, p. 27-48.

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Avec le développement de la chimie et la commercialisation de plusieurs produits synthétiques, l'apparition des contaminants environnementaux dans l'ensemble de nos écosystèmes est devenue une problématique inhérente. Nombreux xénobiotiques sont par le fait même hydrophobes, lipophiles, rémanents, volatils et bioaccumables. Ces caractéristiques leurs confèrent une toxicité accrue pour plusieurs organismes vivants. Plus particulièrement, ces contaminants peuvent provoquer des effets immunotoxiques sur un organe spécifique, un type cellulaire précis ou bien une fonction immunitaire autant chez les invertébrés que chez les vertébrés. À plus petite échelle, le rat et la souris sont des espèces qui sont couramment utilisées en laboratoire dans la compréhension de ces phénomènes chez les mammifères. Toutefois, chez les espèces aviaires c'est plutôt le poulet qui représente la classe des *Aves*. Ainsi, très peu d'informations sont retrouvées dans la littérature chez d'autres espèces d'oiseaux et notamment chez les rapaces.

Tout d'abord, notre objectif premier était l'adaptation et la validation de nos méthodologies chez une espèce aviaire (appendice A). Le poulet domestique fut utilisé pour l'adaptation tandis que la crécerelle d'Amérique fut choisie pour vérifier la validité des paramètres pour une espèce de rapace. Nos résultats suggèrent les conditions optimales suivantes pour la lymphoprolifération chez la crécerelle : incubation de 88 heures et concentration de 25  $\mu\text{g/ml}$  de Con A, entre 5 et 25  $\mu\text{g/ml}$  pour la PHA et entre 5 et 10  $\mu\text{g/ml}$  pour le PWM. Pour la phagocytose une incubation de 60 minutes avec les billes de latex s'avérait la condition optimale au sein de notre laboratoire. Toutefois, ces résultats diffèrent de la littérature lorsque nous les comparons à ceux retrouvés chez le poulet domestique. Nous pouvons expliquer ces différences par le fait que les conditions de laboratoire n'étaient pas identiques et que ce sont deux espèces d'oiseaux relativement éloignées en terme d'évolution. Pour cette raison, il était primordial d'établir les conditions optimales des paramètres immunologiques au sein de

notre laboratoire et plus particulièrement dans des conditions de terrain pour la phagocytose.

Au cours des années 1960, nous avons aperçu un déclin important des populations Nord Américaines de pygargue à tête blanche. Cependant, aujourd'hui il nous est possible d'observer un rétablissement de ces oiseaux sur de nombreuses aires de nidifications. En effet, nous avons remarqué que plusieurs populations ont augmenté leur effectif notamment dans la région près des Grands Lacs depuis les années 1980. Tout récemment, les recherches du Dr Bowerman ont permis d'obtenir des niveaux de contaminations dans le plasma d'aiglons à tête blanche nichant près des Grands Lacs. Suite à ces recherches, il devenait intéressant d'étudier ces populations d'aiglons en examinant leur compétence immunitaire. Étant un paramètre immunologique représenté dans la quasi-totalité du règne animal et agissant comme première ligne de défense, la phagocytose fut choisie pour l'étude de cette espèce. Nos résultats indiquent que l'activité phagocytaire n'est pas influencée par le site de nidification, le sexe, l'âge, le poids et la grosseur de la portée. Toutefois, les résultats d'un dosage sanguin des contaminants environnementaux pour chaque aiglon échantillonné l'été dernier devraient être disponible cet automne. Ainsi, il sera intéressant d'étudier l'activité phagocytaire en corrélation avec les niveaux de xénobiotiques dans le plasma des aiglons pour l'été 1999 (données à venir). Pour le moment, nous pouvons croire que les populations de pygargue à tête blanche nichant près des Grands Lacs possèdent un état de santé généralement bon. En effet, deux arguments peuvent appuyer cette hypothèse

1. leur première ligne de défense du système immunitaire n'est pas altérée
2. l'observation d'une augmentation de leur effectif autour des Grands Lacs

Cependant, il est important de mentionner que seulement les nids reproductifs furent échantillonnés. De ce fait, il est possible d'observer un biais dans notre méthodologie car aucun adulte n'a été échantillonné à cause de l'impossibilité de capture. Par contre, vu l'impossibilité d'attraper des aigles en vol, il serait intéressant pour des recherches futures d'obtenir un groupe témoin afin de comparer l'activité phagocytaire d'aiglons naturellement exposés aux contaminants environnementaux versus des pygargues non contaminés. Malgré la complexité de la problématique lorsque nos recherches s'effectuent dans des conditions de milieux naturels, il nous a été possible d'observer une efficacité phagocytaire similaire entre les différents groupes d'aiglons et semblable aux crécerelles d'Amérique gardées en captivité. Tout nous porte à croire que les populations d'aigle à tête blanche autour des Grands Lacs reprennent leur symbole de puissance et de liberté.

En deuxième lieu, nous avons utilisé la crécerelle d'Amérique afin d'étudier la compétence immunitaire (transformation lymphoblastique) d'un oiseau de proie pouvant être utilisé comme modèle pour la pygargue à tête blanche. Vu l'impossibilité d'effectuer la transformation lymphoblastique chez l'aigle à tête blanche, des expositions *in vitro* au chlorure de mercure et au méthylmercure furent effectuées chez la crécerelle gardée en captivité. Les résultats démontrent une suppression significative de la réponse mitogénique par rapport au témoin à des concentrations de  $10^{-6}$  et  $10^{-5}$  M selon le mercure utilisé. Ainsi, les résultats suggèrent un effet immunomodulateur différent pour le méthylmercure et pour le chlorure de mercure sur les lymphocytes périphériques matures T et B de la crécerelle d'Amérique. Également, l'absence de prolifération lymphocytaire à des concentrations de  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  M pourrait être attribuée à de la cytotoxicité et à une diminution de la viabilité cellulaire. En effet, ce phénomène fut observé chez de nombreuses espèces au sein de notre laboratoire. Nous avons également remarqué que la concentration de méthylmercure qui cause une suppression de 50% de la transformation lymphoblastique s'avère 2.25 fois plus faible que la concentration pour le chlorure de mercure ( $3.6 \times 10^{-6}$  M versus  $8.1 \times 10^{-6}$  M). La

forme organique semble donc plus toxique que la forme inorganique chez la crécerelle d'Amérique. Ce résultat fut observé plusieurs fois dans notre laboratoire. Par contre, selon la littérature la forme organique serait généralement 10 fois plus toxique que la forme inorganique. De ce fait, nous pouvons penser que la crécerelle d'Amérique est un oiseau assez résistant au mercure. D'autres recherches ont démontré que cet oiseau était moins vulnérable aux effets des BPC comparativement à la caille japonaise et au canard. Finalement, la réduction de la prolifération lymphocytaire chez des lymphocytes sanguins de crécerelle exposés *in vitro* à des concentrations de mercure que nous observons dans les plumes des pygargues à tête blanche nichant autour des Grands Lacs nous permet de croire que les contaminants environnementaux peuvent induire de l'immunosuppression chez ces oiseaux de proies.

En troisième lieu, 4 paires de crécerelles d'Amérique furent exposées, via la nourriture, à un mélange d'aroclor (1248:1254:1260) (appendice B). Ces oiseaux furent suivis pour trois générations. Les crécerelles ont été sacrifiées à l'hiver 2000 et la phagocytose ainsi que la transformation lymphoblastique ont été effectuées. Tout d'abord, le taux d'éclosion étant normal ceci nous permet de démontrer que le comportement nuptial de ces oiseaux n'est pas altéré. Pour les paramètres immunologiques, le regroupement des sexes ne permet pas d'observer une différence significative entre les 3 générations pour la phagocytose et la transformation lymphoblastique. Une étude récente a permis d'établir que le temps demi-vie des BPCs chez la crécerelle était entre 9 et 411 jours (Drouillard et al., 2000). Ainsi, nous pensons que les BPCs peuvent affecter la réponse immunitaire mais que cette modification peut être réversible lorsque l'exposition à ces xénobiotiques s'est effectuée depuis une longue période de temps et seulement chez la première génération. Il est difficile de tirer des conclusions pour la différence significative observée entre les mâles de la deuxième génération et les femelles de la première génération pour la phagocytose car l'effectif des femelles de la première génération (n = 3) s'avère très bas. On peut par contre penser que les femelles seraient moins résistantes à une exposition aux

BPCs. En effet, le système immunitaire peut répondre différemment selon le sexe de l'animal chez de nombreuses espèces. Nous avons également remarqué une différence pour les mâles des trois générations stimulés avec le PHA versus les femelles de la deuxième génération stimulée avec du PWM. Indépendamment de la variable génération, nous savons que le PHA stimule la prolifération des cellules T tandis que le PWM stimule la prolifération des cellules T et B. Ainsi, il n'est pas étonnant que nous observions une différence entre ces groupes.

En conclusion, cette étude nous a permis pour la première fois d'observer la compétence immunitaire d'un oiseau de proie qui s'avérait très difficile d'accès d'autant plus qu'il se retrouvait dans son milieu naturel. Malgré la complexité de la problématique, notre laboratoire a démontré que la pygargue à tête blanche nichant près des Grands Lacs possède un état de santé généralement bon. De plus, des études *in vitro* nous ont démontré que la crécerelle était un oiseaux assez résistant au mercure. Cependant, afin d'établir avec certitude que les niveaux des contaminants environnementaux retrouvés dans le milieu naturel n'affectent pas le système immunitaire de la pygargue à tête blanche une multitude d'études devraient être effectuées en prenant en considération de nombreux facteurs pouvant modifier la réponse immunitaire. Notre étude n'était que la pointe d'un gigantesque iceberg.

Pour ce qui est de la contribution réelle, l'article «Assessment of phagocytic competence of heterophils from Bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) nestling in Great Lakes Basin» fut écrit en collaboration avec Madame Marlène Fortier, le Dr Bill Bowerman et le Dr Michel Fournier. Le montage expérimental, l'échantillonnage des aiglons, la phagocytose sur le terrain, l'analyse des données en cytométrie de flux, les statistiques, l'interprétation des données ainsi que l'écriture de l'article ont été réalisés par le premier auteur tandis que l'acquisition de la phagocytose en cytométrie de flux fut effectuée par Madame Marlène Fortier. Pour sa part, le Dr Bill Bowerman m'a permis de me greffer à son équipe de terrain (escaladeurs, pilote d'avion, biologistes...) et de participer à

l'échantillonnage des aiglons. Finalement, mon directeur de maîtrise, le Dr Michel Fournier, a contribué à l'élaboration du projet de recherche, au soutien financier ainsi qu'à l'apport de judicieux conseils.

L'article «Immunotoxicity of mercury on American kestrel (*Falco sparverius*) lymphocytes *in vitro*» fut écrit en collaboration avec le Dr Judit Smits, Monsieur David Bird et le Dr Michel Fournier. La mise aux points de la méthodologie fut effectuée par le premier auteur. Le montage expérimental fut réalisé par le premier auteur et le Dr Michel Fournier. L'échantillonnage des crécerelles d'Amérique, la lymphoprolifération en présence de mercure, l'analyse des données, les statistiques, l'interprétation des données ainsi que l'écriture de l'article ont été accomplis par le premier auteur. Monsieur David Bird a quant à lui fourni les oiseaux ainsi que les installations pour les prises de sang. Le Dr Judit Smits et le Dr Michel Fournier m'ont apporté de précieux conseils. Finalement, le Dr Michel Fournier a vu au support financier de l'expérience.

Les populations de pygargue à tête blanche autour des Grands lacs sont suivies depuis un peu plus d'une dizaine d'années (identification des oiseaux, emplacement des nids, proies). Toutefois, le dénombrement ainsi que le taux de productivité sur l'ensemble des populations Nord Américaine sont des données couramment répertoriées dans la littérature depuis les années 1960. Par contre, ce n'est que tout récemment avec les études du Dr Bill Bowerman que le dosage de certains contaminants environnementaux dans le sang et dans les plumes des aiglons nichant près des Grands Lacs fut établi. Suite aux études du Dr Bowerman, il devient donc intéressant d'étudier le potentiel immunotoxique de ces xénobiotiques sur la pygargue à tête blanche afin d'observer un état de santé générale de ces oiseaux de proie.

Chez les espèces aviaires, le système immunitaire le plus souvent étudié est sans contredit le poulet. Ainsi, la plupart des recherches rapportent des modifications de l'efficacité du système immunitaire suite à une infection aux bactéries et aux

virus (*Salmonella*, virus de la maladie de la bourse, virus de Newcastle). Ce phénomène s'explique entre autres par le fait que certaines infections sont transmissibles à l'humain et qu'une infection peut augmenter la mortalité de ces animaux et par le fait même diminuer la productivité des poulaillers. Toutefois, pour les rapaces, un seul article sur l'étude du système immunitaire rapporte entre autres les conditions optimales de la transformation lymphoblastique pour la pygargue à tête blanche, la buse à queue rousse et le grand duc d'Amérique. Cependant, il est possible d'observer quelques articles sur l'étude du système immunitaire en présence de contaminants *in vitro* ou *in vivo* chez le canard colvert, le goéland argenté, la sterne capsienne et la tourterelle rieuse. Par contre, aucun article n'est répertorié dans la littérature sur l'étude du système immunitaire des pygargues à tête blanche exposées naturellement ou *in vitro* aux contaminants environnementaux.

Pour toutes ces raisons, mon projet de maîtrise permet :

- I. d'établir les conditions optimales pour la phagocytose et la transformation lymphoblastique chez le poulet et la crécerelle d'Amérique au sein de notre laboratoire
- II. l'élaboration d'un paramètre immunologique pour la pygargue à tête blanche, la phagocytose, dans des conditions de terrain
- III. d'obtenir un état de santé générale de la population d'aiglons à tête blanche nichant autour des Grands Lacs et naturellement exposée aux contaminants environnementaux
- IV. d'observer l'effet *in vitro* du méthylmercure et du chlorure de mercure sur la crécerelle d'Amérique
- V. d'observer l'effet *in vivo* des BPC pendant trois générations de crécerelles



## BIBLIOGRAPHIE

Anthony RG, Garrett MG et Schuler CA. 1993. «Environmental contaminants in bald eagles in the Columbia River estuary». J Wildl Manage, vol. 57, no. 1, p.10-19.

Banerjee BL, Ramachandran M et Hussain QZ. 1986. «Subchronic effect of DDT on humoral immune responses in mice». Bull Environ Contam Toxicol, vol. 37, no. 3, p. 433-440.

Best DA, Bowerman WW, Kubiak TJ, Winterstein SR, Postupalsky S et Shieldcastle M. 1994. Compte-rendu de «Reproductive impairment of bald eagles along the Great Lakes shorelines of Michigan and Ohio». In 4<sup>e</sup> world conference on birds of preys and owls, Allemagne: Berlin.

Bevan MJ et Cohn M. 1975. «Cytotoxic effects of antigen- and mitogen-induced T cells on various targets». J. Immunol., vol. 114, no. 1-2, p. 559-565.

Bird DM, Weil PG et Lague PC. 1980. «Photoperiodic induction of multiple breeding seasons in captive American Kestrel». J Can Zool, vol. 58, no. 6, p. 1022-1026.

Bird DM. 1982. «The American kestrel as a laboratory research animal». Nature, vol. 299, no. 5881, p. 300-301.

Bishop CA, Boermans HJ, Ng P, Campbell GD et Struger J. 1998. «Health of tree swallows (*Tachycineta bicolor*) nesting in pesticide-sprayed apple orchards in Ontario, Canada. I. Immunological parameters». J Toxicol Environ Health, vol. 55, no. 8, p.533-559.

Boroskova Z, Soltys J et Benkova M. 1995. «Effect of mercury on the immune response and mean intensity of *Ascaris suum* infection in guinea pigs». J Helminthol. Vol. 69, no. 3, p. 187-194.

Bowerman, W.W. 1993. «Regulation of bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) productivity in the Great Lakes basin: an ecological and toxicological approach». Thèse de doctorat, Michigan, Université du Michigan, 291p.

Bowerman WW, Evans ED, Giesy JP et Postupalsky. 1994a. «Using feathers to assess risk of mercury and selenium to bald eagle reproduction in the Great Lakes region ». Arch Enviro Contam Toxicol, vol. 27, no. 3, p.294-298.

Bowerman WW, Kubiak TJ, Holt JBJ, Evans DL, Eckstein RG, Sindelar CR, Best DA et Kozié KD. 1994b. «Observed abnormalities in mandibles of nestling bald eagles *Haliaeetus leucocephalus*». Bull Environ Contam Toxicol, vol. 53, no. 3, p. 450-457.

Braune, BM et Gaskin DE. 1987. «Mercury levels in Bonaparte's Gulls (*Larus philadelphia*) during autumn molt in the Quoddy Region, New Brunswick, Canada». Arch Environ Contam Toxicol, vol.16, no. 5, p. 539-550.

Brousseau P, Dunier M, Deschaux P, De Guise S, Krzystyniak K et Fournier M. 1997. «Marqueurs immunologiques». Chap. In Biomarqueurs en écotoxicologie aspects fondamentaux, p. 287-314. Ville: Press

Brown C, King DJ et Seal B. 1999. «Detection of a macrophage-specific antigen and the production of interferon gamma in chickens infected with Newcastle disease virus». Avian Dis, vol. 43, no. 4, p. 696-703.

Brunstrom B et Andersson L. 1988. «Toxicity and 7-ethoxyresorufin O-deethylase-inducing potency of coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs) in chick embryos». Arch Toxicol, vol. 62, no. 4, p. 263-266.

Burton RR, Harrison JS. 1969. «The relative differential leucocyte count of the newly hatched chick». Poult Sci, vol. 48, no. 2, p.451-3.

Cassarett LJ et Doull J. 1996. «Cassarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons». Klaassen CD, 5<sup>e</sup> édition, New york: McGraw-Hill.

Contrino J, Marucha P, Ribaldo R, Ference R, Bigazzi PE et Kreutzer DL. 1988. «Effects of mercury on human polymorphonuclear leukocyte function *in vitro*». Am J Pathol, vol. 132, no.1, p. 110-118.

Dean JH et Thurmond LM. 1987. «Immunotoxicology: an overview». Toxicol Pathol, vol. 15, no. 3, p. 265-271.

De Guise S, Martineau D, Béland P et Fournier M. 1998. «Effects of *in vitro* exposure of beluga whale leukocytes to selected organochlorines». J Toxicol Environ Health, vol. 55, no. 7, p. 479-493.

Drouillard KG, Fernie K, Smits JE, Bortolotti GR, Bird DM et Norstrom RJ. Compte-rendu de «Bioaccumulation and toxicokinetics of PCBs in American Kestrels (*Falco sparverius*). Empirical models for estimation of elimination rates

of persistent and readily metabolized congeners». Dans Program and abstracts: 43<sup>e</sup> conférence de la recherche sur les Grands Lacs et le fleuve St. Laurent (Cornwall 22-26 mai 2000), p. 38. Cornwall: Ontario

Dzus EH et Gerrard JM. 1993. «Factors influencing bald eagle densities in northcentral Saskatchewan». J Wildl Manage, vol. 57, no. 1, p. 771-778.

Eisenreich SJ, Looney BB et Thornton JD. 1981. «Airborne organic contaminants in the Great Lakes ecosystem». Envir Sci Technol, vol.15, p.30-38.

Elliott JE, Kennedy SW et Lorenzen A. 1997. «Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls to japanese quail (*Coturnix c.japonica*) and American kestrels (*Falco sparverius*)». J Toxicol Environ Health, vol. 51, no. 1, p. 57-75.

Evans E, Wilson M et Creal W. 1991. «Assessment of mercury contamination in selected Michigan Lakes, 1987-90: Historical trends, environmental correlates, and potential sources». Michigan Dept Nat Resour Staff Rep Surface Water Qual Div, Michigan: Lansing.

Exon JH, Kerkvliet NI et Talcott PA. 1987. «Immunotoxicity of carcinogenic pesticides and related chemicals». J Environ Sci Health, vol. 5, p. 73-120.

Fahey KJ et York JJ. 1987. «Cytotoxic activity of avian lymphoid cells». Chap. In Avian Immunology: Basis and Practice, eds.1. p.179-193. Boca Raton: CRC Press Inc.

Fairbrother A, Fix M, O'Hara T et Ribic CA. 1994. «Impairment of growth and immune function of avocet chicks from sites with elevated selenium, arsenic and boron». J Wildl dis, vol. 30, no. 2, p. 222-233.

Fernie KJ, Bortolotti GR, Smits JE, Wilson J, Drouillard KG and Bird DM. «Changes in egg composition of American kestrels exposed to dietary polychlorinated biphenyls». J Toxicol Environ Health, vol. 60, Part A, p. 291-303.

Fimreite N et Karstad L. 1971. «Effects of dietary methylmercury on red-tailed hawks». J Wildl Manage, vol. 35, p. 293-300.

Fowles JR, Fairbrother A, Trust KA et Kerkvliet NI. 1997. «Effects of aroclor 1254 on the thyroid gland, immune function, and hepatic cytochrome P450 activity in mallards». Environ Res, vol. 75, no. 2, p. 119-129.

Frazer JA. 1973. «Ultrastructure of the chick thymus». Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., vol. 136, p. 191.

Friend M et Trainer DO. 1970. «Polychlorinated biphenyl: interaction with duck hepatitis virus». Sciences, vol. 170, no. 964, p. 1314-6.

Gablirks J, Askari EM et Yolen N. 1973. «DDT and immunological responses: I. Serum antibodies and anaphylactic shock in guinea pigs». Arch Environ Health, vol. 26, no. 6, p. 305-308.

Garcelon DK et Thomas NJ. 1997. «DDE poisoning in an adult bald eagle». J Wildl dis. vol. 33, no. 2, p. 299-303.

Gerrard, JM et Bortolotti GR. 1988. The bald eagle, haunts and habits of a wilderness monarch. Saskatoon: Western Prairies Books.

Giesy JP, Ludwig JP et Tillitt DE. 1994a. «Embryo lethality and deformities in colonial, fish eating waterbirds of the Great Lakes region: Assigning causality». Environ Sci Technol, vol. 28, p. 128A-135A.

Giesy JP, Ludwig JP et Tillitt DE. 1994b. «Dioxins, dibenzofurans, PCBs and similar chlorinated diaromatic hydrocarbons in and their effects on birds: wildlife biomonitoring for hazards of complex environmental mixtures in the Laurentian Great Lakes». Dans Dioxins and Health, p. 254-307. New York: Plenum Press.

Grasman KA, Fox GA, Scanlon PF et Ludwig JP. 1996. «Organochlorine-associated immunosuppression in prefledging Caspian terns and herring gulls from the Great Lakes: an ecopidemiological study». Environ Health Perspect, vol. 104, suppl. 4, p. 829-842.

Grasman KA, Scanlon PF et Fox GA. 1998. «Reproductive and physiological effects of environmental contaminants in fish-eating birds of the Great Lakes: A review of historical trends». Environ Monit Assessment J, vol. 53, p. 117-145.

Grier JW. 1982. «Ban of DDT and subsequent recovery of reproduction in bald eagles». Sciences, vol. 218, no. 4578, p.1232-1235.

Gross WB et Siegel HS. 1983. «Evaluation of the heterophil lymphocyte ratio as a measure of stress in chicken». Avian Dis, vol. 27, no. 4, p. 972-979.

Harmon BG. 1998. «Avian heterophils in inflammation and disease resistance». Poult Sci, vol. 77, no. 7, p. 972-977.

Hoffman DJ, Melancon MJ, Eisemann JD et Klein PN. 1995. «Comparative toxicity of planar PCB congeners by egg injections». Soc Environ Toxicol. Chem, [Résumé]

Hoffman DJ, Melancon MJ, Klein PN, Rice CP, Eisemann JD, Hines, RK, Spann JW et Pendleton GW. 1996. «Developmental toxicity of PCB 126 (3,3',4,4',5-pentaclorobiphenyl) in nestling American kestrels (*Falco sparverius*)». Fundam Appl Toxicol, vol. 34, no. 2, p. 188-200.

Kaliser LA. 1968. «An in vitro and in vivo study of the effect of DDT on the phagocytic activity of rat white blood cells». Toxicol Appl Pharmacol, vol. 13, no. 3, p. 353-357.

Kaminski NE, Wells DS, Dauterman WC, Robert JF et Guthrie FE. 1986. «Macrophage uptake of a lipoprotein-sequestered toxicant: a potential route of immunotoxicity». Toxicol Appl Pharmacol, vol. 82, no. 3, p. 474-480.

Kerkvliet NI. 1984. «Halogenated aromatic hydrocarbons (HAH) as immunotoxicants». Prog Clin Biol Res, vol. 161, p. 369-387.

Kogut MH, Lowry VK, Moyes RB, Bowden LL, Bowden R, Genovese K et Deloach JR. 1998. «Lymphokine-augmented activation of avian heterophils». Poultry Sci, vol. 77, no. 7, p. 964-971.

Koller LD. 1975. «Methylmercury:effect on ontogenic and nonontogenic viruses in mice». Am J Vet Research, vol. 36, no. 10, p. 1501-1554.

Koller LD, Exon JH et Brauner JA. 1977. «Methylmercury decreased antibody formation in mice». Pr Soc Exp Bio Med, vol. 155, no. 4, p. 602-604.

Kublak TJ et Best DA. 1993. Wildlife risks associated with passage of contaminated, anadromous fish at Federal Energy Regulatory. Michigan: Fish and Wildlife Service.

Lahvis GP, Wells RS, Kuehl DW, Stewart HL, Rhinehart HL et Via CS. 1995. «Decreases lymphocyte responses in free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) are associated with increased concentrations of PCBs and DDT in peripheral blood». Environ.Health Perspect, Vol.103, suppl.4, p. 62-72.

Lam KM. 1998. «Alteration of chicken heterophil and macrophage functions by the infectious bursal disease virus». Microb Pathog, vol. 25, no. 3, p.147-55.

Lee FC. 1977. «Chicken lymphocyte stimulation by mitogens: a microassay with whole-blood cultures». Avian Dis, vol. 22, no. 2, p. 296-307.

Lucier GW, Thompson CL. 1987. «Issues in biochemical applications to risk assessment: when can lymphocytes be used as surrogate markers?». Environ Health Perspect, vol. 76, p. 187-191.

Ludwig JP, Kurita-Mastuba H, Auman HJ, Ludwig ME, Summer CL, Giesy JP, Tillitt DE et Jones PD. 1996. «Deformities, PCBs, and TCDD-equivalents in double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*) and Caspian terns (*Hydroprogne caspia*) of the Upper Great Lakes 1986-1991: Testing a cause-effect hypothesis». J Great Lakes Res, vol. 22, no. 2, p. 172-197.

Luster MI, Blank JA et Dean JH. 1987. «Molecular and cellular basis of chemically induced immunotoxicity». Annu Rev Pharmacol Toxicol, vol. 27, p. 23-49.

McKnight AJ, Zimmer GJ, Fogelman I, Wolf SF et Abbas AK. 1994. «Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses in vivo». J Immunol, vol. 152, no. 5, p. 2172-2179.

Montali RJ, 1988. «Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals)». J Comp Pathol, vol. 99, no. 1, p. 1-26.

Nathanson RM. 1982. «Transformation of chicken lymphocytes stimulated by concanavalin A: response parameters». Can J Comp Med, vol. 46, no. 1, p 57-59.

Nichols J, Bradbury S et Swartout J. 1999. «Derivation of wildlife values for mercury». J Toxicol Environ Health, vol.2, no. 4, p.325-355.

Nirmalan G et Robinson GA. 1971. «Haematology of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)». Br Poult Sci, vol. 12, no. 4, p. 475-481.

Omara FO, Flipo D, Brochu C, Denizeau F, Brousseau P, Potworowski EF et Fournier M. 1998. «Lack of suppressive effects of mixtures containing low levels of methylmercury (MeHg), polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDS), polychlorinated dibenzofurans (PCDFS), and arochlor biphenyls (PCBS) on mixed lymphocyte reaction, phagocytic, and natural killer cell activities of rat leukocytes in vitro». J Toxicol Environ Health, vol. 54, no.7, p. 561-577.

Peakall DB et Fox GA. 1987. «Toxicological investigations of pollutant-related effects in Great Lakes gulls». Environ Health Perspect, vol. 71, p. 187-193.

Penniall R et Spritznagel JK. 1975. «Chicken neutrophils: oxidative metabolism in phagocytic cells devoid of myeloperoxidase». Proc Natl Acad Sci, vol. 72, no. 12, p. 5012-5015.

Platonow NS et Reinhart BS. 1973. «The effects of polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) on chicken eggs production, fertility and hatchability». Can J Comp Med, vol. 37, no.4, p. 341-346.

Powell PC. 1987a. «Immune mechanisms in infections of poultry». Vet Immunol Immunopathol, vol. 15, no. 1-2, p. 87-113.

Powell PC. 1987b. «Macrophages and other nonlymphoid cells contributing to immunity». Chap. In Avian Immunology: Basis and Practice, eds.1 p. 195-212. Boca Raton: CRC Press Inc.

Revillard JP. 1994. «Immunotoxicité des xénobiotiques». Chap. In Immunologie, p. 289-296. Bruxelles: De Boeck-Wesmael.

Roitt I, Brostoff J et Male D. 1997. «Immunologie». De Boeck & Larcier, 4<sup>e</sup> édition, France: Paris.

Rustam H, Von Burg R, Amin-Zaki L et El Hassani S. 1974. «Evidence for a neuromuscular disorder in methylmercury poisoning». Arch Environ Health, vol. 30, no. 4, p. 190-195

Sanpera C, Morera M, Ruiz Xet Jover L. 2000. «Variability of mercury and selenium levels in clutches of Audouin's gulls (*Larus audouinii*) breeding at the Chafarinas Islands, Southwest Mediterranean». Arch Environ Contam Toxicol, vol. 39, no. 1, p. 119-123

Sepulveda MS, Williams GE Jr, Frederick PC et Spalding MG. 1999. «Effets of mercury on health and first-year survival of free-ranging egrets (*Ardea albus*) from southern Florida». Arch Environ Contam Toxicol, vol. 37, no. 3, p. 369-376.

Sharma RP et Gehring PJ. 1979. «Immunologic effects of vinyl chloride in mice». Ann N Y Acad Sci, vol. 31, no. 320, p. 551-563

Shou L, Schwartz SA et Good RA. 1976. «Suppressor cell activity after concanavalin A treatment of lymphocytes from normal donors.». J. Exp. Med., vol. 143, no. 5, p.1100-1110.

Skaare JU, Bernhoff A, Derocher A, Gabrielsen GW, Goksoyr A, Henriksen E, Larsen HJ, Lie E et Wiig O. 2000. «Organochlorines in top predators at Svalbart occurrence, levels and effects». Toxicol Lett, vol. 112-113, p. 103-109.

Skrief DP. 1999. «Group keeps eye on eagles». The daily journal, vol. 88, no. 255, p.1. Minnesota.

Slauson DO et Cooper BJ. 1990. «A textbook of comparative general pathology». Chap. In Mechanisms of disease, p.198-200. Baltimore: JW Pine, Jr. Williams et Wilkins.

Smith DW. 1995. «Are PCBs in the Great Lakes approaching a "New Equilibrium" ? ». Environ Sci Technol, vol. 29, no. 1, p.42-46.

Smits J and Bortolotti GR. «Antibody mediated immunotoxicity in American kestrel (*Falco sparverius*) exposed to polychlorinated biphenyls». J Toxicol Environ Health, article soumit

Stabler JG, McCormick TW, Powell KC et Kogut MH. 1994. «Avian heterophils and monocytes: phagocytic and bactericidal activities against *Salmonella enteritidis*.» Vet Microbiol, vol. 38, no. 4, p. 293-305.

Stuht JN, Bowerman WW et Best DA. 1999. «Leucocytozoonosis in nestling bald eagles in Michigan and Minnesota». J Wildl Dis, vol. 35, no. 3, p. 608-612.

Subba Rao DS et Glick B. 1977. «Pesticide effects on the immune response and metabolic activity of chicken lymphocytes». Proc Soc Exp Biol Med, vol. 154, no. 1, p. 27-29.

Tizard I. 1992. Veterinary immunology, an introduction. Philadelphie: WB Saunders Co.

Thaxton P et Parkhurst CR. 1973. «Toxicity of mercury to young chickens. 3. Changes in immunological responsiveness». Poultry Sci, vol. 52, no. 2, p. 761-764.

Thaxton P, Young PS, Cogburn LA et Parkhurst CR. 1974. «Hematology of mercury toxicity in young chicken». Bull Environ Contam Toxicol, vol. 12, no.1, p.46-52.

Thomas PT et Faith RI. 1985. «Immunotoxicology and immunopharmacology». Chap. In Adult and perinatal immunotoxicity induced by halogenated aromatic hydrocarbons, p. 305-313. New York: Raven Press.

Toivanen A et Toivanen P. 1987. Avian Immunology: Basis and Practice. Boca Raton: CRC Press Inc.

Trust KA, Fowles JR, Hooper MJ et Fairbrother A. 1994. «Cyclophosphamide effects on immune function of European starlings». J Wildl Dis, vol. 30, no. 3, p. 328-334.

Tryphonas H, Luster MI, White KL Jr, Naylor PH, Erdos MR, Burlison GR, Germolec D, Hodgen M, Hayward S et Arnold DL. 1991. «Effects of PCB (Aroclor 1254) on non-specific immune parameters in rhesus (*Macaca mulatta*) monkeys». Int J Immunopharmacol, vol. 13, no. 6, p. 639-48.

Voccia I, Blakley B, Brousseau P et Fournier M. 1999. «Immunotoxicity of pesticides: a review». Toxicol Ind Health, vol. 15, no. 1-2, p. 119-132.

Vos J, Van Loveren H, Wester P et Vethaak D. 1989. «Toxic effects of environmental chemicals on the immune system». Trends Pharmacol Sci, vol. 10, no. 7, p. 289-292.

Westermarck T, Odsjo T et Johnels A. 1975. «Mercury content of bird feathers before and after Swedish ban on alkyl mercury in agriculture». Ambio, vol.4, no.2, p. 87-92.

Wiemeyer SN et Porter RD. 1970. «DDE thins eggshells of captive American kestrels». Nature, vol.227, no. 259, p.73-738.

Wiltrout RW, Ercegovitch CD et Ceglowski WS. 1978. «Humoral immunity in mice following oral administration of selected pesticides». Bull Environ Contam Toxicol, vol. 20, no. 3, p. 423-431.

Wood R et Linna TJ. 1965. «The transport of cells from the bursa of Fabricus to the spleen and the thymus». Acta Pathol Microbiol Scand., vol. 64, p. 470.

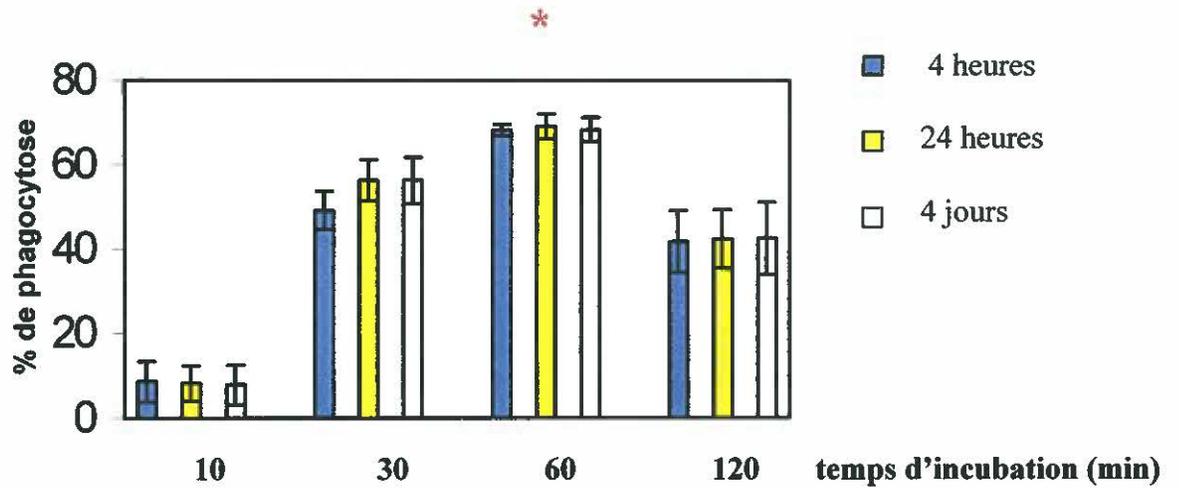


## APPENDICE A

### ADAPTATION ET VALIDATION DES MÉTHODES

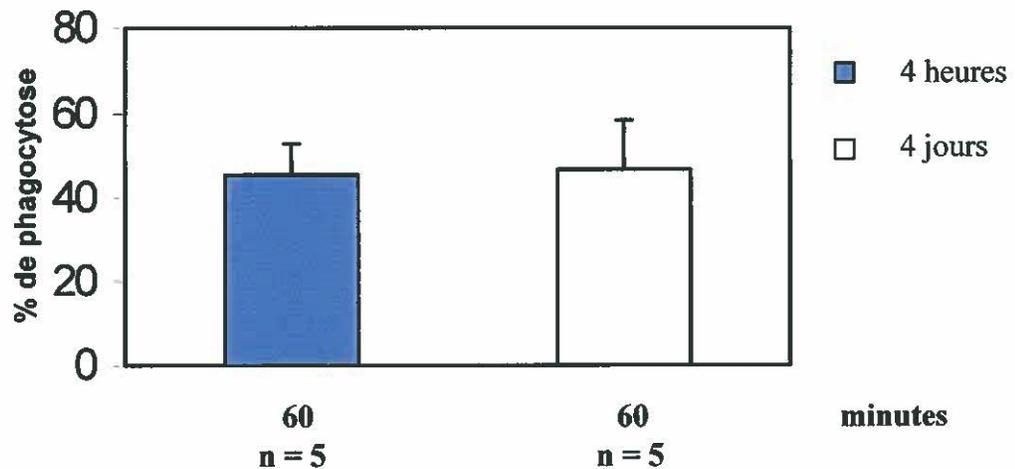
#### 1.1 ADAPTATION DE LA PHAGOCYTOSE CHEZ LE POULET ET VALIDATION CHEZ LA CRÉCERELLE D'AMÉRIQUE

La deuxième partie de notre étude fut d'adapter la phagocytose chez une espèce aviaire, le poulet, et de valider cette technique chez la crécerelle d'Amérique. Un total de 4 temps d'incubations avec l'antigène, 10, 30, 60 et 120 minutes, a été choisi en vue d'obtenir une réponse phagocytaire maximale en présence de billes de latex<sup>2</sup>. Selon nos résultats présentés à la figure 2, le pourcentage de phagocytose maximal est obtenu lorsque les hétérophiles sanguins sont incubés pour une durée de 60 minutes avec les billes de latex. De plus, nous remarquons que la fixation cellulaire (0.5% de formaldéhyde) ne modifie pas la réponse phagocytaire pour une durée de 4 jours (Fig. 2 et 3) chez le poulet et la crécerelle. Finalement, la figure 4 nous permet de noter une différence significative entre la réponse phagocytaire des crécerelles et celle du poulet suite à un test de t pairé ( $p \leq 0.05$ ).

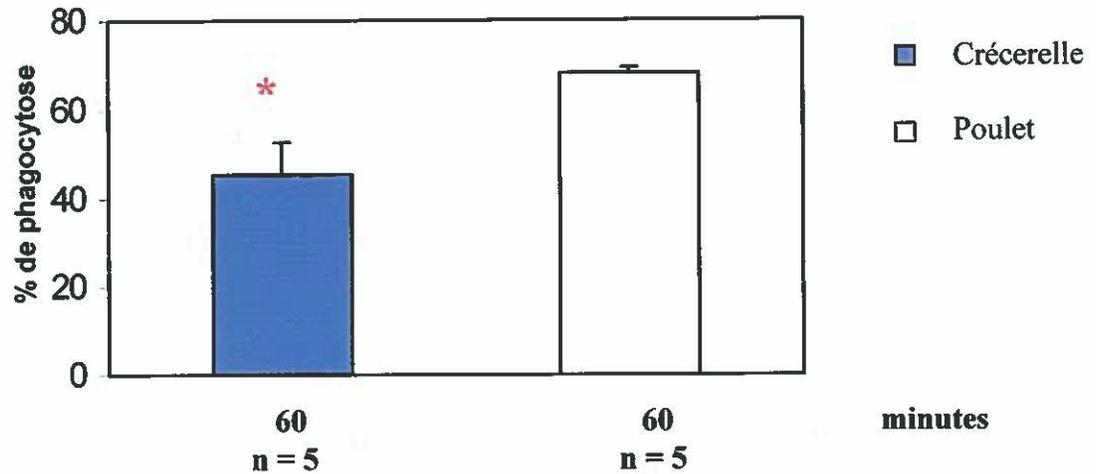


**Figure 1 :** Activité phagocytaire (3 billes et plus) chez des hétérophiles de poulet en fonction du temps d'incubation avec l'antigène. Analyse en cytométrie de flux suite à différentes périodes de fixation cellulaire

<sup>2</sup>pour la méthodologie se rapporter à l'article sur la pygargue à tête blanche



**Figure 2 :** Activité phagocytaire (3 billes et plus) chez des hétérophiles de crécerelle. Analyse en cytométrie de flux suite à différentes périodes de fixation cellulaire.



**Figure 3 :** Activité phagocytaire (3 billes et plus) chez des hétérophiles de crécerelle et de poulet. Différence significative test de t pairé,  $p \leq 0.05$ .

### DISCUSSION

Selon plusieurs études antérieures effectuées chez le poulet sur l'activité phagocytaire suite à une infection à la *Salmonella* (Wells et al., 1998), au virus de la maladie de la bourse (IBDV) (Lam, 1998) ainsi qu'au virus de la maladie de Newcastle (Lam, Kabbur et Eiserich, 1996), la réponse phagocytaire s'avérait maximale suite à une exposition de 30 minutes en présence de l'agent pathogène. Il est également observé qu'une incubation prolongée engendre une immunosuppression de la phagocytose. Ceci nous démontre que l'activité phagocytaire est un processus de défense qui s'établit rapidement chez l'oiseau. Ainsi, selon nos résultats, un temps incubation relativement court est également nécessaire, 60 minutes, afin d'obtenir une réponse maximale suite à une exposition à un antigène (billes de latex). De plus, selon la figure 4, nous remarquons une différence significative entre le pourcentage de phagocytose pour le poulet comparativement à la crécerelle (test de t pairé ;  $p \leq 0.05$ ). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le poulet est un oiseau qui fait partie des

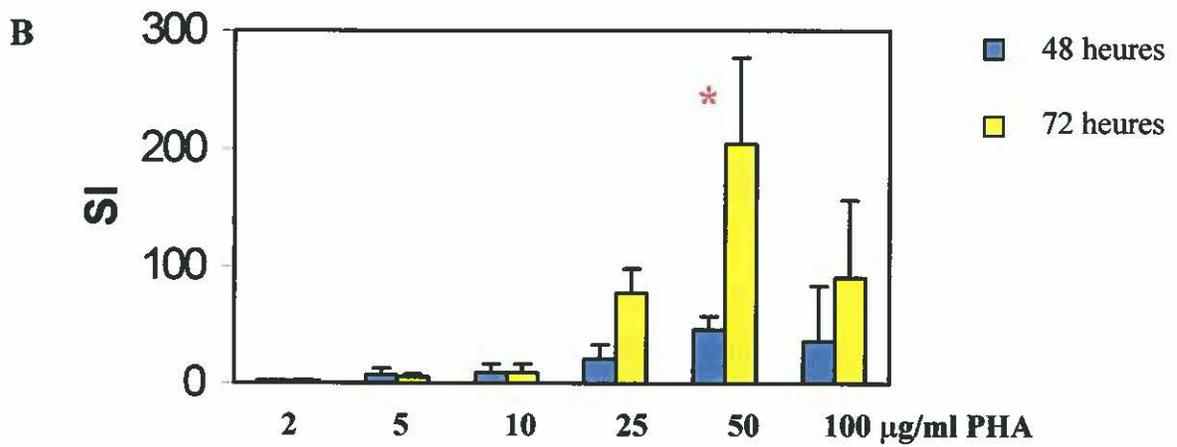
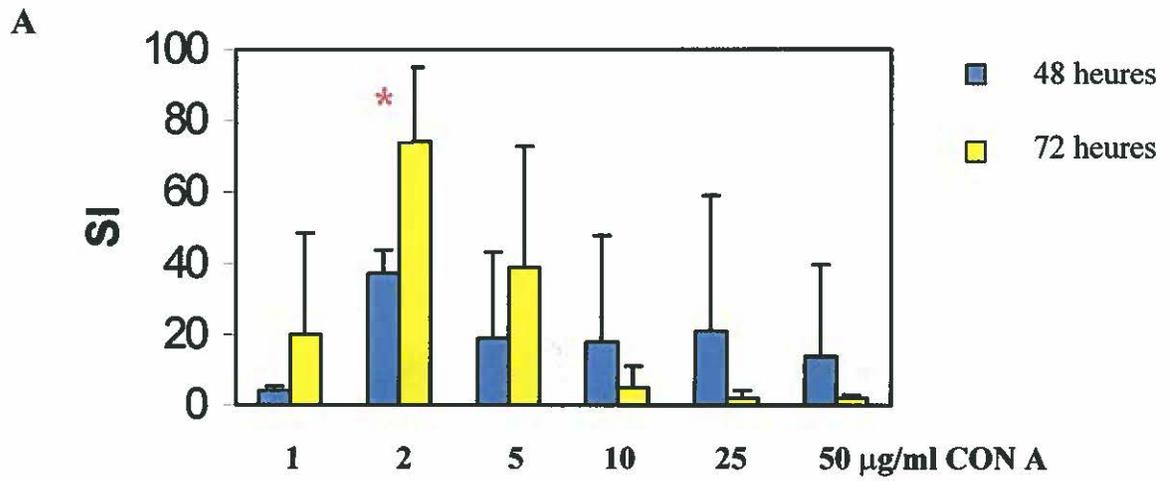
Galliformes tandis que la crécerelle est un falconidae. Ainsi, en terme d'évolution, des différences qu'en au système immunitaire de ces oiseaux pourrait être observées.

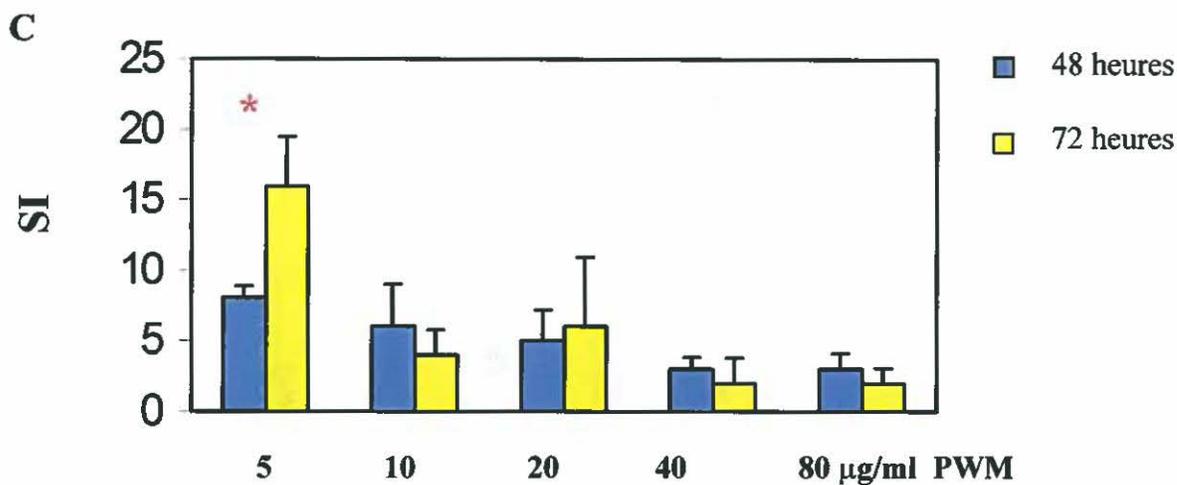
Finalement, selon les figures 2 et 3, nous notons que la réponse phagocytaire est similaire lorsque l'analyse en cytométrie de flux est effectuée après 4 heures ou 4 jours chez le poulet et la crécerelle suite à la fixation cellulaire. Ainsi, lors de l'envoi de nos échantillons sanguins de pygargue à tête blanche à Montréal, nous pouvons confirmer que le temps d'envoi n'influence pas la réponse immunologique.

## 1.2 ADAPTATION DE LA TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE CHEZ LE POULET

La première étape de l'étude a été d'adapter la transformation lymphoblastique chez une espèce aviaire au sein de notre laboratoire. Le poulet, étant une espèce couramment utilisée en immunotoxicologie aviaire, fut choisi afin de mettre au point cette méthode. Ainsi, des courbes doses réponses ont été obtenues en présence de trois mitogènes ; la Concanavaleine A (Con A : 1, 2, 5, 10, 25 et 50  $\mu\text{g/ml}$ ), la phytohemagglutinine (PHA : 2, 5, 10, 25, 50 et 100  $\mu\text{g/ml}$ ) et le pokeweed (PWM : 5, 10, 20, 40 et 80  $\mu\text{g/ml}$ )<sup>1</sup>. La variable temps d'incubation a été également étudiée en incubant les cellules pour une durée de 48 ou 72 heures avant l'incorporer de la radioactivité. Ainsi, la figure 1A nous démontre un index de stimulation maximal lorsque les cellules sont exposées à 2  $\mu\text{g/ml}$  de Con A pour une durée de 72 heures. La figure 1B nous démontre une stimulation maximale des PBLs lorsque ces cellules sont exposées à une concentration de 50  $\mu\text{g/ml}$  pour une durée de 72 heures. Nous notons que la valeur de l'index de stimulation est plus élevée lorsque les cellules sont exposées au mitogène PHA comparativement aux valeurs obtenues lorsque le mitogène utilisé est la Con A ou le PWM. Finalement, nous obtenons un index de stimulation maximal lorsque les lymphocytes sont exposés à 5  $\mu\text{g/ml}$  de PWM pour une durée de 72 h dans la figure 1C.

<sup>1</sup>pour la méthodologie se rapporter à l'article sur la crécerelle d'Amérique





**Figure 4** : Courbe dose réponse de la transformation lymphoblastique chez le poulet domestique (*Gallus gallus*)

## DISCUSSION

**Concentration des mitogènes et temps d'incubation.** Les concentrations optimales des mitogènes varient considérablement d'un animal à l'autre (écart type très élevé). Nous pouvons donc observer une variation interindividuelle importante entre les animaux. Par contre, nous avons établi qu'en présence de Con A la prolifération lymphocytaire est maximale lorsque la concentration du mitogène est de 2 µg/ml. En présence de PHA cette valeur était plutôt de 50 µg/ml tandis qu'une valeur de 5µg/ml fut observée pour le PWM. Les trois mitogènes ont également donné un index de stimulation supérieur pour une période d'incubation de 72 heures. Des études antérieures ont démontré une multitude de paramètres optimaux qui varient considérablement d'un laboratoire à un autre selon les conditions en laboratoire (Barta, Barta et Pierson., 1992; Lee, 1977 ; Nathanson, 1982). Pour cette raison, il devenait primordial d'établir nos paramètres optimaux au sein de notre laboratoire.

**1.3 VALIDATION DE LA TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE  
CHEZ LA CRÉCERELLE D'AMÉRIQUE : VOIR ARTICLE SUR LES  
CRÉCERELLES**



**APPENDICE B**  
**EXPOSITION *IN VIVO* AUX BPC CHEZ 3 GÉNÉRATIONS**  
**DE CRÉCERELLES D'AMÉRIQUE**

**MÉTHODOLOGIE**

Au printemps 1998, 4 paires de crécerelles d'Amérique adultes (F0) gardées en captivité au centre de conservation aviaire du collège Macdonald de l'université McGill ont été exposées aux BPC via la nourriture. L'exposition aux contaminants a débuté un mois avant l'accouplement des oiseaux jusqu'à l'éclosion des œufs pour une durée totale entre 100 et 120 jours. Les BPC étaient composés d'un mélange d'aroclor 1248:1254:1260 (1:1:1 poids humide) dilués dans de l'huile de maïs. Le mélange a été injecté dans la nourriture, poussin, des crécerelles afin que celles-ci ingèrent 7 mg de mixture par kg de poids par jour. Un total de 7 œufs sont venus à éclosion au printemps (F1). L'année suivante ces oisillons ont été accouplés et ont donné naissance à 18 crécerelles (F2) <sup>1</sup>.

L'hiver dernier, les 33 crécerelles d'Amérique (17 mâles et 16 femelles) ont été sacrifiées par dislocation cervicale. La rate et le sang (1 ml) furent prélevés pour chaque rapace. L'obtention des populations cellulaires et la phagocytose (hétérophile) en cytométrie de flux furent effectuées de façon identique aux aiglons<sup>2</sup>. Pour la transformation lymphoblastique, les globules blancs ont été obtenus par

<sup>1</sup> Cette première partie de la méthodologie fut effectuée par l'équipe du Dr Judit Smits

<sup>2</sup> Voir l'article sur la pygargue à tête blanche

suspension cellulaire des cellules de la rate. La viabilité cellulaire fut évaluée par exclusion au bleu de trypan. Les cellules ont été par la suite ajustées à une concentration de  $2.5 \times 10^6$  cellules/ml. Pour la mise en plaque, les lymphocytes ont été mis en présence ou en absence de 2 mitogènes soit le pokeweed (5  $\mu\text{g/ml}$ ) et la phytohemagglutinine (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Pour l'incubation et la lecture des plaques se référer à l'article sur la crécerelle d'Amérique.

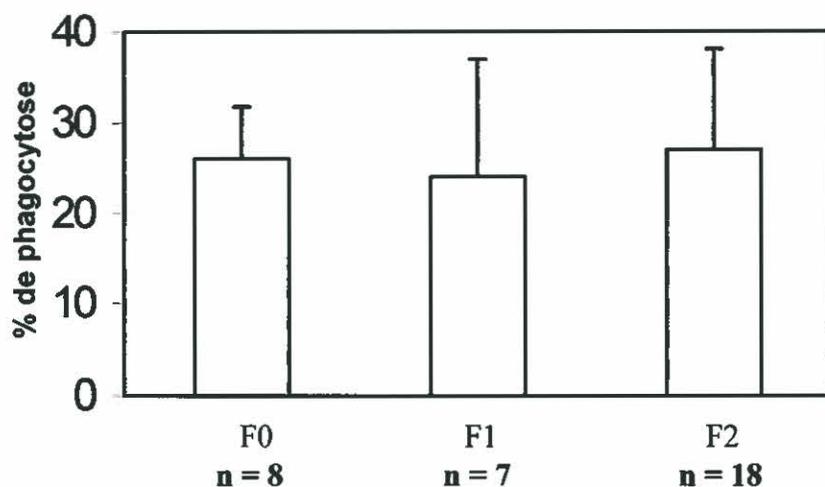
### STATISTIQUES

Pour la réponse phagocytaire et mitogénique, une analyse de variance à un seul critère de classification fut effectuée lorsque les 2 sexes sont répertoriés dans un même groupe. Lors de la séparation des sexes une Anova à un seul critère de classification fut d'abord réalisée suivie d'un test de tukey pour les deux tests immunologiques. Les statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SigmaStat. Nous observons une différence significative lorsque  $p \leq 0.05$ .

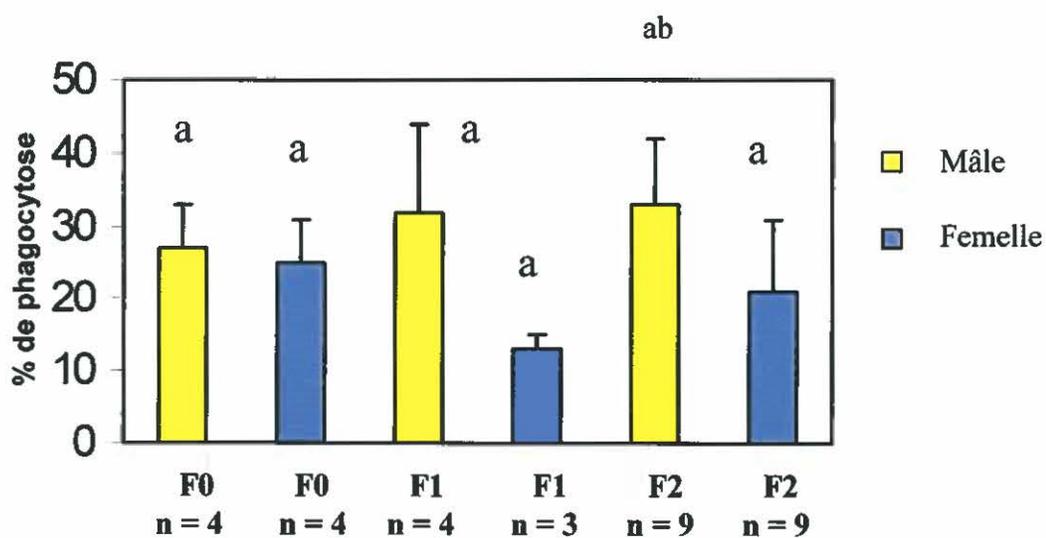
### RÉSULTATS

La figure 1 ne nous démontre pas une différence statistique entre les 3 différentes générations de crécerelles lorsque les femelles et les mâles sont répertoriés dans un même groupe pour la réponse phagocytaire. Par contre, lorsque nous séparons les sexes en deux groupes distincts, la figure 2 nous démontre une différence significative entre les mâles de la deuxième génération et les femelles de la première génération.

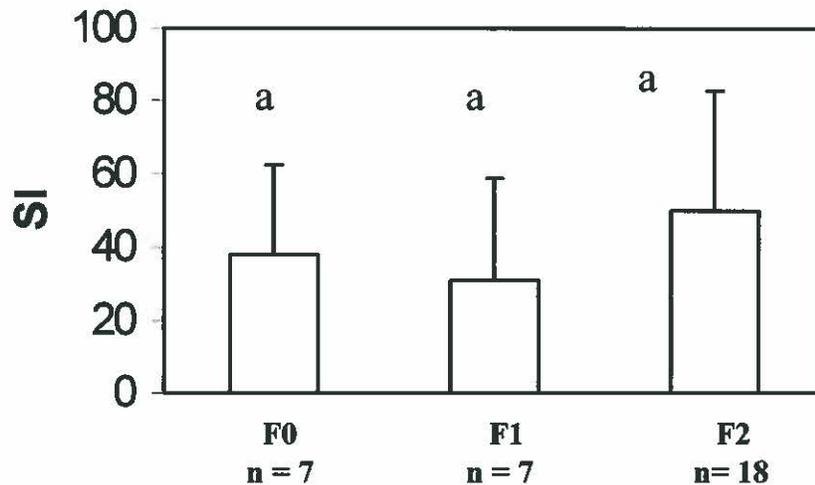
Pour la réponse mitogénique, la figure 3 ne démontre aucune différence significative entre les trois générations de crécerelle. Par contre, la figure 4 nous montre une différence significative entre les mâles des trois générations stimulés à la PHA versus les femelles de la deuxième génération stimulées au PWM.



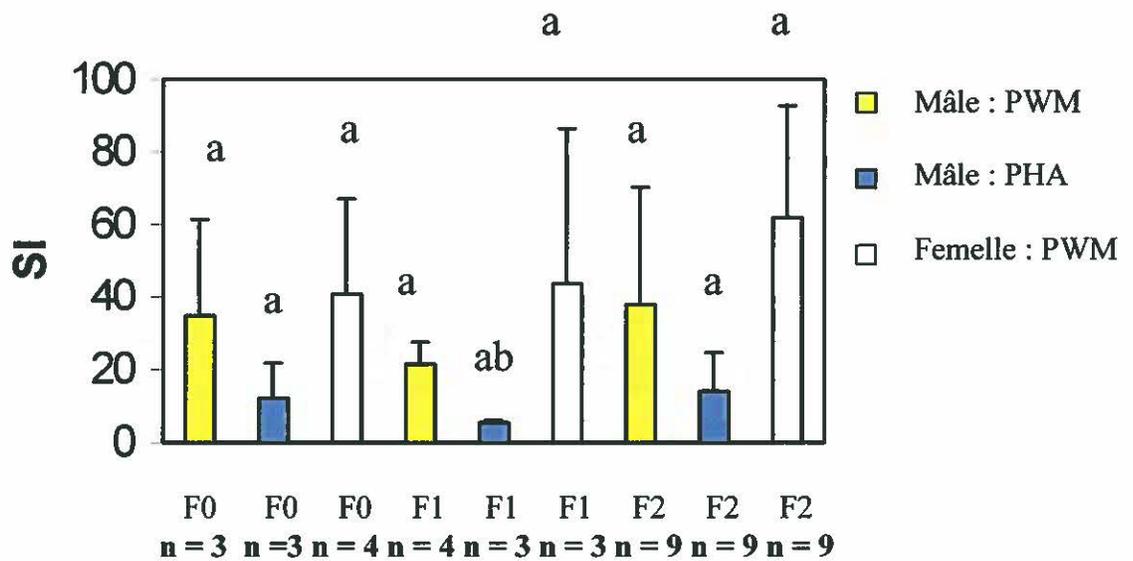
**Figure 1 :** Activité phagocytaire pour des hétérophiles périphériques de trois générations de crécerelles d'Amérique dont la première génération fut exposée *in vivo* aux BPC



**Figure 2 :** Activité phagocytaire pour des hétérophiles périphériques de trois générations de crécerelles d'Amérique de sexe différent et dont la première génération fut exposée *in vivo* aux BPC.



**Figure 3 :** Réponse mitogénique pour des lymphocytes de trois générations de crécerelles d'Amérique dont la première génération fut exposée *in vivo* aux BPC en présence d'un mitogène, PWM = 5 µg/ml



**Figure 4 :** Réponse mitogénique pour des lymphocytes de 3 générations de crécerelles d'Amérique dont la première génération fut exposée *in vivo* aux BPC en présence de deux mitogènes, PWM = 5 µg/ml et PHA = 10 µg/ml.

## DISCUSSION

Les biphényles polychlorés (BPC) sont des contaminants environnementaux industriels qui sont persistants, lipophiliques et omniprésents à travers les écosystèmes aquatique et terrestre. L'effet des BPCs sur le système immunitaire des oiseaux fut révélé pour la toute première fois chez des canards colvert (*Anas platyrhynchos*). Ces oiseaux âgés d'une dizaine de jours ont été exposés à 25, 50 ou 100 ppm de BPC ainsi qu'au virus de l'hépatite. Les oiseaux exposés à ce xénobiotique possédaient un taux de mortalité supérieur aux oiseaux non exposés aux contaminants (Friend et Trainer, 1970). Ainsi, nous savons depuis plusieurs années que les BPCs peuvent produire de l'immunosuppression chez une multitude d'espèces.

Notre étude nous permet tout d'abord de constater que le comportement nuptial des crécerelles d'Amérique n'est pas modifié suite à une exposition aux BPCs. Les adultes ont donné naissance à 7 oisillons la première année et à 18 oisillons la deuxième année.

Selon un modèle récent de toxicocinétique à deux compartiments, plasma et tissu adipeux, le temps demi-vie ( $t_{1/2}$ ) des BPCs chez la crécerelle d'Amérique varie entre 9 et 411 jours selon le degré de substitution des atomes de chlores et la saison de l'année (printemps, été, automne et hiver) (Drouillard et al., 2000). Pour notre étude, le sacrifice des oiseaux s'est effectué 550 jours après l'exposition aux BPCs. De ce fait, nous n'avons observé aucune différence significative entre les 3 générations de crécerelles pour la phagocytose et la transformation lymphoblastique. On peut ainsi penser que la majeure partie des BPCs a été éliminée de l'organisme de l'animal et que les effets d'immunosuppression n'ont pu être observés. Pour la figure 2, il est difficile de tirer des conclusions pour la différence observée entre les mâles de la deuxième génération et les femelles de la première génération pour la phagocytose car l'effectif des femelles de la première génération s'avère très bas ( $n = 3$ ). Nous pouvons par contre penser que les femelles seraient moins résistantes à une

exposition aux BPCs. En effet, le système immunitaire peut répondre différemment selon le sexe de l'animal chez de nombreuses espèces (Burton and Harrison, 1969).

Pour la figure 4, nous remarquons une différence entre les mâles des trois générations stimulés avec le PHA versus les femelles de la deuxième génération stimulées avec le PWM. Indépendamment de la variable génération, nous savons que le PHA stimule la prolifération des cellules T tandis que le PWM stimule la prolifération des cellules T et B. Ainsi, il n'est pas étonnant que nous observions une différence entre ces groupes. Également, nous avons observé lors de cette expérience que les PBLs chez les femelles n'ont pas proliféré suite à une stimulation à la PHA (données non illustrées) contrairement aux mâles. Il est difficile d'expliquer ce résultat, d'autres études devraient être effectuées afin d'élucider ce phénomène. Par contre, nous savons que les crécerelles femelles et mâles peuvent présenter des niveaux d'anticorps différents suite à une exposition aux BPC (Smits and Bortolotti, 2000). Finalement, nous pensons que les BPCs peuvent affecter la réponse immunitaire mais que cette modification peut être réversible chez les oiseaux lorsque l'exposition à ces xénobiotiques s'est effectuée depuis une longue période (élimination des contaminants).