

Université du Québec
INRS-IAF

MODULATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE DE TRUITES ARC-EN-CIEL
(*Oncorhynchus mykiss*) ENGENDRÉE PAR UNE EXPOSITION AUX EFFLUENTS
MUNICIPAUX DE L'ÎLE DE MONTRÉAL OU AUX SUBSTANCES D'INTÉRÊT
PRIORITAIRES (4-NONYLPHÉNOL) GÉNÉRÉES PAR LES STATIONS
D'ÉPURATION

Par Nancy Hébert

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès science (M.Sc)
en science expérimentale de la santé

Jury d'évaluation

Examineur externe	Dr Patrick Jan Cejka. Service de l'environnement voirie et réseaux Station d'épuration des eaux usées de la ville de Montréal
Examineur interne	Dr Michel Charbonneau INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Dr Michel Fournier INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Au cours des dernières décennies, diverses études ont établi le potentiel toxique des rejets provenant de diverses industries et usines. Néanmoins, peu d'intérêt a été attribué aux usines qui recueillent les déchets liquides. La Station d'épuration de la ville de Montréal reçoit les eaux usées en provenance de plusieurs secteurs soit industriel, commercial, institutionnel, domestique (incluant les déchets sanitaires), les eaux de ruissellement et finalement les eaux de lixiviation des anciens dépotoirs de l'île de Montréal. Ces eaux usées sont épurées par un traitement physico-chimique puis rejetées dans le fleuve Saint-Laurent au niveau de l'île aux Vaches. Toutefois, la Station d'épuration rencontre deux problèmes majeurs. En effet, lors de pluies abondantes ou de la fonte des neiges, la capacité maximale de traitement de la Station d'épuration s'avère atteinte et cette dernière rejette des eaux usées non traitées. De plus, suite à un moratoire des gouvernements fédéral et provincial, il lui a été interdit d'utiliser ses installations de désinfection au chlore et par conséquent, la Station d'épuration ne désinfecte pas les effluents avant de les rejeter. Ainsi, malgré le traitement physico-chimique, les effluents en provenance de l'île de Montréal contiennent un niveau significatif de matière en suspension et ils présentent une forte demande biologique/chimique en oxygène et teneur en micro-organismes.

Le but de cette étude consiste à évaluer le potentiel toxique des effluents municipaux ainsi qu'une substance d'intérêt prioritaire, le 4-nonylphénol, généré par la Station d'épuration sur le système immunitaire de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) juvénile. Le potentiel immunotoxique des effluents a été évalué sous divers aspects. Tout d'abord, en déterminant l'effet de diverses concentrations d'effluent, ensuite en établissant la contribution des polluants insolubles (hydrophobes) qui adhèrent aux matières en suspension et des polluants solubles (hydrophiles), puis enfin, en évaluant l'impact de divers procédés de désinfection tels que l'acide peracétique, la radiation UV et l'ozone.

Les compétences immunitaires des truites ont été évaluées par trois essais immunologiques soit la phagocytose, l'essai de cytotoxicité ayant comme effecteur les cellules non spécifiques cytotoxiques (NCC) et enfin, la transformation lymphoblastique. L'essai de la phagocytose consiste à évaluer la capacité des phagocytes à engouffrer des particules étrangères et ainsi à

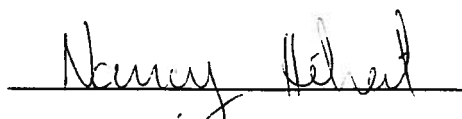
défendre l'organisme. Les cellules effectrices NCC éliminent les cellules cancéreuses (souche humaine YAC-1) en les tuant de manière spontanée. La transformation lymphoblastique évalue la capacité des lymphocytes à proliférer afin de mettre en place une réponse immunitaire spécifique.

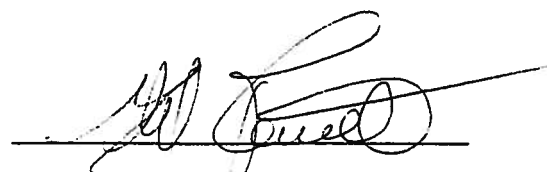
L'essai de la phagocytose a démontré un effet immunodépresseur lorsque les truites ont été exposées au nonylphénol. Les expositions de type courbe dose-réponse ont démontré une modulation inversée reliée à divers facteurs tels que la composition des effluents, la concentration d'effluent employée ainsi que le temps d'exposition. Les poissons exposés aux polluants hydrosolubles et hydrophobes ont démontré une stimulation de l'activité des phagocytes. Les trois procédés de désinfection n'ont eu aucun effet sur les macrophages.

Une augmentation significative du pourcentage de mortalité des cellules cancéreuses a été observée chez les truites exposées à une concentration environnementale de nonylphénol. Aucun effet n'a été noté pour les autres effluents.

Les poissons exposés au nonylphénol ont démontré une stimulation de la prolifération des lymphocytes T et B à court terme. Les expositions de type courbe dose-réponse ont présenté une stimulation de la prolifération des lymphocytes T et B (variant selon la concentration d'effluent employée) à court terme et une suppression de la prolifération des lymphocytes T à long terme. Aucun effet n'a été observé lors de l'exposition aux fractions soluble et insoluble. Les truites exposées à l'acide peracétique et l'ozone ont respectivement montré une prolifération des lymphocytes T et aucun effet au niveau des lymphocytes B. Aucun effet n'a été observé pour les effluents désinfectés aux UV.

En conclusion, l'exposition aux effluents municipaux engendre des effets immunotoxiques, tant à la hausse qu'à la baisse, résultant notamment de la composition complexe des polluants, de leur concentration ainsi que du temps d'exposition. Ces résultats démontrent un désordre au niveau du système immunitaire pouvant entraîner une diminution globale de l'état de santé d'organismes vivants .


Étudiant


Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr Michel Fournier, pour m'avoir donné la chance de participer à un très beau défi environnemental et aussi de la confiance qu'il a su me témoigner.

Je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet soient Christine Yelle, Yves Lafleur, Patrick Jan Cejka et Luc Tremblay de la Station d'épuration des eaux usées de la ville de Montréal; Christian Blaise, François Gagné et Mélanie Douville du Centre Saint-Laurent; Sylvia Ruby et Cathy Momacacos de l'Université de Concordia; Patrick Niquette et Robert Hausler du département de chimie de l'UQAM et sans oublier le support fort apprécié des collègues du laboratoire : Caroline Müller, Daphnée Papillon, Brigitte Badiwa-Bizowé, Kalum Muray, Julie De Gagné, Francesca Proulx, Marlène Fortier, Lucie Ménard et Annie Lalancette.

La réalisation de ce projet n'aurait pas été possible sans la contribution financière d'organismes tels que les Fonds d'Action Québécois pour le Développement Durable (FAQDD) ainsi que le Réseau de Recherche en Écotoxicologie du Saint-Laurent (RRESL) et bien sûr, l'Institut National de la Recherche Scientifique (INRS).

Je termine en remerciant chaleureusement mes proches pour leur soutien à mon égard.

Merci à tous!

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
REMERCIEMENTS.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABÉVIATIONS.....	xi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : BIOMARQUEURS IMMUNOLOGIQUES.....	3
CHAPITRE 2 : LE SYSTÈME IMMUNITAIRE DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL.....	4
2.1 Les organes d'importance.....	4
2.2 Immunité innée.....	5
2.2.1 Couche de mucus.....	6
2.2.2 Cytokines.....	7
2.2.3 Voie du complément.....	8
2.2.4 Réactions inflammatoires.....	9
2.2.5 Phagocytose.....	11
2.2.6 Cellules cytotoxiques non spécifiques (naturelles).....	12
2.3 Immunité spécifique.....	12
2.3.1 Lymphocytes T.....	13
2.3.2 Lymphocytes B.....	14
2.3.3 Les anticorps.....	14
2.3.4 Réaction mixte de leucocytes.....	16
CHAPITRE 3 : EFFETS IMMUNOTOXIQUES DES POLLUANTS DE L'ENVIRONNEMENT CHEZ LES POISSONS.....	17
3.1 Polluants environnementaux.....	17

3.2 Le cas particulier du nonylphénol.....	25
3.2.1 Origine.....	25
3.2.2 Impact chez les organismes aquatiques.....	26
 CHAPITRE 4 : EFFETS DES EFFLUENTS CHEZ DIVERSES ESPÈCES DE POISSONS.....	 28
4.1 Indicateurs généraux.....	28
4.2 Organes externes.....	29
4.3 Organes internes.....	29
4.4 Paramètres sanguins.....	30
4.5 Effets oestrogéniques.....	30
4.6 Effets immunitaires.....	31
 CHAPITRE 5 : LA STATION D'ÉPURATION DES EAUX USÉES DE LA VILLE DE MONTRÉAL ET LES EFFLUENTS MUNICIPAUX DE L'ÎLE.....	 33
5.1 Caractérisation des effluents.....	33
5.2 Aspects généraux de la Station d'épuration de la ville de Montréal.....	34
5.3 Procédés de traitement des eaux usées.....	35
5.4 Désinfection des eaux usées traitées.....	36
5.5 Débordements du réseau.....	38
 CHAPITRE 6 : CONTRIBUTION PERSONNELLE AUX ARTICLES.....	 39
 1 ^o article : EFFECTS OF 4-NONYLPHENOL ON THE IMMUNE SYSTEM OF RAINBOW TROUT (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	 40
 2 ^o article : EFFECTS OF SEWAGE EFFLUENT ON THE IMMUNE SYSTEM OF RAINBOW TROUT (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	 60
 3 ^o article : EFFECTS OF DISINFECTED SEWAGE EFFLUENT ON THE IMMUNE SYSTEM OF RAINBOW TROUT (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	 93

LISTE DES FIGURES

SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

Figure 1. Réseau des intercepteurs de la Station d'épuration des eaux usées de la ville de Montréal.....	35
--	----

SECTION 2 : ARTICLES

1^e article : EFFECTS OF 4-NONYLPHENOL ON THE IMMUNE SYSTEM OF RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

Figure 1. Phagocytic activity of pronephros macrophages in rainbow trouts exposed to nonylphenol (0.85 µg/L), dilution vehicle and tap water. (a) 54 days exposure. * indicates significant difference from tap water groups. (b) 90 days exposure.....	58
---	----

Figure 2. Mitogenic response of head kidney lymphocytes stimulated with LPS and PHA in rainbow trout exposed to nonylphenol (0.85 µg/L) , dilution vehicle and tap water. (a) 54 days exposure. * indicates significant difference from vehicle group. ** indicates highly significant differences from tap water group. (b) 90 days exposure.....	59
--	----

2^e article : EFFECTS OF SEWAGE EFFLUENT ON THE IMMUNE SYSTEM OF RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

Figure 1. Phagocytic activity of rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) exposed to Montreal sewage effluent concentrations between 0.01% and 10% (a) 54 days exposure. (b) 90 days exposure.....	90
--	----

Figure 2. Mitogenic response of head kidney lymphocytes stimulated with LPS (B lymphocytes) and PHA (T lymphocytes) in rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) exposed to sewage effluent concentrations between 0.01% and 10% and control group. (a) 54 days exposure. (b) 90 days exposure.....	91
--	----

Figure 3. Phagocytic activity of rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) exposed to Montreal sewage effluent concentrations between 1% and 50% for a period of 40 days.....	92
--	----

INTRODUCTION

Depuis les années 1980, les conséquences entraînées par la pollution aquatique sur la faune et la flore ont retenu l'attention des scientifiques, de la population et des politiciens (Bucke, 1993). En effet, de nombreuses indications ont permis d'associer diverses problématiques de santé ou de déclin des populations chez les organismes aquatiques suivant la détérioration du milieu en raison d'activités anthropogéniques (Bucke, 1993). Depuis les années 1970, la plupart des rejets industriels sont bien contrôlés. Néanmoins, les rejets d'eaux usées provenant des municipalités constituent maintenant la principale source de polluants chimiques et biologiques qui ont un potentiel additif et synergique. Il devient donc important d'en établir l'impact sur la santé des populations humaines et aquatiques et ceci, afin de développer des outils de suivi et des indicateurs permettant d'évaluer la performance de nouveaux procédés et/ou traitements. Ainsi, les toxicologues environnementaux sont de plus en plus concernés par le potentiel toxique des mélanges complexes de polluants retournés dans l'environnement via les rejets d'eaux usées (Altenburger *et al.*, 1993).

Depuis les deux dernières décennies, l'immunotoxicologie est devenue un champ d'étude populaire (Wester, Vethaak et Van Muiswinkel, 1994) et a été évaluée chez de nombreuses espèces aquatiques (Fournier *et al.*, 2000). Le système immunitaire s'avère un indicateur sensible face aux xénobiotiques (Fournier *et al.*, 2000) et constitue l'objet de la présente étude chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) juvénile. Plus précisément, les capacités immunitaires (non)spécifiques ont été mesurées soit la phagocytose, la cytotoxicité (NK) et enfin la transformation blastique.

La truite arc-en-ciel juvénile constitue un organisme de choix afin d'effectuer des expositions *in vivo* aux effluents municipaux de la ville de Montréal en raison de son accessibilité, de sa sensibilité aux polluants et de l'état des connaissances sur ses capacités immunitaires. De même, l'obtention, l'entretien et la manipulation de ces organismes présentent un faible niveau de complexité et impliquent un budget raisonnable.

La présente étude tentera d'évaluer si les constituants abiotiques (métaux lourds, surfactants, nonylphénol, pesticides, etc) et biotiques (bactéries, virus, protozoaires, etc) contenus dans les eaux usées traitées de la ville de Montréal modulent la réponse immunitaire de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) à la hausse ou à la baisse.

Cette hypothèse sera vérifiée par l'entremise de quatre objectifs. Tout d'abord, on devra évaluer les effets immunotoxiques de diverses concentrations d'effluents (exposition de type courbe dose-réponse). En deuxième lieu, établir la contribution respective des éléments solubles et insolubles à l'immunotoxicité des effluents municipaux. En troisième lieu, établir l'impact de nouveaux procédés de désinfection (UV, ozone et acide peracétique) à l'immunotoxicité des effluents. Enfin, caractériser le potentiel immunotoxique de nouvelles substances d'intérêt prioritaires, tel que le nonylphénol, à une concentration représentative du niveau de contamination de l'environnement.

Chapitre 1

Biomarqueurs immunologiques

Depuis les deux dernières décennies, les populations humaines montrent un intérêt grandissant face aux conséquences des actions anthropiques sur les écosystèmes aquatiques. Ainsi, un nombre impressionnant d'études concernant la faune et la flore aquatiques ont été réalisées. Le système immunitaire constitue une composante très sensible et s'avère un outil de choix afin de détecter les situations problématiques présentes dans l'environnement aquatique. Les compétences immunitaires des organismes aquatiques peuvent être évaluées en effectuant différents essais tant au niveau de l'immunité innée que spécifique.

L'immunité innée constitue une réponse immunitaire simple, rapide et ne fait pas appel à la mémoire immunologique. Elle peut être évaluée par l'entremise de divers essais tels que le dénombrement des leucocytes sanguins, les réactions inflammatoires, l'activité des lysozymes, le système du complément, la cytotoxicité cellulaire, la phagocytose (mesure de la chimoluminescence) et de la flambée oxydative.

L'immunité spécifique comporte des réponses plus complexes qui prennent quelques jours avant d'entrer en action. De plus, ce mécanisme de défense fait intervenir la mémoire immunologique. La performance du système immunitaire spécifique peut être évalué par la prolifération des lymphocytes T (stimulés par le phytohématagglutinine et la concanavaline A) et des lymphocytes B (stimulés par le lipopolysaccharide), la réaction mixte de leucocytes, la quantification de cytokines sériques, la quantification d'anticorps sériques, les cellules inductrices de plages de lyse, l'activité des cellules sécrétant des anticorps et la résistance aux pathogènes.

Chapitre 2

Le système immunitaire de la truite arc-en-ciel

2.1 Les organes d'importance

Les principaux organes impliqués au niveau de l'immunité chez les poissons sont le thymus, le rein antérieur et la rate. Les leucocytes se répartissent dans ces organes en plus du système digestif et du sang périphérique. Le thymus et le rein sont considérés comme des organes immunitaires primaires tandis que la rate constitue un organe secondaire. En effet, une thymectomie réalisée chez *Salmo gairdneri* a démontré que la cellularité du rein demeure stable alors que celle de la rate diminue (Tatner, 1985).

Le thymus est localisé sous l'opercule à proximité des branchies et demeure relativement non protégé contre les pathogènes (Tatner et Mannig, 1982). Diverses indications suggèrent la présence de cellules dendritiques, de cellules « nurse-like » au niveau du thymus des téléostéens et de complexes multicellulaires macrophages-lymphocytes (Zapata, 1981 ; Fänge et Pulsford, 1985 ; Zapata, Chiba et Varas, 1996 ; Flaño *et al.*, 1996). Lorsque le thymus de la truite est stimulé à l'aide de mitogènes, cet organe répond plus intensément à la concanavaline A (Con A) qu'au lipopolysaccharide (LPS) (Etlinger, Hodgins et Chiller, 1976) indiquant une prédominance de lymphocytes T (Zapata et Cooper, 1990 ; Chilmonczyk, 1992 ; Kaattari, 1992). Suite à leur développement, une population de lymphocytes migre dans la rate et le rein (Tatner, 1985). Enfin, l'ablation du thymus n'a aucun effet, à court terme, sur la production d'anticorps (Manning, Grace et Secombes, 1992 ; Tatner, Adam et Leshen, 1987).

Le rein antérieur ou pronéphros constitue un organe d'importance chez la plupart des espèces de poisson. Le rein est un organe hématopoïétique typique des vertébrés qui ne possède pas de moelle osseuse (Zapata, Chiba et Varas, 1996). En effet, diverses évidences suggèrent un parallélisme fonctionnel entre le rein et la moelle osseuse des vertébrés (Zapata, 1979). On note l'absence de regroupement de macrophages (centre mélanomacrophage) chez les salmonidés

comparativement à d'autres espèces de téléostéens (Zapata et Cooper, 1990). Cet organe est constitué de macrophages, de cellules cytotoxiques non spécifiques (NCC), de cellules présentatrices d'antigène, de lymphocytes T et B (Zapata et Cooper, 1990).

La rate sert à filtrer le sang, et à améliorer la capture et la présentation de l'antigène. Cet organe atteint sa maturité plus tard que le thymus et le rein (Ellis, 1977) et s'avère peu développé chez les téléostéens puisque que le pronéphros assure un rôle hématopoïétique d'envergure et demeure actif durant la vie entière de la truite (Zapata, Chiba et Varas, 1996). On retrouve dans cet organe des macrophages localisés tant dans la moelle rouge que blanche. Une stimulation effectuée à l'aide du LPS et de la Con A suggère la présence de lymphocytes T et B (Zapata, 1983 ; Zapata et Cooper, 1990). De plus, chez la truite, les fonctions de liaison de l'antigène ainsi que la production d'anticorps s'effectuent dans la rate.

Diverses indications suggèrent l'existence d'une réactivité immunitaire au niveau des muqueuses du système digestif chez les téléostéens (Hart *et al.*, 1988 ; Zapata et Cooper, 1990). Il semble que l'estomac puisse absorber des antigènes bactériens, des bactéries complètes ou encore des virus (Zapata, Chiba et Varas, 1996). Le second segment de l'intestin, constitué majoritairement de macrophages et d'entérocytes (Zapata, Chiba et Varas, 1996), semble engouffrer, transformer et présenter les particules étrangères (Hart *et al.*, 1988). En effet, l'administration d'un antigène par voie orale entraîne une augmentation du nombre de leucocytes dans l'épithélium (Davina, Parmentier et Timmermans, 1982) ainsi que la production d'anticorps spécifiques dans le mucus stomacal et la bile (Davidson, Ellis et Secombes, 1993).

2.2 Immunité innée

La défense des téléostéens est assurée tant par un mécanisme immunitaire inné que spécifique. Plus précisément, l'immunité innée n'implique pas la mémoire immunologique et s'effectue principalement par les monocytes/macrophages, les granulocytes et les cellules cytotoxiques non spécifiques (NCC) (Zapata, Chiba et Varas, 1996). En parallèle, divers médiateurs cellulaires peuvent être synthétisés. L'immunité innée constitue la première ligne de défense contre les particules étrangères. Elle ne nécessite aucun contact préalable pour déclencher une réponse immunitaire.

2.2.1 Couche de mucus

Contrairement aux mammifères, l'épithélium externe des poissons est constitué de cellules vivantes, ce qui favorise la production de mucus qui recouvre leur épiderme (Anderson et Zeeman, 1995). En conséquence, l'attachement ainsi que la pénétration des micro-organismes s'avèrent considérablement réduits (Watts, Munday et Burke 2001). Ce mucus contient d'importants constituants tels que des peptides, des enzymes bactéricides (les défensines et les lysozymes), des protéases (Hjelmeland, Christie et Raa, 1983), des facteurs du complément (Harrell, Etlinger et Hodgins, 1976), des lymphocytes, des immunoglobulines (non)spécifiques (St-Louis-Cormier, Osterland et Anderson, 1984), des protéines C-réactives, des lectines et des hémolysines (Yano, 1996).

Les lysozymes ont un effet antibactérien direct soit en agissant à titre d'opsonines lors de la phagocytose ou en activant les macrophages ou polymorphonucléaires (Jollès et Jollès, 1984). Plus précisément, chez *Oncorhynchus mykiss*, deux isoformes différentes de lysozymes ayant une spécificité d'action contre les bactéries gram-négatives (*Escherichia coli*, *Aeromonas salmonicida*, etc) ou gram-positives (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, etc) ont été isolées (Yano, 1996 ; Grinde, Jollès et Jollès, 1988). Il existe aussi des protéases spécifiques aux bactéries gram-négatives (Hjelmeland, Christie et Raa, 1983). De plus, les lysozymes dégradent la chitine présente dans la paroi de divers champignons (Yano, 1996). Chez le saumon Atlantique, une corrélation semble existée entre les lysozymes et la résistance aux maladies (Fevolden, Roed et Gjerde, 1994). Enfin, les manipulations, le transport ou la pollution environnementale peuvent réduire significativement le niveau de lysozymes (Möck et Peters, 1990).

Sous l'épithélium, la présence de cellules qui produisent des immunoglobulines (Ig) a été découverte. Ainsi, dans le mucus externe de la truite *Salmo gairdneri*, des anticorps spécifiques aux globules rouges de moutons ont été détectés (Secombes, 1996).

Les micro-organismes piégés dans le mucus sont dégradés puis rejetés dans le milieu environnant (Anderson et Zeeman, 1995). Toutefois, si un micro-organisme réussit à pénétrer la couche de mucus, les écailles constituent une seconde barrière physique (Anderson et Zeeman, 1995).

2.2.2 Cytokines

Les cytokines sont des facteurs solubles qui ont pour fonction de favoriser la communication entre les leucocytes. La plupart des cytokines identifiées chez les poissons présentent des similarités fonctionnelles par rapport à celles des mammifères. Dans certain cas, elles ont même été identifiées grâce à une réaction croisée avec les cytokines de vertébrés à sang chaud. Les cytokines IL-1 (interleukine-1), IL-3, IL-6, le TNF (facteur de nécrose tumoral), l'INF (interféron), le MAF (facteur d'activation des macrophages), le MIF (facteur inhibiteur de migration), le TGF- β (transforming growth factor) et le CF (facteur de chimiotactisme) ont été caractérisées chez la truite (Manning et Nakanishi, 1996).

La cytokine IL-1 est produite majoritairement par les macrophages et elle a pour fonction d'initier une cascade de réactions assurant la prolifération ainsi que la différenciation des lymphocytes et enfin d'augmenter l'expression du récepteur de l'IL-2 (Kaattari, 1992 ; Secombes, 1996). Elle a été découverte pour la première fois chez la truite suite à une infection induite par le virus hémorragique septicémique et de nécrose hématopoïétique (Ahne, 1993). De plus, l'interleukine-1 β (IL-1 β) a été cloné chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) (Secombes, Hardie et Daniels, 1996 ; Secombes, 1997 ; Secombes *et al.*, 1998). Chez les mammifères, l'IL-2 est produite par les lymphocytes T et a pour fonction de stimuler la croissance des cellules T et des cellules NK (Natural Killer). La présence de l'IL-2 semble fortement suggérée chez la truite suite aux essais comportant sur la réaction mixte de leucocytes (Kaastrup *et al.*, 1988). De même, les cytokines IL-3, IL-6 et le TNF- α ont été identifiées dans le sérum de truite suite à une infection virale (Ahne 1993 et 1994). Ces cytokines sont principalement impliquées dans les réponses inflammatoires.

Le TGF- α a été cloné chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) (Secombes, Hardie et Daniels, 1996 ; Secombes, 1997 ; Secombes *et al.*, 1998). Il a pour fonction de réguler négativement les macrophages, d'induire la prolifération des lymphocytes, la migration des neutrophiles et de stimuler de la flambée oxydative chez *Oncorhynchus mykiss* (Jang, Hardie et Secombes, 1995a ; Jang *et al.*, 1995b).

Chez les mammifères, le TNF- α est produit par les macrophages et joue un rôle important dans la destruction des bactéries gram-négatives, des virus et des parasites (Manning et Nakanishi, 1996). Chez la truite, on a détecté la présence du TNF- α dans les macrophages (Zelikoff *et al.*, 1991). De plus, les macrophages et lymphocytes répondent positivement (chimiotactisme) au TNF- α humain suggérant ainsi la présence d'un récepteur de surface chez la truite (Jang *et al.*, 1995b).

Chez les mammifères, les INF, produits par les cellules T, ont pour fonction de résoudre les infections virales. Chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*), une production des INF α et β a été observée suite à une injection de virus (de Kinkelin et Dorson, 1973 ; de Kinkelin et Le Barre, 1974 ; de Kinkelin, Dorson et Hattenberger-Baudouy, 1982 ; Dorson, de Kinkelin et Torchi, 1992).

L'INF- γ , aussi nommé MAF, peut être secrété chez la truite afin de lutter contre les infections virales et d'activer les macrophages (Graham et Secombes, 1988 et 1990). Les leucocytes du rein d'*Oncorhynchus mykiss* stimulés in vitro par *Aeromonas salmonicidae* révèlent une augmentation significative de la production du facteur d'activation des macrophages (MAF) et ce dès la première semaine de vie (Marsden, Cox et Secombes, 1994). La production intensifiée de MAF a pour conséquence d'améliorer significativement la flambée oxydative (Jang, Hardie et Secombes, 1995a). Chez les mammifères, la cytokine MIF a pour fonction d'empêcher les macrophages de quitter le site infecté. Ce facteur a été analysé chez la truite suivant une infection bactérienne induite (Thomas et Woo, 1990).

2.2.3 Voie du complément

Chez la truite, la voie du complément a été démontrée en mesurant la lyse des globules rouges de mouton (Nonaka *et al.*, 1981). La voie du complément classique (dépendante de l'anticorps) activée par le complément 1 (C1) ainsi que la voie alternative (indépendante de l'anticorps) activée par le complément 3 (C3) sont présentes chez la truite et ressemblent à celles des mammifères (Yano, 1996). La synthèse des composantes du complément peut mener à la destruction directe de bactéries et de virus ou faciliter la phagocytose (opsonine) (Sakai, 1983 ; Sakai, 1984 ; Sakai, Suzuki et Awakura, 1994).

Chez la truite, il existe des analogues fonctionnels aux mammifères pour les composantes C4 et C5 (Elcombe *et al.*, 1985 ; Nonaka, Natsuume-Sakai et Takahashi, 1981a). Chez *Salmo gairdneri* et *Oncorhynchus mykiss* le complément 3 (C3) a été trouvé (Nonaka *et al.*, 1984). Cette composante est aussi retrouvée sous forme C3a et C3b (Kaatari et Piganelli, 1996). Les autres facteurs du complément n'ont pas encore été découverts chez la truite. Néanmoins, les composantes C1 à C9, les facteurs B et D ont été identifiées chez la carpe (Yano, 1996).

2.2.4 Réactions inflammatoires

De manière générale, l'inflammation se caractérise par un volume de sang plus élevé dans l'aire inflammatoire, une augmentation de la perméabilité et de la migration des leucocytes provenant des capillaires vers les tissus. Chez les mammifères, l'activation de lectines, de la voie du complément et de cellules de signalisation entraînent la transcription de médiateurs inflammatoires tels que les lymphokines (Zelikoff *et al.*, 1991), les cytokines, les amines vasoactives, les eicosanoïdes, etc (Watts, Munday et Burke, 2001). Les lymphokines comportent plusieurs molécules dont les interférons, les facteurs de chimiotactisme, les facteurs d'activation des macrophages (MAF), les interleukines et les facteurs de croissance des lymphocytes B (Anderson et Zeeman, 1995). Aucune indication ne semble suggérer que l'histamine soit responsable des premières étapes de l'inflammation chez les poissons. Toutefois, cette molécule pourrait agir en tant que médiateur inflammatoire (Suzuki et Iida, 1992).

La réponse inflammatoire implique notamment les neutrophiles, les macrophages et les monocytes. Chez les poissons, ces cellules exercent un rôle qui consiste à retirer les dérivés inflammatoires et les tissus endommagés afin de résoudre l'inflammation ainsi que de lier les organismes étrangers et les détruire (Anderson et Zeeman, 1995). Lors d'une réaction inflammatoire chez les poissons, les leucocytes migrent, adhèrent aux vaisseaux sanguins et pénètrent à l'intérieur des tissus infectés selon des mécanismes encore inconnus (Suzuki et Iida, 1992). Les réactions inflammatoires chez les poissons s'effectuent selon une courbe température dépendante (Suzuki et Iida, 1992).

Les neutrophiles ont pour fonction de libérer des médiateurs inflammatoires (lymphokines) qui attirent les macrophages au site d'inflammation, d'excréter activement des enzymes afin de tuer

les micro-organismes et d'engouffrer les pathogènes (Ellis, 1986 ; Secombes, 1987). Les macrophages et monocytes ont une capacité plus élevée à phagocyter que les neutrophiles (Suzuki, 1984). Toutefois, ces derniers compensent par leur grand nombre (Secombes, 1996). Le patron d'arrivée biphasique des leucocytes consiste en un maximum de neutrophiles et de macrophages respectivement après 24 et 48 heures (Sommer et Bartos, 1981).

Lors de la phase aiguë de l'inflammation, la production de protéines sériques est modulée chez les poissons. Ces protéines ont pour rôle d'agir directement contre les pathogènes, d'activer le système du complément, de rétablir l'homéostasie ou encore de minimiser les dommages subis par l'hôte (Secombes *et al.*, 1999). Certaines protéines dont la protéine C-réactive (CRP), l'amyloïde P sérique (SAP) et l'amyloïde A sérique (SAA) ont été conservées au cours de l'évolution (Jensen *et al.*, 1997). La transferrine, une protéine qui sert à séquestrer le fer chez les mammifères, a été identifiée chez plus de 100 espèces de poissons osseux, mais sa fonction demeure controversée (Turner et Jamieson, 1987).

La CRP a été identifiée chez plusieurs espèces dont la truite arc-en-ciel. On la retrouve notamment dans le sang, le sperme, le mucus de l'épiderme et les œufs (Yano, 1996). La CRP est produite par les macrophages et les lymphocytes. De plus, elle a un rôle déterminant suite à l'invasion par un pathogène. En effet, lors d'une infection causée par *Vibrio anguillarum*, la production de la CRP est stimulée (concentration 3 fois plus élevée), la voie du complément est activée et la phagocytose de la bactérie s'avère plus efficace (Kodama *et al.*, 1989 ; Nakanishi *et al.*, 1991 ; Murai *et al.*, 1990). Le mécanisme d'action de la CRP consiste à reconnaître et lier la phosphorylcholine présente dans la paroi cellulaire des bactéries, des champignons ou d'autres parasites (Yano, 1996). Enfin, chez *Salmo gairdneri* la SAP et la SAA ont été clonées (Jensen *et al.*, 1997). L'expression de l'ARN messager hépatique de la SAA tend à augmenter suite à une infection causée par *A. Salmonicida* (Jensen *et al.*, 1997).

L'inflammation chronique implique plus particulièrement les lymphocytes, macrophages et monocytes. Ce type d'inflammation se caractérise par la formation de granulomes qui sont constitués par un regroupement de macrophages. La libération de divers médiateurs inflammatoires favorise la persistance de l'état d'inflammation et en complexifie la résolution

(Secombes, 1996). Enfin, l'état d'inflammation peut être résorbé par plusieurs types de cellules dont les phagocytes, les éosinophiles, les thrombocytes et les lymphocytes (Secombes, 1996).

2.2.5 Phagocytose

L'immunité innée comporte des réactions qui assurent la destruction des micro-organismes par l'entremise de dérivés d'oxygène ou d'azote. La phagocytose est orchestrée principalement par les cellules phagocytaires polymorphonucléaires (PMN) ou les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) ainsi que les macrophages. Les PMN, ainsi que les macrophages, exercent leur action en reconnaissant un micro-organisme préalablement fixé par une opsonine, en ingérant la particule dans une vacuole intracellulaire et en relâchant des enzymes ou des substances bactéricides qui détruisent le pathogène (Anderson et Zeeman, 1995).

Les macrophages sont de grosses cellules mononucléées d'aspect granuleux (Secombes, 1990). Les macrophages peuvent phagocyter plusieurs micro-organismes, sécréter des radicaux libres de l'oxygène et de l'azote ou encore agir à titre de cellule accessoire aux lymphocytes (Secombes, 1990 ; Vallejo, Miller et Clem, 1992). Plusieurs récepteurs ont été identifiés à la surface des macrophages soit les récepteurs à l'anticorps (Fc), pour le complément (Secombes et Fletcher, 1992) et pour le complexe majeur d'histocompatibilité II (Secombes, 1994).

Les granulocytes présentent un cytoplasme granuleux et possèdent un ou plusieurs noyaux selon le type cellulaire. Plus précisément, les neutrophiles possèdent des capacités élevées pour phagocyter, produire des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Ils présentent toutefois un pouvoir bactéricide réduit (Secombes, 1996). Les récepteurs d'anticorps (Fc) et du complément ont été mis en évidence à la surface de ces cellules (Secombes, 1996).

Chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*), d'importantes différences entre les macrophages stimulés et non stimulés ont été observées (Zelikoff *et al.*, 1991). En effet, les macrophages stimulés *in vitro* ont une mobilité plus importante, produisent un niveau significativement plus élevé de dérivés de l'oxygène, doublent leur taille rapidement et présentent à leur surface plusieurs plis surmontés par de nombreuses microvillosités favorisant ainsi un meilleur contact avec la particule étrangère comparativement aux cellules non stimulées. La destruction des micro-organismes peut

s'effectuer 1h à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule (Whyte, Chappell et Secombes, 1989 ; Secombes, 1996).

2.2.6 Cellules cytotoxiques non spécifiques

L'immunité innée est aussi assurée par des cellules cytotoxiques non spécifiques (NCC) comparables aux cellules tueuses naturelles (NK) des mammifères (Zelikoff *et al.*, 1991). Les cellules NCC de la truite sont de petites tailles, mononucléées (pléomorphisme), sans granule (contrairement aux mammifères), sans vacuole et ressemblent aux monocytes et lymphocytes (Greenlee, Brown et Ristow, 1991 ; Secombes, 1996). Ces cellules exercent leur action cytotoxique spontanément sur les cellules infectées par des virus et sur les cellules cancéreuses selon deux mécanismes différents, soit par apoptose ou par nécrose (Evans et Jaso-Friedmann, 1992 ; Anderson et Zeeman, 1995 ; Greenlee, Brown et Ristow, 1991 ; Meseger *et al.*, 1994). Lorsque stimulé, le NCC présente des microvillosités à sa surface facilitant ainsi le contact avec la cellule cible (Meseguer *et al.*, 1994). De plus, les NCC possède une molécule FAM (function-associated molecule) qui est impliquée dans la reconnaissance des cellules cibles (Harris *et al.*, 1992).

2.3 Immunité spécifique

La truite arc-en-ciel possède la capacité d'élaborer une réponse immunitaire complexe. Tout comme chez les mammifères, l'immunité spécifique implique la collaboration entre les lymphocytes T et B. Cette forme d'immunité débute avec les macrophages qui capturent et présentent les particules étrangères aux lymphocytes T et B (Anderson et Zeeman, 1995). Suite à l'activation causée par l'antigène, la production de médiateurs cellulaires est induite, les cellules entrent dans un processus de prolifération et les lymphocytes B se différencient en cellules plasmatiques productrices d'anticorps spécifiques (Anderson et Zeeman, 1995).

Il y a plus de 25 ans, la capacité des lymphocytes T et B des téléostéens à se diviser et à proliférer lorsqu'ils sont stimulés par un mitogène a été démontrée (Etlinger, Hodgins et Chiller, 1976). Les poissons possèdent donc l'habilité de reconnaître les pathogènes qui sont potentiellement dangereux et de procéder à leur destruction suite à une reconnaissance spécifique.

2.3.1 Lymphocytes T

Les lymphocytes T ont pour fonction de dégrader l'antigène et de présenter un peptide antigénique au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Manning et Nakanishi, 1996). Les lymphocytes T assurent la production d'opsonines, de cytokines et de lymphokines (Anderson et Zeeman, 1995). Chez les téléostéens deux populations de lymphocytes T (T_{H1} et T_{H2}) ont été identifiés (Kaattari, 1992).

Chez la truite, les chaînes alpha (α) et bêta (β) des récepteurs à l'antigène des lymphocytes T ont été caractérisés (Partula *et al.*, 1995 et 1996). La chaîne β comporte un résidu lysine, tout comme chez les mammifères, et a pour fonction de favoriser une interaction avec le complexe CD3 (Partula *et al.*, 1995). Toutefois, les récepteurs tels que le CD3, CD4 ou CD8 présents à la surface des lymphocytes T n'ont pas été identifiés chez les poissons (Manning et Nakanishi, 1996).

La truite *Oncorhynchus mykiss* exprime les CMH I et II. Le gène codant pour le CMH I a été localisé au niveau de plusieurs tissus soient la rate, le thymus, le rein, le cœur, les intestins, le cerveau et le foie. Le CMH I exerce son action sur les antigènes exogènes et présente un important polymorphisme. De plus, l'activité des T_{H1} (cytotoxiques) chez les poissons a été démontrée par le rejet de greffes ainsi que les réactions d'hypersensibilité (Nakanishi *et al.*, 1999).

Chez les mammifères, le CMH II exerce son action principalement sur les antigènes exogènes et a pour fonction de les présenter aux T_{H2} (helper). Le CMH II est exprimé à la surface des macrophages du pronéphros (Knight, Stet et Secombes, 1998 ; Juul-Madsen *et al.*, 1992) et de la rate (Juul-Madsen *et al.*, 1992). Le gène de la chaîne β du CMH II de la truite a été clonée (Juul-Madsen *et al.*, 1992) et présente une certaine homologie avec celui des mammifères. Chez la truite, une stimulation simultanée par le $TNF\alpha$ et le LPS entraîne une expression plus importante du CMH II. Ce fait suggère que les macrophages du pronéphros d'*Oncorhynchus mykiss* peuvent être stimulés entre autre par les opsonines, les cytokines les lymphokines, les facteurs du complément ou des peptides antigéniques entraînant ainsi des modifications de la présentation de l'antigène et conséquemment de la réponse immune spécifique (Knight, Stet et Secombes, 1998).

Néanmoins, les facteurs qui influencent l'expression du CMH et les mécanismes par lesquels ils sont régulés demeurent encore inconnus (Knight, Stet et Secombes, 1998).

2.3.2 Lymphocytes B

Les lymphocytes B ont pour fonction principale de produire des anticorps, autant spécifiques que non spécifiques. On retrouve les lymphocytes B dans plusieurs tissus soit le thymus, la rate, le rein antérieur et le sang périphérique (Kaattari, 1992). Deux populations de lymphocytes B (B₁ et B₂) ont été identifiées (Kaattari, 1992).

Les cellules B peuvent être activées par les voies indépendantes ou dépendantes des lymphocytes T (Clem *et al.*, 1985, Vallejo, Miller et Clem, 1992, Kaatrari, 1992 ; Kaatari et Piganelli, 1996). Des enzymes, localisées dans le pronéphros, dont l'activité est associée au développement des cellules pré-B chez les mammifères ont été identifiées chez les truites (Kaattari, 1992). Les clones de haute affinité sont présents uniquement dans la rate et le rein postérieur et non pas au niveau du pronéphros (Kaattari, 1992). Ainsi, les clones des lymphocytes B du rein antérieur de la truite (*Oncorhynchus mykiss*) synthétisent des immunoglobulines spécifique et non spécifiques. Les anticorps non spécifiques ne nécessitant pas une stimulation préalable et ont pour cible principale les micro-organismes largement répandus dans l'environnement (Zeeman, 1995).

2.3.3 Les anticorps

Les anticorps sécrétés par les plasmocytes dans la circulation sanguine peuvent neutraliser des protéines ou des toxines, faciliter la phagocytose (opsonine), ou encore activer le système du complément pour faciliter la lyse de cellules cibles (Anderson et Zeeman, 1995). Dans une étude réalisée par Griffin (1983) des anticorps spécifiques à *Yersinia ruckeri* chez *Salmo gairdneri* ont permis d'augmenter significativement la phagocytose sans toutefois améliorer l'activité cytotoxique intracellulaire. Chez cette même espèce, des anticorps hautement spécifiques qui neutralisent divers types de virus ont aussi été démontrés (Lorenzen et Lapatra, 1999).

Les immunoglobulines de poissons constituent une population hétérogène quoiqu'ils soient de classe M (IgM) (DeLuca, Wilson et Warr, 1983 ; Elcombe *et al.*, 1985). La molécule d'anticorps

Chez les mammifères, on observe fréquemment des réponses secondaires plus intenses et rapides. Ce phénomène s'avère peu observé chez les téléostéens puisqu'ils ne possèdent pas d'IgG (Watts, Munday et Burke, 2000). Toutefois, *Oncorhynchus mykiss* est en mesure d'élaborer une réponse secondaire plus efficace faisant appel à sa mémoire immunologique. En effet, la production plus rapide et nombreuse d'anticorps est la conséquence d'un répertoire plus varié de cellules B sensibles aux antigènes et non pas à une maturation des immunoglobulines entre les deux expositions (Arkoosh et Kaattari, 1991).

2.3.4 Réaction mixte de leucocytes

Chez les mammifères, cette réponse immunitaire implique une interaction entre le récepteur CD4⁺ d'un lymphocyte T avec le CMH II d'un monocyte/macrophage ou lymphocyte B incompatible (Manning et Nakanishi, 1996). L'activation des lymphocytes T CD4⁺ entraîne la sécrétion de l'IL-2 ainsi que la transformation des lymphocytes T en blastocytes qui effectuent une prolifération clonale lorsque stimulés par l'IL-2 (Manning et Nakanishi, 1996). Diverses espèces, dont la truite, ont la capacité d'effectuer une réaction mixte de leucocytes (Etlinger, Hodgins et Chiller, 1977 ; Kaastrup *et al.*, 1988). La synthèse d'IL-2 et la participation de monocytes/macrophages ainsi que de lymphocytes T et B suite à l'induction d'une réaction mixte de leucocytes ont été détectées chez la carpe et le poisson chat (Capsi et Avtalion, 1984 ; Miller, Sizemore et Clem, 1986).

Chapitre 3

Effets immunotoxiques des polluants de l'environnement chez les poissons

3.1 Polluants environnementaux

Depuis les années 60, un nombre impressionnant d'études ont mesuré l'efficacité des mécanismes de défense des poissons confrontés à divers polluants. Toutefois, il s'avère difficile de tirer une tendance particulière en raison de la variabilité entre les expositions. En effet, ces études divergent dans la durée et les conditions de l'exposition, l'espèce, l'âge, le sexe, la dose, le toxique étudié, la voie d'administration, l'origine tissulaire des cellules, etc. En conséquence, les effets immunitaires respectifs pour chacune des classes de polluants soient les métaux, BPC (biphényles polychlorés)/HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques), dioxines, pesticides et médicaments sont résumés dans les tableaux synthèses et se concentrent uniquement sur les truites à moins qu'aucune étude ne soit disponible pour cette espèce.

Tableau 1. Fonctions immunitaires affectées par les métaux chez la truite

Métal	Concentration	Fonction immunitaire affectée	Référence
Aluminium	10 µg/ml	Diminution de la chimiluminescence lors de la phagocytose	Elasser, Roberson et Hetrick, 1986
Arsenic	1-100 µg	Augmentation de la phagocytose à faible dose et vice versa	Thuvander <i>et al.</i> , 1987
Cadmium	31 et 62 µM (LD50 : 210)	Augmentation de la phagocytose d'une bille et plus	Ename <i>et al.</i> , 1991
	2 ppm	Augmentation de la phagocytose	Zelikoff <i>et al.</i> , 1995
	1 µg/ml	Diminution de la chimiluminescence avec le temps d'exposition	Elasser, Roberson et Hetrick, 1986
	1 et 5 µg/L	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la prolifération des lymphocytes T et B, de la phagocytose, de la flambée oxydative et des Ig M sériques • Stimulation de l'activité des lysozymes 	Sanchez-Dardon <i>et al.</i> , 1999
	0.7 et 3.6 µg/ml	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation du niveau d'anticorps sériques • Diminution de la prolifération des lymphocytes T et B 	Thuvander, 1989

Tableau 1. Suite des fonctions immunitaires affectées par les métaux chez la truite

Métal	Concentration	Fonction immunitaire affectée	Référence
Cadmium	1 et 10 µg/ml	Diminution légère de la production d'anticorps	Viale et Calamari, 1984
	0.05 et 0.1 mg/100g	Diminution du niveau d'anticorps sériques	O'Neill, 1981a
	1 ppM	Augmentation de la flambée oxydative	Chilmonczyk <i>et al.</i> , 1997
	2 ppM	Diminution progressive de la production de radicaux libres d'oxygène et du peroxyde d'hydrogène dans le temps (jours)	Zelikoff <i>et al.</i> , 1995
	31 et 62 µM	Augmentation de la production de radicaux libres d'oxygène (t = 5h)	Ename <i>et al.</i> , 1991
Chrome	50 et 200 µg/l	Aucun effet sur le niveau d'anticorps sériques	Viale et Calamari, 1984
	1 mg/l	Diminution sévère du niveau d'anticorps sériques primaires et secondaires	O'Neill, 1981b
	2340 et 4110 ppM	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'activité des lysozymes sériques • Augmentation de la flambée oxydative • Augmentation du pourcentage de phagocytose 	Gatta <i>et al.</i> , 2001
Cuivre	Indéterminée (terrain)	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution du leucocrite • Diminution du pourcentage de lymphocytes dans le sang 	Dethloff, Bailey et Maier, 2001
	2.1, 3.9, 5.1 ou 9.5 µg/L	Augmentation de la susceptibilité face au virus de nécrose hématopoïétique (IHNV)	Hetrick, Knittel et Fryer, 1979
	10 µg/ml	Diminution de la chimiluminescence lors de la phagocytose	Elasser, Roberson et Hetrick, 1986
	30 et 100 µg/ml	Aucun effet sur la production d'anticorps	Viale et Calamari, 1984
	0.1, 1.0, 10 ou 100 µg/ml	Diminution des cellules inductrices de plaque (PFC)	Anderson <i>et al.</i> , 1989
	2 900 µg/L	Diminution du niveau d'anticorps sériques	O'Neill, 1981b
	1 ppM	Diminution de la flambée oxydative	Chilmonczyk <i>et al.</i> , 1997

Tableau 1. Suite des fonctions immunitaires affectées par les métaux chez la truite

Métal	Concentration	Fonction immunitaire affectée	Référence
Mercure	10 ⁻⁴ et 10 ⁻⁵ M	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de la stimulation des lymphocytes T et B • Modulation de la réaction mixte de leucocytes • Diminution de la phagocytose de trois billes et plus • Inhibition de la flambée oxydative 	Voccia <i>et al.</i> , 1994
	0.1 et 0.5 µg/L	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la prolifération des lymphocytes T et B • Diminution de la phagocytose • Diminution de la flambée oxydative • Stimulation de l'activité des lysozymes • Diminution de l'immunoglobuline M (IgM) sérique 	Sanchez-Dardon <i>et al.</i> , 1999
Nickel	7 500 µg/L	Diminution du niveau d'anticorps sériques	O'Neill, 1981b
Plomb	0.01, 0.1, 0.2 et 0.3 mg/100g	Diminution du niveau d'anticorps sériques	O'Neill, 1981b
Zinc	10 et 50 µg/L	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la stimulation des lymphocytes T et B • Diminution de la phagocytose • Stimulation de l'activité des lysozymes • le zinc offre une protection lorsqu'il est combiné au cadmium ou au mercure 	Sanchez-Dardon <i>et al.</i> , 1999
	1 060 µg/L	Diminution du niveau d'anticorps sériques (contre un bactériophage)	O'Neill, 1981b

Tableau 2. Fonctions immunitaires affectées par les BPC, HAP et dioxines chez la truite

BPC/HAP/dioxines	Concentration	Fonction immunitaire affectée	Référence
Aroclor 1254	1-100 mg/Kg	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution du leucocrite sérique • Diminution de la pulpe blanche de la rate 	Nestel et Budd, 1975
Aroclor 1254	100 mg/Kg	Aucune incidence de tumeurs au foie	Hendricks <i>et al.</i> , 1977
Aroclor 1254	300 ppm	Aucun effet sur les cellules formatrices de plaque (PFC)	Cleland, McElroy et Sonstegard, 1988
Aroclor 1254/1260	0.38 à 6.0 µg/L	Augmentation (injection) ou diminution (immersion) de la susceptibilité à <i>Yersinia ruckeri</i>	Mayer, Mayer et Witt, 1985
20 espèces	Variable (Baie des Anglais)	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution du pourcentage de macrophages • Diminution du pourcentage de macrophages actifs • <i>Hipoglossoides platessoides</i> (plie américaine) 	Lacroix <i>et al.</i> , 2001
HAP	Indéterminée (Rivière Élizabeth)	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution sévère de la phagocytose • <i>Leiostomus xanthurus</i> et <i>Trinectes maculatus</i> 	Weeks et Warinner, 1984 et 1986
HAP	Indéterminée (Rivière Élizabeth)	<ul style="list-style-type: none"> • Suppression de l'activité NCC • <i>Fundulus heteroclitus</i> 	Faisal <i>et al.</i> , 1991a
HAP	Indéterminée (Rivière Élizabeth)	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la prolifération des lymphocytes T • Augmentation de la prolifération des lymphocytes B • <i>Leiostomus xanthurus</i> 	Faisal <i>et al.</i> , 1991b
Créosote (HAP)	3 et 10 µl/L	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition temporaire de la flambée oxydative (le premier mois) • Stimulation temporaire de la phagocytose (1^e semaine) 	Karrow <i>et al.</i> , 2001
TCDD (dioxine)	0.1-10 µg/Kg	Suppression partielle de la prolifération des lymphocytes	Spitsbergen <i>et al.</i> , 1986
	1 µg/Kg	Aucune modulation de la susceptibilité face au virus de nécrose hématopoïétique (IHNV)	Spitsbergen <i>et al.</i> , 1987
		Diminution de la résistance face au (IHNV)	Anderson <i>et al.</i> , 1983

TCDD : Tétrachlorodibenzo

Tableau 3. Fonctions immunitaires affectés par les insecticides chez la truite

Insecticide	Concentration	Fonction immunitaire affectée	Référence
Aldicarb (ca)	0.86 mg/L	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation des lymphocytes et thrombocytes sériques • Diminution des neutrophiles et monocytes sériques • <i>Puntius conchoni</i> Hamilton 	Gill, Pande et Tewari, 1991
Carbaryl (ca)	0.015-10.2 ppm	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la masse de la rate • Diminution du nombre de lymphocytes (rate) 	Walsh et Ribelin, 1975
DDT (oc)	0.5- 17.9 ppM	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la masse de la rate • Diminution du nombre de lymphocytes (rate) 	Walsh et Ribelin, 1975
	0.001-1 ppm	Diminution de la masse de la rate	King, 1962
	0.01-1 ppm	Induction de symptômes relativement aux infections fongiques	Allison <i>et al.</i> , 1963
	0.05- 15 ppm	Induction importante de symptômes relativement aux infections fongiques	Schoenthal, 1963
	10-50 mg/Kg	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution des cellules formatrices de plaque (PFC) et du niveau d'anticorps sériques • <i>Carassius auratus</i> 	Sharma et Zeeman, 1980
	18 et 75 mg/Kg	Induction sévère de tumeurs au foie	Halver, 1967
	80-19 200 mg/Kg	Induction sévère de tumeurs au foie	Ashley, 1970
Dieldrin (oc)	3.3-5.2 ppM	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la masse de la rate • Diminution du nombre de lymphocytes (rate) 	Walsh et Ribelin, 1975
Endosulfan (oc)	0.36 ppM	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la masse de la rate • Diminution du nombre de lymphocytes (rate) 	Walsh et Ribelin, 1975
	1- 10 ppm	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la prolifération des lymphocytes T (10 ppm) et B • Aucun effet sur l'activité NCC 	O'Halloran, Ahokas et Wright, 1996
Endrin (oc)	0.12-0.15 µg/L	<ul style="list-style-type: none"> • Aucun effet, pour la phagocytose et le facteur d'inhibition des macrophages • Diminution des cellules formatrices de plaque (PFC) • Diminution du niveau d'anticorps sériques 	Bennett et Wolke, 1987

ca : carbaryl ; oc : organochloré ; og : organophosphate ; DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane

Tableau 3. Suite des fonctions immunitaires affectées par les insecticides chez la truite

Insecticide	Concentration	Fonction immunitaire affectée	Référence
Esfenvalerate	10 ppm	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la prolifération des lymphocytes T et B • Aucun effet sur l'activité NCC 	O'Halloran, Ahokas et Wright, 1996
Lindane (oc)	1 mg/Kg	Diminution temporaire de la chimiluminescence lors de la phagocytose	Dunier <i>et al.</i> , 1994
	10 mg/Kg	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de la concentration sérique de lysozyme et céruplasmine • Diminution du nombre de lymphocytes B (rein) • Diminution de la prolifération des lymphocytes B 	Dunier <i>et al.</i> , 1995
	10, 50 et 100 mg/Kg	Suppression de l'activité des cellules B sécrétant des anticorps (ASC)	Dunier et Siwiki, 1994
	10, 50 et 100 mg/Kg	Diminution de la prolifération des lymphocytes B et aucun effet sur les lymphocytes T	Dunier <i>et al.</i> , 1994
Malathion (op)	13-178 ppM	Diminution des lymphocytes dans la rate	Walsh et Ribelin, 1975
	1- 10 ppm	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la prolifération des lymphocytes T (10 ppm) et B • Aucun effet sur l'activité NCC 	O'Halloran, Ahokas et Wright, 1996

ca : carbamates ; oc : organochlorés ; og : organophosphates

Tableau 4. Fonctions immunitaires affectées par les herbicides chez la truite

Herbicide	Concentration	Fonction immunitaire affectée	Référence
Atrazine	1.5-13.5 ppm	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la masse de la rate • Diminution du nombre de lymphocytes 	Walsh et Ribelin, 1975
	1 g/Kg	<ul style="list-style-type: none"> • Aucun effet • <i>Cyprinus carpio</i> 	Cossarini-Dunier <i>et al.</i> , 1988
2,4-D	0.35-430 ppm	Diminution de la masse de la rate	Walsh et Ribelin, 1975

2,4-D : acide 2,4-dichlorophenoxyacétique

Tableau 5. Fonctions immunitaires affectées par les fongicides

Fongicide	Concentration	Fonction immunitaire affectée	Référence
Bromure de méthyle	1.8 mg/L	<ul style="list-style-type: none"> • Induction de la nécrose des thymocytes • <i>Oryzias latipes</i> 	Wester, Canton, Dormans, 1988
PCP	5-75 ppm	<ul style="list-style-type: none"> • Réduction de la chimiluminescence selon une courbe dose-réponse • <i>Oryzias latipes</i> 	Anderson, 1992

PCP : Pentachlorophenol

Tableau 6. Fonctions immunitaires affectées par les agents alkylants chez la truite

Agent alkylant	Concentration	Fonction immunitaire affectée	Référence
Cyclophosphamide	1, 10 et 100 mg/Kg	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation du nombre de lymphocyte dans la rate • Augmentation des cellules formatrices de plaque 	Anderson, Roberson et Dixon, 1982
	50 mg/Kg	Aucun effet sur le niveau d'anticorps sériques	Maisse et Dorson, 1976
	400-500 mg/Kg	Diminution sévère du niveau d'anticorps sériques	Sakai, 1982
Mustargen (agent moutarde)	0.1 mg/poisson	<ul style="list-style-type: none"> • Prolongation du temps de rejet • <i>Fundulus heteroclitus</i> 	Hildemann et Cooper, 1963

Tableau 7. Fonctions immunitaires affectées par les antibiotiques chez la truite

Médicaments	Concentration	Fonction immunitaire affectée	Référence
Levamisole (antihelminthe)	5 mg/Kg	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation du pourcentage de phagocytose • Diminution des cellules formatrices de plaque (PFC) 	Siwiki, Anderson et Dixon, 1989
Oxitétracycline (antibiotique)	10 mg/Kg	Diminution des cellules formatrices de plaque (PFC)	van Muiswinkel <i>et al.</i> , 1985
	3333 ppm	Diminution des cellules formatrices de plaque (PFC)	Siwiki, Anderson et Dixon, 1989
	50 µg/ml	Inhibition de la chimiluminescence lors de la phagocytose	Wishkovsky, Roberson et Hetrick, 1987
Tétracycline (antibiotique)	50 µg/ml	Inhibition de la chimiluminescence lors de la phagocytose	Wishkovsky, Roberson et Hetrick, 1987

Tableau 8. Fonctions immunitaires affectées par les hormones chez la truite

Hormone	Concentration	Fonction immunitaire affectée	Référence
ACTH	2 unités/poisson	Modulation du nombre de lymphocytes et thrombocytes en circulation	Weinreb, 1958
	100 µg/ml	Augmentation de la flambée oxydative	Bayne et Levy, 1991
Carbachol	10 ⁻⁵ M	Augmentation de la chimiluminescence	Flory et Bayne, 1991
Cortisol	10-50 mg/kg	Induction d'infections fongiques et bactériennes	Pickering et Duston, 1983
	2-200 mg/kg	Diminution des cellules formatrices de plaque (PFC)	Anderson, Roberson et Dixon, 1982
	300 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution du nombre de lymphocytes en circulation après 36 heures 	Pickering, 1984
Cortisone	0.6-2 mg/Kg	<ul style="list-style-type: none"> • Aucun effet sur les neutrophiles • Diminution de l'inflammation et du saignement • Diminution du nombre de lymphocytes et thrombocytes en circulation 	Weinreb, 1958 Weinreb, 1959
		500 mg/Kg	Diminution des leucocytes dans le rein, la rate et le thymus
Hormone de croissance	0.25 µg/g (de saumon)	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de l'activité des lysozymes plasmatiques 	Yada, Azuma et Takagi, 2001
	2.5 µg/g (de bœuf)	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulation de la production de radicaux d'oxygène libres 	
Épinéphrine	10 ⁻⁴ et 10 ⁻⁶ M	Suppression de la chimiluminescence selon une courbe dose réponse	Flory et Bayne, 1991
Hydrocortisone	10-50 mg/poisson	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution du nombre de lymphocytes dans le rein, la rate et le thymus • Augmentation de l'incidence d'infections fongiques ou bactériennes 	Robertson <i>et al.</i> , 1963
Isoprotérenol	10 ⁻⁵ M	Suppression de la prolifération des lymphocytes T et B	Flory et Bayne, 1991
	100 µM	Diminution de la concentration de peroxyde d'hydrogène des macrophages actifs	Bayne et Levy, 1991

ACTH : Hormone adrénocorticotropine

Tableau 8. Suite des fonctions immunitaires affectées par les hormones chez la truite

Hormone	Concentration	Fonction immunitaire affectée	Référence
Kenalog 40	0.8 ou 8 mg/poisson	Augmentation de l'incidence d'infections fongiques ou bactériennes	Bullock et Stuckey, 1975
	20-200 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution du nombre de lymphocytes dans la rate • Diminution des cellules formatrices de plaque 	Anderson, Roberson et Dixon, 1982
Phényléphrine	10 ⁻⁵ M	Augmentation de la chimiluminescence	Flory et Bayne, 1991
	10-100 µM	Diminution de la flambée oxydative	Bayne et Levy, 1991
Propranolol	10 ⁻⁵ M	Stimulation de la production d'anticorps	Flory et Bayne, 1991

3.2 Le cas particulier du nonylphénol

3.2.1 Origine

Le nonylphénol constitue l'un des produits de la dégradation des alkylphénoléthoxylates (surfactants non ioniques). Ces derniers sont largement employés dans la production du plastique, du textile, du papier, de pesticides, de détergents, de produits cosmétiques, d'émulsifiants, de dispersants, de produits ménagers, etc (Arukwe *et al.*, 2000 ; Burkhardt-Holm, Wahli et Meier, 2000 ; Bennie *et al.*, 1997). En condition aérobie ou anaérobie, l'alkylphénol polyéthoxylate se transforme en sous produits tels que le 4-nonylphénol, le nonylphénol mono- et diéthoxylate (Bennie *et al.*, 1997 ; Environnement Canada, Santé Canada, 1999). De telles conditions se retrouvent entre autre dans les Stations d'épuration des eaux usées (Bennie *et al.*, 1997) qui constituent la principale voie d'entrée du nonylphénol dans l'environnement aquatique (Talmage, 1994). Le nonylphénol est classé à titre de métabolite critique puisqu'il est distribué de manière ubiquiste, il résiste à la biodégradation, il persiste dans les eaux de surface et il possède la propriété de se bioaccumuler dans les organismes aquatiques (Stoffel *et al.*, 2000 ; Tyler, Jobling et Sumpter, 1998). Chez la truite, le nonylphénol s'accumule dans le foie, le cœur, la peau, l'estomac, le gras, le rein, les muscles dorsaux et les branchies (Lewis et Lech, 1996 ; Coldham *et al.*, 1998).

3.2.2 Impact chez organismes aquatiques

Les branchies des poissons ainsi que l'épiderme sont en contact direct avec l'environnement aquatique et constituent le premier tissus exposés aux agresseurs (a)biotiques. Une augmentation significative de la densité des cellules ainsi qu'un accroissement important des microvillosités au niveau de l'aire apicale du plasmalemme des cellules à chlorure situées dans les branchies de truites lors d'une exposition par intermittence à 10 µg/L de nonylphénol ont été observés (Stoffel *et al.*, 2000). De plus, une exposition *in vitro* à de fortes doses de nonylphénol (50 µM) induit des altérations dégénératives au niveau des cellules de l'épiderme (Lamche et Burkhardt-Holm, 2000). D'autres expositions réalisées en bassin à des concentrations de nonylphénol similaires à celles retrouvées au sein de l'environnement (1 et 10 µg/L) ont permis de démontrer une corrélation entre le temps d'exposition, la concentration et le degré d'altération de l'épiderme.

Ce composé chimique est reconnu pour son potentiel oestrogénique chez les poissons, les oiseaux, les reptiles et les mammifères (Burkhardt-Holm, Wahli et Meier, 2000 ; Desbrow *et al.*, 1998 ; Tyler, Jobling et Sumpter, 1998). En effet, le nonylphénol imite l'œstrogène et se lie au récepteur oestrogénique affectant ainsi le développement et la reproduction des espèces aquatiques (Danzo, 1997). Une diminution modérée de la croissance des gonades dû à la présence d'œstrogènes synthétiques et naturels à des concentrations variant entre 0,005 et 0,05 µg/L a été observé chez des truites exposées dans le fleuve Saint-Laurent (Desbrow *et al.*, 1998). Le nonylphénol pourrait affecter le système endocrinien. Ainsi, on peut observer chez des truites mâles, une induction significative de la vitellogénine à partir d'une concentration de 10 µg/L de nonylphénol (Jobling *et al.*, 1996). Des truites mâles mises en cage dans l'Aire River (Royaume Uni) et exposées à des doses particulièrement élevées de nonylphénol/alkylphénoléthoxylate (30 µg/L) ont démontré une masse hépatique plus élevée, une induction de la vitellogénine ainsi qu'un retard marqué de la croissance des gonades (Sheahan *et al.*, 2002).

Le nonylphénol est susceptible de moduler les fonctions immunitaires. Ainsi, on a noté une accumulation importante de macrophages dans la peau de nombreux spécimens laissant supposer l'implication du système immunitaire suite à une agression externe au nonylphénol (Burkhardt-Holm, Wahli et Meier, 2000). Peu d'études ont établi un lien entre une exposition au nonylphénol

et les fonctions du système immunitaire chez les organismes aquatiques. Néanmoins, ce produit de dégradation présente un intérêt environnemental majeur.

En 1995, Environnement Canada a ajouté le nonylphénol à la liste des substances d'intérêt prioritaires pour fin d'évaluation par la loi canadienne de la protection de l'environnement (Bennie *et al.*, 1997). De même, une étude pilote a permis de démontrer une forte teneur de nonylphénol dans les sédiments de Pointe-du-Moulin-à-Vent en relation avec les rejets d'eaux usées de la Station d'épuration de la ville de Montréal (Bennie *et al.*, 1997). Enfin, le nonylphénol constitue l'objet d'une révision visant une norme de rejet environnementale à la baisse.

Chapitre 4

Effets des effluents chez diverses espèces de poissons

4.1 Indicateurs généraux

Les eaux usées comportent de nombreux toxiques qui ne présentent pas d'effets aigus mais qui peuvent conduire à une diminution à long terme de la survie des organismes aquatiques et ainsi entraîner un déclin des populations. En Suisse, près de 50% de toutes les espèces de poisson sont en danger d'extinction ou disparues possiblement en raison de la dégradation de la qualité du milieu aquatique notamment par le rejet des eaux usées (Escher *et al.*, 1999). Les effets toxiques chroniques associés aux effluents se traduisent par des dommages tissulaires et génétiques, une accumulation de contaminants persistants principalement dans le foie et le rein, une incidence accrue de maladies ou de cancers (Burkhardt-Holm, Bernet et Hogstrand, 1999 ; Malin *et al.*, 1988 ; White et Rasmussen, 1998).

Divers indicateurs sont utilisés pour d'établir l'impact du rejet des eaux usées traitées. Tout d'abord, en raison de la variation de la composition des effluents, de l'espèce, de l'âge ainsi que du temps d'exposition, il s'avère parfois difficile de tirer une tendance précise pour chacun des paramètres mesurés. Néanmoins, des études de terrain ont permis d'établir une incidence plus élevée de mortalité chez les groupes exposés aux effluents traités (Burkhardt-Holm, Escher et Meier, 1997 ; Escher *et al.*, 1999). Dans certain cas, on peut noter un taux de croissance plus faible chez les groupes exposés (Grizzle, Horowitz et Strenght, 1988).

L'exposition aux eaux usées traitées peut aussi se traduire au niveau comportemental par des performances de nage réduite (Carline, Benson et Rothenbacher, 1987). De même, des effluents provenant de l'exploitation minière ont aussi démontré une diminution de l'activité globale ou encore une augmentation du temps et de la fréquence de ventilation (Gerhard, 1998).

4.2 Organes externes

Les polluants retrouvés dans les effluents peuvent créer une érosion des certains tissus externes tels que la mâchoire et les nageoires (Escher *et al.*, 1999). De plus, les eaux usées peuvent avoir divers impacts au niveau de l'épiderme de poissons exposés en induisant un amincissement de la peau ou encore en empêchant certains types de cellules, particulièrement celles qui sécrètent le mucus, de se renouveler à un rythme normal (Burkhardt-Holm, Escher et Meier, 1997 ; Escher *et al.*, 1999). Une étude de terrain démontre clairement une infiltration prononcée de leucocytes (lymphocytes, macrophages et granulocytes) au niveau de l'épiderme des individus exposés. Toutefois, bon nombre de leucocytes démontraient un état apoptotique (Burkhardt-Holm, Escher et Meier, 1997).

L'épiderme et les branchies ont en commun plusieurs effets induits par les effluents dont l'érosion, l'hyperplasie, l'hypertrophie et la nécrose (Gerhard, 1998 ; Grizzle, Horowitz et Strenght, 1988). L'érosion des branchies et la fusion de lamelles s'avèrent accentuées chez les poissons exposés aux effluents municipaux et ces détériorations augmentent directement selon la concentration d'effluents employés (Carline, Benson et Rothenbacher, 1987). Les branchies des poissons exposés affichent couramment un renouvellement plus rapide des cellules à chlorure (Bucher et Hofer, 1993) ainsi que la séparation des cellules de soutien de l'épithélium (Escher *et al.*, 1999).

4.3 Organes internes

Les conséquences de l'exposition à des eaux usées se répercutent aussi au niveau des organes internes. En effet, le foie et la rate peuvent présenter des masses différentes comparativement au groupe témoin (Escher *et al.*, 1999 ; Grizzle, Horowitz et Strenght, 1988). Des signes d'inflammation au foie ainsi que la nécrose d'hépatocytes ont été observé et ce, selon une réponse dépendante de la concentration d'effluent (Bucher et Hofer, 1993). De plus, il semble que la nécrose de divers types cellulaires puisse être associée aux toxines bactériennes (Escher *et al.*, 1999). Dans certains cas, les poissons exposés présentent une infiltration de lymphocytes et de macrophages au niveau du foie (Escher *et al.*, 1999). Une étude réalisée au niveau de différents sites canadiens indique que les effluents ont un effet cytotoxique sur les hépatocytes et induisent le cytochrome P450 (en réponse à la présence de HAP) (Gagné et Blaise, 1999). Les

expositions aux effluents entraînent aussi une diminution du glycogène hépatique (Bucher et Hofer, 1993 ; Grizzle, Horowitz et Strenght, 1988).

Le rein des organismes exposés s'avère plus ou moins sensible et présente de façon inconsistante des effets tels que la nécrose et la dégénérescence en gouttelette de l'hyaloplasme. Toutefois, ces conséquences tendent à augmenter lorsque les organismes sont exposés à des concentrations plus élevées (Bucher et Hofer, 1993). Le mauvais fonctionnement d'organes principaux peut entraîner une fluctuation des paramètres sanguins (Bernet *et al.*, 2001).

4.4 Paramètres sanguins

L'exposition de truites aux eaux usées peut occasionner la modulation d'une foule de paramètres sériques qui servent à titre d'indicateurs environnementaux. Une étude a démontré que la métallothionéine, une protéine induite par la présence de métaux lourds dont l'argent, le cadmium, le zinc ou encore le cuivre, affiche une production significativement plus élevée chez les cellules à chlorure des branchies et les hépatocytes suite à une exposition aux eaux usées (Burkhardt-Holm, Bernet et Hogstrand, 1999 ; Gagné et Blaise, 1999). D'autres paramètres biochimiques tels que les protéines sériques totales, la créatinine et la phosphatase alcaline peuvent aussi subir des modulations importantes suite à une exposition aux effluents et ainsi traduire des dommages aux organes internes comme le rein, le foie et les branchies (Bernet *et al.*, 2000 et 2001).

Les eaux usées peuvent moduler tant à la hausse qu'à la baisse la synthèse d'enzymes tels que la lactate déshydrogénase, la créatine kinase ou encore l'aspartate aminotransférase modulant ainsi l'activité enzymatique (Escher *et al.*, 1999). Certaines de ces enzymes présentent une réponse reliée à la concentration d'effluent (Kosmala *et al.*, 1998).

4.5 Effets oestrogéniques

Les rejets des eaux usées traitées d'origine domestique, industrielle ou les deux à la fois sont principalement responsable des nombreux effets oestrogéniques observés chez les poissons d'eau douce aux Etats-Unis et au Royaume-Uni (Folmar *et al.*, 1996 ; Purdom , Hardiman et Bye, 1994). Parmi ces effets, une induction de la production de vitellogénine a été notée chez

différentes espèces (Allen *et al.*, 1999 ; Harries *et al.*, 1997 ; Routledge *et al.*, 1998), une réduction de la croissance des gonades, des anomalies testiculaires (Harries *et al.*, 1997 ; Lye *et al.*, 1997), une intersexualité (masculinisation et féminisation) (Jobling *et al.*, 1998), une inhibition de la ponte (Waring *et al.*, 1996), etc. De plus, des expositions spécifiques à divers contaminants présents dans les effluents dont les BPC, les HAP ou encore les contaminants organiques ont mis en évidence des effets nuisibles pour la reproduction (Johnson *et al.*, 1997 ; Spies et Rice, 1988). Des effets similaires ont été observés chez les poissons suite aux expositions d'effluent provenant des industries de pâte et papier (Vos *et al.*, 2000).

4.6 Effets immunitaires

Plusieurs facteurs peuvent influencer la réponse immunitaire dont l'âge, l'espèce, la maturité sexuelle, le statut social, le stress, la nourriture, la température, etc (Anderson, 1993 ; Wester, Vethaak et Van Muiswinkel, 1994). Les composés chimiques des effluents peuvent altérer les fonctions immunitaires chez les jeunes stades de vie ou encore réduire la résistance des adultes aux infections (Vos *et al.*, 2000). Encore peu d'études ont été réalisées concernant les effets des rejets des eaux usées sur le système immunitaire.

Toutefois, de nombreuses indications suggèrent que la pollution aquatique entraîne une plus grande susceptibilité face aux agents infectieux et peuvent indiquer que le système immunitaire des individus exposés pourrait être compromis (Khan et Thulin, 1991 ; Poulin, 1992). Une étude de terrain a mis en évidence une mortalité, une infestation parasitaire et des infections bactériennes accrues chez les individus exposés aux eaux usées (Escher *et al.*, 1999). De plus, une différence marquée entre les populations sauvages de truite localisées en aval et en amont d'une Station d'épuration des eaux usées a été observée (Bernet *et al.*, 2000). Toutefois, les infections ne présentent pas forcément une corrélation avec la concentration d'eaux usées employées.

Plusieurs chercheurs ont noté une augmentation de la fréquence de néoplasies chez les téléostéens et ce, particulièrement dans les régions contaminées par les eaux usées industrielles et municipales (Black et Baumann, 1991). Une étude récente a démontré que les composés oestrogéniques naturels ou synthétiques peuvent entraîner des lésions néoplasiques (Cooke et Hinton, 1999).

L'évaluation des fonctions immunitaires particulières telles que l'activité des macrophages, des lymphocytes, des neutrophiles ou encore des NCC chez les espèces de poisson suite à une exposition aux eaux usées demeure un sujet encore peu exploré. Néanmoins, on sait que les eaux usées des industries de pâte et papier (mélange complexe à teneur oestrogénique) engendrent une modulation des fonctions immunitaires tant au niveau innée que spécifique (Aaltonen *et al.*, 2000 ; Fournier *et al.*, 1998).

Plus précisément, une exposition de longue durée aux eaux usées a mis en évidence une diminution plasmatique très rapide (14 jours) des lymphocytes et une augmentation des neutrophiles chez le poisson chat (*Ictalurus punctatus*) (Grizzle, Horowitz et Strenght, 1988). De plus, une exposition *in vivo* aux effluents municipaux semble moduler la prolifération de diverses sous-populations de lymphocytes T ainsi que l'activité des macrophages selon la concentration d'effluent ainsi que le temps d'exposition (Escarné *et al.*, communication personnelle).

1993 ; Sousa *et al.*, 1985) peuvent entraîner le rejet de substances mutagènes telles que des HAP, des composés N-nitroso, des fécapentènes et de puissantes amines aromatiques via l'urine et les fèces (Hayatsu, Hayatsu et Wataya, 1986 ; de Kok *et al.*, 1992 ; Ohe, 1997). Le contenu mutagène des eaux de ruissellement contribue pour une fraction inférieure à 5% (Hoffman *et al.*, 1984 ; Latimer *et al.*, 1990). Enfin une forte tendance tend à souligner que la contamination génotoxique des eaux de surface est d'origine non industrielle particulièrement pour la ville de Montréal (White et Rasmusen, 1998).

La complexité de cette problématique environnementale réside dans le fait que peu de substances chimiques présentes dans les effluents municipaux ont été étudiées individuellement afin d'en déterminer leur toxicité ou encore la perturbation hormonale qu'ils peuvent engendrer. On estime à 63 000 le nombre de produits d'usage domestique qui sont utilisés universellement. À ce nombre s'ajoute entre 200 et 1000 nouveaux produits chimiques chaque année (Desbrow *et al.*, 1998).

5.2 Aspects généraux de la Station d'épuration de la ville de Montréal

La Station d'épuration de la ville de Montréal est localisée à la pointe est de l'île. Elle reçoit la totalité des eaux usées de la Ville de Montréal ainsi qu'une proportion importante des eaux pluviales. Le débit quotidien enregistré à la Station d'épuration est de l'ordre de 2 500 000 m³. À titre de comparaison, ceci correspond au débit de la rivière l'Assomption à certaines périodes de l'année. En temps de pluie, le débit peut tripler et dépasser la capacité maximale quotidienne de la Station d'épuration soit 7 600 000 m³ (Purenne, 2002a).

Les eaux usées sont acheminées à la Station d'épuration par l'intermédiaire de deux intercepteurs localisés sur les versants nord et sud de l'île. Le réseau de drainage est constitué à la fois d'un système d'égout séparatif et unitaire. En effet, la partie ouest de l'île de Montréal (1/3), présente un système séparatif formé d'un égout sanitaire et pluvial tandis qu'au centre et à l'est de l'île on retrouve un système unitaire combiné. L'inclinaison ouest-est des intercepteurs nord et sud facilite l'écoulement des eaux usées en direction de la Station d'épuration. Les eaux traitées par un procédé physico-chimique sont rejetées dans le fleuve Saint-Laurent précisément à l'île aux Vaches par un tunnel long de 4 kilomètres (figure1). Le temps de rétention du tunnel correspond

à une durée de 2 heures. Les eaux rejetées forment un panache concentré au centre du fleuve (Boulay et Boulay, 1999; Purenne, 2002b; Wagner, Brumelis et Gehr, 2002).

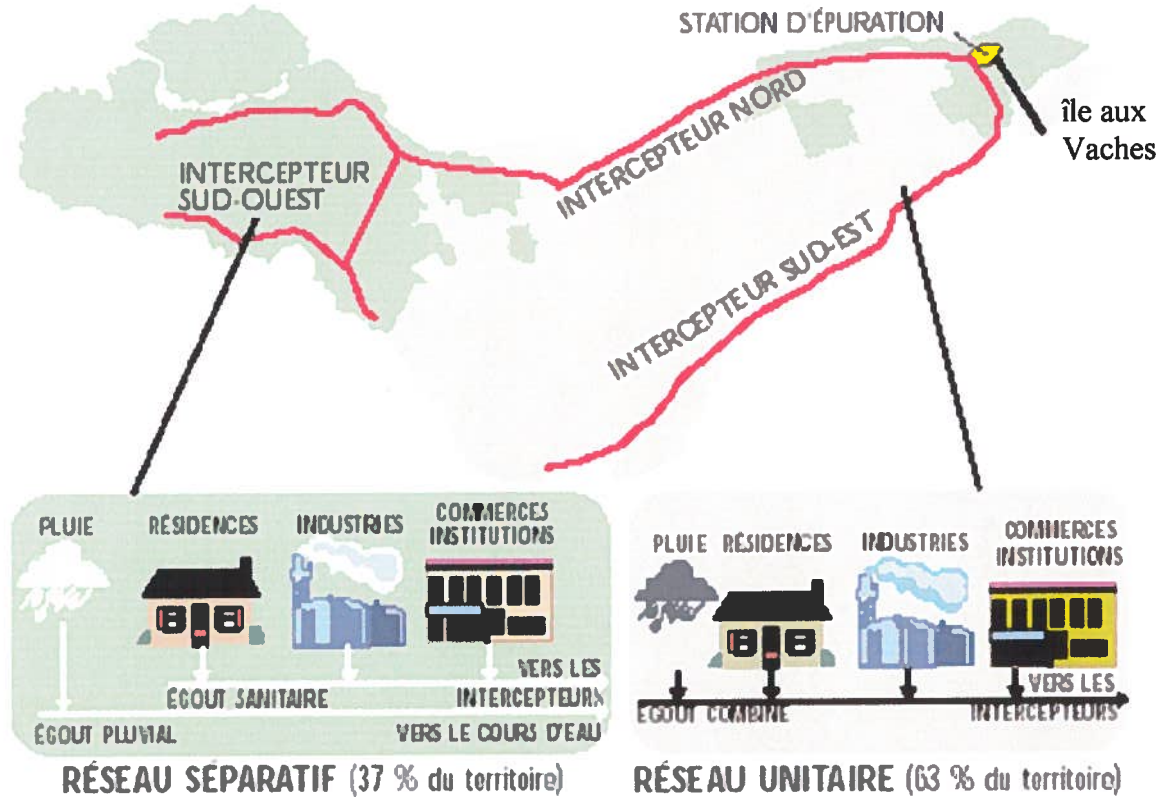


Figure 1. Réseau des intercepteurs de la Station d'épuration des eaux usées de la ville de Montréal.

6.3 Procédés de traitement des eaux usées

Les informations suivantes ont tous été tirées d'après le rapport produit en 2002a (Purenne). À leur arrivée à la Station d'épuration, les eaux usées sont remontées en surface à l'aide de motopompes à vitesse fixe et variable avant d'y subir un traitement physico-chimique (Purenne, 2002a).

En premier lieu, les eaux usées sont soumises à deux traitements physiques. Tout d'abord, une série de grilles procède à l'élimination de résidus en suspension (roches, morceaux de bois, contenants de plastique, etc.) dont la dimension est supérieure à 25 mm. Les résidus solides

récupérés par les grilles sont dirigés vers des tambours rotatifs pour en éliminer l'excédent d'eau puis acheminés vers un site d'enfouissement sanitaire.

Les eaux ainsi débarrassées des solides en suspension poursuivent leur course en direction de dessableurs aérés. Les 14 dessableurs permettent d'éliminer les particules de faible dimension, c'est-à-dire d'un diamètre et d'une densité respectivement supérieurs ou égale à 150 μm et 2,5. Les sables utilisés pour les fins de cette opération sont concentrés, lavés et acheminés vers la carrière de Demix (site d'enfouissement sanitaire).

Par la suite, les eaux usées subissent un traitement chimique. L'utilisation d'un coagulant tel que le chlorure ferrique ou l'alun ainsi qu'un polymère anionique visent à réduire les phosphates et les matières en suspension dans les eaux usées. Plus précisément, le coagulant permet de déstabiliser les colloïdes (phosphore sous forme de fines particules) qui cherchent à s'agglomérer et à s'alourdir tandis que le polymère tant à accélérer ce processus d'agglomération.

Les eaux traitées sont ensuite dirigées vers 21 bassins de décantation (décantation et écumage) où elles séjournent environ 2 heures avant d'emprunter le chemin menant à leur évacuation dans le fleuve Saint-Laurent. Les boues et écumes sont déshydratées, séchées, incinérées et transportées au site d'enfouissement de la carrière Demix.

Le traitement physico-chimique utilisé à la Station d'épuration favorise l'élimination d'une proportion importante de matière en suspension ainsi que de toxiques qui y ont adhéré. Néanmoins, les eaux usées traitées comportent toujours un niveau significatif de solides en suspension, de demande biochimique en oxygène (DBO), de demande chimique en oxygène (DCO) et de micro-organismes (Wagner, Brumelis et Gehr, 2002 ; Cejka, 2002).

5.4 Désinfection des eaux usées traitées

Avant de rejeter les effluents municipaux dans le fleuve, la Station d'épuration de la ville de Montréal n'effectue aucun traitement de désinfection visant l'élimination des pathogènes présents au sein des eaux usées traitées (Wagner, Brumelis et Gehr, 2002). Parmi les nombreux micro-organismes présents dans les effluents traités, on retrouve notamment des bactéries telles que les

coliformes totaux (dont coliformes fécaux), entérocoques fécaux et *Clostridium perfringens* ou encore des pathogènes tels que *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* et des virus entériques humains (Payment *et al.*, 2000).

La Station d'épuration de la ville de Montréal a érigé dans les années 80 des installations de désinfection au chlore. Toutefois, la Station s'est vue interdire la mise en fonction de ses installations en raison de la toxicité pour la faune et la flore aquatiques engendrée par la formation de nombreux sous produits de désinfection (Manning, Wilson et Chapman, 1996 ; Szal *et al.*, 1991 ; Wagner, Brumelis et Gehr, 2002). Trois traitements de désinfection (acide peracétique, ultraviolet, ozone) sont actuellement à l'étude afin d'en évaluer l'impact écotoxicologique, les propriétés désinfectantes et la possibilité de réduire ou d'augmenter la charge toxique des effluents traités.

Diverses études réalisées en Europe ont démontré les propriétés désinfectantes de l'acide peracétique pour traiter les eaux usées (Wagner, Brumelis et Gehr, 2002). Ce désinfectant présente les avantages suivants : un faible coût, simplicité, rapidité pour la mise en opération et la facilité à s'ajuster rapidement aux fluctuations du débit (Wagner, Brumelis et Gehr, 2002). Néanmoins, son efficacité pour désinfecter les effluents de la ville de Montréal semble équivoque (Wagner, Brumelis et Gehr, 2002 ; Cejka, 2002). De plus, la manipulation de ce produit nécessite des normes de sécurité élevées ainsi qu'un entreposage particulier.

L'irradiation ultraviolet empêche la reproduction des bactéries en s'attaquant à leur ADN (acide désoxyribonucléique) (Tremblay, 2002). Toutefois, il semble que les bactéries atteintes par ce procédé puissent se réactiver par un mécanisme de photoréactivation ou encore par un autre mécanisme de réparation, nommé « excision-réparation » (Gehr et Nicell, 1996). Ce procédé présente les avantages d'avoir une action désinfectante à faible dose, l'absence de sous-produits indésirables, il implique une technologie simple, une bonne fiabilité, aucun transport et entreposage de produits chimiques, etc (Tremblay, 2002). Par contre, l'irradiation UV présente une efficacité variable, compromet l'utilisation du chlorure ferrique à titre de coagulant, présente un entretien pouvant être complexe, implique la possibilité de perdre du mercure des lampes, exige un programme de disposition des lampes usées, etc (Tremblay, 2002).

L'ozone est un puissant oxydant reconnu pour son pouvoir germicide en plus de s'attaquer aux protéines des virus et à la membrane cellulaire des bactéries (Tremblay, 2002). L'ozone présente d'autres avantages tels que la réduction de la couleur, des odeurs, des pesticides, des organophosphorés résiduels et des détergents, la dégradation des inorganiques non ou peu biodégradables, aucun transport et entreposage de produits chimiques, etc. De plus, l'ozone génère peu de sous-produits indésirables (aldéhydes, cétones et acide carboxylique) (Gerh et Nicell, 1996). En contre-partie ce procédé exige l'implantation d'infrastructures majeures et de mise en œuvre complexe, un personnel spécialisé, une demande énergétique importante, une dose résiduelle minimale pour obtenir l'action désinfectante, la destruction de l'ozone résiduel avant son rejet dans l'écosystème, favorise une augmentation de la DBO etc (Tremblay, 2002 ; Gerh et Nicell, 1996).

5.5 Débordements du réseau

Lors de pluies abondantes ou encore de la fonte des neiges printanières, la Station d'épuration atteint sa capacité maximale de traitement et se voit donc obliger de rejeter le volume excédentaire sans en effectuer préalablement le traitement physico-chimique. Toutefois, la Station d'épuration priorise les secteurs qui présentent un risque environnemental plus critique grâce à un système de vannes. Ces débordements peuvent se répéter deux ou trois fois par semaine au cours de la période estivale. Cette absence de traitement entraîne des conditions d'insalubrité dans le fleuve Saint-Laurent qui mène à l'interdiction d'activités aquatiques en plus de causer un préjudice sérieux pour la faune et la flore (Langevin, 2002 ; Cejka, 2002). En effet, deux études réalisées en Suisse ont démontré que les rejets d'eaux usées non traitées découlant des précipitations abondantes additionnés à la toxicité des effluents traités peuvent produire diverses altérations chez les truites brunes (Burkhardt-holm, Escher et Meier, 1997 ; Escher *et al.*, 1999).

Environ 20% des débordements causées par les eaux pluviales échappent à la Station d'épuration de la ville de Montréal (Langevin, 2002). Néanmoins, la mise en place d'un système de contrôle en temps réel optimal et prédictif en août 2003 a permis de minimiser les rejets d'eaux usées non traitées. De plus, ce système sera optimisé par l'installation ultérieure de bassins de rétention (Langevin, 2002).

Chapitre 6

Contribution personnelle aux articles

Pour chacun des articles j'ai contribué à la mise en place des expositions ainsi qu'à l'entretien des aquariums. J'ai assuré la planification et la répartition des tâches lors des journées de sacrifice des poissons. De manière générale, ces longues journées de travail comportant trois essais immunologiques se sont déroulées sous ma supervision et ont impliqué ma participation à des étapes ou essais spécifiques. J'ai effectué la collecte des données en cytométrie de flux (phagocytose et essai de cytotoxicité) à l'aide d'une coéquipière. J'ai réalisé la récolte des cellules de la transformation blastique (essai immunologique) ainsi que la collecte des données. J'ai compilé les données à l'aide de stagiaires pour certaines expositions et effectué l'analyse statistique en utilisant le logiciel informatique Statistica. De même, j'ai effectué l'interprétation des résultats. Précisément, la mise en place de la journée de désinfection des effluents aux divers procédés de traitement (UV, ozone, PAA) a exigé une planification qui s'est étalée sur plusieurs mois. Ainsi, j'ai assuré la planification et la coordination des journées visant la préparation d'effluents qui ont été gelés pour des fins d'utilisation ultérieure. Enfin, j'ai écrit toutes les sections de chacun des articles.

Enfin, les résultats des équipes des chercheurs Daniel Cyr, Jacques Bernier, Sylvia Rubby, François Gagné vont s'ajouter ultérieurement aux résultats présentés dans ces articles.

RÉSUMÉ

L'utilisation des alkylphénols polyéthoxylates est largement répandue dans le monde entier. En condition anaérobie, les alkylphénols polyéthoxylates sont dégradés en sous produits tels que le 4-nonylphénol, le mono- et diéthoxylate. Les déficits en oxygène sont retrouvés en particulier dans les Stations d'épuration des eaux usées entraînant ainsi une accumulation de ces composés dans les environnements aquatiques où sont déversés ces eaux traitées. Le 4-nonylphénol appartient à la famille des surfactants non ioniques et est actuellement classé à titre de substance d'intérêt prioritaire en raison de sa distribution ubiquiste, sa résistance à la dégradation, sa persistance, sa toxicité, son accumulation dans les organismes aquatiques, etc. Le nonylphénol est reconnu pour avoir un large spectre d'effets oestrogéniques tant au niveau d'études *in vivo* que *in vitro*. L'objectif de cette étude consiste à établir les conséquences immunologiques d'une exposition à une concentration environnementale (0.85 µg/L) de nonylphénol. Les cellules du rein antérieur de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) juvéniles exposées 54 et 90 jours ont été prélevées afin de réaliser trois essais soient la phagocytose, l'essai de cytotoxicité et la transformation lymphoblastique. La phagocytose a été effectuée en utilisant des billes de latex fluorescentes tandis que l'essai de cytotoxicité a été effectué à l'aide de cellules cancéreuses nommées YAC-1. Ces deux essais ont été analysés en cytométrie de flux. La stimulation de la prolifération des lymphocytes a respectivement été réalisée à l'aide du PHA et du LPS. L'indice de prolifération des lymphocytes a été mesuré par l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN nouvellement synthétisé. Les truites exposées 54 jours ont démontré une diminution significative du pourcentage de phagocytose des macrophages actifs lorsque comparé au groupe témoin. Les truites exposées au nonylphénol ont démontré une activité cytotoxique exercée par les NCC significativement plus élevée lorsque comparée au véhicule de dilution (DMSO). La prolifération des lymphocytes stimulés par le LPS s'avère significativement plus élevée lorsque comparée au véhicule de dilution et au groupe témoin eau douce. La prolifération des lymphocytes stimulés par le PHA s'avère hautement stimulée lorsque comparée au groupe véhicule et groupe témoin (eau douce). Ces résultats suggèrent que le nonylphénol peut perturber le système immunitaire de truites arc-en-ciel juvéniles à une concentration environnementale. Cette immunomodulation pourrait être reliée à l'expression de récepteur de surface ou encore à la migration de cellules.

ABSTRACT

Alkylphenol polyethoxylates are widely used in the world. Under anaerobic conditions alkylphenol polyethoxylates are degraded as 4-nonylphenol, nonylphenol mono- and diethoxylate. Such conditions are found into sewage treatment plant (STP) effluent and it explains why these compounds are quite present in river and other aquatic environments that receive sewage discharges. 4-nonylphenol belongs to nonionic surfactants group and it represent a worrying pollutant because of it ubiquitous distribution, toxicity, resistance to degradation, persistence in surface water, ability to bioaccumulate into aquatic organisms, etc. Nonylphenol is recognized to have many estrogenic effects both *in vitro* and *in vivo* studies. However, little work has been done to characterize the impact on immune system of fish. To evaluate immune responses of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to nonylphenol at 0.85 µg/L (54 and 90 days exposure), three immune parameters were used: phagocytosis Assay, NCC Assay (corresponding to NK activity in mammal) and mitogenic Assay. Immunological functions were assessed on 15 trout from each group using the pronephros (head kidney). Phagocytosis by head kidney macrophages was measured by flow cytometry using fluorescent latex beads. Natural cytotoxic cells (NCC) were assessed using YAC-1 cancerous cells and measured by flow cytometry. Proliferative responses to PHA (T lymphocytes) and LPS (B lymphocytes) by head kidney lymphocytes were determined by [³H]-thymidine incorporation into replicating DNA. After 54 days exposure, trouts showed a significant decrease of active phagocytic activity (macrophages engulfing three beads and more) compared to control group. NCC activity demonstrated a significant increase of mortality percentage at 54 days when compared to its appropriate dilution vehicle (DMSO). [³H]-thymidine DNA incorporation was significantly increase when compared to the DMSO group and highly increased when compared to control group for B lymphocytes (LPS stimulation). T lymphocytes (PHA stimulation) showed highly significant increase when compared to control and DMSO groups. These results suggest that nonylphenol impair immune system of juvenile rainbow trout at environmentally relevant concentration.

INTRODUCTION

Alkylphenol polyethoxylates belong to nonionic surfactants group that are among the most widely used in the world (Talmage, 1994). These chemicals are commonly used in the manufacturing of plastic, paper, textile, pesticides, domestic detergents, dispersants, emulsifiants, cosmetic products, etc (Arukwe *et al.*, 2000; Burkhardt-Holm, Wahli and Meier, 2000; Bennie *et al.*, 1997). Under anaerobic conditions alkylphenol polyethoxylates are degraded as 4-nonylphenol, nonylphenol mono- and diethoxylate. Such conditions are found into sewage treatment plant (STP) effluent and it explains why these compounds are quite present in river and other aquatic environments that receive sewage discharges. Nonylphenol and ethoxylates occur in Laurentian Great Lakes basin and in St. Lawrence River (Bennie *et al.*, 1997). Nonylphenol represents a worrying pollutant because of its ubiquitous distribution, toxicity, resistance to degradation, persistence in surface water, ability to bioaccumulate into aquatic organisms, etc (Arukwe *et al.*, 2000; Stoffel *et al.*, 2000; Tyler, Jobling and Sumpter, 1998).

Nonylphenol can bioaccumulate into skin, gills, fat, dorsal muscles, stomach, heart, kidney and liver in rainbow trout (Lewis and Lech, 1996; Coldham *et al.*, 1998). In vitro exposure to high dose of nonylphenol (50 μM) or lower doses (10 $\mu\text{g/L}$) demonstrate respectively degenerative alterations or epidermis abnormalities in rainbow trout (Lamche and Burkhardt-Holm, 2000 ; Burkhardt-Holm, Wahli and Meier, 2000). Trout exposed intermittently to 10 $\mu\text{g/L}$ of nonylphenol revealed a highly significant increase of chloride cell fractional surface area into gills (Stoffel *et al.*, 2000).

Nonylphenol is known to be estrogenic for fishes, birds, reptiles and other mammals (Burkhardt-Holm, Wahli and Meier, 2000; Desbrow *et al.*, 1998; Tyler, Jobling and Sumpter, 1998). Precisely, nonylphenol competes estrogen for receptor binding and adverse effects could occur on reproduction and development (Danzo, 1997). Significant induction of vitellogenin was observed in male trout exposed at 10 $\mu\text{g/L}$ or more of nonylphenol (Jobling *et al.*, 1996). Field exposure into St. Lawrence River demonstrates a moderate diminution of gonads growth in trout (Desbrow *et al.*, 1998). Male trout exposed in the Aire River (United Kingdom) to strong concentration of

nonylphenol/alkylphenoethoxylate (30 µg/L) showed an increase in hepatosomatic index, vitellogenin index and an important delay for gonads development (Sheahan *et al.*, 2002).

Nonylphenol effects present a major environmental concern. In 1995, Environment Canada added nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates to the Priority Substances List (Bennie *et al.*, 1997). Precisely, high concentration of nonylphenol found into St. Lawrence River sediments at “Pointe-du-Moulin-à-Vent” was attributed to discharge of sewage treatment plant of Montreal Island (Bennie *et al.*, 1997).

Immune system is extremely vulnerable to environmental pollutants (Fournier *et al.*, 2000; Sanchez-Dardon *et al.*, 1999; Luebke *et al.*, 1997; Dunier, 1994; Zelikoff, 1993). This system can be used as indicator of immunotoxicity or as biomarker to assess fish health. Immunocompetence can be evaluated using a number of immunological parameters (Fournier *et al.*, 2000; Brousseau *et al.*, 1998). Rainbow trouts possess non-specific and specific immune mechanisms that ensure their defence against pathogens or contaminants (Anderson and Zeeman, 1995; Zelikoff, 1994). Macrophages have an important function in engulfing and destroying foreign particles while natural cytotoxic cells (NCC) concentrate their activities on virus infected cells or cancerous cells destruction (Fournier *et al.*, 2000; Faisal *et al.*, 1991). Specific immune system can be monitor with mitogenic assay that evaluates immunocompetence of lymphocytes to proliferate when exposed to stimulus (Brousseau *et al.*, 1998).

Little is known about immune responses in fish when they are exposed to nonylphenol or alkylphenol polyethoxylates. The goal of this study is to evaluate the immunotoxic potential of nonylphenol at environmental concentration found into St. Lawrence River in juvenile rainbow trout.

Determination of viability

Viability was determined using trypan blue dye exclusion (0.4%) (Sigma Chemical Co.). Viable and dead cells were determined microscopically with an hemacytometer (Bright-line, PA, USA).

Phagocytosis Assay

All assays were done using the protocol describes in Brousseau *et al.* (1998). A duplicate of 500 μ l volume of each cellular suspension was adjusted to 1×10^6 cells/ml in 5 ml polypropylene round bottom tubes (Sarstedt). Fluorescent latex beads ($d= 1,716 \mu$ n) (Polysciences, PA, USA) were added to the cell suspensions in order to respect 100 : 1 (beads : cell) ratio. Tubes were covered with paraffin and protected against light. Cells and beads were incubated at 15 °C for 18 h. Following incubation period, cellular suspensions were layered separately over 3 ml of RPMI supplemented with 3% of bovine serum albumin (BSA) (Sigma Chemical Co.) and 10% of SVF. Elimination of free beads was performed by centrifugation at $150 \times g$ at 4°C for 8 minutes. Cell pellets were then resuspended in 0.5 ml of 0.5% formaldehyde (Sigma Chemical Co.) diluted in Hematall (Becton Dickinson, CA, USA). Cells were analysed by flux cytometry using a FACScan (Becton Dickinson, CA, USA) and 5 000 events were recorded. Analyses were done using two biomarkers defined as M1 and M2 that correspond respectively to the percentage of phagocytes containing one bead or more and percent of phagocytes containing three beads or more. These biomarkers represent the percentage of macrophages (M1) and active phagocytic activity of macrophages (M2).

Natural cytotoxic cells (NCC) Assay

The first part of the assay consists in target cells labelling. Initial mortality of YAC-1 cells should be less than 5%. An aliquot of 1 ml of 1×10^7 YAC-1 tumor cells were vigorously thrown into 10 μ l of 3 mM perchlorate 3,3-dioctadecyloxacarbocyanine (DIO) (Sigma Chemical Co.) contained into 15 ml sterile polypropylene conical tube. Cellular suspension was agitated and incubated at 37 °C with 5% of CO₂ for 20 minutes (tube was partially unscrew). After incubation, cells were washed twice and adjusted to 1×10^6 cells/ml.

Contact between effector and target cells was done into 5 ml polypropylene round bottom tubes with two different ratios corresponding to 20:1 (effector:target) and 80:1. Equal volumes of

Alkylphenolic compounds are known to bind to estrogenic receptors and disrupt endocrine system inducing histological or biochemical effects. The interactions between endocrine, nervous and immune systems are not well understood but, it is known that binding activity of alkylphenols can modulate a number of biological responses such as gene transcription or cell growth (Whitte *et al.*, 1994). The mechanism explaining the effects of nonylphenol or its metabolites on immune system presented into this study could be related to particular interactions between immune and endocrine systems reflecting such modulation.

The Canadian "no observed effects level" (NOEL) suggested for the nonylphenol is 1 $\mu\text{g/L}$ (Environnement Canada, Santé Canada, 1999). Unfortunately, the immune system in rainbow trout seem to be impacted at a lower concentration. Our results suggest that biological systems have different sensitivity level and they also indicate that some biological functions can be modulated unlike other function at the same concentration. In regard to this study, the Canadian environmental law will benefit from reviewing this NOEL concentration.

Environmental risk related to nonylphenol is coming principally from sewage treatment plant (STP). It is estimated that 60% of the APEOs are evacuated by STP also that more than 40% of STP exceed the concentration of 1 $\mu\text{g/L}$ (Naylor *et al.*, 1992 ; Environnement Canada, Santé Canada, 1999). During treatment process, NPE are readily degraded to relatively stable metabolites such as NP that tend to accumulate in sewage sludge or suspended matter, whereas others, such as short chain APEOs and carboxylic derivatives (APECs) are more soluble (White *et al.*, 1994). These soluble metabolites are estrogenic and can impact aquatic wildlife. Moreover, extensive research should be done concerning STP to document the actual concentration and to compare them to the NOEL concentration established. Future experiments should integrate other biomarker (immune, endocrine, etc) at nonylphenol concentration below and above NOEL level. In conclusion, specific and non specific immune system of juvenile rainbow trout seem to be impaired by short time exposure to environmental nonylphenol, however for longer exposures recovery or reverse effects are seen.

REFERENCES

- ANDERSON D.P. and M.G. Zeeman. 1995. Immunotoxicology in fish. In G. Rand (ed.). Fundamentals of aquatic toxicology: Effets, environmental fate, and risk assessment. Washington D.C. : Taylor and Francis, p. 371-404.
- ARUKWE A., R. Thibaut, K. Ingebrigtsen, T. Celius, A. Goksøyr and J.P. Cravedi. 2000. “*In vivo* and *in vitro* metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*)”. Aquatic toxicol., vol. 49, no. 249, p. 289-304.
- BENNIE D.T., C.A. Sullivan, H.B. Lee, T.E. Peart and R.J. Maguire. 1997. “Occurrence of alkylphenols *et al.* kylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and upper St. Lawrence River”. Sci. Tot. Environ., vol. 193, p. 263-275.
- BROUSSEAU P., Y. Payette, B. Blakley, H. Boermans, D. Flipo, H. Tryphomonas and M. Fournier. 1998. Manual of immunological methods. Boston, USA : CRP Press, 141 p.
- BURKHARDT-HOLM P., T. Wahli and W. Meier. 2000. “Nonylphenol affects the granulation pattern of epidermal mucous cells in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*”. Ecotox. Environ. Safety, vol. 46, p. 34-40.
- COLDHAM N.G., S. Sivapathasundaram, M. Dave, L.A. Ashfield, T.G. Pottinger, C. Goodall and M.J. Sauer. 1998. “Biotransformation, tissue distribution, and persistence of 4-nonylphenol residues in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)”. Drug Metab. Dispo., vol. 26, p. 347-353.
- DANZO B.J. 1997. “Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins”. Environ. Health. Perspect., vol. 105, p. 294-301.
- DESBROW C., E.J. Routledge, G. Brighty, J.P. Sumpter and M. Waldock. 1998. “Identification of oestrogenic chemicals in STW effluent. I. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening”. Environ. Sci. Technol., vol. 32, p. 1549-1558.
- DUNIER M., A.K. Siwicki, J. Scholtens, S.D. Molin, C. Vergnet and M. Studnicka. 1994. “Effect of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity. III. Effect on non-specific immunity and B lymphocyte functions”. Ecotox. Environ. Saf., vol. 27, p. 324-334.
- ENVIRONNEMENT CANADA, SANTÉ CANADA. 1999. "Loi canadienne sur la protection de l'environnement. Liste des substances d'intérêt prioritaire, Rapport d'évaluation : le nonylphénol et ses dérivés éthoxylés." 105p.
- FAISAL M., B.A. Weeks, W.K. Vogelbein and R.J. Hugett. 1991. “Evidence of aberration of the natural cytotoxic cell activity in *Fundulus heteroclitus* (Pisces : Cyprinodontidae) from the Elizabeth River, Virginia”. Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 29, p. 339-351.

- FOURNIER M., D. Cyr, B. Blakley, H. Boerman and P. Brousseau. 2000a. "Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics". Amer. Zool., vol. 40, p. 212-220.
- FOURNIER M., D. Cyr, P. Brousseau and H. Tryphonas. 2000b. Biomarkers in immunotoxicology : Evolutionary perspective. In L. Guillett and D. Crain (ed.). Environmental Endocrine Disruptors. NY : Taylor and Francis Publishers. 335 p.
- GHANMI Z., M. Rouabhia, M. Alifuddin, D. Troutaud and P. Deschaux. 1990. "Modulatory effects of metal ions on the immune response of fish : *in vivo* and *in vitro* influence of MnCl₂ on NK activity of carp pronephros cells". Ecotoxicol. Environ. Safety, vol. 20, p. 241-245.
- HARRIS D.T. and R. Kapur. 1996. "Molecular characterization of an evolutionarily conserved function-associated molecule (FAM) on *Natural killer* (NK) cells". In J.S. Stolen, T.C. Fletcher, C.J. Bayne, C.J. Secombes, J.T. Zelikoff, L.E. Twerdok et D.P. Anderson (ed.). Modulators of immune responses : The evolutionary trail. Volume 2. Fair Haven, N.J. : SOS Publications, p. 167-182.
- JOBLING S., D.A. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen and J.P. Sumpter. 1996. "Inhibition of testicular growth in trout exposed to environmental estrogens". Environ. Toxicol. Chem., vol. 15, p. 194-202.
- LAMCHE G. and P. Burkhardt-Holm. 2000. "Nonylphenol provokes a vesiculation of the golgi apparatus in three fish epidermis cultures". Ecotox. Environ. Safety, vol. 47, p. 137-148.
- LEWIS S.K. and J.J. Lech. 1996. "Uptake, disposition, and persistence of nonylphenol from water in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". Xenobiotica, vol. 26, no. 8, p. 813-819.
- LUEBKE R.W., P.V. Hodson, M. Faisal, P.S. Ross, K.A. Grasman and J. Zelikoo. 1997. "Aquatic pollution-induced immunotoxicity in wildlife species". Fund. Appl. Toxicol., vol. 37, p. 1-15.
- NAYLOR G.C., J.P. Mierure, J.A. Weeks, F.J. Castaldi and R.R. Romano. 1992. "Alkylphenol ethoxylates in the environment". J. Am. Oil Chemists Soc., vol. 69, p. 695-703.
- O'HALLORAN K., J.T. Ahokas and P.F.A. Wright. 1996. "*In vitro* responses of fish immune cells to three classes of pesticides". In J.S. Stolen, T.C. Fletcher, C.J. Bayne, C.J. Secombes, J.T. Zelikoff, L.E. Twerdok and D.P. Anderson (ed.). Modulators of immune responses : The evolutionary trail. Volume 2. Fair Haven, N.J. : SOS Publications, p. 535-538.
- SANCHEZ-DARDON J., I. Voccia, A. Hontela, S. Chilmonczyk, M. Dunier, H. Boermans, B. Blakley and M. Fournier. 1999. "Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vivo*". Environ. Toxicol. Chem., vol. 18, no. 7, p. 1492-1497.

SHEAHAN D.A., C.G. Brighty, M. Daniel, S. Jobling, J.E. Harries, M.R. Hurst, J. Kennedy, S.J. Kirby, S. Morris, E.J. Routledge, J.P. Sumpter and M.J. Waldock. 2002. "Reduction in the estrogenic activity of treated sewage effluent discharge to an English river as a result of decrease in the concentration of industrially derived surfactants". Environ. Toxicol. Chem., vol. 21, p. 515-519.

SOTO A.M., H. Justica, J.W. Wray and C. Sonnenschein. 1991. "P-Nonylphenol : an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene". Environ. Health Perspect., vol. 92, p. 167-193.

STOFFEL M.H., T. Wahli, A.E. Friess and P. Burkhardt-Holm. 2000. "Exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to nonylphenol is associated with an increased chloride cell fractional surface area". Schweiz Arch. Tierheilkd., vol. 142, no.5, p. 263-7.

TALMAGE S.S. 1994. Environmental and human safety of major surfactant. In Non ionic surfactants. New York : The soap and detergent Association, p.11-16.

TYLER C.R., S. Jobling and J.P. Sumpter. 1998. "Endocrine disruption in wildlife : a critical review of the evidence". Crit. Rev. Toxicol., vol. 28, p. 319-361.

VOS J.G., E. Dybing, H.A. Greim, O. Ladefoged, C. Lambré, J.V. Tarazona, I. Brandt and A.D. Vethaak. 2000. "Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to european situation". Crit. Rev. Toxicol., vol. 30, no. 1, p. 71-133.

WHITE R., S. jobling, S.A. Hoare, J.P. Sumpter and M.G. Parker. 1994. "Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic". Endocrinology, vol. 135, no. 1, p.175-182.

YAMASHITA U., T. Sugiura and E. Kuroda. 2002. "Effect on endocrine disrupters on immune responses *in vitro*". J. UQEH., vol. 24, p. 1-10.

ZELIKOFF J.T. 1993. "Metal pollution-induced immunomodulation in fish". Annual Rev. Fish Dis., p. 305-325.

ZELIKOFF J.T. 1994. "Fish Immunotoxicology". In J.H. Dean, M.I. Luster, A.E. Munson and I. Kimber (ed.). Immunotoxicology and immunopharmacology. NY : Raven Press, p. 71-95.

Table 1. Measures of weights, lengths and cellular concentrations at 54 and 90 days exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to nonylphenol (0.85 µg/L) and appropriate dilution vehicle (n = 15). (means ± S.E.)

Measures	Control		DMSO		Nonylphenol	
	54 Days	90 Days	54 Days	90 Days	54 Days	90 Days
Weight (g)	21.3 ± 1.8	29.4 ± 2.2	19.0 ± 1.7	29.7 ± 2.8	18.8 ± 1.1	34.7 ± 3.0
Length (cm)	12.2 ± 3.8	13.4 ± 3.3	11.7 ± 3.2	13.1 ± 4.5	11.9 ± 2.2	14.0 ± 2.9
Cell. Conc. (10 ⁶ cells/ml)	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.2	2.4 ± 0.4	1.6 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.6 ± 0.2

Table 2. Mortality percentage of cancerous cells YAC-1 at 54 and 90 days exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to nonylphenol (0.85 µg/L) and appropriate dilution vehicle (n = 15). Highly significant differences between exposure time for each group. (mean ± S.E.)

Ratios	Control		DMSO		Nonylphenol	
	54 Days	90 Days	54 Days	90 Days	54 Days	90 Days
20 : 1	52.8 ± 2.6	13.3 ± 2.6	48.1 ± 2.8	12.4 ± 1.6	58.9 ± 2.8*	11.1 ± 1.1
80 : 1	56.9 ± 4.0	19.7 ± 5.3	49.9 ± 2.3	21.1 ± 5.0	59.9 ± 3.2	17.3 ± 1.9

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Phagocytic activity of pronephros macrophages in rainbow trouts exposed to nonylphenol (0.85 $\mu\text{g/L}$), dilution vehicle and tap water. (a) 54 days exposure. * indicates significant difference from tap water groups. (b) 90 days exposure. * indicates significant difference from vehicle groups. Data (mean \pm S.E.) are express as percentage of phagocytes (M1) and active macrophage activity (M2).

Figure 2. Mitogenic response of head kidney lymphocytes stimulated with LPS and PHA in rainbow trout exposed to nonylphenol (0.85 $\mu\text{g/L}$), dilution vehicle and tap water. (a) 54 days exposure. * indicates significant difference from vehicle group. ** indicates highly significant difference from vehicle group. ” indicates highly significant differences from tap water group. (b) 90 days exposure. (stimulation index \pm S.E.)

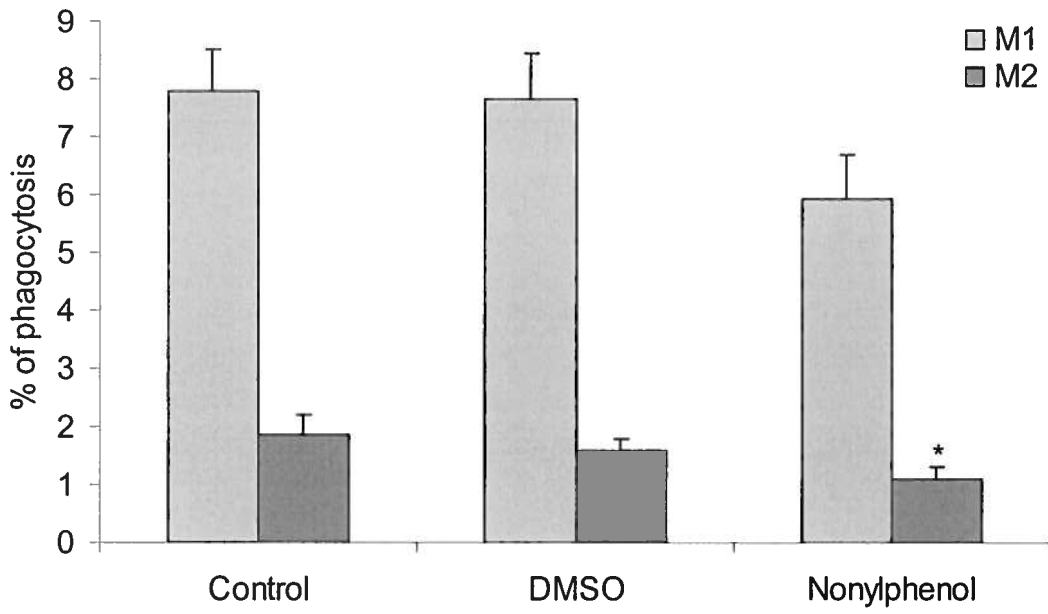


Figure 1a

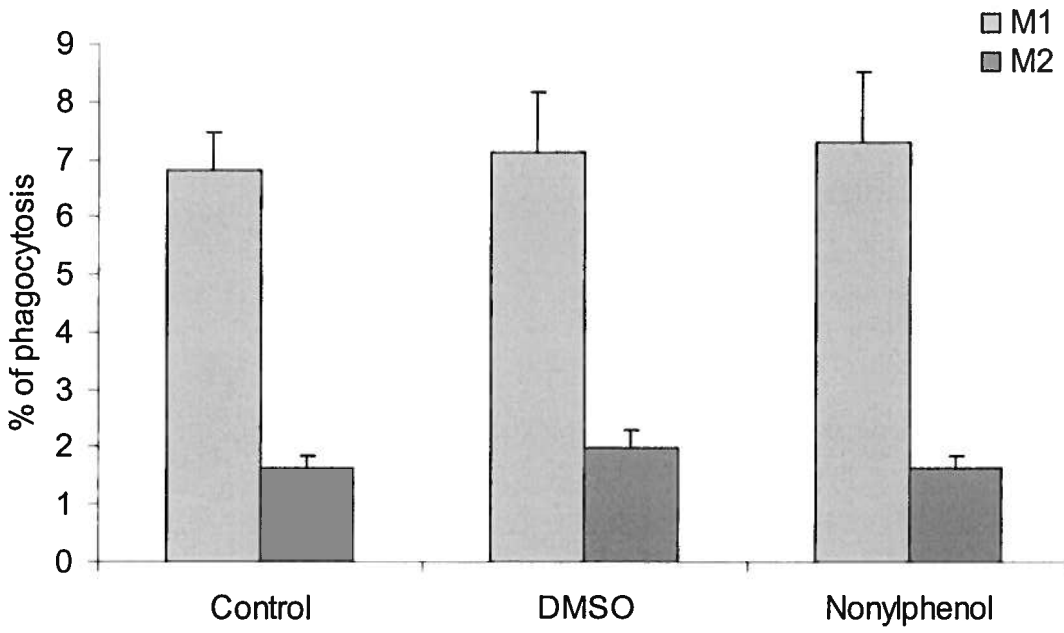


Figure 1b

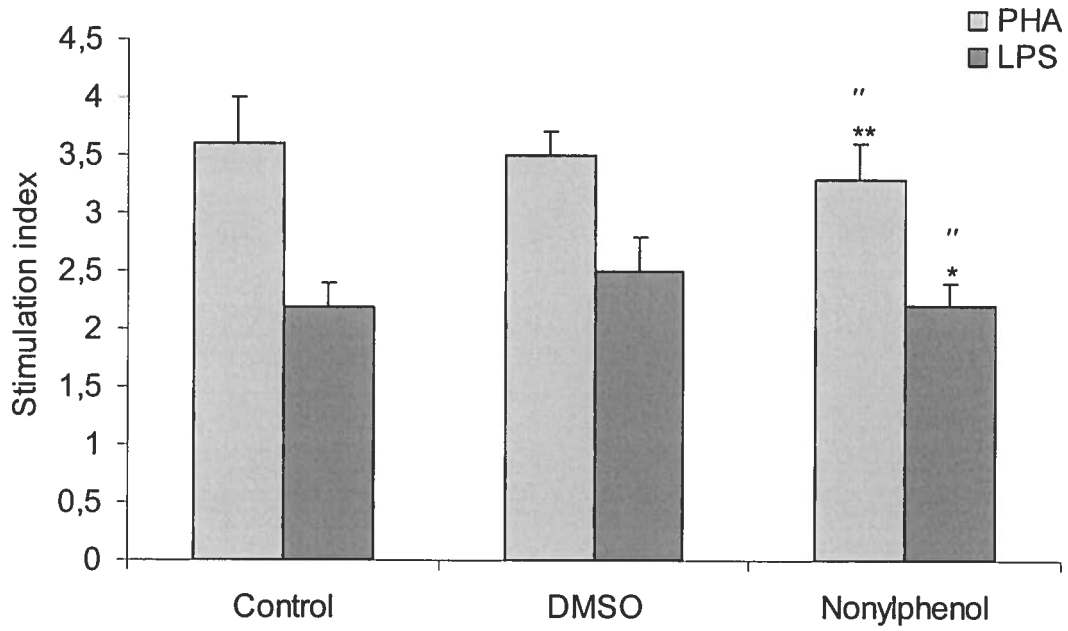


Figure 2a

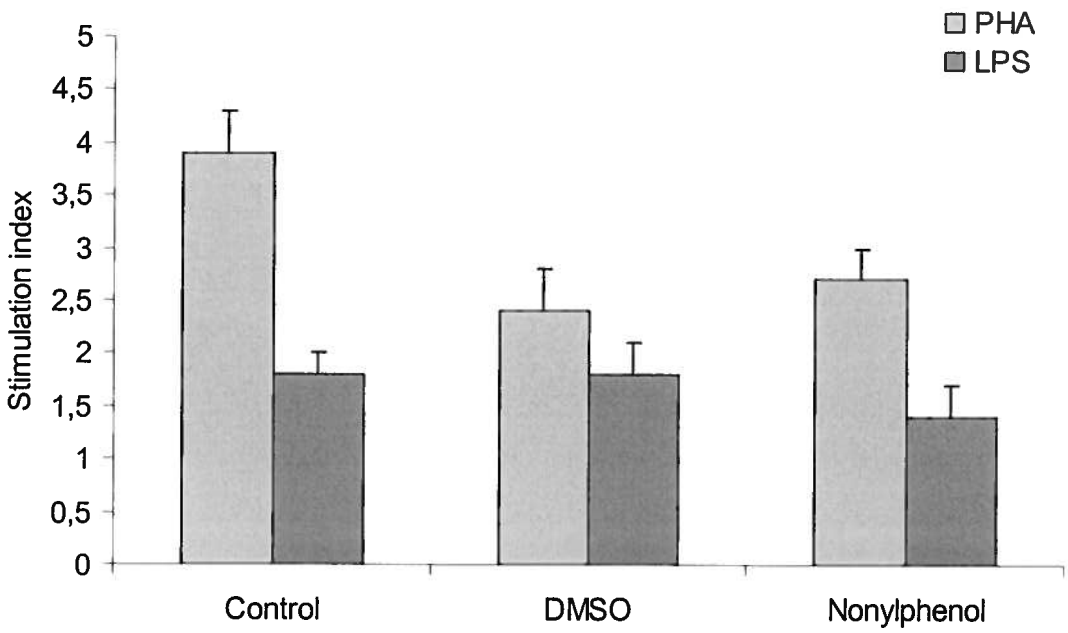


Figure 2b

EFFECTS OF SEWAGE EFFLUENT ON THE IMMUNE SYSTEM OF RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

¹Hébert, N., ²Ruby, S., ¹Bernier, J., ¹Cyr, D., ³Gagné, F., ³Blaise, C., ⁴Pellerin, J.,
*¹Fournier, M.

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

² Concordia University, 1455 de Maisonneuve Blvd. W, Montreal, QC, Canada, H3G
1M8.

³ Centre Saint-Laurent, Environnement Canada, 501 McGill, Montréal, Québec, H2Y 2E7

⁴ ISMER, 310 Allées des Ursulines, Rimouski, Québec, G5L 3A1

* : Author to whom correspondance should be addressed. INRS-Institut Armand-Frappier 245 Hymus Boul. Pointe-Claire, Québec, Canada H9R 1G6. Phone: (514)-630-8824; (514)-630-8850; E-mail: michel.fournier@inrs-iaf.quebec.ca

Key words: sewage effluent, St-Lawrence River, xenobiotics, immune system, fish, rainbow trout, phagocytosis, macrophages, NCC, NK, cytotoxicity, lymphocytes, mitosis, suspended matter or solid, SPM, DOM

RÉSUMÉ

Les effluents municipaux constituent un mélange complexe de contaminants reconnus pour perturber le système immunitaire et endocrinien des vertébrés. Le but de cette étude consiste à déterminer l'effet des effluents municipaux sur le système immunitaire de truites arc-en-ciel juvéniles (*Oncorhynchus mykiss*). Les fractions soluble et insoluble de l'effluent ont aussi été évaluées afin de différencier l'impact des polluants solubles et insolubles (riche en micro-organismes). L'exposition aux fractions soluble et insoluble s'est déroulée sur une période de 28 jours. La conception expérimentale de l'exposition aux diverses concentrations d'effluent est la suivante : une exposition de 54 et 90 jours aux concentrations 0.01%, 0.1%, 1% et 10% ainsi qu'une exposition de 40 jours aux concentrations 1%, 10%, 25% et 50%. Chaque traitement dénombre 15 truites. Les compétences immunitaires des truites ont été évaluées à l'aide de trois essais soient la phagocytose, la cytotoxicité induite par les cellules effectrices NCC et la transformation lymphoblastique. La phagocytose a été effectuée en utilisant des billes de latex fluorescentes tandis que l'essai de cytotoxicité a été effectué à l'aide de cellules cancéreuses nommées YAC-1. Ces deux essais ont été analysés en cytométrie de flux. La stimulation de la prolifération des lymphocytes a respectivement été réalisée à l'aide du PHA et de LPS. L'indice de prolifération des lymphocytes a été mesuré par l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN nouvellement synthétisé. Les truites exposées aux fractions soluble et insoluble ont démontré une stimulation de la phagocytose par les deux fractions. Ce résultat indique que les contaminants hydrophiles et hydrophobes (adhèrent aux particules en suspension) peuvent perturber le système immunitaire non spécifique. Les poissons exposés à une concentration d'effluent de 1% ont démontré une diminution significative du pourcentage de phagocytose à 54 et 90 jours d'exposition. Les truites exposées 40 jours (1%-50%) ont démontré une stimulation de l'activité des phagocytes pour toutes les concentrations. Les truites exposées 54 jours ont démontré une stimulation de la prolifération des lymphocytes stimulés par le PHA et le LPS pour toutes les concentrations à l'exception de 0.1%. La prolifération des lymphocytes stimulés par le PHA de s'avère significativement réduite pour chacune des concentrations après 90 jours d'exposition. Aucun effet n'a été observé pour les lymphocytes stimulés par le LPS. Les expositions de type courbe dose-réponse n'indique aucun effet pour l'essai de cytotoxicité. En général, la réponse immunitaire de truites exposées aux eaux usées municipales est reliée à divers facteurs tels que la composition de l'échantillon (nouveau à chaque deux jours), la concentration des contaminants et le temps d'exposition.

ABSTRACT

Municipal sewage effluents contain a complex mixture of contaminants known to disrupt immune and endocrine functions. The present study was designed to determine the impact of municipal effluent on the immune system of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Soluble and insoluble fractions of the effluent were also tested to discriminate the effects between soluble pollutants and the insoluble moiety rich in microorganisms. Trout were exposed to low concentrations of sewage effluent (0.01% - 0.1% - 1% - 10%) for a period of either 54 or 90 days and high concentration of sewage effluent (1% - 10% - 25% - 50%) during 40 days. Moreover, trout (n=15/treatment) were exposed to soluble and insoluble portion of effluent for a period of 28 days. Three immune parameters were used to evaluate trout health status: phagocytosis, Natural cytotoxic cells (corresponding to NK activity in mammal) and blastogenesis of lymphocytes with mitogens. Immunological functions were assessed on 15 trout from each group using the pronephros (head kidney). Phagocytosis by head kidney macrophages was measured by flow cytometry using fluorescent latex beads. Natural cytotoxic cells (NCC) were assessed using YAC-1 cells and measured by flow cytometry. Proliferative responses to PHA and LPS by head kidney cells were determined by [³H]-thymidine incorporation into replicating DNA. Fish exposed to 1% sewage effluent concentration for 54 and 90 days demonstrated a decreased of phagocytosis activity, while fish exposed to high dose response demonstrated stimulation of phagocytic activity for all concentrations. Cells stimulated by PHA and LPS in fish exposed 54 days to Montreal sewage effluent concentrations demonstrated stimulation for all concentrations except 0.1% of sewage effluent. Cells stimulated by PHA were significantly lower for all concentrations in fish exposed 90 days to sewage effluent. No effect was observed for cells stimulated by LPS at 90 days exposure. No effect was found for NCC activity. Exposure to (in)soluble fractions demonstrated an immunostimulation of phagocytosis activity by both fractions. This result indicates that hydrophilic and hydrophobic (sorption on suspended particles) contaminants could impair innate immune system of fish. These results indicate that the overall immune response of rainbow trout is modulated by municipal sewage effluent and that the soluble portion presents a certain level of biological activity.

INTRODUCTION

The Montreal Urban Community Wastewater Treatment Plant (MUCWTP) is located at the eastern end of Montreal Island in the province of Quebec, Canada. These wastewaters are mixture of toxics and biologic colonies coming from several sources characterized as commercial, institutional, industrial, sanitary discharge, underground infiltration and surface runoff (White and Rasmussen, 1998). MUCWTP average flow is 2 500 000 m³/d however, during raining period it can reach a maximal capacity of 7 600 000 m³/d (Purenne, 2002). Montreal wastewaters are treated with a physicochemical process (primary treatment) (Purenne, 2002). This treatment consists in gate and grit removal and sedimentation assisted by coagulation with alum and/or ferric chloride and anionic polyelectrolyte. MUCWTP does not disinfect wastewater before discharging it into St-Lawrence River via a 4-Km underground tunnel (Wagner, Brumelis and Gehr, 2002). Even if an important proportion of toxics are removed with the elimination of suspended particles, the final effluent demonstrates a significant level of suspended solid (SS), biochemical oxygen demand (BOD), chemical oxygen demand (COD) and microorganisms (Wagner, Brumelis and Gehr, 2002 ; Payment *et al.*, 2000). Montreal wastewaters are considered to be genotoxic and toxicity is mainly associated to non industrial sources (White and Rasmussen, 1998).

During the treatment process, some pollutants partially or totally resist to their biodegradation and induce adverse effects on wildlife health (Desbrow *et al.*, 1998). These toxics present into the effluent might affect survival of exposed organisms via chronic exposure (White and Rasmussen, 1998). Chronic exposures to sublethal concentrations of pollutants are known to predispose fish to several health diseases (Dunier and Siwicki 1993). Single chemical studies have been frequently investigated in fish compared to complex mixture of pollutants. Consequently, there are few studies concerning the effects of wastewater discharges on wildlife.

Nevertheless, in some case, field studies demonstrate a higher mortality or reduced growth in exposed organisms (Burkhardt-Holm, Escher and Meier, 1997 ; Escher *et al.*, 1999 ; Grizzle, Horowitz and Strenght, 1988). External and internal organs as skin, fins, jaw, gills, lever and kidney are impacted by sewage effluents. Those tissues show specific alterations or infection

diseases, erosion, hyperplasia, hypertrophy, necrosis, inflammation, leukocytes infiltration, etc (Burkhardt-Holm, Escher and Meier, 1997 ; Bucher and Hofer, 1993 ; Escher *et al.*, 1999 ; Gagné and Blaise, 1999 ; Grizzle, Horowitz and Strenght, 1988). Some organ alterations are related to effluent concentrations (Bucher and Hofer, 1993 ; Carline, Benson and Rothenbacher, 1987). The modulation of the concentration in serum parameters directly reflects damage in specific organs (Casillas, Meyers and Ames, 1983). Several proteins (metallothionein, blood urea nitrogen, bilirubin, creatinine, etc) or enzymes (alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase, creatinine kinase, etc) in fish have been found at an abnormal level following effluent exposure (Bernet *et al.*, 2000 et 2001 ; Burkhardt-Holm, Bernet and Hogstrand, 1999 ; Escher *et al.*, 1999 ; Gagné and Blaise, 1999). In some case, modulations of serum parameters are related to the effluent concentration (Kosmala *et al.*, 1998).

In United States and United Kingdom, wastewaters from industrial and domestic origin are known to be responsible for many estrogenic effects (Folmar *et al.*, 1996 ; Purdom, Hardiman and Bye, 1994 ; Vos *et al.*, 2000). The principal estrogenic alterations are vitellogenin modulation depending on the sex of the organisms, reduced gonad growth, testicular abnormalities, inhibition of spawning, intersex, etc (Allen *et al.*, 1999 ; Harries *et al.*, 1996 ; Jobling *et al.*, 1998 ; Lye *et al.*, 1997 ; Routledge *et al.*, 1998 ; Waring *et al.*, 1996).

Exposure to xenobiotic compounds present into the effluent can disrupt immune function of young life stage and compromise survival of adults (Vos *et al.*, 2000). Several contaminants are associated with an increase of diseases in wild fish population (Vos *et al.*, 1996). Trout exposed to the effluent in the Alte Aare River experienced higher infestation by parasites and infection by bacteria (Escher *et al.*, 1999). Moreover, prevalence of neoplastic diseases was observed in teleost in sites contaminated by municipal and industrial wastewaters (Black and Baumann, 1991).

To our knowledge there are any studies evaluating (non)specific immune function of fish exposed to sewage effluent. A field work done by our team (spring 2000) evaluated the impact of Montreal sewage effluent on the immune system of the spottail shiner (*Notropis hudsonius*). Using phagocytosis as biomarker, this study demonstrated a stimulation of phagocytosis

percentage for all downstream sites (exposed fish). Moreover, active macrophage activity was significantly higher for one downstream site (Bout de l'île) and increased for three other downstream sites when compared to the reference sites (3) (Ménard *et al.*, submitted). Another study done by our team indicates that trout exposed 15 days to Montreal sewage effluent under controlled conditions demonstrated a significant increase of phagocytic activity to lower dilution of effluent. Moreover, certain sub-population of T-lymphocytes demonstrated significant adverse effects when trout were exposed to various concentrations of Montreal effluent. After 45 days exposure, phagocytic activity was significantly decreased at lower concentration of effluent and the sub-population of T lymphocytes demonstrated adverse effect when compared to 15 days exposure. These results indicate that modulation of immune system of trout exposed to Montreal sewage effluent depends on effluent concentration and time exposure (Escarné *et al.*, submitted).

The aim of this study is to characterize the impact of wastewaters on the immune system of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Precisely, this study will evaluate the immunotoxic effects of various sewage effluent concentrations with different exposure times. Finally, establish the contribution of soluble and insoluble fraction of effluent xenobiotics to the immunotoxicity of the wastewaters.

Rainbow trout have been chosen for this study because this species is considered to be more sensitive to pollutants and is frequently used as a sentinel species in environmental challenges (Katz, 1961). Immune system of rainbow trout is also well characterized. The head kidney or pronephros is an important lymphoid organ in teleosts and exhibit high hematopoietic capacity (Zapata, 1981). The kidney share structural and functional resemblances to the bone marrow of higher vertebrates (Zapata, Chiba and Varas, 1996). Several types of cells such as macrophages, B and T lymphocytes, non specific cytotoxic cells (NCC) or antigen-binding cells have been found in this primary organ (Zapata and Cooper, 1990).

Rainbow trout can exhibit both innate and specific immune responses (Watts, Munday and Burke ; 2001). Innate immunity is performed principally by macrophages, granulocytes and NCC cells. Phagocytosis by macrophages and granulocytes internalize, kill and digest foreign microorganisms (Secombes, 1996). NCC cells have been shown to be capable of spontaneous

cytotoxic action against fish and mammalian cancerous cell line, virus infected cells and protozoan parasites (Evans and Jaso-Friedmann, 1994). NCC cells can induce both apoptic and necrotic lesions in target cells (Greenlee, Brown and Ristow, 1991). Specific immune responses are mediated principally by B and T lymphocytes (Maning and Nakanishi, 1996). This system is unique because of the production of specific molecules, the antibodies. Globally, this response consists to recognize foreign particles, produce intercellular messengers, divide and secrete specific molecules (Maning and Nakanishi, 1996).

MATERIAL AND METHOD

Animal care

Juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Aquipro, Qc, Can), with a body weight around 10 g, were acclimated at 15 °C and 16h/8h (day/night) for two weeks in 90L glass aquaria containing chlorine free tap water (soluble and insoluble portion experiment and dose-response concentrations between 0.01% and 10%). For experiments trout were transferred into 45L glass aquaria. Fish were fed daily at a rate between 1 and 2 % body weight with commercial G0.7 or G1 food (Aquipro) depending on the weight of trout. Half of water was renewed each two days (static conditions).

Water parameters

During the experiment, water quality parameters such as temperature, dissolved oxygen, PH and conductivity have been collected with Multi 340i set (Hoskin Scientific, Mtl, Qc). Also, data concerning nitrite, nitrate and ammonia have been collected with commercial kits (Haggen, Mtl, Qc).

Experimental design

1. Dose-response exposure

In the first experiment, five groups of 30 juvenile rainbow trout were exposed to 0.01%, 0.1%, 1% and 10% to Montreal effluent concentrations for a period of either 54 or 90 days. In the second experiment, five groups of 15 juvenile rainbow trout were exposed to 1%, 10%, 25 % and 50 % dilution of Montreal effluent for a period of 40 days. Each experiment had its appropriate chlorine free tap water control group.

2. Exposure to soluble and insoluble fraction

Fish were exposed at 10% concentration to gross treated effluents (uncentrifuge), insoluble fraction (15 mg/L) and soluble fraction of Montreal sewage effluents for a period of 28 days. These fractions were separated by centrifugation of gross treated sewage effluents at 10 000 RPM (15 652 X g) for 10 minutes into 250 ml polypropylene bottles (Nalgene Brand Products, Rochester, NY, USA) specific to the ultracentrifuge (LG-80) (Biotechnology instrumentation,

Albertville, Minnesota, USA). The pellet corresponds to the insoluble fraction and is composed of microorganisms, particles and xenobiotics that adhered to suspended matter. The supernatant corresponds to the soluble fraction and it is characterized as xenobiotics present into liquid effluent. Moreover soluble fraction has been filtered on a 0.22 μm steritop filter (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) to eliminate residual suspended matter. Pellet *aliquot* were distributed into 5 ml sterile polypropylene round bottom tubes (Ultident, St-Laurent, Qc, Can). Uncentrifuged effluent and supernatant were separately distributed into 3 L polypropylene bottles (Nalgene Brand Products). All aliquot were freeze at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. In order to reduce heterogeneity, this operation was done on a 100 L of Montreal sewage effluent sample.

Preparation of cell suspensions

At sampling time, fish were killed by 0.1% of MS-222 (Boreal Laboratories, Ont., CAN.) and measured for weight and length. Anterior kidney was removed aseptically and mashed with a 2 ml glass grinder (Wheaton Scientific, New Jersey, USA) containing 1 ml of sterile RPMI 1640 (Bio Media, Qc, CAN) supplemented with heparin (10 U/ml) (Organon Teknika, Ont. CAN.), HEPES (10 mM) (Bio Media), penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100mg/ml) (Bio media) and 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (SVF) (Bio Media). The cellular suspension then was transferred to a 15 ml sterile polypropylene conical tube (17- 120 mm) (Sarsted, NC, USA) and final volume was completed to 5 ml total with RPMIc.

Leukocytes purification

Cellular suspension (5ml) was laid down over 5 ml of Lympholyte Poly (Cedarlane Laboratories, Ont., CAN) contained into a 15 ml sterile polypropylene conical tube. Suspension was centrifuged at $275 \times g$ during 30 minutes. Leukocytes between the two layers were aspirated with sterile polypropylene pipettes (Sarstedt) and transferred to a 15 ml sterile polypropylene conical tube. The cells were washed twice and adjusted to 1×10^6 cells/ml using supplemented RPMI (without heparin).

Determination of viability

Viability was determined using trypan blue dye exclusion (0.4%) (Sigma Chemical Co., MO, USA). Viable and dead cells were determined microscopically with an hemacytometer (Bright-line, PA, USA).

Phagocytosis Assay

All assays were done using the protocol describes in Brousseau *et al.* (1998). A duplicate of 500 μ l volume of each cellular suspension was adjusted to 1×10^6 cells/ml in 5 ml polypropylene round bottom tubes (Sarstedt). Fluorescent latex beads (diameter between 1,716 μ n and 1.87 μ n) (Polysciences, PA, USA) were added to the cell suspensions in order to respect 100 : 1 (beads : cell) ratio. Tubes were covered with paraffin and protected against light. Cells and beads were incubated at room temperature for 18 h. Following incubation period, cellular suspensions were layered separately over 3 ml of RPMI supplement with 3% of bovine serum albumin (BSA) (Sigma Chemical Co.) and 10% of SVF. Elimination of free beads was performed by centrifugation at $150 \times g$ at 4°C for 8 minutes. Cell pellets were then resuspended in 0.5 ml of 0.5% formaldehyde (Sigma Chemical Co.) diluted in Hematall (Becton Dickinson, CA, USA). Cells were analysed by flux cytometry using a FACScan (Becton Dickinson, CA, USA) and 5 000 events were recorded. Analyses were done using two biomarkers defined as M1 and M2 that correspond respectively to the percentage of phagocytes containing one bead or more and percent of phagocytes containing three beads or more. These biomarkers represent the percentage of macrophages (M1) and active phagocytic activity of macrophages (M2).

Natural cytotoxic cells (NCC) Assay

The first part of the assay consists in target cells labelling. Initial mortality of YAC-1 cells should be less than 5%. An aliquot of 1 ml of 1×10^7 YAC-1 tumor cells were vigorously thrown onto 10 μ l of 3 mM perchlorate 3,3-dioctadecyloxacarbocyanine (DIO) (Sigma Chemical Co.) contained into 15 ml sterile polypropylene conical tube. Cellular suspension was agitated and incubated at 37°C with 5% of CO_2 for 20 minutes (tube was partially unscrew). After incubation, cells were washed twice and adjusted to 1×10^6 cells/ml.

Contact between effector and target cells was done into 5 ml polypropylene round bottom tubes with different ratios. The ratios utilized for (in)soluble portions, dose-response concentrations between 0.01% and 10% and finally for dose-response concentrations between 1% and 50% were respectively 10:1 (effector:target), 20:1 and 40:1; 20:1 and 80:1 and finally 20:1 and 40:1. Equal volumes of cellular suspensions were centrifuged at 350 x g for 5 minutes. Cell pellets were then resuspended in 150 µl propidium iodide (PI) (Sigma Chemical Co.) and 150 µl of supplemented RPMI. Cells were centrifuged at 350 x g for 5 minutes, covered with paraffin, protected from light and incubated at 15 °C for 18 hours. Cells were analysed by flow cytometry using a FACScan and 2 500 events were recorded. Analyses were done using a live gate on YAC-1 cells. Data are expressed in percentage of mortality

Mitogenic Assay

Preliminary tests were done to determine optimal mitogens concentration for cells proliferation. Mitogens were prepared with sterile L-15 (for dose-response concentrations between 0.01% and 10%) or RPMI-1640 (other) medium supplemented with HEPES (10 mM), penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100mg/ml), 10% (v/v) SVF and 2-mercaptoethanol (5µl/l) (Sigma Chemical Co.). In 96 wells round bottom microplates (Sarstedt), 100 µl of 1×10^6 cells/ml were incubated with 20 µg/ml of phytohemagglutinin (PHA) (Sigma Chemical Co.) or 200 µg/ml de lipopolysaccharide (LPS) (Sigma Chemical Co.). Unstimulated cells were incubated with supplemented L-15 or RPMI-1640 medium only. Samples were tested in triplicate. After 72 hours incubation 0.5 µCi of [³H]-methyl thymidine (ICN Biomedicals, CA., USA) was added in each well and incubated for 18 hours more. Cells were harvested with a semi-automatic cell harvester (Skatron Instruments As, Lier, Norway) and transferred on fibreglass filter (Skatron Instruments As). Radioactivity was determined with β-scintillation counter (LKB Wallac 1217 Rackbeta) (ChemGen Corp., MD, USA). Data were expressed as stimulation index (SI).

Statistical analysis

Significant differences between groups were determined by Tuckey test (ANOVA). Preceding Tuckey test, normality and homogeneity of variance were assessed using respectively Kolmogorov-Smirnov test and Levene test. If the event one of these two conditions were not respected, Tuckey test was replaced by a non parametric test, variance of Mann-Withney.

Significance was established at $p < 0.05$. All analyses were done using Statistica computer software.

RESULTS

Water Parameters

All parameters were stable for the dose response exposure. However dissolved oxygen was decreased for the 50% effluent group (between 65% and 75%). This diminution was directly related to the concentration of effluent. Moreover, all parameters were stable for the exposure to soluble and insoluble fractions. Nitrite was above the recommended concentration at the beginning of the experiment but get down quickly.

Dose-response between 0.01% and 10%

Weights, lengths and cellular concentrations

There were no significant differences between the groups after 54 or 90 days exposure (Table 1 and 2).

Phagocytosis

Fish exposed to 1% sewage effluent concentration for 54 days demonstrated a decreased of phagocytosis activity both M1 and M2 biomarkers when compared to the control group (figure 1). After 90 days exposure, percentage of active macrophages having engulfed three beads or more (M2) was significantly lower for 1% sewage effluent concentration when compared to the control group (Figure 2).

NCC Assay

NCC assay did not work after 54 days exposure (data not shown). Fish exposed 90 days to sewage effluent concentrations did not show significant differences between the groups for all ratios (20:1 – 80:1) (Table 3).

Mitogenic Assay

For this assay, data are expressed as a ratio obtained by dividing stimulated cells by unstimulated cells for each treatment. Cells stimulated by PHA and LPS in fish exposed 54 days to Montreal sewage effluent concentrations demonstrated high significant increased at 0.01% and 10%

effluent concentrations. At 1% effluent concentration, cells stimulated by LPS and PHA respectively showed significant and highly significant increase in cells proliferation. No effect was observed in trout exposed to 0.1% effluent concentration at 54 days exposure (figure 3).

Cells stimulated by LPS in fish exposed to sewage effluent concentrations showed any significant difference between the groups at 90 days exposure. Cells stimulated by PHA demonstrated adverse effect at 90 days exposure compared to 54 days exposure for all sewage effluent concentrations. Precisely, cells proliferation stimulated by PHA was significantly decreased in trout exposed to 0.1 % and 10% sewage effluent concentrations. Trout exposed to 0.01 % and 1% sewage effluent concentrations demonstrated a high significant decreased for cells stimulated by PHA proliferation (Figure 4).

Dose-response between 1% and 50%

Weights, lengths and cellular concentrations

There were no significant differences between the groups for mass and length after 40 days exposure (Table 4). Cellular concentrations of fish exposed to 1% concentration of sewage effluents demonstrated a highly significant increase (Table 4).

Phagocytosis

Fish exposed to sewage effluent concentration for 40 days demonstrated an increased of phagocytosis activity for both M1 and M2 biomarkers when compared to the control group (figure 5). Precisely, percentage of phagocytosis (M1) demonstrated highly significant increased for all concentrations when compared to the control group. The percentage of active macrophages having engulfed three beads or more (M2) was significantly increased for lowest concentrations (1% and 10%) and showed a highly significant increased for 25 and 50 % of sewage effluent concentrations when compared to the control group.

Soluble and insoluble fractions

Weights, lengths and cellular concentrations

There were no significant differences between the groups after 28 days exposure (Table 5).

Phagocytosis

Based on previous data base and pilot studies, we decided to use only phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity (Fournier *et al.*, 2000). Fish exposed to gross treated effluents and soluble and insoluble fractions show increased of phagocytosis activity for M1 and/or M2 biomarkers. Precisely, the percentage of phagocytosis (M1) and active macrophages having engulfed three beads or more (M2) demonstrated a significant increase for raw effluent when compared to the control group (chlorine free tap water). Moreover, fish exposed to the insoluble fraction of effluent showed a high significant increase for both markers compared to soluble fraction that demonstrated a stimulation only for M1 biomarker (figure 6).

DISCUSSION

Effluent dose-response exposure

Phagocytosis Assay

Phagocytic activity was modulated independently of exposure conditions. Dose response between 0.01% and 10% indicated suppression at 1% concentration whereas dose response between 1% and 50% demonstrated stimulation for all concentrations. Adverse effects noted between low dose-response exposure (0.01%-10% / 54 and 90 days) and high dose-response exposure (1%-50% / 40 days) suggest that longer exposure period to low effluent concentrations provoke a suppression in phagocytosis while a shorter exposure period to higher concentrations stimulates macrophages activity. A similar time effect was found by Escarné (personal communication) when juvenile rainbow trout were exposed to various municipal sewage effluent concentrations. There are several studies indicating a time modulation caused by pollutants in relation with phagocytosis or the destruction of foreign particles in fish (Dunier *et al.*, 1995 ; Lacroix *et al.*, 2001 ; Pegg and Iwama, 1996 ; Zelikoff *et al.*, 1995). This discrepancy could also be explained by significant differences in the composition and concentration of contaminants between samples (new sample of effluent each two days). The important variations between the percentage of phagocytosis might be due to the age of trout (trout were fourth months older for low dose-response exposure) and to slight differences in exposure conditions (we moved between the exposure).

NCC Assay

There were no significant differences between groups for all exposures independently on the concentrations and time exposure. However, low dose response (0.01% - 10%) and high dose response (1%-50%) respectively showed a slight increased for 80:1 ratio and slight decreased for 40:1 ratio. In such assay, modulation in mortality percentage could be attributable to receptor expression in relation to estrogenic compounds (Vos *et al.*, 2000) or the inability to recognize and bind tumor target cells (Faisal *et al.*, 1991).

Mitogenic Assay

Cells stimulated by LPS and PHA demonstrated significant and highly significant increases for various concentrations except 0.1% at 54 days exposure to sewage effluent. Trout exposed 90 days to the same effluent concentrations showed adverse effect for cells stimulated by PHA and any effect for cells stimulated by LPS. First of all, these data suggest that the effluent could selectively target different populations of immune system (Arkoosh *et al.*, 1996). This result indicates that efficiency of cells stimulated by LPS and PHA are modulated by time exposure. *In vitro* exposure to cadmium shows that B and T lymphocytes were modulated by time exposure (Thuvander, 1989). There were distinctive effects depending on the concentrations indicating that cells stimulated by LPS and PHA are significantly modulated by the quantity of contaminants. *In vitro* exposure to various pollutants demonstrated an immunomodulation of both B and T proliferation related to the chemical and the concentration (Flory and Bayne, 1991 ; O'Halloran, Ahokas and Wright, 1996). Depending on the dose of a contaminant, numerous activities such as DNA replication and tissue repair might be enhanced or suppressed (Mehendale, 1994). Moreover, adverse effects observed for cells stimulated by PHA indicate an influence resulting on the fluctuation in the pollutants mixture (new sample of effluent each two days) and time exposure. It was observed that various combinations and concentrations of metals induce significant stimulation, suppression or any effect in rainbow trout (Sanchez-Dardon *et al.*, 1999). A similar pattern for cells stimulated by PHA was observed by Escarné (personal communication).

Exposure to soluble and insoluble fractions

Phagocytosis activity is disrupted by both soluble and insoluble fractions of effluents. Insoluble fraction seems to have a stronger effect on fish compared to soluble fraction of effluent. This finding is very interesting because dissolved organic matter (DOM) or suspended particulate matter (SPM) are usually associated to a reduction of bioavailability of organic compounds for uptake and bioconcentration by aquatic organisms (Day, 1991 ; Evans, 1988 ; Goodrich *et al.*, 1991 ; Haitzer *et al.*, 1998 ; Laversee *et al.*, 1983 ; McCarthy and Jimenez, 1985). Precisely, many DOM molecules are amphiphilic and amphoteric meaning that they have hydrophilic and

hydrophobic binding sites (Leenheer and Croué, 2003). Interactions between DOM and xenobiotics involve various modes of binding such as polyvalent cation interactions, hydrogen bonding, charge transfer, ion exchange, non polar interaction, hydrophobic adsorption, etc (Leenheer and Croué, 2003 ; Piccolo, 1994). There are many contaminants that bind on fine SPM coming from STP such as polycyclic musk fragrances, polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), surfactants, polychlorinated biphenyl (PCB), sterol (cholesterol), metal ions, etc (Alberts, Filip and Leversee, 1989 ; Hasset and Anderson, 1979 ; Paxéus, 1996 ; Rimkus, 1999 ; Weber, 1988). Paxéus (1996) found up to 137 contaminants in the effluents of large wastewater treatment plants in Sweden.

Usually (depending on the nature of the chemical and DOC origin/concentrations) these interactions enhance the concentration of xenobiotics in water and modify the bioconcentration into aquatic organisms (Carter and Suffet, 1982 ; Chiou *et al.*, 1986 ; Haitzer *et al.*, 1998 ; Lee *et al.*, 1993 ; Lorenz *et al.*, 1996). DOM reduces free organic chemicals uptake by the gills of fish (Black et McCarthy, 1988) implicating different biochemical reaction into the biota (Haitzer *et al.*, 1998). There are many studies indicating that pollutants can bind to dissolved humic material, however, it has been proved that organic contaminants, such as PAH, can completely dissociate from dissolved humic material (DHM) and reach an equilibrium with the water column (McCarthy and Jimenez, 1985). Contact time seems to be controversial depending on the contaminants in regard to the recovery of the pollutant or the reversibility of the binding (Johnsen, 1987 ; McCarthy and Jimenez, 1985). Nevertheless, field works demonstrated that pollutants can be released into water column by sediments and/or SPM and disrupt immune system or bioaccumulate into organisms (Lacroix *et al.*, 2001 ; Lacorte and Eggen, 1993). Also, it is recognized that contaminants could be uptaken by food and can impact aquatic organisms (Kierkegaard *et al.*, 1999 ; Lacorte and Eggen, 1993). It was demonstrated that low water solubility PCB remain easily adsorbed to suspended particles resulting in higher bioconcentration in flounder for less hydrophobic PCB (Lacorte and Eggen, 1993 ; Evans, 1988).

Such results could explain the modulation of phagocytosis activity by uncentrifuged effluent, soluble and insoluble fractions. Immunological effects involved by insoluble fraction of effluents indicate an uptake by water column implicating dissociation between less hydrophobic

contaminants to suspended particles and/or by fish food suggesting sorption with suspended particles of food. The stronger effect observed for insoluble fraction of effluent could be explained by a higher concentrations of pollutants adsorbed on suspended particles and a mixture of pollutants more complex including both hydrophilic and hydrophobic contaminants (Leenheer and Croué, 2003). Moreover, the concentration of biologic colonies is higher in the insoluble fraction group. Bacteria and sub-lethal concentrations of pollutants may have stimulated phagocytosis activity for these treatments (Karrow, Bols and Whyte, 2001 ; Thuvander, Norrgren and Fossum, 1987 ; Zelikoff *et al.*, 1995).

Also, difference between soluble and insoluble fraction of effluent could be explained in part by the metabolism and depuration of hydrophilic and hydrophobic contaminants (McCarthy and Jimenez, 1985 ; Muir, Hobden and Servos, 1994). Metabolism of sewage effluent hydrophobic contaminants produces water-soluble metabolites that are excreted into the water column and therefore bioconcentrate into fish and could possibly impact immune system (van Dijk, 1996 a, b).

Environmental implications

Various contaminants demonstrated a high concentration in the effluent of STP indicating a poor degradation or retention of some pollutants (Rimkus, 1999). In natural environment, when contact time is long and the water contains biotic components, the possibility of biological activities and thereby biotransformation may occur (Johnsen, 1987). In regard to the St-Lawrence River, result concerning soluble and insoluble fractions should be considered as an important warning sign because of the significant biomass of fine particles that are usually evacuated by STP (Schetane, Doyon and Fournier, 2000). Moreover, dissolved humic matter generates photoactive species when they are in the presence of sunlight such as singlet oxygen, derived peroxy radicals, hydrogen peroxide, solvated electrons and superoxide anions (Lee *et al.*, 1993 ; Zeep, Baughman and Schlotzhauer, 1981). The increased amount of contaminants because of the Montreal STP and their transport by the suspended particles could also be a source of biological concern considering ubiquitous distribution of pollutants. Finally, a widely accepted mechanism by which environmental pollutants are thought to impact fish health is via the modulation of immune system (Zelikoff, 1993).

In conclusion, this study demonstrated that phagocytic activity and cells proliferation in rainbow trout are altered by exposure to soluble and insoluble fraction of effluents and various concentrations of municipal sewage effluents. These responses are modulated by both concentration of sewage effluent and time exposure. Because humans and fishes share many common elements of immune system, teleosts constitute a good model to evaluate immunotoxicological impacts and risk assessment for human health. Moreover, additional studies concerning the influence of various disinfection processes are needed.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been financially supported by the Fonds d'Action Québécois pour le Développement Durable (FAQDD) and le Réseau de Recherche en Écotoxicologie du Saint-Laurent (RRESL). The authors acknowledge the assistance of Christine Yelle, Yves Lafleur, Patrick Cejka and Luc Tremblay from MUCWTP ; Cathy Momacacos from Concordia University ; Mélanie Douville from St-Lawrence Center ; Lucie Ménard, Caroline Müller, Daphnée Papillon, Francesca Proulx, Julie De Gagné, Marlène Fortier, Brigitte Badiwa-Bizowé, Kalum Muray and Annie Lalancette from INRS-IAF.

REFERENCES

- ALBERTS J.J., Z. Filip and G.J. Laversee. 1989. "Interactions of estuarine organic matter with copper and benzo(a)pyrene". Mar. Chem., vol. 28, p. 77-87.
- ALLEN Y., P. Matthiessen, S. Haworth, J.E. Thain and S. Feist. 1999. "Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*". Environ. Toxicol. Chem., vol. 18, p. 1791-1800.
- ARKOOSH M.R., E. Clemons, P. Huffman, H.R. Sanborn, E. Casillas and J.E. Stein. 1996. "Leuproliferative response of splenocytes from English Sole (*Pleuronectes velutus*) exposed to chemical contaminants". Environ. Toxicol. Chem., vol. 15, p. 1154-1162.
- BERNET D., H. Schmidt-Posthaus, T. Wahli and P. Burkhardt-Holm. 2000. "Effets of wastewater on fish health : an integrated approach to biomarker responses in brown trout (*Salmo trutta L.*)". J. Aqua. Ecosystem Stress and Recovery, vol. 8, p.143-151.
- BERNET D., H. Schmidt-Posthaus, T. Wahli and P. Burkhardt-Holm. 2001. "Effluent from a sewage treatment work causes changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo trutta L.*)". Ecotox. Environ. Saf., vol. 48, p. 140-147.
- BLACK J.J. and P.C. Baumann. 1991. "Carcinogens and cancers in freshwater fishes". Environ. Health Perspect., vol. 90, p. 27-33.
- BLACK M.C. and J.F. McCarthy. 1988. "Dissolved organic macromolecules reduce the uptake of hydrophobic organic contaminants by the gills of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)". Environ. Toxicol. Chem., vol. 7, p. 593-600.
- BROUSSEAU P., Y. Payette, B. Blakley, H. Boermans, D. Flipo, H. Tryphomonas and M. Fournier. 1998. Manual of immunological methods. Boston, USA : CRP Press, 141 p.
- BUCHER F. and R. Hofer. 1993. "The effects of treated domestic sewage on three organs (gills, kidney, liver) of brown trout (*Salmo trutta*)". Wat. Res., vol. 27, no. 2, p. 255-261.
- BURKHARDT-HOLM P., M. Escher and W. Meier. 1997. "Waste-water management plant effluents cause cellular alterations in the skin of brown trout". J. Fish Bio., vol. 50, p. 744-758.
- BURKHARDT-HOLM P., D. Bernet and C. Hogstrand. 1999. "Increase of metallothionein-immunopositive chloride cells in the gills of brown trout and rainbow trout after exposure to sewage treatment plant effluents". Histochemical J., vol. 31, p. 339-346.
- CARLINE R.F., A.J. Benson and H. Rothenbacher. 1987. "Long-term effects of treated domestic wastewater on brown trout". Wat. Res., vol. 21, no. 11, p. 1409-1415.
- CARTER C.W. and I.H. Suffet. 1982. "Binding of DDT to dissolved humic materials". Environ. Sci. Technol., vol. 16, p. 735-740.

CASILLAS E., M. Meyers and W.E. Ames. 1983. "Relationship of serum chemistry values to liver and kidney histopathology in English sole (*Parophrys vetulus*) after acute exposure to carbon tetrachloride". Aquat. Toxicol., vol. 3, p. 61-78.

CHIOU C.T., R.L. Malcolm, T.I. Brinton and D.E. Kile. 1986. "Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids". Environ. Sci. Technol., vol. 20, no. 5, p. 502-508.

DAY K.E. 1991. "Effects of dissolved organic carbon on accumulation and acute toxicity of fenvalerate, deltamethrin and cyhalothrin to *Daphnia magna* (Straus)". Environ. Toxicol. Chem., vol. 10, p. 91-101.

DESBROW C., E.J. Routledge, G. Brighty, J.P. Sumpter and M. Waldock. 1998. "Identification of oestrogenic chemicals in STW effluent. I. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening". Environ. Sci. Technol., vol. 32, p. 1549-1558.

DUNIER M. and A.K. Siwicki. 1993. "Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish : a review". Fish Shellfish Immunol., vol. 3, p. 423-438.

DUNIER M., C. Vergnet, A.K. Siwicki and V. Verlhac. 1995. "Effect of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity. IV. Prevention of non-specific and specific immunosuppression by dietary vitamin C (Ascorbate-2-polyphosphate)". Ecotox. Environ. Saf., vol. 30, p. 259-268.

ESCARNÉ R., D.G. Cyr, K. Finsson, D.J. Marcogliese, J. Bernier and M. Fournier. 1999. "Effect of municipal sewage effluent on the immune and thyroid function of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". Submitted.

ESCHER M., T. Wahli, S. Büttner, W. Meier and P. Burkhardt-Holm. 1999. "The effects of sewage plant effluent on brown trout (*Salmo trutta fario*) : a cage experiment". Aquat. Sci., vol. 61, p. 93-110.

EVANS H.E. 1988. "The binding of three PCB congeners to dissolved organic carbon in freshwaters". Chemosphere, vol. 17, no. 12, p. 2325-2338.

EVANS D.L. and L. Jaso-Friedmann. 1994. "Role of protein phosphatases in the regulation of non-specific cytotoxic cell activity". Fish Shellfish Immunol., vol. 18, p. 137-146.

FAISAL M., B.A. Weeks, W.K. Vogelbein and R.J. Hugett. 1991. "Evidence of aberration of the natural cytotoxic cell activity in *Fundulus heteroclitus* (Pisces : Cyprinodontidae) from the Elizabeth River, Virginia". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 29, p. 339-351.

FLORY C.M. and C.J. Bayne. 1991. "The influence of adrenergic and cholinergic agents on the chemiluminescent and mitogenic responses of leucocytes from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*". Dev. Comp. Immunol., vol. 15, p. 135-142.

- FOLMAR L.C., N.D. Denslow, V. Rao, M. Chow, D.A. Crain, J. Enbolm, J. Marcino and L.J. Guillette. 1996. "Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations on feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant". Environ. Health Perspect., vol. 104, p. 1096-1101.
- FOURNIER M., D. Cyr, B. Blackley, H. Boermans and P. Brousseau. 2000. "Phagocytosis as biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics". Amer. Zool., vol. 40, p. 412-420.
- GAGNÉ F. and C. Blaise. 1999. "Toxicological effects of municipal wastewaters to rainbow trout hepatocytes". Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 63, p. 503-510.
- GOODRICH M.S., L.H. Dulak, M.A. Friedman and J.J. Lech. 1991. "Acute and long-term toxicity of water soluble cationic polymers to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the modification of toxicity by humic acid". Environ. Toxicol. Chem., vol. 10, p. 509- 515.
- GREENLEE A.R., R.A. Brown and S.S. Ristow. 1991. "Nonspecific cytotoxic cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kill YAC-1 targets by both necrotic and apoptotic mechanisms". Dev. Comp. Immunol., vol. 15, p. 153-164.
- GRIZZLE J.M., S.A. Horowitz and D.R. Strengh. 1988. "Caged fish as monitors of pollution : effects of chlorinated effluent from a wastewater treatment plant". Water Res. Bull., vol. 24, no. 5, p. 951-959.
- HAITZER M., S. Höss, W. Traunspurger and C. Steinberg. 1998. "Effects of dissolved organic chemicals in aquatic organisms – a review". Chemosphere, vol. 37, p. 1335-1362.
- HARRIES J.E., D.A. Sheahan, S. Jobling, P. Matthiessen, P. Neall, E. Poutledge, R. Rycroft, J.P. Sumpter and T. Taylor. 1996. "A survey of estrogenic activity in U.K. inland waters". Environ. Toxicol. Chem., vol. 15, p. 1993-2002.
- HASSET J.P. and M.A. Anderson. 1979. "Association of hydrophobic organic compounds with dissolved organic matter in aquatic systems". Environ. Sci. Tech., vol. 13, no. 12, p. 1526-1529.
- JOBBLING S., C.R. Tyler, M. Nolan and J.P. Sumpter. 1998. The identification of estrogenic effects in wild fish. R&D Technical Report W1119. Bristol, UK : Environment Agency. 115 p.
- JOHNSEN S. 1987. "Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and natural aquatic humic substances. Contact time relationship". Sci. Tot. Environ., vol. 67, p. 269-278.
- KARROW N.A., N.C. Bols and J.J. Whyte. 2001. "Effects of creosote exposure on rainbow trout pronephros phagocyte activity and percentage of lymphoid B cells". J. Toxicol. Environ. Health, vol. 63a, p. 363-381.
- KATZ M. 1961. "Lindane toxicity in fish and frogs". Trans. Am. Fish Soc., vol. 90, p. 264-270.

KIERKEGAARD A., L. Balk, U. Tjärnlund, C.A. De Wit and B. Jansson. 1999. "Dietary uptake and biological effects of decabromodiphenyl ether in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". Environ. Sci. Technol., vol. 33, no. 10, p. 1612-1617.

KOSMALA A., B. Migeon, P. Flammarion and J. Garric. 1998. "Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using the fish biomarker ethoxyresorufin-O-deethylase : field and on-site experiments". Ecotox. Environ. Safety, vol. 41, p. 19-28.

LACORTE S. and M.L. Eggens. 1993. "Influence of diet on the bioaccumulation of PCBs". Sci. Tot. Environ., vol. supp., p. 479-489

LACROIX A., M. Fournier, M. Lebeuf, J.J. Nagler and D.G. Cyr. 2001. "Phagocytic response of macrophages from the pronepros of American plaice (*Hipoglossoides platessoides*) exposed to contaminated sediments from Baie des Anglais, Quebec". Chemosphere, vol. 45, p. 599-607.

LEE S.K., D. Freitag, C.E.W. Steinberg, A. Katstrup and Y.H. Kim. 1993. "Effects of dissolved humic materials on acute toxicity of some organic chemicals to aquatic organisms". Wat. Res., vol. 27, p. 199-204.

LEENHEER J.A. and P.-P. Croué. 2003. "Aquatic organic matter : understanding the unknown structures is key to better treatment of drinking water". Environ. Sci. tech., vol. 33, p. 19 -26.

LEVERSEE G.J., P.F. Landrum, J.P. Giesy and T. Tannin. 1983. "Humic acid reduce bioaccumulation of some polycyclic aromatic hydrocarbons". Can. J. Fish Aquat. Sci., vol. 40, p. 63-69.

LORENZ R., R. Brüggemann, C.E.W. Steinberg and O.H. Spiesser. 1996. "Humic material changes effects of terbutylazine on behavior of zebrafish (*Brachydanio rerio*)". Chemosphere, vol. 33, p. 2145-2158.

LYE C.M., C.L.J. Frid, M.E. Gill and D. McCormick. 1997. "Abnormalities in reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works". Mar. Pollut. Bull., vol. 34, p. 34-41.

MANNING M.J. and T. Nakanishi. 1996. The specific immune system : cellular defenses. In G. Iwama et T. Nakanishi (ed.). The fish immune system : organism, pathogen, and environment. San Diego, Ca. : Academic Press, p. 159-205.

McCarthy J.F. and B.D. Jlmenez. 1985. "Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and dissolved humic material : binding and dissociation". Environ. Sci. Technol., vol. 19, no.11, p. 1072-1076.

MEHENDALE H.M. 1994. "Amplified interactive toxicity of chemicals at non-toxic levels: mechanistic considerations and implications to public health". Env. Health Perspec., vol. 102, p. 139-149.

- MÉNARD L., R. Escarné, D.J. Marcogliese, D. Cyr and M. Fournier. "Toxicity assessment of municipal effluents of the Montreal Island using phagocytosis function in the spottail shiner (*Notropis hudsonius*)". Submitted.
- MUIR D.C.G., B.R. Hobden and M.R. Servos. 1994. "Bioconcentration of pyrethroid insecticides and DDT by rainbow trout: uptake, depuration, and effects of dissolved organic carbon". Aquat. Toxicol., vol. 29, p. 223-240.
- O'HALLORAN K., J.T. Ahokas and P.F.A. Wright. 1996. "In vitro responses of fish immune cells to three classes of pesticides". In J. S. Stolen, T.C. Fletcher, C.J. Bayne, C.J. Secombes, J.T. Zelikoff, L.E. Twerdok and D.P. Anderson (ed.). Modulators of immune responses : The evolutionary trail. Volume 2. Fair Haven, N.J. : SOS Publications, p. 535-538.
- PAXÉUS N. 1996. "Organic pollutants in the effluents of large wastewater treatment plants in Sweden". Wat. Res., vol. 30, no. 5, p. 1115-1122.
- PAYMENT P., A. Berte, M. Prévost, B. Ménard and B. Barbeau. 2000. "Occurrence of pathogenic microorganisms in the Saint Lawrence River (Canada) and comparison of health risks for populations using it as their source of drinking water". Can. J. Microbiol., vol. 46, p. 565-576.
- PEGG J.R. and G.K. Iwama. 1996. "The effects of stress and cortisol on phagocyte function in juvenile salmonids". In J. S. Stolen, T.C. Fletcher, C.J. Bayne, C.J. Secombes, J.T. Zelikoff, L.E. Twerdok and D.P. Anderson (ed.). Modulators of immune responses : The evolutionary trail. Volume 2. Fair Haven, N.J. : SOS Publications, p. 233-239.
- PICCOLO A. 1994. "Interactions between organic pollutants and humic substances in the environment". In N. Sensi and T.M. Miano (ed.). Humic substances in the global environment and implications on human health. Netherlands, Amsterdam : Elsevier, p. 961-979.
- PURDOM C.E., P.A. Hardiman and V.J. Bye. 1994. "Estrogenic effects of effluent from sewage treatment works". Chem. Ecol., vol. 8, p. 275-285.
- PURENNE P. 2002. Rapport annuel 2001. Analyse de la qualité des eaux brutes et de l'eau traitée à la Station d'épuration et évaluation du rendement des installations. Communauté Urbaine de Montréal. Station d'épuration des eaux usées. Division ingénierie de procédé. 46 p.
- RIMKUS G.G. 1999. "Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment". Toxicol. Letters, vol. 111, p. 37-56.
- ROUTLEDGE E.J., D. Sheanan, C. Desbrow, G.C. Brighty, M. Waldock and J. Sumpter. 1998. "Identification of estrogenic chemicals in STW effluent 2. In vivo responses in trout and roach". Environ. Sci. Technol., vol. 32, p. 1559-1565.
- SANCHEZ-DARDON J., I. Voccia, A. Hontela, S. Chilmonczyk, M. Dunier, H. Boermans, B. Blakley and M. Fournier. 1999. "Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vivo". Environ. Toxicol. Chem., vol. 18, no. 7, p. 1492-1497.

SCHETANE R., J.-F. Doyon, J.-J. Fournier. 2000. "Export of mercury downstream from reservoirs". Sci. Tot. Environ., vol. 260, no. 1-3, p. 135-145.

SECOMBES C.J. 1996. "The nonspecific immune system : cellular defenses". In G. Iwama and T. Nakanishi (ed.). The fish immune system : organism, pathogen, and environment. San Diego, Ca. : Academic Press, p. 63-103.

THUVANDER A., L. Norrgren and C. Fossum. 1987. "Phagocytic cells in blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson) characterized by flow cytometry and electron microscopy". J. Fish Biology, vol. 31, p.197-208.

THUVANDER A. 1989. "Cadmium exposure of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson : effects on immune functions". J. Fish Biol., vol. 35, p. 521-529.

van DIJK A. 1996a. Accumulation and elimination of [¹⁴C] AHTN by Bluegill Sunfish in a dynamic flow-through system. Report to RIFM, RCC Umweltchemie AG, Project 364 825.

van DIJK A. 1996b. Accumulation and elimination of [¹⁴C] HHCB by Bluegill Sunfish in a dynamic flow-through system. Report to RIFM, RCC Umweltchemie AG, Project 381 418.

VOS J.G., E. Dybing, H.A. Greim, O. Ladefoged, C. Lambré, J.V. Tarazona, I. Brandt and A.D. Vethaak. 2000. "Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to european situation". Crit. Rev. Toxicol., vol. 30, no. 1, p. 71-133.

VOS J.G., H. van Loveren, A.D.M.E. Osterhaus, M. Vaal, A.D. Vethaak and P. Wester. 1996. "Immunotoxicity of environmental pollutants : adverse effect on resistance to infectious diseases". In Proceedings OECD Workshop (ed). Ecotoxicology: responses, biomarkers and risk assessment. SOS publications, Fair Haven, N.J., p 127-136.

WAGNER M., D. Brumelis and R. Gehr. 2002. "Disinfection of wastewater by hydrogen peroxide or peracetic acid : development of procedures for measurement of residual disinfectant and application to a physicochemically treated municipal effluent". Water Environ. Res., vol. 74, no. 1, p. 33-50.

WARING C.P., R.M. Stagg, K. Fretwell, H.A. McLay and M.J. Costella. 1996. "The impacts of sludge exposure on the reproduction of the sandy goby, *Pomatoschistus minutes*". Environ. Pollut., vol. 93, p. 17-25.

WATTS M., B.L. Munday and C.M. Burke. 2001. "Immune responses of teleost fish". Aust. Vet. J., vol. 79, no. 8, p. 570-574.

WEBER J.H. 1988. "Binding and transport of metals by humic materials". In F.H. Frimmel and R.F. Christman (ed.). Humic substances and their role in the environment. Wiley, N.Y., p. 165-178.

WHITE P.A. and J. B. Rasmussen. 1998. "The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters". Mut. Research, vol. 410, p. 223-236.

ZAPATA A.G. 1981. "Lymphoid organs of teleost fish. II. Ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*". Dev. Comp. Immunol., vol. 5, p. 585-590.

ZAPATA A.G. and E.L. Cooper. 1990. The immune system: comparative histophysiology. Chichester : John Wiley and sons. 45 p.

ZAPATA A.G., A. Chiba and A. Varas. 1996. "Cells and tissues of the immune system of fish". In G. Iwama and T. Nakanishi (ed.). The Fish Immune System : Organism, Pathogen, and Environment. San Diego, Ca. : Academic Press, p. 1-62.

ZEEP R.G., G.L. Baughman and P.F. Schlotzhauer. 1981. "Comparison of photochemical behavior of various humic substances in water : I. Sunlight induced reactions of aquatic pollutants photosensitized by humic substances". Chemosphere, vol. 10, p. 109-117.

ZELIKOFF J.T. 1993. "Metal pollution-induce immunomodulation in fish". Annu. Rev. Fish dis., vol. 2, p. 305-325.

ZELIKOFF J.T., D. Bower, K.S. Squibb and F. Frenkel. 1995. "Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish : An alternative animal model for immunotoxicological studies". J. Toxicol. Environ. Health, vol. 45, p. 235-248.

Table 1. Measures of weights, lengths and cellular concentrations at 54 days exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to Montreal sewage effluent concentrations between 0.01% and 10% and control group (n=15). (means \pm S.E.)

Measures	Sewage effluent concentrations (%)				
	Control	0.01	0.1	1	10
Cell. Conc. (10^6 cells/ml)	1.75 \pm 0.19	1.88 \pm 0.26	1.88 \pm 0.27	1.94 \pm 0.16	2.64 \pm 0.4
Weight (g)	21.31 \pm 1.8	18.01 \pm 1.74	15.7 \pm 1.45	19.47 \pm 1.46	19.22 \pm 1.07
Length (cm)	12.16 \pm 0.38	11.49 \pm 0.39	11.02 \pm 0.35	11.84 \pm 0.30	11.93 \pm 0.26

Table 2. Measures of weights, lengths and cellular concentrations at 90 days exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to control group and to Montreal sewage effluent concentrations between 0.01% and 10% (n=15). (means \pm S.E.)

Measures	Sewage effluent concentrations (%)				
	Control	0.01	0.1	1	10
Cell. Conc. (10^6 cells/ml)	1.80 \pm 0.16	1.86 \pm 0.26	1.90 \pm 0.23	1.57 \pm 0.21	1.61 \pm 0.22
Weight (g)	29.36 \pm 2.15	33.54 \pm 2.61	35.25 \pm 2.50	32.04 \pm 2.31	30.73 \pm 2.12
Length (cm)	13.43 \pm 0.33	13.55 \pm 0.41	13.81 \pm 0.41	13.77 \pm 0.33	13.76 \pm 0.32

Table 3. Mortality percentage of tumor YAC-1 cells at 90 days exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage effluent concentrations between 0.01% and 10% and control group. (means \pm S.E.)

Ratios	Sewage effluent concentrations (%)				
	Control	0.01	0.1	1	10
20:1	13.31 \pm 2.61	15.89 \pm 3.63	9.64 \pm 1.18	14.08 \pm 1.59	15.51 \pm 3.00
80:1	19.72 \pm 5.27	29.43 \pm 7.03	19.11 \pm 5.41	30.23 \pm 6.85	22.65 \pm 6.34

Table 4. Measures of weights, lengths and cellular concentrations at 40 days exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to control group and to Montreal sewage effluent concentrations between 1% and 50% (n=15). (means \pm S.E.)

Measures	Sewage effluent concentrations (%)				
	Control	1	10	25	50
Cell. Conc. (10^6 cells/ml)	1.17 \pm 0.21	2.11 \pm 0.16**	1.09 \pm 0.09	1.17 \pm 0.11	1.22 \pm 0.15
Weight (g)	2.69 \pm 0.28	2.35 \pm 0.22	2.64 \pm 0.21	2.31 \pm 0.14	2.49 \pm 0.26
Length (cm)	6.02 \pm 0.19	5.76 \pm 0.15	6.08 \pm 0.15	5.83 \pm 0.12	5.94 \pm 0.16

** indicates highly significant differences

Table 5. Measures of weights, lengths and cellular concentrations after 28 days exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to gross treated effluent, soluble and insoluble portions of effluent and control group (n=15). (means \pm S.E.)

Measures	Control	Effluent	Soluble portion	Insoluble portion
Cell. Conc. (10^6 cells/ml)	2.45 \pm 0.29	3.03 \pm 0.33	2.86 \pm 0.34	3.07 \pm 0.35
Weight (g)	8.13 \pm 0.89	7.54 \pm 0.67	8.27 \pm 0.63	6.37 \pm 0.37
Length (cm)	8.50 \pm 0.30	8.30 \pm 0.18	8.58 \pm 0.18	7.99 \pm 0.14

FIGURE LEGEND

Figure 1. Phagocytic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to Montreal sewage effluent concentrations between 0.01 % and 10%. Data (means \pm S.E.) are express as percentage of phagocytes (M1) and active macrophage activity (M2). * indicates significant difference from control group ($p < 0.05$). (a) 54 days exposure. (b) 90 days exposure.

Figure 2. Mitogenic response of head kidney cells stimulated with LPS and PHA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage effluent concentrations between 0.01% and 10% and control group. * indicates significant difference from control group ($p < 0.05$). ** indicates highly significant difference from control group ($p < 0.01$). (stimulation index \pm S.E.). (a) 54 days exposure. (b) 90 days exposure.

Figure 3. Phagocytic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to Montreal sewage effluent concentrations between 1 % and 50% for a period of 40 days. Data (means \pm S.E.) are express as percentage of phagocytes (M1) and active macrophage activity (M2). * indicates significant difference from control group ($p < 0.05$). ** indicates highly significant difference from control group ($p < 0.01$).

Figure 4. Phagocytic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros macrophages after 28 days exposure to (in)soluble portions of effluent. Data (means \pm S.E.) are express as percentage of phagocytes (M1) and active macrophage activity (M2). * indicates significant difference from control group ($p < 0.05$). ** indicates highly significant difference from control group ($p < 0.01$).

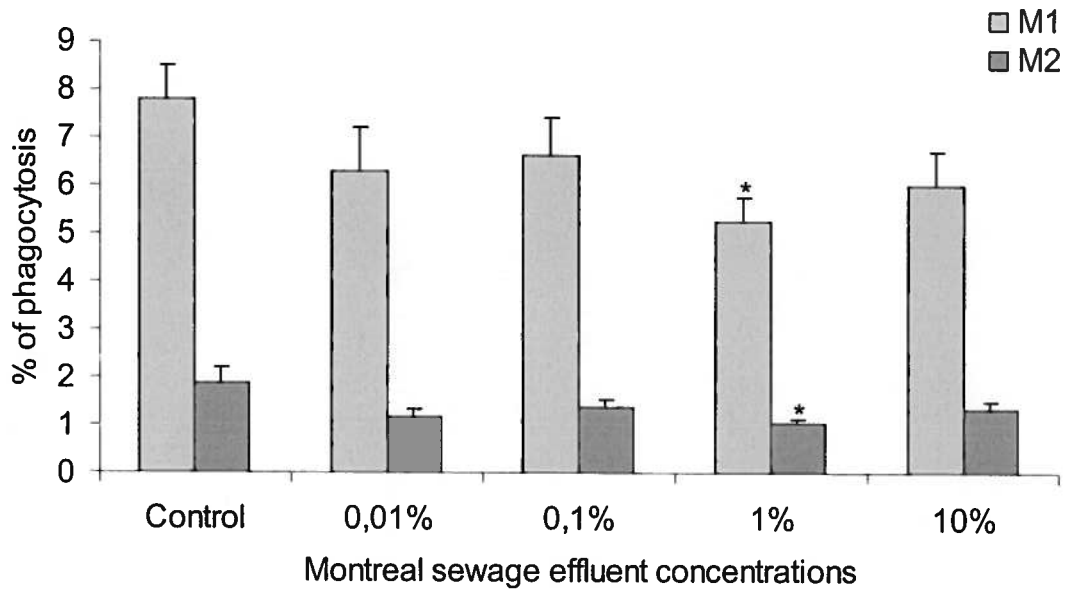


Figure 1a

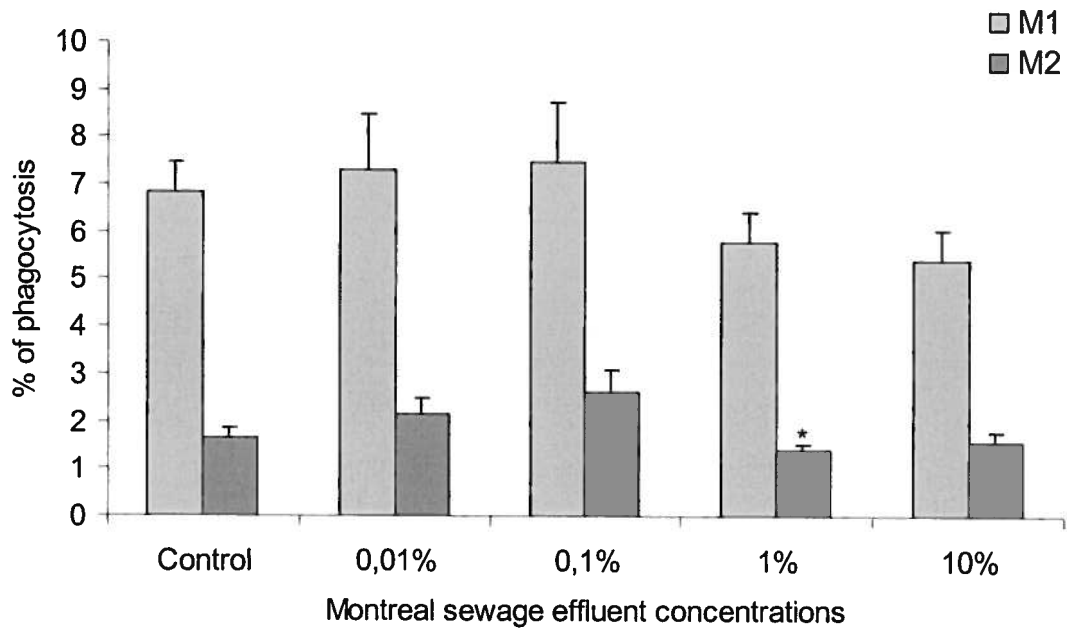


Figure 1b

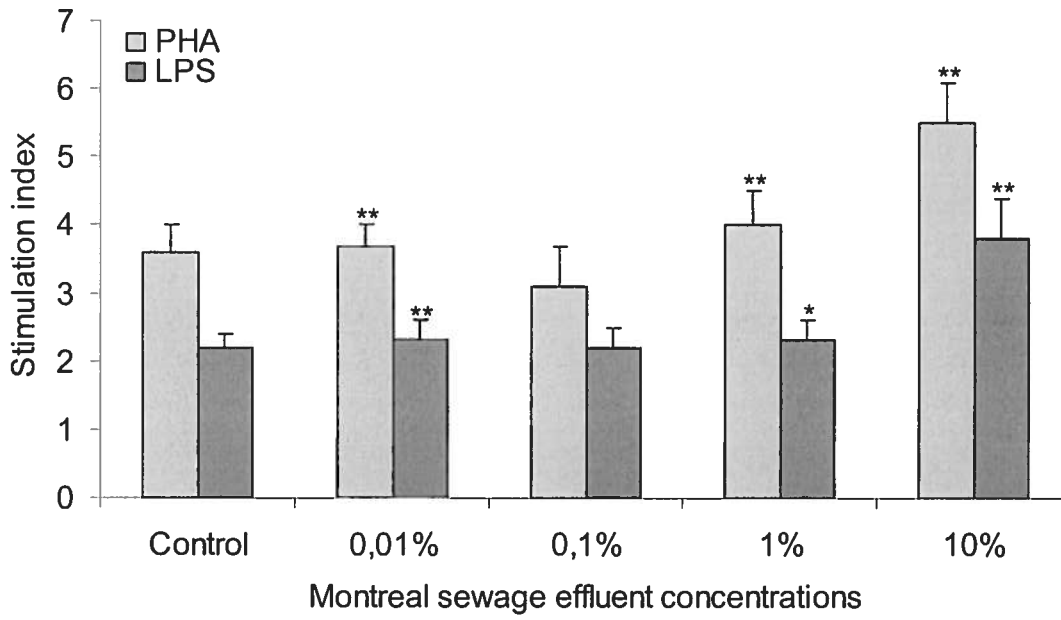


Figure 2a

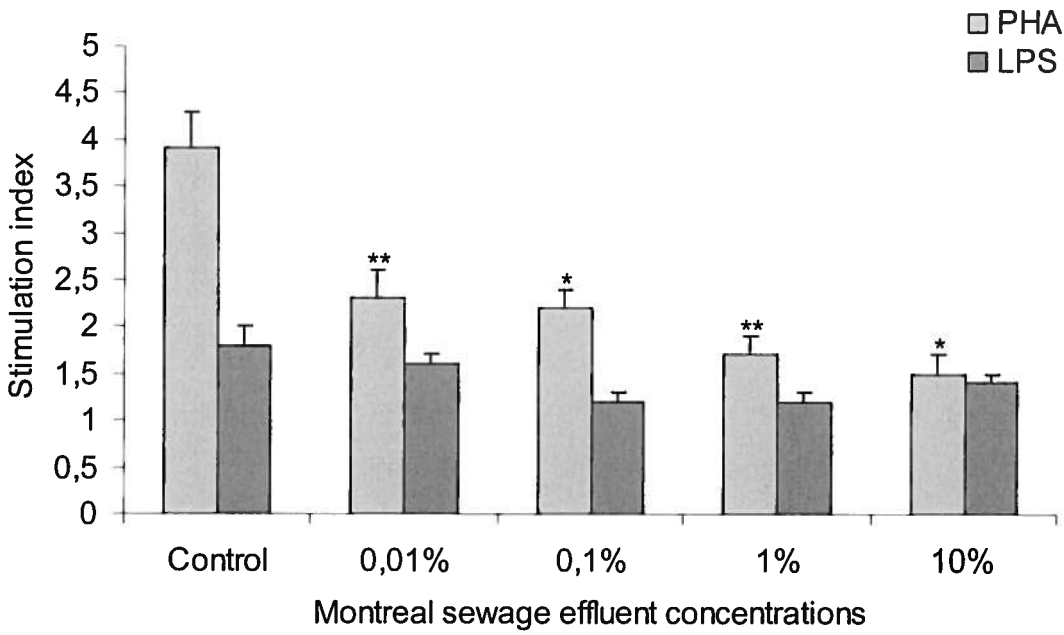


Figure 2b

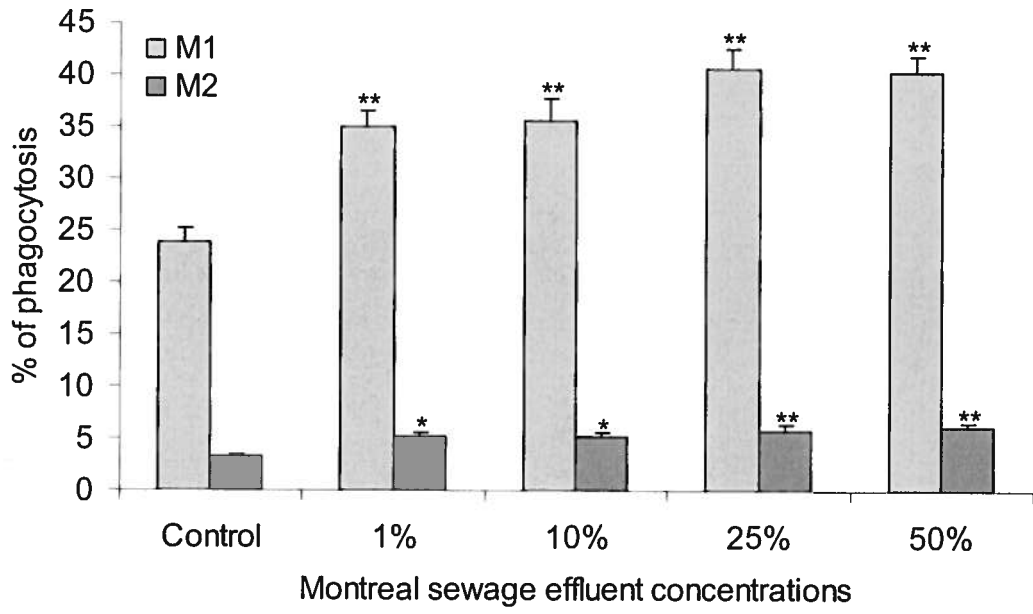


Figure 3

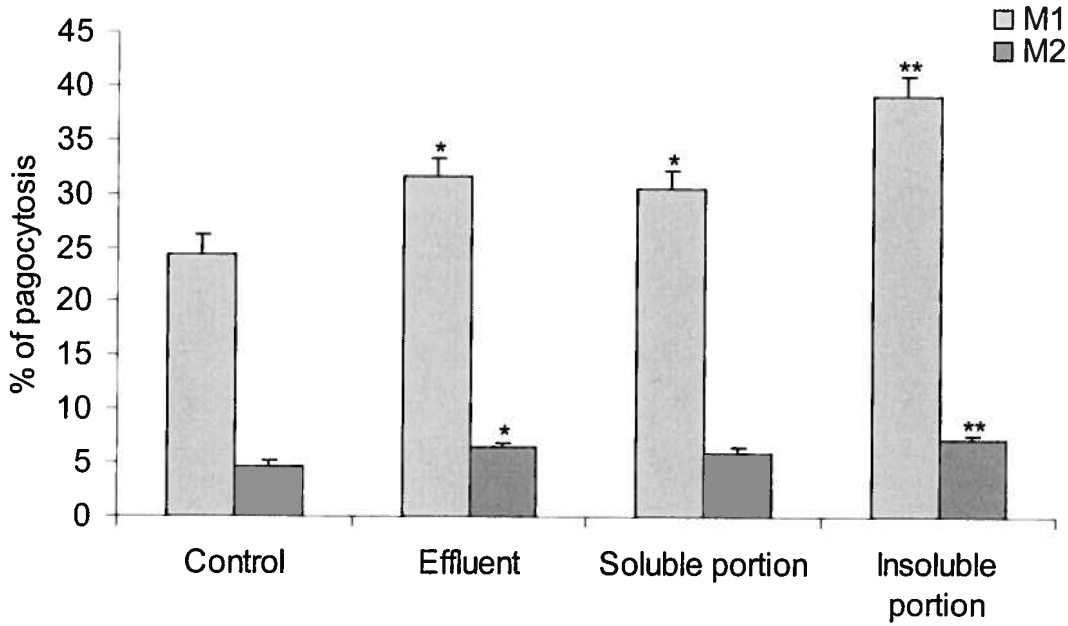


Figure 4

EFFECTS OF DISINFECTED SEWAGE EFFLUENT ON THE IMMUNE SYSTEM OF RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

¹Hébert, N., ²Ruby, S., ¹Bernier, J., ¹Cyr, D., ⁴Pellerin J., ⁵Hausler R., ³Gagné, F., ³Blaise, C., *¹Fournier, M.

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

² Concordia University, 1455 de Maisonneuve Blvd. W, Montreal, QC, Canada, H3G 1M8.

³ Centre Saint-Laurent, Environnement Canada, 501 McGill, montréal, Québec, H2Y 2E7

⁴ ISMER, 310 Allées des Ursulines, Rimouski, Québec, G5L 3A1

⁵ UQAM, 2101 avenue Jeanne-Mance, H2X 2J6

* : Author to whom correspondance should be addressed. INRS-Institut Armand-Frappier 245 Hymus Boul. Pointe-Claire, Québec, Canada H9R 1G6. Phone: (514)-630-8824; Fax : (514)-630-8850; E-mail: michel.fournier@inrs-iaf.quebec.ca

Key words: sewage effluent, St-Lawrence River, xenobiotics, immune system, fish, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), phagocytosis, macrophages, NCC, NK, cytotoxicity, lymphocytes, mitosis, UV, ozone, peracetic acid

RÉSUMÉ

Les effluents municipaux constituent un mélange complexe de contaminants reconnus pour moduler la réponse du système immunitaire et endocrinien des vertébrés. Le but de cette étude consiste à évaluer l'impact de divers procédés de désinfection au niveau du système immunitaire de truites arc-en-ciel juvéniles (*Oncorhynchus mykiss*). Les truites ont été exposées à trois procédés de désinfection soit par acide peracétique, radiation ultraviolet et ozone ainsi qu'à des effluents non désinfectés. Une concentration de 10% a été employée pour chacun des traitements. Les cellules du rein antérieur de 15 truites juvéniles par traitement ont été prélevées afin de réaliser trois essais immunologiques soient la phagocytose, l'essai de cytotoxicité et la transformation lymphoblastique. La phagocytose a été effectuée en utilisant des billes de latex fluorescentes tandis que l'essai de cytotoxicité a été effectué à l'aide de cellules cancéreuses nommées YAC-1. Ces deux essais ont été analysés en cytométrie de flux. La stimulation de la prolifération des lymphocytes a respectivement été réalisée à l'aide du PHA et du LPS. L'indice de prolifération des lymphocytes a été mesuré par l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN nouvellement synthétisé. La longueur des truites exposées aux effluents désinfectés et non désinfectés s'avère significativement plus élevée suggérant une présence résiduelle de modulateurs endocriniens. Le ratio poids/taille des truites exposées aux effluents démontre une diminution significative suggérant une prédisposition aux maladies. Les truites exposées au groupe effluent non désinfecté ont démontré une stimulation du pourcentage de phagocytose lorsque comparé au témoin eau douce. Ce résultat suggère que la désinfection des effluents améliore sensiblement la qualité d'eau. La prolifération des lymphocytes stimulés par le PHA ainsi que des cellules non stimulées chez les poissons exposés au procédé de désinfection à l'ozone démontrent une immunosuppression tandis que les poissons exposés à l'acide peracétique affichent une stimulation de la prolifération des lymphocytes stimulés par le PHA. Ces effets défavorables pourraient être causés par la genotoxicité ou cytotoxicité générée par les procédés de désinfection. Aucun effet n'a été observé pour les lymphocytes stimulés par le LPS. Cette étude constitue la première preuve d'une altération du système immunitaire chez des organismes aquatiques entraînée par divers procédés de désinfection des eaux usées municipales.

ABSTRACT

Municipal sewage effluents contain a complex mixture of contaminants known to disrupt immune and endocrine functions. The aim of this study was to evaluate the impact of various disinfection process of sewage effluent on the immune system of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Trout were exposed to undisinfected effluent and sewage effluent disinfected by UV radiation, ozonation or peracetic acid for a period of 28 days. Current concentration used for this exposure was 10 % for each treatment. Three immune parameters were used to evaluate trout health state name as: phagocytosis Assay, NCC Assay (corresponding to NK activity in mammal) and mitogenic Assay. Immunological functions were assessed on 15 trouts from each group using the pronephros (head kidney). Phagocytosis by head kidney macrophages was measured by flow cytometry using fluorescent latex beads. Natural cytotoxic cells (NCC) were assessed using YAC-1 cancerous cells and these assays were measured by flow cytometry. Proliferative responses to PHA (T lymphocytes) and LPS (B lymphocytes) by head kidney lymphocytes were determined by [³H]-thymidine incorporation into replicating DNA. Length of exposed trout was stimulated suggesting the presence of endocrine disrupter. The ratio mass/lengths demonstrated highly significant decreased for both three disinfection process and undisinfected effluents indicating that trout could be predispose to diseases. Exposure to undisinfected effluents showed an immunostimulation for active macrophage activity, but any effect with disinfected treatment groups suggesting that disinfection of sewage effluent enhance water quality. T lymphocytes proliferation and unstimulated cells in fish exposed to ozone disinfection process showed an immunosuppression. Fish exposed to PAA (peracetic acid) disinfection process demonstrated stimulation of T lymphocytes proliferation. This adverse effect might be related to cytotoxicity or genotoxicity generated by the disinfection process. Any effect was observed for B lymphocytes proliferation. This study is the first documented evidence of alteration of immune function in fish caused by various disinfection processes of sewage effluents.

INTRODUCTION

The rainbow trout is considered to be more sensitive to pollutants and is frequently used as a sentinel species in environmental challenges (Katz, 1961). Rainbow trout is commonly used in immunotoxicological studies because its immune system is well known. The head kidney or pronephros is the most important organ to assess immune function in teleosts and exhibit high hematopoietic capacity (Zapata, 1981). The kidney share structural and functional similarities to the bone marrow of higher vertebrates (Zapata, Chiba and Varas, 1996). This organ contains many cell types such as macrophages, B and T lymphocytes, non specific cytotoxic cells (NCC) or antigen-binding cells (Zapata and Cooper, 1990).

Immunocompetence can be readily assessed using a number of immunotoxicological parameters as biomarkers of toxicity (Fournier *et al.*, 2000 ; Brousseau *et al.*, 1998). Rainbow trout can exhibit both innate and specific immune responses (Watts, Munday and Burke ; 2001). Phagocytosis is a key function to ensure immune defence and it is performed principally by macrophages and granulocytes cells (Anderson and Zeeman, 1995 ; Fournier *et al.*, 2000). This innate immune function consists to internalize, kill and digest foreign microorganisms (Secombes, 1996). Other innate function performed by *Natural Killer* (NK) cells are known to combat tumor establishment or virus infected cells (Evans and Jaso-Friedmann, 1994 ; Faisal *et al.*, 1991). In teleosts, analogous cells named non-specific or natural cytotoxic cells (NCC) demonstrated spontaneous cytotoxicity against fish and mammalian cancerous cell lines, virus infected cells and protozoan parasites (Evans and Jaso-Friedmann, 1994). In fish, NCC cells recognize, bind and kill target cells by apoptic and necrotic mechanism (Greenlee, Brown and Ristow, 1991). Specific immune responses can be assessed by a number of assay (Brousseau *et al.*, 1998). Mitogenic assay is commonly used to evaluate the capability of B and T lymphocytes to divide and replicate in order to protect the host against (a)biotic constituents (Maning and Nakanishi, 1996).

There is a number of evidence demonstrating the potential of several xenobiotics to impact aquatic organisms (Vos *et al.*, 2000). Environmental discharge of sewage effluent coming from sewage treatment work (STW) is actually a major concern for toxicologists. Insufficient water

quality caused by wastewater is suspected to endanger 50% of all fish species in Switzerland (Escher *et al.*, 1999). In United States and United Kingdom, wastewaters from industrial and domestic origin are known to be responsible for many estrogenic effects (Folmar *et al.*, 1996 ; Purdom, Hardiman and Bye, 1994 ; Vos *et al.*, 2000). The principal estrogenic alterations are vitellogenin modulation depending on the sex of the organisms, reduced gonad growth, testicular abnormalities, inhibition of spawning, intersex, etc (Allen *et al.*, 1999 ; Harries *et al.*, 1996 ; Jobling *et al.*, 1998 ; Lye *et al.*, 1997 ; Routledge *et al.*, 1998 ; Waring *et al.*, 1996). Little is known concerning the effects of wastewater discharges on wildlife.

Nevertheless, sewage effluent can increase mortality or reduce growth in exposed organisms (Burkhardt-Holm, Escher and Meier, 1997 ; Escher *et al.*, 1999 ; Grizzle, Horowitz and Strenght, 1988). External and internal organs (skin, fins, jaw, gills, liver and kidney) demonstrated specific alterations provoked by sewage effluent exposure such as infection diseases, erosion, hyperplasia, hypertrophy, necrosis, inflammation, leukocytes infiltration, etc (Burkhardt-Holm, Escher and Meier, 1997 ; Bucher and Hofer, 1993 ; Escher *et al.*, 1999 ; Gagné and Blaise, 1999 ; Grizzle, Horowitz and Strenght, 1988). The modulation in the serum parameters (proteins or enzymes) directly reflects damage in specific organs and functions following effluent exposure (Bernet *et al.*, 2000 et 2001 ; Burkhardt-Holm, Bernet and Hogstrand, 1999 ; Casillas, Meyers and Ames, 1983 ; Escher *et al.*, 1999 ; Gagné and Blaise, 1999). In some case, organs alteration and the modulation of serum parameters are related to the effluent concentration (Bucher and Hofer, 1993 ; Carline, Benson and Rothenbacher, 1987 ; Kosmala *et al.*, 1998).

Exposure to the complex mixture of contaminants of sewage effluent can disrupt immune function of young life stage and compromise survival of adults (Vos *et al.*, 2000). Several pollutants are associated with an increase of diseases in wildlife (Vos *et al.*, 1996). Trout exposed to the effluent in the Alte Aare River demonstrated higher rate of parasites and bacteria infections (Escher *et al.*, 1999). Moreover, prevalence of tumor establishment was noted in teleosts living in wastewaters (municipal and industrial origin) contaminated site (Black and Baumann, 1991).

The Montreal Urban Community Wastewater Treatment Plant (MUCWTP) is located in the province of Quebec (Canada) at the eastern side of the island. These wastewaters constitute a complex mixture of contaminants and biologic colonies originating from commercial,

institutional, industrial, sanitary discharge, underground infiltration and surface runoff (White and Rasmussen, 1998). MUCWTP average flow is 2 500 000 m³/d and the maximal capacity of the treatment plant is 7 600 000 m³/d (Purene, 2002). However, during raining weather and melting snow period high inflow of runoff from street, roof and other surface exceed MUCWTP capacity and the overflow is evacuated without treatment (Purene, 2002).

Montreal wastewaters are treated with a physicochemical process (primary treatment) (Purene, 2002). It consists in gate and grit removal and sedimentation assisted by coagulation with alum and/or ferric chloride and anionic polyelectrolyte. MUCWTP does not disinfect wastewater before discharging it into St-Lawrence River via a 4-Km underground tunnel (Wagner, Brumelis and Gehr, 2002). The primary treatment remove an important proportion of suspended particles, but the final effluent demonstrates a significant level of suspended solid (SS), biochemical oxygen demand (BOD), chemical oxygen demand (COD) and microorganisms (Wagner, Brumelis and Gehr, 2002 ; Payment *et al.*, 2000).

Actually, MUCWTP investigates three disinfection process termed as ultraviolet (UV) radiation, ozonation and peracetic acid (PAA). Chemical disinfectant like peracetic acid has been used commonly in Europe for multiple wastewater applications (Baldry and French, 1989; Lefevre, Audic and Ferrand, 1992 ; Liberti and Notarnicola, 1999 ; Sánchez-Ruiz, Martínez-Royano and Tejero-Monzón, 1995). This process include major advantages such as low capital cost, simple operation, ability to flow-pace and rapid start-up (Wagner, Brumelis and Gehr, 2002). However it efficiency seems to be controversial and also, the storage and use of peracetic acid implicate high security level (Cejka, 2002 ; Wagner, Brumelis and Gehr, 2002).

The mechanism of action of UV radiation consists to inhibit replication of bacteria by damaging desoxyribonucleic acid (DNA) (Gehr and Nicell, 1996). However, bacteria are able to repair their own DNA by various mechanisms and consequently, UV disinfection process may show a slight bacterial regrowth (Gehr and Nicell, 1996). UV disinfection presents many advantages and disadvantages such as low dose to reach disinfection criteria, any disinfectant by-product (DBP), reliability, simple technology; unstable efficiency, a complex maintenance, lost of mercury by the UV lamp, particular program for the storage of used lamp, etc (Tremblay, 2002).

Ozone is a potent oxidizer damaging virus proteins and cellular membrane of bacteria (Tremblay, 2002). Disinfection process by ozonization greatly improves the quality of effluent by reducing the color, smell, pesticides, organophosphates and detergents (Tremblay, 2002). Nevertheless, ozone produce disinfectants by-product such as aldehydes, ketones and carboxylic acids (Gehr and Nicell, 1996). This disinfection process require major and complex infrastructure with specialized employees.

The aim of this study is to characterize the impact of wastewater disinfection on the immune system of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Finally, compare the three disinfection process (UV, Ozone, peracetic acid) between them.

MATERIAL AND METHOD

Animal care

Juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (AQUIPRO, Qc, Can), with a body weight around 7 g, were acclimated at 15 °C and 12h/12h (day/night) for two weeks in 90L glass aquaria containing chlorine free tap water. Fish were fed daily at a rate between 1 and 2 % body weight with commercial G1 food (AQUIPRO). Half of water was renewed each two days (static conditions).

Water parameters

During the experiment, water quality parameters such as temperature, dissolved oxygen, pH and conductivity have been collected with Multi 340i set (HOSKIN Scientific, Mtl, Qc). Also, data concerning nitrite, nitrate and ammonia have been collected with commercial kits (HAGGEN, Mtl, Qc).

Experimental design

Fish were exposed to control group (free chlorinated tap water) and 10% concentration of each treatment corresponding to undisinfected Montreal sewage effluents, effluents disinfected by UV radiation, ozonization and peracetic acid for a period of 28 days. Each group contains fifteen fish.

Effluent disinfection

In order to reduce heterogeneity, this operation was done with 150 L sample of Montreal sewage effluents and subsequently separated to form each treatment. For each treatment, the level of total coliforms and enterococci was measured before and after the disinfection process. UV disinfection process was done by Trojan Technologies inc (London, Ont., CAN). Sewage effluents were disinfected using medium pressure system with a dose of 30 mWs/cm² and a quick contact time. Ozone disinfection was done by the laboratories of Robert Hausler (UQAM) (Mtl, Qc, CAN). Wastewaters were disinfected using a dose of 18 mg/L and a contact time of 18 minutes. Peracetic acid was supplied by Solvay Interlox Inc (Houston, Texas, USA) and the disinfection was performed in INRS-IAF (Mtl, Qc, Can). The disinfection was done using the protocol assessed by Wagner *et al.* (2002). Quickly, it consists to disinfect with a dose of 1,6

mg/L of peracetic acid using a contact time of two hours and finally quench residual peroxycompounds. Each treatment was separately distributed into 1L and 4L polypropylene bottles (Nalgene Brand Products, Rochester, N.Y., USA). All aliquot were freeze at -20 °C.

Preparation of cell suspensions

At sampling time, fish were killed by 0.1% of MS-222 (Boreal Laboratories, Ont., CAN.) and measured for weight and length. Anterior kidney of each fish was removed aseptically and mashed with a 2 ml glass grinder (Wheaton Scientific, New Jersey, USA) containing 1 ml of sterile RPMI 1640 (Bio Media, Qc, CAN) supplemented with heparin (10 U/ml) (Organon Teknika, Ont., CAN.), HEPES (10 mM) (Bio Media), penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100 mg/ml) (Bio media) and 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS) (Bio Media). The cellular suspension was then transferred to 15 ml sterile polypropylene conical tube (17-120 mm) (Sarsted, NC, USA) and final volume was adjusted to 5 ml total with RPMIc.

Leukocytes purification

Cellular suspension (5ml) was laid down over 5 ml of Lympholyte Poly (Cedarlane Laboratories, Ont., CAN) contained into a 15 ml sterile polypropylene conical tube. Suspension was centrifuged at 275 x g during 30 minutes. Leukocytes between the two layers were aspirated with sterile polypropylene pipettes (Sarstedt) and transferred to a 15 ml sterile polypropylene conical tube. The cells were washed twice and adjusted to 1×10^6 cells/ml using supplemented RPMI (without heparin).

Determination of viability

Viability was determined using trypan blue dye exclusion (0.4%) (Sigma Chemical Co., MO, USA). Viable and dead cells were determined microscopically with an hemacytometer (Bright-line, PA, USA).

Phagocytosis Assay

The three immunological assays were done using common protocol in our laboratory (Brousseau *et al.*, 1998). A duplicate of 500 µl volume of each cellular suspension was adjusted to 1×10^6 cells/ml in 5 ml polypropylene round bottom tubes (Sarstedt). Fluorescent latex beads ($d=1.87$

μm) (Polysciences, PA, USA) were added to the cell suspensions in order to respect 100 : 1 (beads : cell) ratio. Tubes were covered with paraffin and protected against light. Cells and beads were incubated at 20 °C for 18 h. Following incubation period, cellular suspensions were layered separately over 3 ml of RPMI supplement with 3% of bovine serum albumin (BSA) (Sigma Chemical Co.) and 10% of SVF. Elimination of free beads was performed by centrifugation at 150 x g at 4°C for 8 minutes. Cell pellets were then resuspended in 0.5 ml of 0.5% formaldehyde (Sigma Chemical Co.) diluted in Hematall (Becton Dickinson, CA, USA). Cells were analysed by flux cytometry using a FACScan (Becton Dickinson, CA, USA) and 5 000 events were recorded. Analyses were done using two biomarkers defined as M1 and M2 that correspond respectively to the percentage of phagocytes containing one bead or more and percent of phagocytes containing three beads or more. These biomarkers represent the percentage of macrophages (M1) and active phagocytic activity of macrophages (M2).

Natural cytotoxic cells (NCC) Assay

The first part of the assay consists in target cells labelling. Initial mortality of YAC-1 cells should be less than 5%. An aliquot of 1 ml of 1×10^7 YAC-1 tumor cells were vigorously thrown onto 10 μl of 3 mM perchlorate 3,3-dioctadecyloxacarbocyanine (DIO) (Sigma Chemical Co.) contained into 15 ml sterile polypropylene conical tube. Cellular suspension was agitated and incubated at 37 °C with 5% of CO₂ for 20 minutes (tube was partially unscrew). After incubation, cells were washed twice and adjusted to 2×10^6 cells/ml.

Contact between effectors and target cells were done into 5 ml polypropylene round bottom tubes with different ratios. The ratios utilized were 10:1 (effectors:target), 20:1 and 40:1. Equal volumes of cellular suspensions were centrifuged at 350 x g for 5 minutes. Cell pellets were then resuspended in 150 μl propidium iodide (PI) (Sigma Chemical Co.) and 150 μl of supplemented RPMI. Cells were centrifuged at 350 x g for 5 minutes, covered with paraffin, protected from light and incubated at 20 °C for 18 hours. Cells were analysed by flow cytometry using a FACScan and 3 000 events were recorded. Analyses were done using a live gate on YAC-1 cells labelling. Data are expressed in percentage of mortality (apoptosis).

Mitogenic Assay

Preliminary tests were done to determine optimal mitogens concentration for lymphocytes proliferation. Mitogens were prepared with sterile RPMI-1640 medium supplemented with HEPES (10 mM), penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100mg/ml), 2.5% (v/v) Sea Grow (East Coast Biologics Inc, North Berwick, Maine, USA) and 2-mercaptoethanol (5 μ l/l) (Sigma Chemical Co.). In 96 wells round bottom microplates (Sarstedt), 100 μ l of 1×10^6 cells/ml were incubated with 20 μ g/ml of phytohemagglutinin (PHA) (Sigma Chemical Co.) or 200 μ g/ml de lipopolysaccharide (LPS) (Sigma Chemical Co.). Samples were tested in triplicate. After 78 hours incubation 0.5 μ Ci of [3 H]-methyl thymidine (ICN Biomedicals, CA., USA) was added in each well and incubated for 18 hours more. Cells were harvested with a semi-automatic cell harvester (Skatron Instruments As, Lier, Norway) and transferred on fibreglass filter (Skatron Instruments As). Radioactivity was determined with β -scintillation counter (LKB Wallac 1217 Rackbeta) (ChemGen Corp., MD, USA). Data are expressed as disintegration per minutes (DPM).

Statistical analysis

Significant differences between groups were determined by Tuckey test (ANOVA). Preceding Tuckey test, normality and homogeneity of variance were assessed using respectively Kolmogorov-Smirnov test and Levene test. If the event one of these two conditions was not respected, Tuckey test was replaced by a non parametric test, variance of Mann-Withney. Significance was established at $p < 0.05$. All analyses were done using Statistica computer software.

RESULTS

Cellular concentrations

There were no significant differences between the groups after 28 days exposure (Table 1).

Weights and lengths measures

There were no significant differences between the groups for weights parameter (Table 1). Fishes exposed to disinfected or undisinfected effluent showed highly significant increased for length measure (Figure 1). Consequently, the ratio mass/lengths demonstrated highly significant decreased compared to the control group (Figure 2).

Phagocytosis

Fish exposed to undisinfected effluent showed a significant increased of active phagocytic activity of macrophages (M2) when compared to the control group. There was no effect observed for all three disinfection process (UV, PAA, Ozone) (figure 3).

NCC Assay

There were no significant differences between the groups for all three ratios (10:1 – 20:1 – 40:1) after 28 days exposure. Nevertheless, the percentage of mortality of UV radiations disinfection process was found to be slightly lower when compared to the control group for the three ratios (Table 2).

Mitogenic Assay

Unstimulated (normal, natural division process) cells demonstrated a highly significant decreased for ozone disinfection process when compared to the control group. T lymphocytes proliferation (PHA) in fish exposed to PAA and ozone disinfection process showed respectively a significant increased and decreased. B lymphocytes proliferation in fish exposed to the three disinfection process and undisinfected sewage effluent demonstrated any immunomodulation. No effect was observed in trout exposed to UV radiation and undisinfected effluent after 28 days exposure (figure 4).

Water parameters

Water quality parameters were stable with the exception of dissolved oxygen that fluctuated between 70% and 100% for all group.

Bacteriological analysis

UV disinfection process reduced total coliforms by 4 or 5 log and fecal enterococci by 2 or 3 log depending on the dose (20 or 40 mWs/cm²) (Table 3). Disinfection by ozone had decreased total coliforms and fecal enterococci respectively by 4 and 3 log (table 3). Disinfection by PAA did not decreased total coliforms and fecal enterococci (data not shown) (Patrick Cejka, personal communication).

DISCUSSION

Weight and length measures

Fish exposed to disinfected or undisinfected effluent demonstrated an increase of length parameter. We make the assumption that residual concentration of endocrine disrupter could bind to growth hormone receptor and thereby stimulate fish growth. It is known that endocrine disrupter may interfere with the binding, secretion, synthesis, transport, action or elimination of natural hormone that regulate reproduction, development, behaviour and/or homeostasis (Vos *et al.*, 2000). Refuse dump leach contains many endocrine disrupters and the exposure of immature perch demonstrated an increase of somatic growth (g/years) when compared to the reference lake (Noaksson *et al.*, 2001).

Moreover, injection of growth hormones in fish demonstrated that body growth was accelerated (Takagi *et al.*, 1992). Growth hormone (GH) transgenic fish showed enhancement in food conversion and efficiency of growth (Du *et al.*, 1992 ; Krasnov *et al.*, 1999 ; Martinez *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 2000 ; Mori and Devlin, 1999). In natural environment, optimal photoperiod also increase GH level stimulating highest growth rate (Bjornsson, Stefansson and Hansen, 1995 ; Marchant and Peter, 1986).

Fish were longer but they still have the same weight implicating a significant decreased of weight/length ratio. The percentage of adipose tissue was significantly reduced in exposed fish indicating that exposure to effluent require more energy. Consequently, it may predispose trout to diseases, health or reproductive problems (Bernet *et al.*, 2000 et 2001 ; Escher *et al.*, 1999). This result suggests that disinfected effluent still contains endocrine disruptors.

Phagocytosis

There was stimulation for active macrophage activity for the undisinfected effluent group. This result indicates that the three disinfection processes (PAA, UV, Ozone) enhance sufficiently water quality to not modulate innate immunity. This result is in agreement with other phagocytic activity assay done by our team respecting the same exposure conditions (Hébert, unpublished).

Mitogenic Assay

T lymphocytes of fish exposed to PAA and ozone disinfection process indicate adverse effects corresponding respectively to a stimulation and suppression of cells division. There was no disruption of T lymphocytes proliferation for undisinfected effluent group indicating that the modulation is due to the disinfection process itself.

Surface water disinfected by PAA (0.6 and 1 mg/L) also demonstrated a stimulation in micronuclei division of *Tradescantia* (a plant) (Monarca *et al.*, 2003). Stimulation of T lymphocytes division suggests that PAA disinfection by-product or free disinfectant could be genotoxic for exposed organisms. Residual peroxy compound, microbial presence and by-product such as carboxylic acid (Monarca *et al.*, 2002) could also explain this immunostimulation.

Disinfection by-product or residual free ozone suppresses T lymphocytes proliferation. However, *in vitro* exposure of trout red blood cells upon ozone induce the synthesis of reactive oxygen species inside the cell causing damage such as hemolysis, membrane lipid peroxidation (Fukunaga *et al.*, 1999). It seem reasonable to think that ozone or disinfection by-product impair DNA replication or specific cellular mechanism. However, ozone is an unstable gas that is rapidly degraded and contact time with aquatic organisms is fast or absent. To our knowledge there is any evidence concerning genotoxicity or cell toxicity of ozone disinfectant by-products upon aquatic wildlife.

There was no evidence that B lymphocytes proliferation was disrupted by the disinfection processes or either undisinfected wastewater indicating that free disinfectant or by-product do not induce similar cellular response.

In conclusion, disinfected or undisinfected wastewater seems to impact the regulation of developmental processes in trout by unknown endocrine disruptor. Adverse effects occurs for T lymphocytes proliferation depending on the disinfection process. Finally, innate immunity is not modulated by the disinfection process compared to specific immunity in regard to the actual exposure conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been financially supported by the Fonds d'Action Québécois pour le Développement Durable (FAQDD) and le Réseau de Recherche en Écotoxicologie du Saint-Laurent (RRESL). The authors acknowledge the assistance of Christine Yelle, Yves Lafleur, Patrick Cejka and Luc Tremblay from MUCWTP ; Cathy Momacacos from Concordia University ; Patrick Niquette from STEPPE-UQAM ; Caroline Müller, Brigitte Badiwa-Bizowé, Kalum Muray, Julie de Gagné, Annie Lalancette and Marlène Fortier from INRS-IAF.

REFERENCES

- ALLEN Y., P. Matthiessen, S. Haworth, J.E. Thain and S. Feist. 1999. "Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*". Environ. Toxicol. Chem., vol. 18, p. 1791-1800.
- ANDERSON D.P. and M.G. Zeeman. 1995. Immunotoxicology in fish. In G. Rand (ed.). Fundamentals of aquatic toxicology: Effets, environmental fate, and risk assessment. Washington D.C. : Taylor and Francis, p. 371-404.
- BALDRY M.G.C and M.S. French. 1989. "Disinfections of sewage effluent with peracetic acid". Water Sci. Technol., vol. 21, no. 3, p. 203-213.
- BERNET D., H. Schmidt-Posthaus, T. Wahli and P. Burkhardt-Holm. 2000. "Effets of wastewater on fish health : an integrated approach to biomarker responses in brown trout (*Salmo trutta L.*)". J. Aqua. Ecosystem Stress and Recovery, vol. 8, p.143-151.
- BERNET D., H. Schmidt-Posthaus, T. Wahli and P. Burkhardt-Holm. 2001. "Effluent from a sewage treatment work causes changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo trutta L.*)". Ecotox. Environ. Saf., vol. 48, p. 140-147.
- BLACK J.J. and P.C. Baumann. 1991. "Carcinogens and cancers in freshwater fishes". Environ. Health Perspect., vol. 90, p. 27-33.
- BJORNSSON B.T., S.O. Stefansson, T. Hansen. 1995. "Photoperiod regulation of plasma growth hormone levels during parr-smolt transformation of Atlantic salmon : implications for hypoosmoregulatory ability and growth". Gen. Comp. Endocrinol., vol. 100, no. 1, p. 73-82.
- BROUSSEAU P., Y. Payette, B. Blakley, H. Boermans, D. Flipo, H. Tryphomonas and M. Fournier. 1998. Manual of immunological methods. Boston, USA : CRP Press, 141 p.
- BUCHER F. and R. Hofer. 1993. "The effects of treated domestic sewage on three organs (gills, kidney, liver) of brown trout (*Salmo trutta*)". Wat. Res., vol. 27, no. 2, p. 255-261.
- BURKHARDT-HOLM P., M. Escher and W. Meier. 1997. "Waste-water management plant effluents cause cellular alterations in the skin of brown trout". J. Fish Bio., vol. 50, p. 744-758.
- BURKHARDT-HOLM P., D. Bernet and C. Hogstrand. 1999. "Increase of metallothionein-immunopositive chloride cells in the gills of brown trout and rainbow trout after exposure to sewage treatment plant effluents". Histochemical J., vol. 31, p. 339-346.
- CARLINE R.F., A.J. Benson and H. Rothenbacher. 1987. "Long-term effects of treated domestic wastewater on brown trout". Wat. Res., vol. 21, no. 11, p. 1409-1415.
- CASILLAS E., M. Meyers and W.E. Ames. 1983. "Relationship of serum chemistry values to liver and kidney histopathology in English sole (*Parophrys vetulus*) after acute exposure to carbon tetrachloride". Aquat. Toxicol., vol. 3, p. 61-78.

CEJKA P. 2002. Évaluation des risques à la santé publique en tenant compte des différents modes de désinfection. In 2^e journée d'information et d'échanges de la Station d'épuration des eaux usées de la ville de Montréal (Montréal, 3 décembre 2002). Montréal, Station d'épuration des eaux usées de la ville de Montréal. 12 p.

DU S.J., Z.Y. Gong, G.L. Fletcher, M.A. Shears, M.J. King, D.R. Idler and C.L. Hew. 1992. "Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct". Biotechnology (NY), vol. 10, no. 2, p. 176-181.

ESCHER M., T. Wahli, S. Büttner, W. Meier and P. Burkhardt-Holm. 1999. "The effects of sewage plant effluent on brown trout (*Salmo trutta fario*) : a cage experiment". Aquat. Sci., vol. 61, p. 93-110.

EVANS D.L. and L. Jaso-Friedmann. 1994. "Role of protein phosphatases in the regulation of non-specific cytotoxic cell activity". Fish Shellfish Immunol., vol. 18, p.137-146.

FAISAL M., B.A. Weeks, W.K. Vogelbein and R.J. Hugett. 1991. "Evidence of aberration of the natural cytotoxic cell activity in *Fundulus heteroclitus* (Pisces : Cyprinodontidae) from the Elizabeth River, Virginia". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 29, p. 339-351.

FOLMAR L.C., N.D. Denslow, V. Rao, M. Chow, D.A. Crain, J. Enbolm, J. Marcino and L.J. Guillette. 1996. "Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations on feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant". Environ. Health Perspect., vol. 104, p. 1096-1101.

FOURNIER M., D. Cyr, B. Blakley, H. Boerman and P. Brousseau. 2000a. "Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics". Amer. Zool., vol. 40, p. 212-220.

FOURNIER M., D. Cyr, P. Brousseau and H. Tryphonas. 2000b. Biomarkers in immunotoxicology : Evolutionary perspective. In L.Guillett and D. Crain (ed.). Environmental Endocrine Disruptors. NY : Taylor and Francis Publishers. 335 p.

FUKUNAGA K., N. Nakazono, T. Suzuki and K. Takama. 1999. "Mechanism of oxidative damage to fish red blood cells by ozone". IUBMB Life, vol. 48, no. 6, p. 631-4.

GAGNÉ F. and C. Blaise. 1999. "Toxicological effects of municipal wastewaters to rainbow trout hepatocytes". Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 63, p. 503-510.

GEHR R. and J. Nicell. 1996. "Pilot studies and assessment of downstream effects of UV and ozone disinfection of physicochemical wastewater". Water Qual. Res. J. Canada, vol. 31, no. 2, p. 263-281.

GREENLEE A.R., R.A. Brown and S.S. Ristow. 1991. "Nonspecific cytotoxic cells of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) kill YAC-1 targets by both necrotic and apoptotic mechanisms". Dev. Comp. Immunol., vol. 15, p. 153-164.

- GRIZZLE J.M., S.A. Horowitz and D.R. Strenght. 1988. "Caged fish as monitors of pollution : effects of chlorinated effluent from a wastewater treatment plant". Water Res. Bull., vol. 24, no. 5, p. 951-959.
- HARRIES J.E, D.A. Sheahan, S. Jobling, P. Matthiessen, P. Neall, E. Poutledge, R. Rycroft, J.P. Sumpter and T. Taylor. 1996. "A survey of estrogenic activity in U.K. inland waters". Environ. Toxicol. Chem., vol. 15, p. 1993-2002.
- HÉBERT N., S. Ruby, J. Bernier, D. Cyr, F. Gagné, C. Blaise and M. Fournier. "Effects of sewage effluent on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". Unpublished.
- JOBBLING S., C.R. Tyler, M. Nolan and J.P. Sumpter. 1998. The identification of estrogenic effects in wild fish. R&D Technical Report W1119. Bristol, UK : Environment Agency. 115 p.
- KATZ M. 1961. "Lindane toxicity in fish and frogs". Trans. Am. Fish Soc., vol. 90, p. 264-270.
- KOSMALA A., B. Migeon, P. Flammarion and J. Garric. 1998. "Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using the fish biomarker ethoxyresorufin-O-deethylase : field and on-site experiments". Ecotox. Environ. Safety, vol. 41, p. 19-28.
- KRASNOV A., J.J. Agren, T.I. Pitaknen and H. Molsa. 1999. "Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr. (*Salvelinus alpinus L.*). II. Nutrient partitioning in rapidly growing fish". Genet. Anal., vol. 15, no. 3-5, p. 99-105.
- LEFEVRE f., J.M. Audic and F. Ferrand. 1992. "Peracetic acid disinfection of secondary effluents discharged of coastal seawater". Water Sci. Technol., vol. 25, no. 12, p. 155-165.
- LIBERTI L. and M. Notarnicola. 1999. "Advanced treatment and disinfection for municipal wastewater reuse in agriculture". Water Sci. Technol., vol. 40, no. 4-5, p. 235-245.
- LYE C.M., C.L.J. Frid, M.E. Gill and D. McCormick. 1997. "Abnormalities in reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works". Mar. Pollut. Bull., vol. 34, p. 34-41.
- MANNING M.J. and T. Nakanishi. 1996. The specific immune system : cellular defenses. In G. Iwama et T. Nakanishi (ed.). The fish immune system : organism, pathogen, and environment. San Diego, Ca. : Academic Press, p. 159-205.
- MARCHANT T.A. and R.E. Peter. 1986. "Seasonal variations in body growth rates and circulating levels of growth hormone in goldfish, *Carassius auratus*". J. Exp. Zool., vol. 237, no. 2, p. 231-239.
- MARTINEZ R., M.P. Estrada, J. Berlanga, I. Guillen, O. Hernandez, E. Cabrera, R. Pimentel, R. Morales, A. Morales, J.C. Pina, Z. Abad, V. Sanchez, P. Melamed, R. Leonart and J. de la Fuente. 1996. "Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone". Mol. Mar. Biol. Biotechnol., vol. 5, no. 1, p. 62-70.

MARTINEZ R., J. Juncal, C. Zaldivar, A. Arenal, I. Guillen, V. Morera, O. Carrillo, M. Estrada, A. Morales and M.P. Estrada. 2000. "Growth efficiency in transgenic tilapia (*Oreochromis sp.*) carrying single copy of an homologous cDNA growth hormone". Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 267, no. 1, p. 466-472.

MONARCA S., M. Rizzoni, B. Gustavino, C. Zani, A. Alberti and D. Feretti and I. Zerbini. 2003. "Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using in situ plant tests". Environ. Mol. Mutagen., vol. 41, p. 353-359.

MONARCA S., M. Grottolo, D. Feretti, S.D. Richardson, A.D. Thruston, C. Zani, G. Navazio, P. Ragazzo, I. Zerbini and A. Alberti. 2002. "Mutagenicity and disinfection by-products in surface drinking water disinfected with peracetic acid". Environ. Toxicol. Chem., vol. 21, p. 309-318.

MORI T. and R.H. Devlin. 1999. "Transgene and host growth hormone gene expression in pituitary and nonpituitary tissues of normal and growth hormone transgenic salmon". Mol. Cell. Endocrinol., vol. 149, no. 1-2, p. 129-139.

NOAKSSON E., U. Tjärnlund, A.T.C. Bosveld and L. Balk. 2001. "Evidence for endocrine disruption in perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) in a remote Swedish lake in the vicinity of a public refuse dump". Toxicol. App. Pharmacol., vol. 174, p. 160-176.

PAYMENT P., A. Berte, M. Prévost, B. Ménard and B. Barbeau. 2000. "Occurrence of pathogenic microorganisms in the Saint Lawrence River (Canada) and comparison of health risks for populations using it as their source of drinking water". Can. J. Microbiol., vol. 46, p. 565-576.

PURDOM C.E., P.A. Hardiman and V.J. Bye. 1994. "Estrogenic effects of effluent from sewage treatment works". Chem. Ecol., vol. 8, p. 275-285.

PURENNE P. 2002. Rapport annuel 2001. Analyse de la qualité des eaux brutes et de l'eau traitée à la Station d'épuration et évaluation du rendement des installations. Communauté Urbaine de Montréal. Station d'épuration des eaux usées. Division ingénierie de procédé. 46 p.

ROUTLEDGE E.J., D. Sheanan, C. Desbrow, G.C. Brighty, M. Waldock and J. Sumpter. 1998. "Identification of estrogenic chemicals in STW effluent 2. *In vivo* responses in trout and roach". Environ. Sci. Technol., vol. 32, p. 1559-1565.

SANCHEZ-RUIZ C., S. Martínez-Royano and I. Tejero-Monzón. 1995. "An evaluation of the efficiency and impact of raw wastewater disinfection with peracetic prior to ocean discharge". Water Sci. Technol., vol. 32, no. 7, p. 159-169.

SECOMBES C.J. 1996. "The nonspecific immune system : cellular defenses". In G. Iwama and T. Nakanishi (ed.). The fish immune system : organism, pathogen, and environment. San Diego, Ca. : Academic Press, p. 63-103.

TAKAGI Y., S. Moriyama, T. Hirano and J. Yamada. 1992. "Effects of growth hormones on bone formation and resorption in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), as examined by histomorphometry of pharyngeal bone". Gen. Comp. Endocrinol., vol. 86, no. 1, p. 90-95.

TREMBLAY L. 2002. Présentation technique sur l'irradiation ultra-violet et l'ozonation. In 2^e journée d'information et d'échanges de la Station d'épuration des eaux usées de la ville de Montréal (Montréal, 3 décembre 2002). Montréal, Station d'épuration des eaux usées de la ville de Montréal. 15 p.

VOS J.G., E. Dybing, H.A. Greim, O. Ladefoged, C. Lambré, J. V. Tarazona, I. Brandt and A.D. Vethaak. 2000. "Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to european situation". Crit. Rev. Toxicol., vol. 30, no. 1, p. 71-133.

WAGNER M., D. Brumelis and R. Gehr. 2002. "Disinfection of wastewater by hydrogen peroxide or peracetic acid : development of procedures for measurement of residual disinfectant and application to a physicochemically treated municipal effluent". Water Environ. Res., vol. 74, no. 1, p. 33-50.

WARING C.P., R.M. Stagg, K. Fretwell, H.A. McLay and M.J. Costella. 1996. "The impacts of sludge exposure on the reproduction of the sandy goby, *Pomatoschistus minutes*". Environ. Pollut., vol. 93, p. 17-25.

WATTS M., B.L. Munday and C.M. Burke. 2001. "Immune responses of teleost fish". Aust. Vet. J., vol. 79, no. 8, p. 570-574.

WHITE P.A. and J.B. Rasmussen. 1998. "The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters". Mut. Research, vol. 410, p. 223-236.

ZAPATA A.G. 1981. "Lymphoid organs of teleost fish. II. Ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*". Dev. Comp. Immunol., vol. 5, p. 585-590.

ZAPATA A.G. and E.L. Cooper. 1990. The immune system: comparative histophysiology. Chichester : John Wiley and sons. 45 p.

ZAPATA A.G., A. Chiba and A. Varas. 1996. Cells and tissues of the immune system of fish. In G. Iwama and T. Nakanishi (ed.). The Fish Immune System : Organism, Pathogen, and Environment. San Diego, Ca. : Academic Press, p. 1-62.

Table 1. Cellular concentrations and weights measure after 28 days exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to three disinfection process (UV radiation, peracetic acid, ozone) and undisinfected effluent (n=15). (means \pm S.E.)

Measures	Control	UV radiation	PAA	Ozone	Undisinfected
Weight (g)	7.85	7.78	7.18	7.81	7.09
Cell. Conc. (10^6 cells/ml)	3.35 ± 0.39	2.83 ± 0.3	3.61 ± 0.48	4.37 ± 0.45	4.23 ± 0.32

Table 2. Mortality percentage of cancerous cells YAC-1 at 28 days exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to three disinfection process (UV radiation, peracetic acid, ozone) and undisinfected effluent (n=15). (means \pm S.E.)

Ratios	Control	UV radiation	PAA	Ozone	Undisinfected
10:1	20.46 ± 2.19	19.38 ± 1.31	29.20 ± 3.61	28.55 ± 3.96	30.92 ± 3.82
20:1	30.82 ± 4.16	26.75 ± 2.7	37.16 ± 4.95	35.85 ± 4.6	37.94 ± 4.44
40:1	40.22 ± 5.23	35.24 ± 4.81	48.37 ± 6.86	46.84 ± 5.86	44.20 ± 4.97

Table 3. Quatification of coliforms and enterococci (per 100 ml) in Montreal sewage effluent sample before and after the disinfection processes.

Disinfection processes	Total coliforms/100ml		Enterococci/100ml	
	Before	After	Before	After
UV (20 mWs/cm ²)	1 090 000	197	40 800	19
UV (40 mWs/cm ²)	1 090 000	94	40 800	7
Ozone (18 mg/L - 18 min)	170 000	10	84 000	100
PAA (1.6 mg/L - 2h)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

FIGURE LEGEND

Figure 1. Lengths of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after 28 days exposure to three disinfection process and undisinfectied effluent (n=15). ** indicates highly significant difference from control group (p<0.01). (means \pm S.E.)

Figure 2. Ratio mass/lengths of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after 28 days exposure to three disinfection process and undisinfectied effluent (n=15). ** indicates highly significant difference from control group (p<0.05). (means \pm S.E.)

Figure 3. Phagocytic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros macrophages after 28 days exposure to three disinfection process (UV, PAA, ozone) and undisinfectied effluent. Data (means \pm S.E.) are express as percentage of phagocytes (M1) and active macrophage activity (M2). * indicates significant difference from control group (p<0.05).

Figure 4. Mitogenic response of head kidney lymphocytes stimulated with PHA (T lymphocytes) and LPS (B lymphocytes) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed 28 days to three disinfection process (UV, PAA, ozone) and undisinfectied sewage effluent. * indicates significant difference from control group (p<0.05). ** indicates highly significant difference from control group (p<0.01). (DPM \pm S.E.)

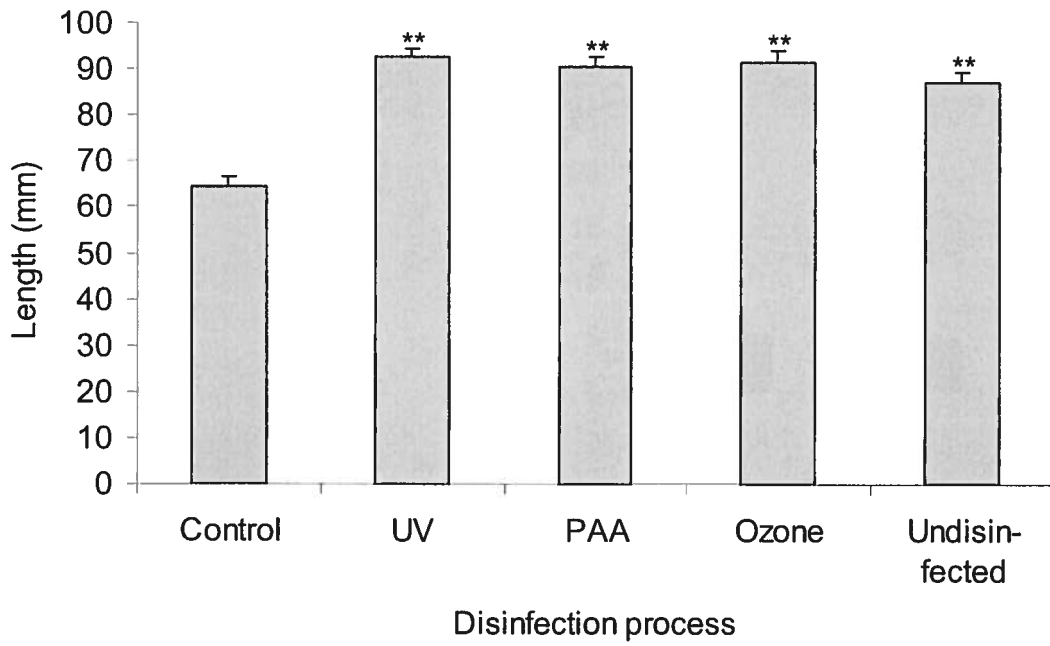


Figure 1

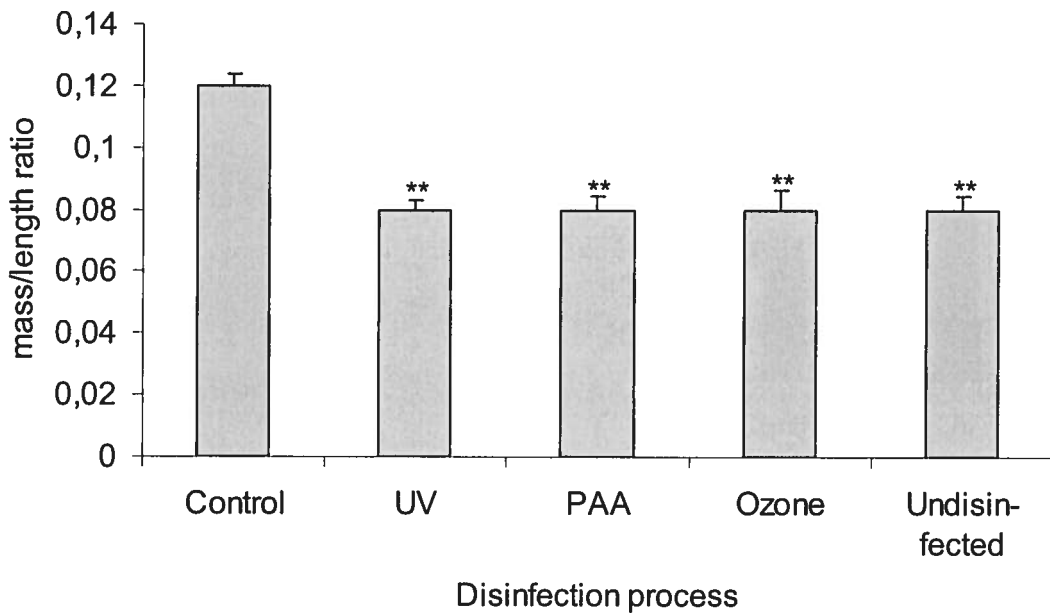


Figure 2

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les effluents municipaux constituent un mélange complexe de produits chimiques et de colonies biologiques reconnus pour perturber le système immunitaire et endocrinien des vertébrés. Le but de cette étude consiste à déterminer l'effet des effluents municipaux ainsi que des substances d'intérêt prioritaire associées aux stations d'épuration (nonylphénol) sur le système immunitaire de truites arc-en-ciel juvéniles.

L'exposition de truites au nonylphénol ($0.85 \mu\text{g/L}$) présente divers effets dont une diminution de l'activité phagocytaire des macrophages du pronéphros. Cette baisse significative pourrait être attribuable à une migration des macrophages au niveau de la peau du poisson. En effet, des truites exposées au nonylphénol ont démontré une densité plus élevée de macrophages au niveau de l'épiderme de la peau (Burkhardt-Holm *et al.*, 2000). De plus, de nombreuses études tendent à démontrer une diminution de l'efficacité de macrophages suite à une exposition à des polluants environnementaux (Fournier *et al.*, 2000a).

De même, une augmentation du pourcentage de mortalité des cellules cancéreuses a été notée suite à 54 jours d'exposition au nonylphénol. Cette augmentation du pourcentage de mortalité pourrait être reliée à une expression plus importante du récepteur FAM impliqué notamment dans le processus de reconnaissance et d'activation cellulaire (Harris et Kapur, 1996). Les composés oestrogènes, tel que le nonylphénol, sont reconnus pour moduler des fonctions reliées à la synthèse ainsi que les mécanismes d'action, de reconnaissance et de liaison (Vos *et al.*, 2000).

De plus, l'induction significative de la division des cellules stimulées par le PHA et le LPS suite à 54 jours d'exposition au nonylphénol, constitue une réponse typique suite à une exposition à une substance œstrogène. Diverses études ont démontré une stimulation de la division de lymphocytes B ou T murins ainsi que des cellules cancéreuses humaines suite à une exposition *in vitro* au nonylphénol (Yamashita, Sugiura et Kuroda, 2002 ; White *et al.*, 1994). Enfin, les diverses composantes du système immunitaire présentent des réponses différentes selon le temps d'exposition.

Cette étude présente un intérêt certain puisqu'il a été possible de constater une modulation des fonctions du système immunitaire en deçà de la valeur estimée sans effet observé (VESEO) établie à 1 $\mu\text{g/L}$. (Environnement Canada, Santé Canada, 1999). En effet, les systèmes biologiques peuvent présenter une sensibilité variable et par conséquent, il pourrait être justifié de réviser cette norme canadienne. Les composés œstrogènes peuvent altérer diverses fonctions biologiques telles que la transcription des gènes ou encore la croissance cellulaire (White *et al.*, 1994). Ainsi, les effets observés au niveau du système immunitaire des truites arc-en-ciel pourraient être attribuables à une interaction entre les systèmes biologiques entraînant la modulation des paramètres mesurés.

La contribution par les fractions solubles et insolubles de l'effluent ont aussi été évaluée afin de différencier l'impact des polluants hydrophiles et hydrophobes (riche en micro-organismes). Les truites exposées aux fractions solubles et insolubles ont démontré une stimulation de la phagocytose par les deux fractions. Ce résultat indique que les polluants hydrophiles et hydrophobes (adhérant aux particules en suspension) ou encore leurs métabolites sont biologiquement actifs et peuvent perturber le système immunitaire non-spécifique. L'effet

prononcé observé pour la fraction insoluble pourrait s'expliquer par un mélange plus complexe de toxiques relâchés par les matières en suspension comportant notamment de polluants hydrophiles et hydrophobes ainsi qu'une concentration de micro-organismes plus importante. À cet effet, les alkylphénols polyéthoxylates acheminés aux stations d'épuration sont rapidement dégradés en composés plus simples et à caractère hydrophobe, tel que le nonylphénol, qui adhèrent aux particules en suspension (White *et al.*, 1994). À la lumière de cette étude, il semble que de tels composés oestrogènes pourraient se détacher et induire un effet toxique sur les systèmes biologiques d'organismes vivants. Enfin, les concentrations sub-létales de polluants ainsi que les bactéries sont reconnus pour leurs effets stimulateurs (Karrow, Bols et Whyte, 2001; Thuvander, Norrgren et Fossum, 1987 ; Zelikoff *et al.*, 1995)

Les poissons exposés à une concentration d'effluent de 1% ont démontré une diminution significative du pourcentage de phagocytose à 54 et 90 jours d'exposition. Les truites exposées 40 jours (1%-50%) ont démontré une stimulation de l'activité des phagocytes pour toutes les concentrations. Ces résultats suggèrent qu'une exposition de longue durée à de faibles concentrations entraînent une diminution de la compétence immunitaire des phagocytes contrairement aux expositions de courte durée à des concentrations d'effluents plus élevées. De nombreuses études effectuées en utilisant divers toxiques semblent indiquer une modulation au niveau de la phagocytose selon le temps d'exposition et la concentration employée (Dunier *et al.*, 1995 ; Lacroix *et al.*, 2001 ; Pegg et Iwama, 1996 ; Zelikoff *et al.*, 1995).

Les truites exposées 54 jours ont démontré une augmentation significative de la prolifération des cellules stimulées par le PHA et le LPS pour toutes les concentrations à l'exception de 0.1%. La prolifération des cellules stimulées par le PHA s'avère significativement réduite pour chacune

des concentrations après 90 jours d'exposition et aucun effet a été observé pour les cellules stimulées par le LPS. Ces résultats suggèrent que les effluents peuvent cibler des populations cellulaires et exercer un effet sur eux (Arkoosh *et al.*, 1996). De même, la division cellulaire s'avère modulée par le temps d'exposition. Ce type de résultat a été observé lors de l'exposition à des métaux (Thuvander, 1989). Diverses études ont démontré une immunomodulation de la division des lymphocytes B et T dépendamment du toxique et de la concentration employés (Flory et Bayne, 1991 ; O'Halloran, Ahokas et Wright, 1996). Les effets variables observés dans le cadre de cette étude peuvent s'expliquer notamment par des facteurs tels que le changement en temps réel de la composition et de la concentration des toxiques (nouvel échantillon à tous les deux jours) ainsi que le temps d'exposition.

De plus, l'impact de trois procédés de désinfection (UV, ozone et acide peracétique) a été évalué au niveau du système immunitaire des truites. La longueur des truites exposées aux effluents désinfectés et non-désinfectés s'avère significativement plus élevée suggérant la présence résiduelle de modulateurs endocriniens. Ces derniers peuvent imiter les hormones naturelles et créer des désordres au niveau de la reproduction, du développement, des comportements et/ou de l'homéostasie (Vos *et al.*, 2000). Les modulateurs endocriniens provenant des écoulements des sites sanitaires ont démontré une augmentation de l'indice somatique de croissance chez des perches juvéniles (Noaksson *et al.*, 2001). De plus, le ratio poids/taille des truites exposées aux effluents a démontré une diminution significative suggérant ainsi une masse adipeuse plus faible et en conséquence, une prédisposition aux maladies, aux problèmes de santé et de reproduction (Bernet *et al.*, 2000 et 2001 ; Escher *et al.*, 1999).

Les truites exposées au groupe effluent non désinfecté ont démontré une stimulation du pourcentage de phagocytose lorsqu'elles ont été comparées au témoin eau douce. Ce résultat suggère que la désinfection des effluents améliore sensiblement la qualité de l'eau afin de ne pas induire un effet au niveau de l'immunité innée. Les poissons exposés au procédé de désinfection à l'ozone ont démontré une suppression de la prolifération des lymphocytes stimulés par le PHA ainsi que des cellules non-stimulées. La présence d'ozone libre résiduel ou de sous produits de désinfection pourraient être à l'origine de cette diminution de la division cellulaire. Une étude réalisée à l'aide de globules rouges de truites exposés à l'ozone a démontré la synthèse d'espèces d'oxygène à l'intérieur de la cellule entraînant des dommages tels que l'hémolyse et la peroxydation des lipides de la membrane (Fukunaga *et al.*, 1999). Les poissons exposés à l'acide peracétique ont démontré une augmentation significative de la prolifération des lymphocytes stimulés par le PHA. Un résultat similaire a été observé au niveau de la division des micronucléi de la plante *Tradescantia* (Monarca *et al.*, 2002).

En conclusion, l'exposition aux effluents municipaux engendre des effets immunitoxiques, tant à la hausse qu'à la baisse, résultant notamment de la composition complexe des polluants, de leur concentration ainsi que du temps d'exposition. Ces réponses équivoques originent de la complexité du mélange que constitue les effluents municipaux. De plus, les effluents de la ville de Montréal démontrent un niveau de complexité particulièrement élevé étant donné leur charge industrielle, commerciale, résidentielle, sanitaire, des eaux de lixiviation d'anciens dépotoirs ainsi que des eaux pluviales. Il s'avère donc possible que les effluents engendrent des réponses fonctionnelles multidirectionnelles. À la lumière de cette étude, on constate l'importance d'évaluer plusieurs paramètres reliés à différents systèmes biologiques afin de cibler les effets induits.

BIBLIOGRAPHIE

- AALTONEN T.M., E.I. Jokinen, J. Lappivaara, S.E. Markkula, H.M. Salo, H. Leppänen et R. Lammi. 2000. "Effects of primary- and secondary-treated bleached kraft mill effluents on the immune system and physiological parameters of roach". Aqua. Toxicol., vol. 51, p. 55-67.
- AHNE W. 1993. "Presence of interleukins (IL-1, Il-3, Il-6) and tumour necrosis factor (TNF alpha) in fish sera". Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., vol. 13, p. 106-107.
- AHNE W. 1994. "Evidence for the early appearance of interleukins and tumor necrosis factor in the phylogenesis of vertebrates". Immunol. Today, vol. 15, p. 137-141.
- ALLEN Y., P. Matthiessen, S. Haworth, J.E. Thain et S. Feist. 1999. "Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*". Environ. Toxicol. Chem., vol. 18, p. 1791-1800.
- ALLISON D., B.J. Kallman, O.B. Cope et C.C. van Valin. 1963. "Insecticides : effects on cutthroat trout of repeated exposure to DDT". Science, vol. 142, p. 958-967.
- ALTENBURGER R., W. Boedeker, M. Faust et L.H. Grimme. 1993. Aquatic toxicology, analysis of combinason effets. In. M. Corn (éd.). Handbook of hazardous materials. San Diego, Ca. : Academic Press, p. 15-27.
- ANDERSON D.P., O.W. Dixon et B.S. Roberson . 1979. "Kinetics of primary immune response in rainbow trout after flush esposure to *Yersinia ruckeri* o-antigen". Dev. Comp. Immunol., vol. 3, p. 739-744.
- ANDERSON D.P., B.S. Roberson, O.W. Dixon. 1982. "Immunosuppression induced by a corticosteroid or an alkylating agent in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) administered a *Yersinia ruckeri* bacterin". Dev. Comp. Immunol., vol. suppl. 2, p. 197-204.
- ANDERSON D.P., B. Merchant, O.W. Dixon, C.F. Schott et E.F. Lizzio. 1983. "Flush exposure and injection immunization of rainbow trout to selected DNP conjugates". Dev. Comp. Immunol., vol. 7, p. 261-268.
- ANDERSON D.P., O.W. Dixon, J.E. Bodammer et E.F. Lizzio. 1989. "Suppression of antibody-producing cells in rainbow trout spleen sections exposed to copper *in vitro*". J. Aquat. Anim. Health, vol. 1, p. 57-61.
- ANDERSON D.P. et M.G. Zeeman. 1995. Immunotoxicology in fish. In G. Rand (éd.). Fundamentals of aquatic toxicology : Effets, environmental fate, and risk assessment. Washington D.C. : Taylor and Francis, p. 371-404.
- ANDERSON R.S. 1992. "In vitro inhibition of medaka phagocyte chemiluminescence by pentachlorophenol". Fish Shellfish Immunol., vol. 2, p. 299-310.

ANDERSON R.S. 1993. Modulation of non-specific immunity by environmental stressors. In J. Fournie et J. Couch, (éd.). Pathobiology of marine and estuarine organisms. Boca Raton, Fl. : CRC Press Inc., p. 483-510.

ARKOOSH M.R. et S.L. Kaattari. 1987. "Effet of early aflatoxin B1 exposure on *in vivo* and *in vitro* antibody responses in rainbow trout, *Salmo gairdneri*". J. Fish Biol., vol. 31(Suppl. A), p. 19-22.

ARKOOSH M.R., E. Clemons, P. Huffman, H.R. Sanborn, E. Casillas et J.E. Stein. 1996. "Leuproliferative response of splenocytes from English Sole (*Pleuronectes velutus*) exposed to chemical contaminants". Environ. Toxicol. Chem., vol. 15, p. 1154-1162.

ARKOOSH M.R. et S.L. Kaattari. 1991. "Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I. An immunological and cellular analysis of the B cell response". Dev. Comp. Immunol., vol. 15, p. 279-293.

ARUKWE A., R. Thibaut, K. Ingebrigtsen, T. Celius, A. Goksøyr et J.P. Cravedi. 2000. "In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*)". Aquatic toxicol., vol. 49, no. 249, p. 289-304.

ASHLEY L.M. 1970. Pathology of fish fed aflotoxins and other antimetabolites. In S.F. Snieszko (éd.). Symposium on diseases of fishes and shellfishes. Washington, D.C. : American Fisheries Society, p. 366-379.

BAYNE C.J. et S. Levy. 1991. "Modulation of oxidative burst in trout myeloid cells by adrenocorticotrophic hormone and catecholamines : Mechanisms of action". J. Leukocyte Biol., vol. 50, p. 554-560.

BENNETT R.O. et R.E. Wolke. 1987. "The effet of sublethal endrin exposure on rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. I. Evaluation of serum cortisol concentrations and immune responsiveness". J. Fish Biol., vol. 31, p. 375-385.

BENNIE D.T., C.A. Sullivan, H.B. Lee, T.E. Peart et R.J. Maguire. 1997. "Occurrence of alkylphenols *et al.*..kylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and upper St. Lawrence River". Sci. Tot. Environ., vol. 193, p. 263-275.

BERNET D., H. Schmidt-Posthaus, T. Wahli et P. Burkhardt-Holm. 2000. "Effets of wastewater on fish health : an integrated approach to biomarker responses in brown trout (*Salmo trutta L.*)". J. Aqua. Ecosystem Stress and Recovery, vol. 8, p.143-151.

BERNET D., H. Schmidt-Posthaus, T. Wahli et P. Burkhardt-Holm. 2001. "Effluent from a sewage treatment work causes changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo trutta L.*)". Ecotox. Environ. Saf., vol. 48, p. 140-147.

BLACK J.J. et P.C. Baumann. 1991. "Carcinogens and cancers in freshwater fishes". Environ. Health Perspect., vol. 90, p. 27-33.

- BOULAY P. et J. Boulay. 1999. Procédé de traitement. Station d'épuration des eaux usées. Communauté Urbaine de Montréal. Mtl, Qc : Une publication du Service de l'Environnement.
- BUCHER F. et R. Hofer. 1993. "The effects of treated domestic sewage on three organs (gills, kidney, liver) of brown trout (*Salmo trutta*)". Wat. Res., vol. 27, no. 2, p. 255-261.
- BUCKE D. 1993. "Aquatic pollution : effects on the health of fish and shellfish". Parasitology, vol. 106, p. 825-837.
- BULLOCK G.L. et H.M. Stuckey. 1975. "*Aeromonas salmonicida* : detection of asymptotically infected trout". Prog. Fish Cult., vol. 37, p. 237-241.
- BURKHARDT-HOLM P., M. Escher et W. Meier. 1997. "Waste-water management plant effluents cause cellular alterations in the skin of brown trout". J. Fish Bio., vol. 50, p. 744-758.
- BURKHARDT-HOLM P., D. Bernet et C. Hogstrand. 1999. "Increase of metallothionein-immunopositive chloride cells in the gills of brown trout and rainbow trout after exposure to sewage treatment plant effluents". Histochemical J., vol. 31, p. 339-346.
- BURKHARDT-HOLM P., T. Wahli et W. Meier. 2000. "Nonylphenol affects the granulation pattern of epidermal mucous cells in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*". Ecotox. Environ. Safety, vol. 46, p. 34-40.
- CAPSI R.R. et R.R. Avtalion. 1984. "The mixed leucocyte reaction (MLR) in carp : bidirectionnal and unidirectional MLR responses". Dev. Comp. Immunol., vol. 8, p. 631-636.
- CARLINE R.F., A.J. Benson et H. Rothenbacher. 1987. "Long-term effects of treated domestic wastewater on brown trout". Wat. Res., vol. 21, no. 11, p. 1409-1415.
- CEJKA P. 2002. Évaluation des risques à la santé publique en tenant compte des différents modes de désinfection. In 2^e journée d'information et d'échanges de la Station d'épuration des eaux usées de la ville de Montréal (Montréal, 3 décembre 2002). Montréal, Station d'épuration des eaux usées de la ville de Montréal. 12 p.
- CHILMONCZYK S. et D. Monge. 1982. "Rainbow trout lymphoid organs : cellular effects of corticosteroids and anti-thymocyte serum". Dev. Comp. Immunol., vol. 6, p. 271-280.
- CHILMONCZYK S. 1992. "The thymus in fish : Development and possible function in the immune response". Annu. Rev. Fish Dis., vol. 2, p. 181-200.
- CHILMONCZYK S., I. Voccia, J.V. Tarazona et D. Monge. 1997. Flow cytometric analysis of fish leucocyte populations exposed to pollutants and pathogens : Modulatory effects induced by experimental procedures. In J.T. Zelikoff, (éd.). Ecotoxicology : Responses, Biomarkers and risk assessment, an OECD workshop. Fair Haven, N.J. : SOS Publications, p. 171-184.

- CLELAND G.B., P.J. McElroy et R.A. Sonstegard. 1988. "The effect of dietary exposure to Aroclor 1254 and/or mirex on humoral immune expression of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)". Aqua. Toxicol., vol. 12, p. 141-146.
- CLEM L.W., R.C. Sizemore, C.F. Ellasaesser et N.W. Miller. 1985. "Monocytes as accessory cells in fish immune responses". Dev. Comp. Immunol., vol. 9, p. 803-809.
- COLDHAM N.G., S. Sivapathasundaram, M. Dave, L.A. Ashfield, T.G. Pottinger, C. Goodall et M.J. Sauer. 1998. "Biotransformation, tissue distribution, and persistence of 4-nonylphenol residues in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". Drug Metab. Dispo., vol. 26, p. 347-353.
- COOKE J.B. et D.E. Hinton. 1999. "Promotion of 17 β -estradiol and β -hexachlorocyclohexane of hepatocellular tumors in medaka, *Oryzias latipes*". Aquat. Toxicol., vol. 45, p. 127-145.
- COSSARINI-DUNIER M., A. Demael, J.L. Rivier et D. Lepot. 1988. "Effects of oral doses of the herbicide atrazine on carp (*Cyprinus carpio*)". Ambio., vol. 17, p. 401-405.
- DANZO B.J. 1997. "Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins". Environ. Health. Perspect., vol. 105, p. 294-301.
- DAVIDSON G.A., A.E. Ellis et C.J. Secombes. 1993. "Route of immunization influences the generation of antibody secreting cells in gut of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaun 1792)". Dev. Comp. Immunol., vol. 17, p. 373-376.
- DAVINA J.H.M., H.K. Parmentier et L.P.M. Timmermans. 1982. "Effect of oral administration on vibrio bacteria on the intestine of cyprinoid fish". Dev. Comp. Immunol. Suppl. A, vol. 2, p. 157-166.
- de KINKELIN P. et M. Dorson. 1973. "Interferon production in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) experimentally infected with Egtved virus". J. Gen. Virol., vol. 19, p. 125-127.
- de KINKELIN P. et M. Le Barre. 1974. Nécrose hématopoïétique infectieuse des salmonidés : production d'interféron circulant induite après l'infection expérimentale de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* Richardson). C.R. Acad. Sci. Paris, vol. 279 D, p. 445-448.
- de KINKELIN P., M. Dorson et A.M. Hattenberger-Baudouy. 1982. "Interferon synthesis in trout and carp after viral infection". Dev. Comp. Immunol., vol. suppl. 2, p. 167-174.
- de KOK T.M.C.M., P.J. Levels, A. van Faassen, M. Hazen, F. ten Hoor et J.C.S. Kleinjans. 1992. "Chromatographic methods for the determination of toxicants in faeces". J. Chromatogr., vol. 580, p. 135-159.
- de LUCA D., M. Wilson et G.W. Warr. 1983. "Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defines with monoclonal antibodies to IgM". Eur. J. Immunol., vol. 13, p. 546-551.

DESBROW C., E.J. Routledge, G. Brighty, J.P. Sumpter et M. Waldock. 1998. "Identification of oestrogenic chemicals in STW effluent. I. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening". Environ. Sci. Technol., vol. 32, p. 1549-1558.

DETHLOFF G.M., H.C. Bailey et K.J. Maier. 2001. "Effects of dissolved copper on select haematological, biochemical, and immunological parameters of wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". Arch. Environ. Contam. Toxicol., vol. 40, p. 371-380.

DORSON M., P. de Kinkelin et C. Torchi. 1992. "Interferon synthesis in rainbow trout fry following infection with infectious pancreatic necrosis virus". Fish Shellfish Immunol., vol. 2, p. 311-313.

DUNIER M. et A.K. Siwiki. 1994. "Effect of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity. I. Effect of lindane on antibody-secreting cells (ASC) measured by ELISPOT Assay". Ecotox. Environ. Saf., vol. 27, p. 1-6.

DUNIER M., A.K. Siwiki, J. Scholtens, S.D. Molin, C. Vergnet et M. Studnicka. 1994. "Effect of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity. III. Effect on non-specific immunity and B lymphocyte functions". Ecotox. Environ. Saf., vol. 27, p. 324-334.

DUNIER M., C. Vergnet, A.K. Siwiki et V. Verlhac. 1995. "Effect of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity. IV. Prevention of non-specific and specific immunosuppression by dietary vitamin C (Ascorbate-2-polyphosphate)". Ecotox. Environ. Saf., vol. 30, p. 259-268.

ELASSER M.S., B.S. Roberson et F.M. Hetrick. 1986. "Effects of metals on the chemiluminescent response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) phagocytes". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 12, p. 243-250.

ELCOMBE B.M., R.J.Chang, C.J. Taves et J.L. Winkelhake. 1985. "Evolution of antibody structure and effector functions : comparative hemolytic activities of monomeric and tetrameric IgM from rainbow trout, *Salmo gairdneri*". Comp. Biochem. Physiol., vol. 80B, no.4, p. 697-706.

ELLIS, A.E. 1977. "The leucocytes of fish : A review". J. Fish Biol., vol. 11, p. 453-491.

ELLIS A.E. 1986. "The function of teleost fish lymphocytes in relation to inflammation". Int. J. tiss. React., vol. 8, p. 263-270.

ENAME N.A., D. Bowser, K. Frenkel, K.S. Squibb et J.T. Zelikoff. 1991. "Fish immune response : A biomarker for detecting the effects of cadmium exposure". Proc. Soc. Environ. Toxicol. Chem., vol. 12, p.187-197.

ENVIRONNEMENT CANADA, SANTÉ CANADA. 1999. "Loi canadienne sur la protection de l'environnement. Liste des substances d'intérêt prioritaire, Rapport d'évaluation : le nonylphénol et ses dérivés éthoxylés." 105p.

- ESCARNÉ R., D.G. Cyr, K. Finnson, D.J. Marcogliese, J. Bernier et M. Fournier. 1999. "Effect of municipal sewage effluent on the immune and thyroid function of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". Non publié.
- ESCHER M., T. Wahli, S. Büttner, W. Meier et P. Burkhardt-Holm. 1999. "The effects of sewage plant effluent on brown trout (*Salmo trutta fario*) : a cage experiment". Aquat. Sci., vol. 61, p. 93-110.
- ETLINGER H.M., H.O. Hodgins et J.M. Chiller. 1976. "Evolution of lymphoid system. I. Evidence for lymphocyte heterogeneity in rainbow trout revealed by the organ distribution of mitogenic responses". J. Immunol., vol. 116, p. 1547-1553.
- ETLINGER H.M., H. O. Hodgins et J.M. Chiller. 1977. "Evolution of lymphoid system. III. Evidence for immunoglobulin determinants on rainbow trout lymphocytes and demonstration of mixed leukocyte reaction". Eur. J. Immunol., vol. 7, p. 881-886.
- EVANS D.L. et L. Jaso-Friedmann. 1992. "Nonspecific cytotoxic cell as effectors of immunity in fish". Annu. Rev. Fish Dis., vol. 2, p. 109-121.
- FAISAL M., B.A. Weeks, W.K. Vogelbein et R.J. Hugett. 1991a. "Evidence of aberration of the natural cytotoxic cell activity in *Fundulus heteroclitus* (Pisces : Cyprinodontidae) from the Elizabeth River, Virginia". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 29, p. 339-351.
- FAISAL M., M.S.M. Marzouk, C.L. Smith et R.J. Huggett. 1991 b. "Mitogen induced proliferative responses of lymphocytes from spot (*Leiostomus xanthurus*) exposed to polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated environments". Immunopharmacol. Immunotoxicol., vol. 13, p. 311-327.
- FÄNGE R. et A. Pulsford. 1985. The thymus of the angler fish *Lophius piscatorius* (Pisces : teleostei) : A light and electron microscopic study. In M.J. Manning et M.F. Tatner (éd.). Fish immunology. London : Academic Press, p. 293-311.
- FEVOLDEN S.E., K.H. Roed et B. Gjerde. 1994. "Genetic components of post-stress cortisol and lysozyme activity in Atlantic salmon; correlations to disease resistance". Fish Shellfish Immunol., vol. 4, p. 507-519.
- FLANO E., F. Alvares, P. López-Fierro, B.E. Razquin, A.J. Villena et A.G. Zapata. 1996. "In vitro and in vivo characterization of fish thymic nurse cells". Develop. Immunol., vol. 5, p. 17-24.
- FLORY C.M. et C.J. Bayne. 1991. "The influence of adrenergic and cholinergic agents on the chemiluminescent and mitogenic responses of leucocytes from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*". Dev. Comp. Immunol., vol. 15, p. 135-142.
- FOLMAR L.C., N.D. Denslow, V. Rao, M. Chow, D.A. Crain, J. Enbolm, J. Marcino et L.J. Guillette. 1996. "Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations on feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant". Environ. Health Perspect., vol. 104, p. 1096-1101.

FOURNIER M., A. Lacroix, I. Voccia, P. Brousseau. 1998. "Phagocytic and metabolic activities of macrophages from mummichog naturally exposed to pulp mill effluents in the Miramichi River". Ecotoxicol. Environ. Saf., vol. 40, p. 177-183.

FOURNIER M., D. Cyr, B. Blakley, H. Boerman et P. Brousseau. 2000. "Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics". Amer. Zool., vol. 40, p. 212-220.

FRACASSO M.E., A. Barba, G. Tessari, S. Gasperini et F. Brunello. 1993. "Urinary mutagenic activity after different immunosuppressive protocols in renal transplant patients". Mutation Res., vol. 319, p. 279-283.

FUKUNAGA K., N. Nakazono, T. Suzuki et K. Takama. 1999. "Mechanism of oxidative damage to fish red blood cells by ozone". IUBMB Life, vol. 48, no. 6, p. 631-4.

GAGNÉ F. et C. Blaise. 1999. "Toxicological effects of municipal wastewaters to rainbow trout hepatocytes". Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 63, p. 503-510.

GATTA P.P., K.D. Thompson, R. Smullen, A. Piva, S. Test et A. Adam. 2001. "Dietary organic chromium supplementation and its effect on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". Fish Shell. Immunol., vol. 11, no. 5, p. 371-382.

GEHR R. et J. Nicell. 1996. "Pilot studies and assessment of downstream effects of UV and ozone disinfection of physicochemical wastewater". Water Qual. Res. J. Canada, vol. 31, no. 2, p.263-281.

GERHARD A. 1998. "Whole effluent toxicity testing with *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792) : survival and behavioral responses to a dilution series of a mining effluent in South Africa". Arch. Environ. Contam. Toxicol., vol. 35, p. 309-316.

GILL T.S., J. Pande et H. Tewari. 1991. "Hemopathological changes associated with experimental aldicarb poisoning in fish (*Puntius conchonius* Hamilton)". Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 47, p. 628-633.

GRAHAM S. et C.J. Secombes. 1988. "The production of macrophage-activating factor from rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes". Immunology, vol. 65, p. 293-297.

GRAHAM S. et C.J. Secombes. 1990. "Do fish lymphocytes secrete interferon- γ ?" J. Fish Biol., vol. 36, p. 563-573.

GREENLEE A.R., R.A. Brown et S.S. Ristow. 1991. "Nonspecific cytotoxic cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kill YAC-1 targets by both necrotic and apoptotic mechanisms". Dev. Comp. Immunol., vol. 15, p. 153-164.

GRIFFIN B.R. 1984. "Random and directed migration of trout (*Salmo gairdneri*) leucocytes : activation by antibody, complement, and normal serum components". Dev. Comp. Immunol., vol. 8, p. 589-597.

GRINDE B., J. Jollès et P. Jollès. 1988. "Purification and characterisation of two lysozymes from rainbow trout". Eur. J. Biochem., vol. 173, p. 269-273.

GRIZZLE J.M., S.A. Horowitz et D.R. Strenght. 1988. "Caged fish as monitors of pollution : effects of chlorinated effluent from a wastewater treatment plant". Water Res. Bull., vol. 24, no. 5, p. 951-959

HALVER J.E. 1967. Crystalline aflatoxin and other vectors for trout hepatoma. In J.E. Halver et I.A. Mitchell (éd.). Trout hepatoma research conference papers. Washington D.C. : Bureau of sport fisheries and wildlife Res. Rep. 70, p. 78-81.

HARRELL L.W., H.M. Etlinger, H.O. Hodgins. 1976. "Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease. II. Anti-*Vibrio anguillarum* activity in mucus and observations of complement". Aquaculture, vol. 7, p. 363-370.

HARRIES J.E, D.A. Sheahan, S. Jobling, P. Matthiessen, P. Neall, E. Poutledge, R. Rycroft, J.P. Sumpter et T. Taylor. 1996. "A survey of estrogenic activity in U.K. inland waters". Environ. Toxicol. Chem., vol. 15, p. 1993-2002.

HARRIS D.T., R. Kapur, C. Frye, A. Acevedo, T. Camenisch, L. Jaso-Friedmann et D.L. Evans. 1992. "A species-conserved NK cell antigen receptor is a novel vimentin-like molecule". Dev. Comp. Immunol., vol. 16, p. 395-403.

HARRIS D.T. et R. Kapur. 1996. "Molecular characterization of an evolutionarily conserved function-associated molecule (FAM) on *Natural killer* (NK) cells". In J.S. Stolen, T.C. Fletcher, C.J. Bayne, C.J. Secombes, J.T. Zelikoff, L.E. Twerdok et D.P. Anderson (ed.). Modulators of immune responses : The evolutionary trail. Volume 2. Fair Haven, N.J. : SOS Publications, p. 167-182.

HART S., A.B. Wrathmell, J.E. Harris et T.H. Grayson. 1988. "Gut immunology in fish : a review". Dev. Comp. Immunol., vol. 17, p. 241-248.

HAYATSU H., T. Hayatsu et Wataya. 1986. "Use of bleu cotton for detection of mutagenicity in human feces excreted after ingestion of cooked meat". Environ. Health Perspect., vol. 67, p. 32-34.

HENDRICKS J.D., T.P. Putnam, D.D. Bills et R.O. Sinnhuber. 1977. "Inhibiting effect of polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) on aflatoxin B1 carcinogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)". J. Nat. Cancer Inst., vol. 59, p. 1545-1553.

HETRICK F.M., M.D. Knittel et J.L. Fryer. 1979. "Increased susceptibility of rainbow trout to infectious hematopoietic necrosis virus after exposure to copper". Appl. Environ. Microbiol., vol. 37, p. 198-201.

HILDEMANN W.H. et E.L. Cooper. 1963. "Immunogenesis of homograft reactions in fishes and amphibians". Fed. Proc., vol. 22, p. 1145-1155.

HJELMELAND K., M. Christie et J. Raa. 1983. "Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance". J. Fish Biol., vol. 23, p. 13-22.

HOFFMAN E.J., G.L. Mills, J.S. Latimer et J.G. Quinn. 1984. "Urban runoff as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons to coastal waters". Environ. Sci. Technol., vol.18, p.580-587.

IWAMA G. et T. Nakanishi. 1996. The fish immune system : organism, pathogen, and environment. San Diego, Ca. : Academic Press, 379 p.

JANG S.I., L.J. Hardie et C.J. Secombes. 1995a. "Elevation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity with macrophage-derived supernatants". J. leukoc. Biol., vol. 57, no. 6, p. 943-947.

JANG S.I., V. Mulero, L.J. Hardie et C.J. Secombes. 1995b. "Inhibition of rainbow trout phagocyte responsiveness to human tumor necrosis factor α (hTNF α) with monoclonal antibodies to the hTNF α 55 kDa receptor". Fish Shellfish Immunol., vol. 5, p. 61-69.

JENSEN L.E., M.P. Hiney, D.C. Shields, C.M. Uhlar, A.J. Lindsay et A.S. Whitehead. 1997. "Acute phase proteins in salmonids". J. immunol., vol. 158, p. 384-392.

JOBLING S., D.A. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen et J.P. Sumpter. 1996. "Inhibition of testicular growth in trout exposed to environmental estrogens". Environ. Toxicol. Chem., vol. 15, p. 194-202.

JOBLING S., C.R. Tyler, M. Nolan et J.P. Sumpter. 1998. The identification of estrogenic effects in wild fish. R&D Technical Report W1119. Bristol, UK : Environment Agency. 115 p.

JOLLÈS P. et J. Jollès. 1984. "What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday". Mol. Cell. Biochem., vol. 63, p. 165-189.

JOHNSON L.L., S.Y. Sol, D.P. Lomax, G.M. Nelson, C.A. Sloan et E. Casillas. 1997. "Fecundity and egg weight in English sole, *Pleuronectes vetulus*, from Puget Sound, Washington : influence of nutritional status and chemical contaminants". FB., vol. 95, p.231-249.

JUUL-MADSEN H.R., J. Glamann, H.O. Madsen et M. Simonsen. 1992. "MHC class II beta-chain expression in the rainbow trout". Scand. J. Immunol., vol. 35, p. 687-694.

KAASTRUP P., B. Nielson, V. Horlyck et M. Simonsen. 1988. "Mixed lymphocyte reactions (MLR) in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, cibling". Dev. Comp. Immunol., vol. 12, p. 801-808.

KAATTARI S.L., M.J. Irwin, M.A. Yui, R.A. Tripp et J.S. Parkins. 1986. "Primary in vitro stimulation of antibody production by rainbow trout lymphocytes". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 12, p. 29-38.

KAATTARI S.L. 1992. "Fish B lymphocytes : defining their form and function". Ann. Rev. Fish Dis., vol. 2, p. 161-180.

- KAATTARI S.L et J.D. Piganelli. 1996. The specific immune system : humoral defense. In G. Iwama et T. Nakanishi (éd.). The fish immune system : organism, pathogen, and environment. San Diego, Ca. : Academic Press, p. 207-253.
- KARROW N.A., N.C. Bols, J.J. Solomon, D.G. Dixon et H.J. Boermans. 2001. "Effects of creosote exposure on rainbow trout pronephros phagocyte activity and percentage of lymphoid B cells". J. Toxicol. Environ. Health A, vol. 63, no. 5, p. 363-381.
- KHAN R.A. et J. Thulin. 1991. "Influence of pollution on parasites of aquatic animals". Adv. Parasitol., vol. 30, p. 201-238.
- KING S.F. 1962. Some effects of DDT on the guppy and the brown trout : report 299. Washington, D.C. : US Fish Wildl. Serv. Spec. Sci. Rep. Fish, 32p.
- KNIGHT J., J.M. Stet et C.J. Secombes. 1998. "Modulation of MHC class II expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophages by TNF α and LPS". Fish Shell. Immunol., vol. 8, p. 545-553.
- KODAMA H., F. Yamada, T. Murai, Y. Nakanishhi, T. Mikami et H. Izawa. 1989. "Activation of trout macrophages and production of CRP after immunisation with *Vibrio anguillarum*". Dev. Comp. Immunol., vol. 13, p. 123-132.
- KOSMALA A., B. Migeon, P. Flammarion et J. Garric. 1998. "Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using the fish biomarker ethoxyresorufin-O-deethylase : field and on-site experiments". Ecotox. Environ. Safety, vol. 41, p. 19-28.
- LACROIX A., M. Fournier, M. Lebeuf, J.J. Nagler et D.G. Cyr. 2001. "Phagocytic response of macrophages from the pronephros of American plaice (*Hipoglossoides platessoides*) exposed to contaminated sediments from Baie des Anglais, Quebec". Chemosphere, vol. 45, p. 599-607.
- LAMCHE G. et P. Burkhardt-Holm. 2000. "Nonylphenol provokes a vesiculation of the golgi apparatus in three fish epidermis cultures". Ecotox. Environ. Safety, vol. 47, p. 137-148.
- LANGEVIN P. 2002. Contrôle des débordements des réseaux municipaux. In 2^e journée d'information et d'échanges de la Station d'épuration des eaux usées de la ville de Montréal (Montréal, 3 décembre 2002). Montréal, Station d'épuration des eaux usées de la ville de Montréal. 14 p.
- LATIMER J.S., E.J. Hoffman, G. Hoffman, J.L. Fasching et J.G. Quinn. 1990. "Sources of petroleum hydrocarbons in urban runoff". Water Air Soil Pollut., vol. 52, p. 1-21.
- LEWIS T., H. Zang et L. Kaattari. 2000. Molecular mechanisms of affinity maturation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Pergamon Cairns : 8th Congress of International Society of Developmental and Comparative Immunology. 33 p.
- LORENZEN N. et S.E. Lapatra. 1999. "Immunity to rhabdoviruses in rainbow trout : the antibody response". Fish Shell. Immunol., vol. 9, p. 345-360.

LYE C.M., C.L.J. Frid, M.E. Gill et D. McCormick. 1997. "Abnormalities in reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works". Mar. Pollut. Bull., vol. 34, p. 34-41.

MAISSE G. et M. Dorson. 1976. "Production d'agglutinines anti *Aeromonas salmonicida* par la truite arc-en-ciel influence de la température, d'un adjuvant et d'un immunodépresseur". Ann. Rech. Veter., vol. 7, p. 307-312.

MALIN D.C., B.B. McCain, J.T. Landahl, M.S. Myers, M.M. Krahn, D.W. Brown, S.L. Chan et W.T. Roubal. 1988. "Neoplastic and other diseases in fish in relation to toxic chemicals : An overview". Aquat. Toxicol., vol. 11, p. 43-67.

MANNING M.J., M.F. Grace et C.J. Secombes. 1992. Developmental aspect of immunity and tolerance in fish. In R.J. Roberts (éd.). Microbial diseases of fish. London : Academic Press, p. 31-46.

MANNING M.J. et T. Nakanishi. 1996. The specific immune system : cellular defenses. In G. Iwama et T. Nakanishi (éd.). The fish immune system : organism, pathogen, and environment. San Diego, Ca. : Academic Press, p. 159-205.

MANNING T.M., S.P. Wilson et J.C. Chapman. 1996. "Toxicity of chlorine and other chlorinated compounds to some australian aquatic organisms". Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 56, p. 971-976.

MARSDEN M.J., D. Cox et C.J. Secombes. 1994. "Antigen-induced release of macrophage activating factor from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* leucocytes". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 42, p. 199-208.

MARSDEN M.J., S.H. Hamdani et C.J. Secombes. 1995. "Proliferative responses of rainbow trout, *Aeromonas salmonicida*". Fish Shellfish Immunol., vol. 5, p. 199-210.

MAYER K.S., F.L. Mayer et Jr. A. Witt. 1985. "Waste transformer oil and PCB toxicity to rainbow trout". Trans. Am. Fish Soc., vol. 114, p. 869-886.

MESEGUER J., M.A. Esteban, A. Lopez-Ruiz et E. Bielek. 1994. "Ultrastructure of nonspecific cytotoxic cells in teleosts". Anatomical Record., vol. 239, p. 468-474.

MILLER N.W., R.C. Sizemore et L.W. Clem. 1986. "Phylogeny of lymphocyte heterogeneity : the cellular requirements for the mixed leukocyte reaction in catfish". J. Immunol., vol. 134, p. 2884-2888.

MÖCK A. et G. Peters. 1990. "Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport, and water pollution". J. Fish Biol., vol. 37, p. 873-885.

- MONARCA S., M. Grottolo, D. Feretti, S.D. Richardson, A.D. Thruston, C. Zani, G. Navazio, P. Ragazzo, I. Zerbini et A. Alberti. 2002. "Mutagenicity and disinfection by-products in surface drinking water disinfected with peracetic acid". Environ. Toxicol. Chem., vol. 21, p. 309-318.
- MURAI T., H. Kodama, M. Nakai, T. Mikami et H. Izawa. 1990. "Isolation and characterization of rainbow trout C-reactive protein". Dev. Comp. Immunol., vol. 14, p. 49-58.
- NAKANISHI Y., H. Kodama, T. Murai, T. Mikami et H. Izawa. 1991. "Activation of rainbow trout complement by C-reactive protein". Am. J. Vet. Res., vol. 52, no. 3, p. 397-401.
- NAKANISHI T., K. Aoyagi, C. Xia, J.M. Dijkstra et M. Ototake. 1999. "Specific cell-mediated immunity in fish". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 72, p. 101-109.
- NESTEL H. et J. Budd. 1975. "Chronic oral exposure of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) : pathological effects". Can. J. Comp. Med., vol. 39, p. 208-217.
- NOAKSSON E., U. Tjärnlund, A.T.C. Bosveld et L. Balk. 2001. "Evidence for endocrine disruption in perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) in a remote Swedish lake in the vicinity of a public refuse dump". Toxicol. App. Pharmacol., vol. 174, p. 160-176.
- NONAKA M., S. Natsuume-Sakai et M. Takahashi. 1981a. The complement system of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). II. Purification and characterization of the fifth component (C5). J. Immunol., vol. 126, p. 1495-1498.
- NONAKA M., N. Yamaguchi, S. Natsuume-Sakai et M. Takahashi. 1981b. The complement system of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). I. Identification of the serum lytic system homologous to mammalian complement. J. Immunol., vol. 126, p. 1389-1494.
- NONAKA M., M. Iwaki, C. Nakai, M. Nozaki, T. Kaidoh, S. Natsuume-Sakai et M. Takahashi. 1984. "Purification of a major serum protein of rainbow trout (*Salmo garidneri*) homologous to the third component of mammalian complement". J. Biological Chem., vol. 259, p. 6327-6333.
- O'HALLORAN K., J.T. Ahokas et P.F.A. Wright. 1996. *In vitro* responses of fish immune cells to three classes of pesticides. In J. S. Stolen, T.C. Fletcher, C.J. Bayne, C.J. Secombes, J.T. Zelikoff, L.E. Twerdok et D.P. Anderson (éd.). Modulators of immune responses : The evolutionary trail. Volume 2. Fair Haven, N.J. : SOS Publications, p. 535-538.
- OHE T. 1997. "Quantification of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines, MeIQx, Trp-P-2 and PhIP, contributing highly to the genotoxicity of the river water". Mutation Res., vol. 393, p. 73-79.
- O'NEILL J.G. 1981a. "Effects of intraperitoneal lead and cadmium on the humoral immune response of *Salmo trutta*". Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 27, p. 42-48.
- O'NEILL J.G. 1981b. "The humoral immune response of *Salmo trutta* L. and *Cyprinus carpio* L. exposed to heavy metals". J. Fish Biol., vol. 19, p. 297-306.

PARTULA S., A. De Guerra, J.S. Fallah et J. Charlemagne. 1995. "Structure and diversity of the T cell antigen receptor β -chain in the teleost fish". J. immunology., vol. 155, p. 699-705.

PARTULA S., A. De Guerra, J.S. Fallah et J. Charlemagne. 1996. "Structure and diversity of the TCR a-chain in the teleost fish". J. immunol., vol. 157, p. 207-212.

PAYMENT P., A. Berte, M. Prévost, B. Ménard et B. Barbeau. 2000. "Occurrence of pathogenic microorganisms in the Saint Lawrence River (Canada) and comparison of health risks for populations using it as their source of drinking water". Can. J. Micribiol., vol. 46, p. 565-576.

PEGG J.R. et G.K. Iwama. 1996. "The effects of stress and cortisol on phagocyte function in juvenile salmonids". In J. S. Stolen, T.C. Fletcher, C.J. Bayne, C.J. Secombes, J.T. Zelikoff, L.E. Twerdok and D.P. Anderson (ed.). Modulators of immune responses : The evolutionary trail. Volume 2. Fair Haven, N.J. : SOS Publications, p. 233-239.

PICKERING A.D et J. Duston. 1983. "Administration of cortisol to brown trout, *Salmo trutta* L., and its effects on the susceptibility to *Saprolegnia* infection and furunculosis". J. Fish Biol., vol. 23, p. 163-175.

PICKERING A.D. 1984. "Cortisol-induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L". Gen. Comp. Endocrin., vol. 53, p. 252-259.

POULIN R. 1992. "Toxic pollution and parasitism in freshwater fish". Parasitology Today, vol. 8, no. 2, p. 58-60.

PURDOM C.E., P.A. Hardiman et V.J. Bye. 1994. "Estrogenic effects of effluent from sewage treatment works". Chem. Ecol., vol. 8, p. 275-285.

PURENNE P. 2002a. Rapport annuel 2001. Analyse de la qualité des eaux brutes et de l'eau traitée à la Station d'épuration et évaluation du rendement des installations. Communauté Urbaine de Montréal. Station d'épuration des eaux usées. Division ingénierie de procédé. 46 p.

PURENNE P. 2002b. Station d'épuration des eaux usées : traitabilité des eaux usées. In 2^e journée d'information et d'échanges de la Station d'épuration des eaux usées de la ville de Montréal (Montréal, 3 décembre 2002). Montréal, Station d'épuration des eaux usées de la ville de Montréal. 5 p.

ROBERTSON C.H., S. Hane, B.C. Wexler et A.P. Rinfret. 1963. "The effects of hydrocortisone on immature rainbow trout (*Salmo gairdneri*)". Gen. Comp. Endocrinol., vol. 3, p. 422-432.

ROUTLEDGE E.J., D. Sheanan, C. Desbrow, G.C. Brighty, M. Waldock et J. Sumpter. 1998. "Identification of estrogenic chemicals in STW effluent 2. In vivo responses in trout and roach". Environ. Sci. Technol., vol. 32, p. 1559-1565.

SAKAI D.K. 1982. "Immunological roles of sensitive lymphocytes and resistant lymphocytes against cyclophosphamide in rainbow trout immune system reorganized by adoptive transfer". Bull. Jpn. Sos. Sci. Fish., vol. 48, p. 1059-1064.

- SAKAI D.K. 1983. "Lytic and bactericidal properties of salmonid sera". J. Fish Biol., vol. 23, p. 457-466.
- SAKAI D.K. 1984. "Opsonization by fish antibody and complement in the immune phagocytocytosis by peritoneal exudates cells isolated from salmonid fishes". J. Fish Dis., vol. 7, p. 29-38.
- SAKAI D.K., K. Suzuki et T. Awakura. 1994. "Ontogenesis of salmonid complement and its nonspecific defense to viral infections". Sci. Rep. Hokkaido Fish Hatchery, vol. 48, p. 25-31.
- SANCHEZ C., P. Lopez-Fierrot, A.G. Zapata et J. Dominguez. 1993. "Characterisation of monoclonal antibodies against heavy and light chains of trout immunoglobulin". Fish Shellfish Immunol., vol. 3, p. 237-251.
- SANCHEZ-DARDON J., I. Voccia, A. Hontela, S. Chilmonczyk, M. Dunier, H. Boermans, B. Blakley et M. Fournier. 1999. "Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vivo*". Environ. Toxicol. Chem., vol. 18, no. 7, p. 1492-1497.
- SCHOENTHAL N.D. 1963. "Some effects of DDT on cold water fish and fish-food organisms". Proc. Montana Acad. Sci., vol. 23, p. 63-68.
- SECOMBES C.J. 1987. "Lymphokine release from rainbow trout leucocytes stimulated with concanvalin A. Effects upon macrophage spreading and adherence". Dev. Comp. Immunol., vol. 11, p. 513-520.
- SECOMBES C.J. 1990. "Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity". Tech. Fish Immunol., vol. 1, p. 137-154.
- SECOMBES C.J et T.C. Fletcher. 1992. "The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish". Ann. Rev. Fish Dis., vol. 2, p. 53-71.
- SECOMBES C.J. 1994. "Macrophage activation in fish". Modulat. Fish Immune Responses, vol. 1, p. 421-436.
- SECOMBES C.J. 1996. The nonspecific immune system : cellular defenses. In G. Iwama et T. Nakanishi (éd.). The fish immune system : organism, pathogen, and environment. San Diego, Ca. : Academic Press, p. 63-103.
- SECOMBES C.J., L.J. Hardie et G. Daniels. 1996. "Cytokines in fish : an update". Fish Shellfish Immunol., vol. 6, p. 291-304.
- SECOMBES C.J. 1997. "Phylogeny of cytokines". Dev. Comp. Immunol., vol. 21, p. 187-196.
- SECOMBES C.J., J. Zou, G. Daniels, C. Cunningham, A. Koussounadis et G. Kemp. 1998. "Rainbow trout cytokine and cytokine receptor genes". Immun. Rev., vol. 166, p. 333-340.

SECOMBES C.J., J. Zou, K. Laing, G.D. Daniels et C. Cunningham. 1999. "Cytokine genes in fish". Aquaculture, vol. 172, p. 93-102.

SHARMA R.P. et M.G. Zeeman. 1980. "Immunologic alterations by environmental chemicals : relevance of studying mechanisms versus effects". J. Immunopharmacol., vol. 2, p. 385-307.

SHEAHAN D.A., C.G. Brighty, M. Daniel, S. Jobling, J.E. Harries, M.R. Hurst, J. Kennedy, S.J. Kirby, S. Morris, E.J. Routledge, J.P. Sumpter et M.J. Waldock. 2002. "Reduction in the estrogenic activity of treated sewage effluent discharge to an English river as a result of decrease in the concentration of industrially derived surfactants". Environ. Toxicol. Chem., vol. 21, p. 515-519.

SIWIKI A.K., D.P. Anderson et O.W. Dixon. 1989. "Comparisons of nonspecific and specific immunomodulation by oxolinic acid, oxytetracycline and levamisole in salmonids". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 23, p. 195-200.

SOMMER C.V. et J.M. Bartos. 1981. "In vivo leukocyte migration assay in rainbow trout with a flexible silicone coverslip". J. Comp. Path., vol. 91, p. 443-445.

SOUSA J., J. Nath, J.D. Tucker et T.M. Ong. 1985. "Dietary factors affecting the urinary mutagenicity assay system : I. Detection of mutagenic activity in human following a fried beef meal". Mutation Res., vol. 149, p.365-374.

SPIES R.B. et D.W. Rice. 1988. "Effects of organic contaminants on reproduction of starry flounder (*Platichthys stellatus*) in San Francisco Bay". Mar. Biol., vol. 98, p. 191-200.

SPITSBERGEN J.M., K.A. Schat, J.M. Kleeman et R.E. Peterson. 1986. "Interactions of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) with immune responses of rainbow trout". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 12, p. 263-280.

SPITSBERGEN J.M., K.A. Schat, J. M. Kleeman et R.E. Peterson. 1987. "Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) or Aroclor 1254 on the resistance of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to infectious hematopoietic necrosis virus". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 13, p. 231-235.

ST-LOUIS-CORMIER E.A., C.K. Osterland et P.D. Anderson. 1984. "Evidence for cutaneous secretory immune system in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)". Dev. Comp. Immunol., vol. 8, p. 71-80.

STOFFEL M.H., T. Wahli, A.E. Friess et P. Burkhardt-Holm. 2000. "Exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to nonylphenol is associated with an increased chloride cell fractional surface area". Schweiz Arch. Tierheilkd., vol. 142, no.5, p. 263-7.

SUZUKI K. 1984. "A light and electron microscope study on the phagocytosis of leucocytes in rockfish and rainbow trout". Bull. Jpn. Sci. Fish., vol. 50, p. 1305-1315.

- SUZUKI Y. et T. Iida. 1992. "Fish granulocytes in the process of inflammation". Annual Rev. Fish Dis., vol.2, p. 149-160.
- SZAL G.M., P.M. Nolan, L.E. Kennedy, C.P. Barr et M.D. Bilger. 1991. "The toxicity of chlorinated wastewater : instream and laboratory case studies". J. Water Pollut. Control Fed., vol. 63, no. 6, p. 910-920.
- TALMAGE S.S. 1994. Environmental and human safety of major surfactant. In Non ionic surfactants. New York : The soap and detergent Association, p.11-16.
- TATNER M.F. et M.J. Manning. 1982. "The morphology of the trout, *Salmo gairdneri*, thymus. Some practical and theoretical considerations". J. Fish Biol., vol. 21, p. 27-32.
- TATNER M.F. 1985. "The migration of labelled thymocytes into the peripheral lymphoid organs in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson". Dev. Comp. Immunol., vol. 9, p. 85-91.
- TATNER M.F., A. Adam et W. Leschen. 1987. "An analysis of the primary and secondary antibody responses in intact and thymectomized rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to human gamma globulin and *Aeromonas salmonicida*". J. Fish Biol., vol. 31, p. 177-195.
- THOMAS P.T. et P.T.K. Woo. 1990. "In vivo and in vitro cell-mediated immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Cryptobia salmositica* Katz, 1951 *Sarcomastigophora* : Kinetoplastida". J. Fish Dis., vol. 13, p.423-433.
- THUVANDER A, L. Norrgren et C. Fossum. 1987. "Phagocytic cells in blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), characterized by flow cytometry and electron microscopy". J. Fish. Biol., vol. 31, p. 197-208.
- THUVANDER A. 1989. "Cadmium exposure of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson : effects on immune functions". J. Fish Biol., vol. 35, p. 521-529.
- TREMBLAY L. 2002. Présentation technique sur l'irradiation ultra-violet et l'ozonation. In 2^e journée d'information et d'échanges de la Station d'épuration des eaux usées de la ville de Montréal (Montréal, 3 décembre 2002). Montréal, Station d'épuration des eaux usées de la ville de Montréal. 15 p.
- TURNER R.J. et A. Jamieson. 1987. "Transferrins in fishes". Anim. Genet., vol. 18 (suppl. 1), p. 70-71.
- TYLER C.R., S. Jobling et J.P. Sumpter. 1998. "Endocrine disruption in wildlife : a critical review of the evidence". Crit. Rev. Toxicol., vol. 28, p. 319-361.
- VALLEJO A.N., N.W. Miller et L.W. Clem. 1992. "Antigen processing and presentation in teleost immune responses". Ann. Rev. Fish Dis., vol. 2, p. 73-89.

van MUISWINKEL W.B., D.P. Anderson, C.H. J. Lamers, E. Egberts, J.J. van Loon et J.P. Ijssel. 1985. In M.J. Manning et M.F. Tatner (éd.). Fish immunology. London : Academic Press, p. 1-8.

VIALE G. et D. Calamari. 1984. "Immune response in rainbow trout *Salmo gairdneri* after long-term treatment with low levels of Cr, Cd and Cu". Environ. Poll., vol. 35, p. 247-257.

VOC CIA I., K. Krzystyniak, M. Dunier, D. Flipo et M. Fournier. 1994. "In vitro mercury-related cytotoxicity and functional impairment of the immune cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". Aqua. Toxicol., vol. 29, p. 37-48.

VOS J.G., E. Dybing, H. A. Greim, O. Ladefoged, C. Lambré, J. V. Tarazona, I. Brandt et A.D. Vethaak. 2000. "Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to european situation". Crit. Rev. Toxicol., vol. 30, no. 1, p. 71-133.

WAGNER M., D. Brumelis et R. Gehr. 2002. "Disinfection of wastewater by hydrogen peroxide or peracetic acid : development of procedures for measurement of residual disinfectant and application to a physicochemically treated municipal effluent". Water Environ. Res., vol. 74, no. 1, p. 33-50.

WALSH A.H. et W.E. Ribelin. 1975. The pathology of pesticide poisoning. In W.E. Ribelin et G. Migaki (éd.). The pathology of fishes. Madison, Wi. : University of Wisconsin Press, p. 22-34.

WARING C.P., R. M. Stagg, K. Fretwell, H.A. McLay et M.J. Costella. 1996. "The impacts of sludge exposure on the reproduction of the sandy goby, *Pomatoschistus minutes*". Environ. Pollut., vol. 93, p. 17-25.

WATTS M., B.L. Munday et C.M. Burke. 2001. "Immune responses of teleost fish". Aust. Vet. J., vol. 79, no. 8, p. 570-574.

WEEK B.A. et J.E. Warinner. 1984. "Effects of toxic chemicals on macrophage phagocytosis in two estuarine fish". Marine Environ. Res., vol. 14, p. 327-335.

WEEK B.A. et J.E. Warinner. 1986. "Functional evaluation of macrophages in fish from a polluted estuary". Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 12, p. 313-320.

WEINREB E.L. 1958. "Studies on the histology and histopathology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*. I. Hematology : under normal and experimental conditions of inflammation". Zoologica, vol. 43, p. 145-52.

WEINREB E.L. 1959. "Studies on the histology and histopathology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*. II. Effects of induced inflammation and cortisone treatment on the digestive organ". Zoologica, vol. 44, p. 45-55.

WESTER P.W., J.H. Canton, J.A.M.A. Dormans. 1988. "Pathological effects in freshwater fish *Poecilia reticulata* (guppy) and *Oryzias latipes* (medaka) following methyl bromide and sodium bromide exposure". Aquat. Toxicol., vol. 12, p. 323-344.

- WESTER P.W., A.D. Vethaak et W.B. Muiswinkel. 1994. "Fish as biomarkers in immunotoxicology". Toxicology, vol. 86, p. 213-232.
- WHITE P.A., J. B. Rasmussen et C. Blaise. 1996. "Comparing the presence, potency and potential hazard of organic compounds extracted from a broad range of industrial effluents". Environ. Mol. Mutagen, vol. 27, p.116-139.
- WHITE P.A. et J. B. Rasmussen. 1998. "The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters". Mut. Research, vol. 410, p. 223-236.
- WHITE R., S. Jobling, S.A. Hoare, J.P. Sumpter et M.G. Parker. 1994. "Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic". Endocrinology, vol. 135, no. 1, p.175-182.
- WISHKOVSKY A., B.S. Roberson et F.M. Hetrick. 1987. "*In vitro* suppression of the phagocytic response of fish macrophages by tetracyclines". J. Fish Biol., vol. 31, p. 61-65.
- WHYTE S.K., L.H. Chappell et Secombes C.J. 1989. "Cytotoxic reactions of rainbow trout macrophages for larvae of the eye fluke *Diplostomum spathaceum* (Digenea)". J. Fish Biol., vol. 35, p. 333-345.
- YADA T., T. Azuma et Y. Takagi. 2001. "Stimulation of non-specific immune functions in seawater-acclimated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, with reference to the role of growth hormone". Comp. Biochem. Physiol. Part B : Biochem. Mol. Bio., vol. 129, no 2-3, p. 695-701.
- YAMASHITA U., T. Sugiura et E. Kuroda. 2002. "Effect on endocrine disrupters on immune responses *in vitro*". J. UQEH., vol. 24, p. 1-10.
- YANO T. 1996. The nonspecific immune system : humoral defense. In G. Iwama et T. Nakanishi (éd.). The fish immune system, organism, pathogen and environment. San Diego, Ca. : Academic Press, p. 105-157.
- ZAPATA A.G. 1979. "Ultrastructural study of the teleost fish kidney". Dev. Comp. Immunol., vol. 3, p. 55-65.
- ZAPATA A.G. 1981. "Lymphoid organs of teleost fish. I. Ultrastructure of the thymus of *Rutilus rutilus*". Dev. Comp. Immunol., vol. 5, p. 427-436.
- ZAPATA A.G. 1983. "Phylogeny in fish immune system". Bull. Inst. Pasteur, vol. 81, p. 165-186.
- ZAPATA A.G. et E.L. Cooper. 1990. The immune system: comparative histophysiology. Chichester : John Wiley and sons. 45 p.
- ZAPATA A.G., A. Chiba et A. Varas. 1996. Cells and tissues of the immune system of fish. In G. Iwama et T. Nakanishi (éd.). The Fish Immune System : Organism, Pathogen, and Environment. San Diego, Ca. : Academic Press, p. 1-62.

ZELIKOFF J.T., N.A. Enane, D. Bowser, K.S. Squibb et K. Frenkel. 1991. "Development of fish peritoneal macrophages as a model for higher vertebrates in immunotoxicological studies I. Characterization of trout macrophage morphological, functional, and biochemical properties". Fundamental App. Toxicol., vol. 16, p. 576-589.

ZELIKOFF J.T., D. Bower, K.S. Squibb et F. Frenkel. 1995. "Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish : An alternative animal model for immunotoxicological studies". J. Toxicol. Environ. Health, vol. 45, p. 235-248.

