

**INRS – Institut Armand Frappier**

**IMPACT DES REJETS URBAINS SUR LE SYSTÈME  
IMMUNITAIRE ET ENDOCRINIEN CHEZ LA MOULE  
*ELLIPTIO COMPLANATA***

**Par**

**Bertrand Bouchard**

**Mémoire présenté**

**pour l'obtention**

**du grade de Maître ès sciences (M.Sc)**

**en sciences expérimentales de la santé**

**Jury d'évaluation**

Président du jury et examinateur interne	Jacques Bernier, Institut Armand Frappier
Examineur externe	Gérard Keck, École Nationale Vétérinaire de Lyon
Examineur interne	Jacques Bernier, Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Michel Fournier, Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	François Gagné, Environnement Canada



## Résumé

Le but de cette étude était de déterminer si les effluents urbains peuvent perturber l'immunité et la reproduction d'une espèce sentinelle, la moule d'eau douce *Elliptio complanata*. Trois échelles d'évaluations ont permis de tester cette hypothèse au niveau cellulaire et hormonal, dans des conditions de laboratoire et de terrain.

Tout d'abord, une expérience en aquarium a consisté en l'exposition de moules à différentes concentrations d'effluents urbains de la ville de Laval (Québec) issus de traitements physico-chimique (effluent F) ou par biofiltration (effluent A), et caractérisés chimiquement de façon exhaustive. Les réponses obtenues, apparues généralement à partir d'une concentration de 10%, ont confirmé la sensibilité des biomarqueurs immunologiques chez les bivalves. Les animaux ont subi une diminution de leurs comptes d'hémocytes, accompagnée d'une augmentation de la phagocytose et une diminution de la capacité cytotoxique des cellules immunitaires. La sécrétion d'oxyde nitrique fut augmentée de façon proportionnelle à la phagocytose, suggérant que cette molécule joue un rôle important dans la lutte antibactérienne chez les bivalves d'eau douce. Aucune perturbation des mécanismes endocriniens, mesurés par la sécrétion de vitellogénine (VTG) dans la gonade, n'a été mesurée.

Dans une deuxième expérience, les moules ont été exposées aux mêmes effluents F et A dans le cours d'eau récepteur, la rivière des Mille-Îles, grâce à la mise en place de cages d'exposition en aval et en amont des rejets par les stations d'épuration. Les résultats ont montrés que les effluents urbains peuvent provoquer la mort des mollusques (60% en aval des deux rejets) après un mois d'exposition. Cependant, les effets immunologiques ont été très différents selon la station. L'effluent F, rejeté en amont de la rivière, a provoqué une immunostimulation induite par les fortes charges bactériennes. L'effluent A a cependant inhibé les fonctions cellulaires et la sécrétion

de lysozymes, indiquant probablement une contamination chimique plus toxique ainsi qu'une accumulation des polluants le long de la rivière. De plus, des liens entre activité phagocytaire et production de VTG chez les moules ont été mis en évidence de manière statistique, suggérant une implication de cette protéine dans les processus immunitaires, et donc des liens entre l'immunité et le statut hormonal.

Afin de tester ces hypothèses au niveau cellulaire, des hémocytes ont été exposés *in vitro* à la VTG isolée de gonade de moule ainsi qu'à l'estradiol. Les résultats montrent que la que la VTG peut stimuler faiblement la phagocytose. De même, l'estradiol peut augmenter cette activité immunitaire, ce qui suggère la présence de récepteurs aux stéroïdes sexuels sur les hémocytes.

Ces expériences ont donc contribué à une meilleure connaissance des mécanismes de toxicité des rejets urbains sur les moules d'eau douce, qui sont des espèces largement utilisées en écotoxicologie et qui jouent un rôle majeur dans le fonctionnement des écosystèmes lacustres. Les mécanismes cellulaires de ces perturbations devront être précisés, ainsi que le rôle des différents contaminants contenus dans ces effluents.

---

Étudiant

---

Directeur de recherche

# Remerciements

À Michel Fournier

Professeur à l'Institut National de la Recherche Scientifique, titulaire de la chaire de recherche canadienne en immunotoxicologie de l'environnement. À nos discussions de biologie et autres passions communes. Et au bon vin, bien sûr.

À François Gagné

Chercheur au Centre Saint-Laurent d'Environnement Canada. Toute ma gratitude pour avoir accepté de m'encadrer sur ce projet, pour la confiance que tu m'as accordée et pour ta disponibilité à toute épreuve.

À toute l'équipe de recherche sur les écosystèmes fluviaux d'Environnement Canada (alias mes « Jacqueline » !). À votre dynamisme, votre générosité et à la belle ambiance qu'il règne au Centre Saint-Laurent, au gré des thés de Mr Nguyen. Au beau cadeau de la vie que Chantale nous a donné ce dernier Noël.

À toute l'équipe du laboratoire d'immunotoxicologie de l'IAF, merci pour votre sympathie, et votre dévouement pour aider les étudiants.



## Liste des figures

<i>Figure 1 : Triade des facteurs impliqués dans la progression d'une maladie</i> .....	1
<i>Figure 2 : Schéma de fonctionnement d'un traitement physico-chimique (A) et de biofiltration (B)</i> .....	7
<i>Figure 3 : Évolution de la population desservie par une station d'épuration au Québec</i> .....	8
<i>Figure 4 : Évolution des rejets quotidiens de phosphore, MES (matières en suspension) et DBO5 (Demande Biochimique en Oxygène) par les municipalités du Québec</i> .....	8
<i>Figure 5 : Carte de la rivière des Mille-Îles</i> .....	10
<i>Figure 6 : Graphique illustrant le niveau moyen (moyenne géométrique) des microorganismes à chaque étape de traitement à la station d'épuration de Ville de Laval (Auteuil)</i> .....	11
<i>Figure 7 : Nombre de jours où des rejets d'eaux usées non désinfectées (déversements et dérivations) ont été observés aux stations d'épuration entre 2003 et 2005</i> .....	11
<i>Figure 8 : Distribution d'Elliptio complanata</i> .....	14
<i>Figure 9 : Durée de réponse et niveau d'intégration des biomarqueurs en écotoxicologie</i> .....	15
<i>Figure 10 : Intégration des biomarqueurs dans la démarche d'analyse écotoxicologique</i> .....	16
<i>Figure 11 : Inhibition de la phagocytose par le méthylmercure chez différentes espèces de bivalves marins et d'eau douce, dont E.complanata</i> .....	28
<i>Figure 12 : Principaux stéroïdes sexuels retrouvés chez les mollusques</i> .....	29
<i>Figure 13 : Concentrations en hormones stéroïdes chez Elliptio buckleyi de janvier à mai, montrant clairement une augmentation lors de la saison de reproduction</i> .....	30
<i>Figure 14 : Concentration en hémocytes totaux dans l'hémolymphe des moules exposées 12 jours aux effluents A et F</i> .....	45
<i>Figure 15 : Viabilité des hémocytes circulant dans l'hémolymphe des moules exposées 12 jours aux effluents A et F</i> .....	45
<i>Figure 16 : Phagocytose de plus de 1 ou 3 billes par les hémocytes des moules exposées 12 jours à l'effluent F</i> .....	46
<i>Figure 17 : Phagocytose de plus de 1 ou 3 billes par les hémocytes des moules exposées 12 jours à l'effluent A</i> .....	47

<i>Figure 18 : Capacité cytotoxique des hémocytes des moules exposées 12 jours aux effluents A et F.</i>	47
<i>Figure 19 : Concentration en oxyde nitrique dans l'hémolymphe des moules exposées 12 jours aux effluents A et F.</i>	48
<i>Figure 20 : Activité cyclo-oxygénase dans les hémocytes des moules exposées 12 jours aux effluents A et F.</i>	49
<i>Figure 21 : Production de vitellogénine dans la gonade des moules exposées 12 jours à l'effluent F.</i>	51
<i>Figure 22 : Phagocytose de billes fluorescentes (barres) et viabilité (points carrés) des hémocytes de E.complanata exposés à la vitellogénine de moule femelle.</i>	96
<i>Figure 23 : Phagocytose de billes fluorescentes (barres) et viabilité (points carrés) des hémocytes de E.complanata exposés à l'estradiol (E2).</i>	97

## Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Liste des principaux groupes de polluants chimiques contenus dans les rejets urbains</i>	6
<i>Tableau 2 : Taux d'enlèvement des principaux contaminants inorganiques selon les types de traitements</i>	6
<i>Tableau 3 : Composés chimiques susceptibles de perturber un ou plusieurs paramètres immunitaires chez les bivalves</i>	25
<i>Tableau 4 : Principaux produits chimiques ayant une action de perturbateur endocrinien chez les invertébrés.</i>	33
<i>Tableau 5 : Corrélation entre les biomarqueurs immunitaires mesurés dans les moules exposées 12 jours à l'effluent d'Auteuil</i>	50

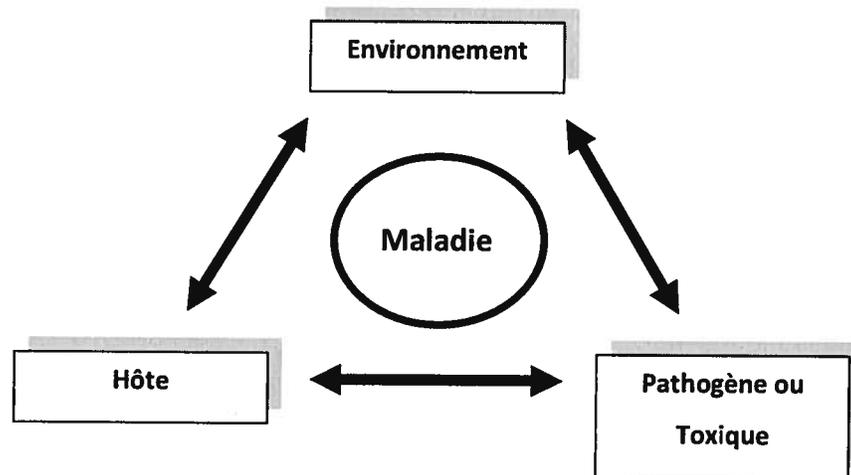
# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Revue de la littérature</b>	<b>3</b>
<b>I. La problématique des rejets urbains</b>	<b>3</b>
I.1 Contexte général	3
I.2 Cas de la rivière des Mille-Îles	9
<b>II. La moule d'eau douce <i>Elliptio complanata</i> : un bioindicateur de choix pour les écosystèmes aquatiques</b>	<b>13</b>
II.1 La moule d'eau douce comme espèce sentinelle	13
II.1.a Caractéristiques d'une espèce sentinelle	13
II.1.b Les biomarqueurs en écotoxicologie	15
II.1.c Limites du modèle bivalve	17
II.2 L'immunotoxicologie	18
II.2.a Aspects fonctionnels de l'immunité des mollusques bivalves	18
II.2.b Altération des fonctions immunitaires par les polluants aquatiques	23
II.3 La perturbation endocrinienne	29
II.3.a Métabolisme des stéroïdes sexuels chez les bivalves	29
II.3.b Les perturbateurs endocriniens	31
<b>III. Les liens entre systèmes immunitaire et endocrinien</b>	<b>37</b>
III.1 Immunotoxicité des xenoestrogènes chez les bivalves	38
III.2 La vitellogénine comme acteur dans l'immunité	38
<b>Chapitre II : Expériences écotoxicologiques</b>	<b>41</b>
<b>I. Effets des rejets urbains sur le système immunitaire de la Moule <i>Elliptio complanata</i> : étude en laboratoire</b>	<b>42</b>
III.3 Matériel et méthodes	42
III.3.a Exposition des animaux au laboratoire	42
III.3.b Mesure des biomarqueurs d'immunocompétence et de reproduction	43
III.3.c Analyse des données	44
III.4 Résultats	44
III.4.a Analyses chimiques	44
III.4.b Immunocompétence	44
III.4.c Production de vitellogénine	51
III.5 Discussion	52
III.6 Conclusion de l'expérience	57

<b>IV. Article scientifique</b>	<b>59</b>
IV.1 Abstract	60
IV.2 Introduction	61
IV.3 Material and methods	64
IV.3.a Mussel exposure experiment	64
IV.3.b Immunocompetence evaluation	65
IV.3.c Gonad activity	67
IV.3.d Data analysis	68
IV.4 Results	69
IV.4.a Surface water characteristics at the caging sites	69
IV.4.b Bacterial levels in mussels	69
IV.4.c Mortalities of the transplanted mussels	70
IV.4.d Immunocompetence	70
IV.4.e Gonad activity	71
IV.5 Discussion	72
IV.5.a Influence of water quality characteristics on mussels' health	72
IV.5.b Immunomodulation by water contaminants	73
IV.5.c Gonad activity and links with immunity	77
IV.5.d Final conclusions	79
IV.6 Acknowledgements	79
IV.7 Tables & figures	80
IV.8 References	88
<b>V. Étude des liens entre reproduction et immunité chez la moule d'eau douce</b>	<b>95</b>
V.1 Matériel et méthodes	95
V.1.a Exposition des hémocytes	95
V.1.b Mesure de l'immunocompétence	95
V.2 Résultats	96
V.3 Discussion	97
<b>VI. Bilan des expériences</b>	<b>102</b>
VI.1 Expositions in vivo au laboratoire et en rivière	102
VI.2 Les autres modèles expérimentaux	104
<b><i>Conclusion et perspectives</i></b>	<b>107</b>
<b><i>Appendices</i></b>	<b>111</b>
<b>Appendice A : Graphiques de comptes cellulaires et viabilité</b>	<b>111</b>
<b>Appendice B : Graphique de mesure de l'activité de phagocytose</b>	<b>112</b>
<b>Appendice C : Analyses chimiques des effluents de Laval, QC</b>	<b>113</b>
<b><i>Liste des références</i></b>	<b>117</b>

## Introduction

En ce début de XXI<sup>e</sup> siècle, l'humanité fait face à une pollution globale des écosystèmes terrestres et aquatiques. Les rejets de contaminants dans l'environnement depuis plus de 150 ans ont déjà entraîné des effets irréversibles et menacent aujourd'hui les écosystèmes aquatiques voire la population humaine. Il est donc indispensable de surveiller le fonctionnement des écosystèmes et la notamment santé des animaux qui participent à leur équilibre. De surcroit, l'étude des mécanismes de toxicité et leur diagnostic précoce dans la faune peuvent servir à prédire les effets néfastes de certaines substances sur la santé publique. La compréhension des facteurs environnementaux qui favorisent le développement des pathologies chez la faune sauvage passe par l'étude des facteurs déterminant l'apparition des maladies, comme la sensibilité de l'hôte aux infections, la virulence des pathogènes et la toxicité des xénobiotiques (Figure 1).



**Figure 1 : Triade des facteurs impliqués dans la progression d'une maladie**

Les polluants peuvent exercer une action toxique à des niveaux variés de la physiologie des animaux, et leur toxicité est grandement influencée par de nombreux facteurs de l'environnement. Cependant, le risque écologique que représente une

source de pollution peut être estimé en étudiant des fonctions essentielles ou fondamentales à la survie des espèces animales, comme la reproduction ou l'immunité.

Comme nous le verrons dans la revue de littérature (Chapitre 0), une des sources majeures de pollution des cours d'eaux est le rejet des effluents de stations d'épuration municipales. En effet, leurs effluents contiennent de nombreux polluants qui ont le potentiel de pouvoir perturber autant la reproduction et que l'immunité chez les animaux aquatiques. La moule d'eau douce *Elliptio complanata* est bien indiquée pour les études écotoxicologiques des rejets urbains au Québec, car elle représente une espèce sentinelle de choix pour évaluer les perturbations immunitaires et endocriniennes dues aux contaminants chimiques. L'objectif de cette étude consiste donc à étudier les perturbations des systèmes immunitaire et endocrinien et d'identifier quels sont les principaux mécanismes impliqués chez la moule exposée aux rejets urbains.

D'autre part, de récents travaux suggèrent qu'il existe des interactions entre l'immunité et reproduction chez les espèces ovipares et que ces deux systèmes physiologiques ne sont donc pas indépendants, notamment au niveau du fonctionnement des cellules immunitaires (hémocytes) des bivalves. En effet, le précurseur des protéines de réserve de l'œuf, la vitellogénine, est produit et sécrétée lors d'un signal estrogénique. Elle semble aussi jouer un rôle dans les mécanismes immunitaires des poissons. Un sous-objectif de cette étude déterminera si les stéroïdes sexuels et la vitellogénine peuvent influencer la fonction immunitaire principale des bivalves, soit la phagocytose.

Ainsi, nous débuterons ce mémoire par une revue de la littérature expliquant la problématique environnementale des rejets urbains et l'intérêt d'utiliser l'immunité et la reproduction de la moule d'eau douce comme biomarqueurs écotoxicologiques. Ensuite, nous détaillerons les expériences menées au laboratoire et sur le terrain afin de répondre aux objectifs de l'étude.

# Chapitre I

## Revue de la littérature

### *I. La problématique des rejets urbains*

#### *I.1 Contexte général*

Aujourd'hui, l'une des problématiques environnementales majeures est la pollution de l'eau douce de surface, qui menace l'approvisionnement en eau potable et les activités récréatives aquatiques (pêche, baignade, etc.).

Notamment, le rejet des eaux usées municipales est considéré comme une des principales sources de pollution des cours d'eau car elles sont chargées en composés chimiques et en micro-organismes (bactéries, virus, protozoaires, fongi). En effet, les eaux d'égouts recueillent les produits rejetés par les habitations, les commerces et les industries, mais aussi des hôpitaux et d'autres institutions, ainsi que les eaux de pluie qui lessivent des polluants déposés sur le sol (Coutellier 2008). Les eaux d'égouts issues de régions urbaines sont donc composées d'une grande diversité de polluants inorganiques et organiques (Tableau 1). Comme nous le verrons dans les paragraphes suivants, plusieurs de ces contaminants ont des effets toxiques chez les animaux aquatiques en perturbant les fonctions cellulaires ou en mimant l'action de substances physiologiques. De plus, certains polluants comme les composés azotés, le phosphore ou la matière organique peuvent stimuler la croissance de végétaux ou de bactéries qui peuvent altérer la dynamique de productivité des systèmes aquatiques. Enfin, les micro-organismes issus des effluents domestiques sont potentiellement pathogènes, et représentent une menace pour la santé publique (eau potable, activités nautiques, etc.) et la faune aquatique.

Les stations d'épurations sont donc conçues pour diminuer les concentrations de ces polluants avant le rejet des eaux usées dans un cours d'eau (Tableau 2), en utilisant des procédés de traitement primaires (décantation) et secondaires. Ces derniers peuvent différer selon les besoins et les moyens des municipalités. Le traitement physico-chimique (Figure 2A) est le plus couramment utilisé au Québec : il est basé sur le principe de la coagulation chimique des eaux usées, suivie d'une séparation des solides par décantation. Les coagulants les plus courants sont l'alun et le chlorure ferrique. Le procédé de biofiltration fait passer les eaux usées au travers d'un médium filtrant (ex. schiste), sur lequel sont fixées des bactéries. Celles-ci utilisent la pollution organique dissoute et disponible dans les eaux usées pour leur croissance, et permettent ainsi de diminuer fortement les concentrations en azote ammoniacal dans l'effluent. Le médium agit également comme un filtre et élimine aussi des matières en suspension (Figure 2B). Certains traitements tertiaires de désinfection (par exemple UV ou ozone) permettent d'éliminer une grande quantité de micro-organismes.

Depuis une vingtaine d'années, au Québec comme dans la plupart des pays industrialisés, la construction de stations d'épuration et l'amélioration des techniques de traitement ont permis de diminuer sensiblement la quantité de contaminants présentes dans les effluents comme les matières en suspension, la matière organique et le phosphore (Figure 3 & Figure 4). Aujourd'hui, 98% des municipalités qui disposent d'un réseau d'égout sont équipées d'une station de traitement municipale (Hébert 2005), mais les rejets d'eau usées sans traitement sont encore nombreux, notamment dans les petites municipalités et dans les régions isolées. Par ailleurs, les systèmes de désinfection sont encore peu répandus et seulement 40% des eaux usées subissent ce traitement au Québec. Ceci est particulièrement problématique au niveau de Montréal dans le fleuve saint-Laurent, car les eaux usées de plus de 2,2 millions de personnes sont rejetées sans désinfection préalable (Hébert 2005). Cette lacune devrait être partiellement comblée après l'installation d'un système de traitement à l'ozone à la station d'épuration de la ville de Montréal, annoncé il y a

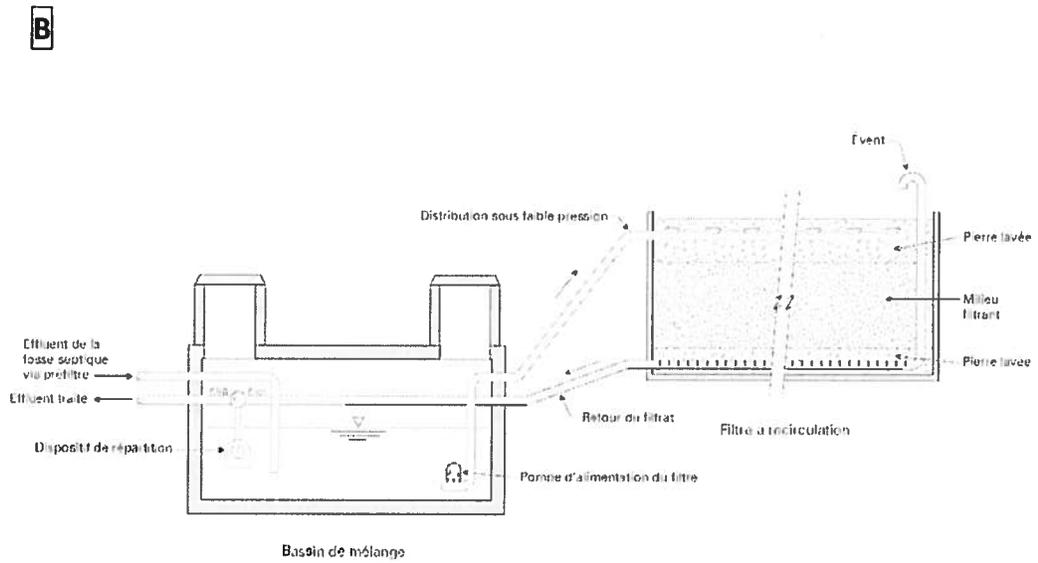
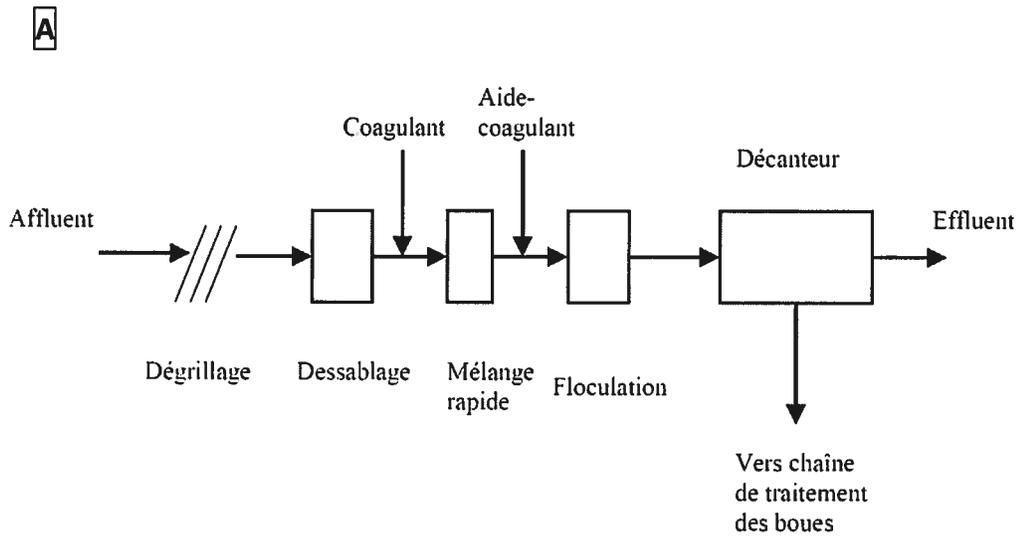
quelques mois (Francoeur 2008). Enfin, malgré les récentes avancées dans le traitement des eaux usées municipales, les concentrations encore importantes de certains polluants, l'apparition de nouveaux contaminants chimiques issus de l'industrie (PBDE, nanoparticules, etc.) et l'augmentation des volumes rejetés dans l'environnement font que les rejets urbains représentent aujourd'hui encore une menace pour la santé des animaux aquatiques.

<b>Contaminants inorganiques</b>	<b>Contaminant organique</b>
Zinc (Zn)	Sulphonates d'Alkylbenzene
Cuivre (cu)	Éthoxylates de Nonylphenol
Nickel (Ni)	Di-(2-ethylexyl)phtalates
Cadmium (cd)	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
Plomb (Pb)	Biphénils Polychlorés
Chrome (Cr) III et IV	Dibenzo-p-dioxines polychlorées
Mercure (Hg)	Dibenzofuranes polychlorés
Métaux du type platine	Chloronitrobenzènes
Autres (Ar, Ag, Mo, Sn...)	Produits pharmaceutiques
	Composés estrogéniques (endogènes et synthétiques)
	Polyacrilamide
	Autres ( organohalogènes, paraffines chlorées...)

**Tableau 1 : Liste des principaux groupes de polluants chimiques contenus dans les rejets urbains (Union-Européenne 2001)**

<b>Contaminants inorganiques</b>	<b>Pourcentage d'enlèvement</b>		
	<b>Traitement primaire</b>	<b>Traitement secondaire</b>	<b>Traitement primaire + secondaire</b>
<b>Zn</b>	50	56	78
<b>Cu</b>	52	57	79
<b>Ni</b>	24	26	44
<b>Cd</b>	40	40	64
<b>Pb</b>	56	60	70
<b>Cr</b>	40	64	78
<b>Hg</b>	55	55	80

**Tableau 2 : Taux d'enlèvement des principaux contaminants inorganiques selon les types de traitements (Union-Européenne 2001)**



**Figure 2 : Schéma de fonctionnement d'un traitement physico-chimique (A) et de biofiltration (B) (Bernier 2001)**

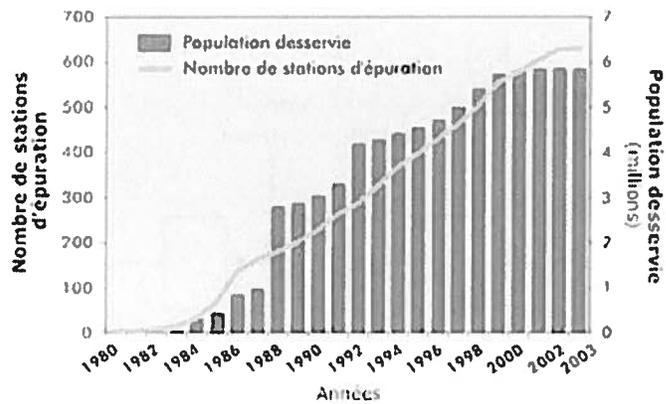


Figure 3 : Évolution de la population desservie par une station d'épuration au Québec (Hébert 2005)

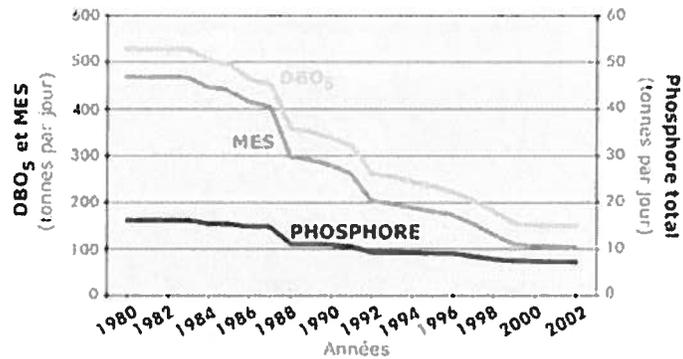


Figure 4 : Évolution des rejets quotidiens de phosphore, MES (matières en suspension) et DBO5 (Demande Biochimique en Oxygène) par les municipalités du Québec (Hébert 2005)

## *1.2 Cas de la rivière des Mille-Îles*

Le cas de la rivière des Mille-Îles illustre bien la dégradation de la qualité de l'eau due aux rejets massifs d'effluents municipaux. Située entre l'île de Laval et la rive Nord montréalaise, elle débute au lac des Deux-Montagnes et trouve son embouchure dans la rivière des Prairies. Ses eaux proviennent principalement de la rivière des Outaouais (eaux dites « brunes » par opposition aux eaux « vertes » issues du fleuve Saint-Laurent), et son débit moyen varie mensuellement entre 50 et 450 m<sup>3</sup>/s mais peut descendre à environ 15 m<sup>3</sup>/s en automne les années de faibles précipitations. Les abords de la rivière sont soumis à une forte pression de développement urbain, avec une croissance de la population de 62,5% ces 20 dernières années dans son bassin versant. Une dizaine de stations d'épurations évacuent les eaux usées de cette région urbanisée, constituant au total environ 300,000 m<sup>3</sup>/jour, soit 3,4 m<sup>3</sup>/s en moyenne (Figure 5). Ainsi, les eaux usées municipales peuvent représenter jusqu'à 20% du débit total de la rivière lors de périodes sèches.

Ainsi, malgré les divers procédés de traitement utilisés dans les stations rejetant leurs effluents dans la rivière des Mille-Îles (principalement étangs aérés, mais également biofiltration ou traitement physico-chimique suivis de désinfection aux UV), ces effluents sont une source importante de contamination chimique et microbiologique (Figure 6). C'est pourquoi les critères gouvernementaux de qualité de l'eau relatifs à l'ammoniac (0,5 mg/l) et aux coliformes fécaux (200 UFC/100mL pour le contact direct et 1000 UFC/mL pour le contact indirect) sont dépassés la plupart du temps, et menacent les prises d'eau potables et les activités récréatives (baignade, canot, pêche, etc.) (Brouillette 2007). De plus, lors de défaillance technique dans les stations d'épuration ou lors de débits trop importants à traiter (fortes pluies, fonte des neiges, etc.), des eaux usées sont rejetées dans la rivière sans traitement (déversement) ou après un traitement partiel, c'est-à-dire sans désinfection (dérivation). Ces événements, qui causent le rejet de quantités

importantes de matières organiques ainsi que de contaminants chimiques et microbiologiques, se produisent fréquemment (plus de 90 jours par an) dans plusieurs stations des municipalités environnantes (Figure 7).

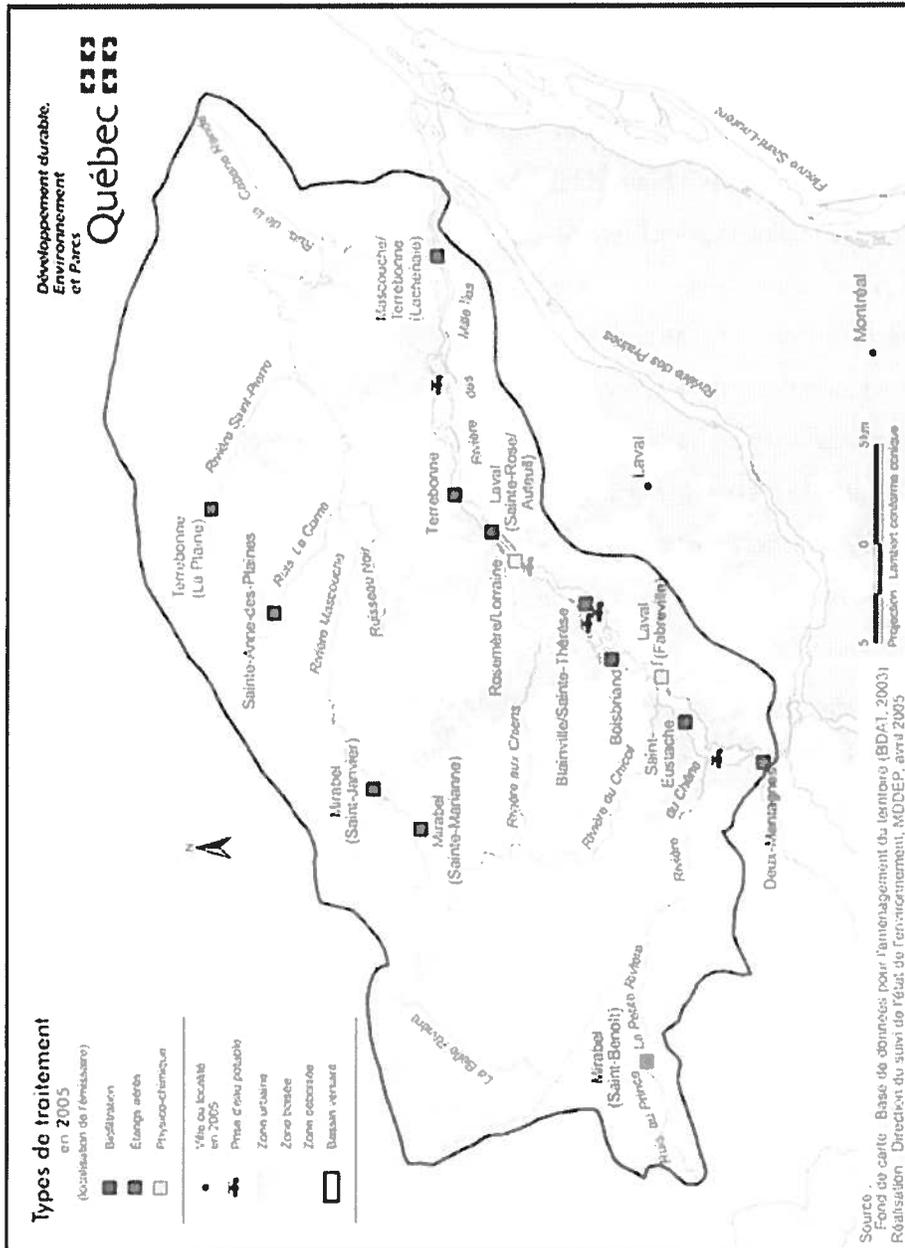


Figure 5 : Carte de la rivière des Mille-Îles.

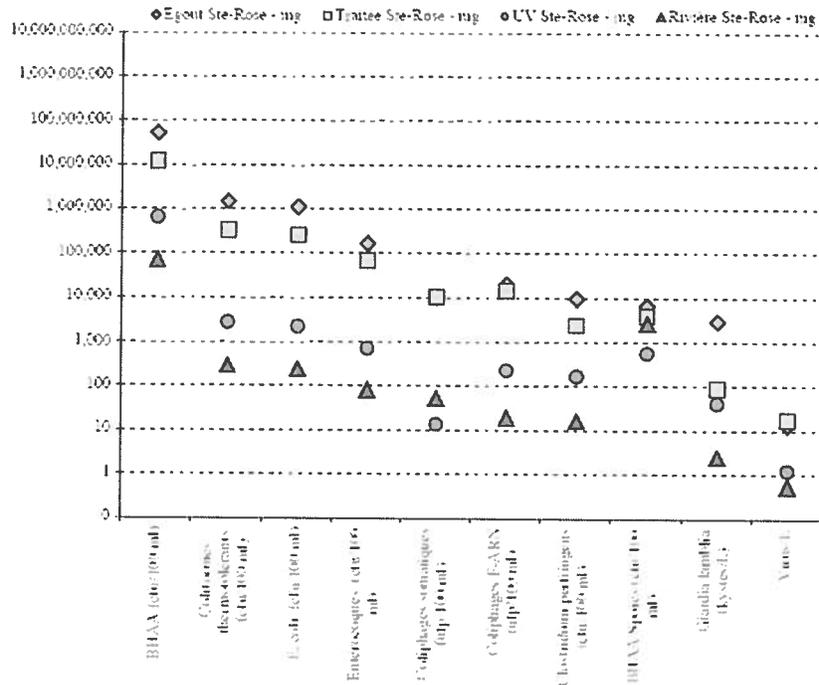


Figure 6 : Graphique illustrant le niveau moyen (moyenne géométrique) des microorganismes à chaque étape de traitement à la station d'épuration de Ville de Laval (Auteuil) (Payment 2003)

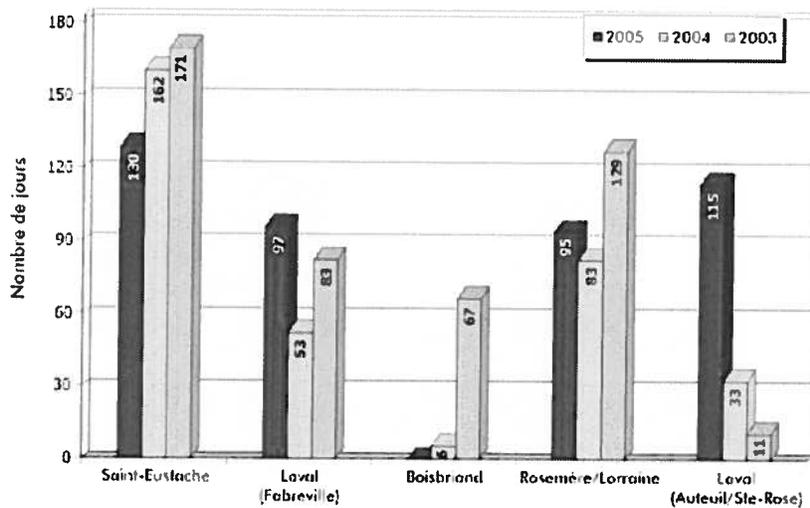


Figure 7 : Nombre de jours où des rejets d'eaux usées non désinfectées (déversements et dérivations) ont été observés aux stations d'épuration entre 2003 et 2005. D'après (Brouillette 2007).



## ***II. La moule d'eau douce *Elliptio complanata* : un bioindicateur de choix pour les écosystèmes aquatiques***

Les mollusques d'eau douce, dont la majorité des espèces indigènes en Amérique du Nord sont menacées de disparition, semblent très sensibles à la dégradation de la qualité de l'eau (Lydeard et al. 2004). Leur sensibilité à l'action des polluants chimiques est une des raisons pour lesquelles ils sont utilisés depuis plusieurs années comme espèces sentinelles dans diverses études écotoxicologiques (Farris et al. 2006).

### ***II.1 La moule d'eau douce comme espèce sentinelle***

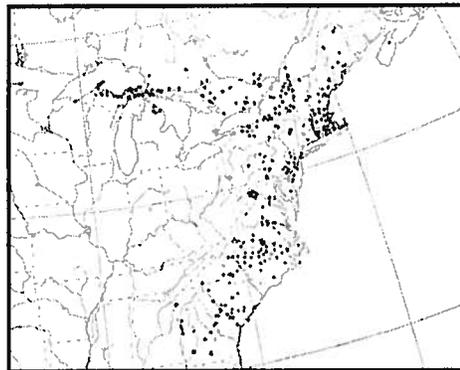
#### ***II.1.a Caractéristiques d'une espèce sentinelle***

Une espèce sentinelle, qu'elle soit animale ou végétale, doit permettre d'évaluer rigoureusement le risque toxique potentiel d'une substance polluante ou d'un mélange complexe de polluants, et s'intègre donc une démarche écotoxicologique (Ramade 2007). Cette espèce doit donc posséder certaines caractéristiques précises, entre autres : avoir un rôle significatif dans le fonctionnement de leur écosystème, être sensibles aux polluants considérés, être largement réparties dans la zone étudiée, avoir une longue durée de vie et enfin être aisément manipulables lors d'expérimentations au laboratoire ou sur le terrain (Lagadic et al. 1997).

La moule d'eau douce *Elliptio complanata* représente, comme beaucoup de mollusques bivalves, une espèce sentinelle intéressante pour les études écotoxicologiques. En effet, son aire de distribution est importante dans l'est de l'Amérique du Nord (Figure 8) et permet donc des comparaisons intersites à large

échelle. De plus, cet animal se nourrit et respire par filtration de grandes quantités d'eau (entre 3 et 5 litres par heure chez les bivalves d'eau douce), et accumulent ainsi dans leurs tissus les contaminants présents dans l'eau et la matière en suspension (Kryger et al. 1988). Par exemple, le facteur de bioaccumulation (rapport entre la concentration d'un polluant dans les tissus et dans l'eau) chez *Elliptio complanata* est de 3650 pour l'hexachlorobenzène, et de 14500 pour l'octachlorostyrène (Russell et al. 1989). Par ailleurs, les moules sont des organismes sessiles, qui ne se déplace que très peu. Elles sont donc dépendantes des variations des conditions environnementales locales, comme la qualité de l'eau et des sédiments.

Ces caractéristiques rendent l'espèce *Elliptio complanata* intéressante pour l'étude de la toxicité de certains rejets dans le milieu aquatique. On peut donc l'utiliser pour mesurer des paramètres physiologiques sensibles aux polluants, ou biomarqueurs.



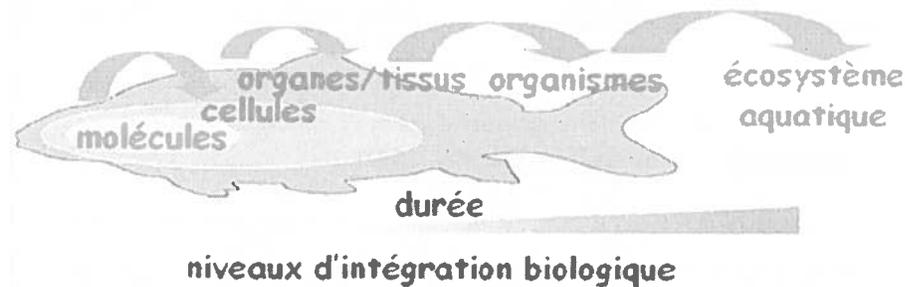
**Figure 8 : Distribution d'*Elliptio complanata* (Mulcrone 2006)**

### **II.1.b Les biomarqueurs en écotoxicologie**

Toute modification provoquée par un contaminant sur la biologie d'un animal, que ce soit au niveau moléculaire, cellulaire ou physiologique, peut altérer sa santé ou sa reproduction. Par conséquent, si l'exposition à cette substance est suffisamment importante (par la dose ou la durée d'exposition), elle peut conduire à diminuer l'abondance de l'espèce localement, voire mener à la disparition de la population. Or, si cette espèce joue un rôle important dans le fonctionnement de l'écosystème local, c'est toute la biocénose qui peut être affectée par le contaminant. Il y a donc un grand intérêt à connaître quelles sont les cibles physiologiques des toxiques, et leur importance dans le maintien de l'homéostasie des individus : un impact au niveau moléculaire peut avoir des répercussions sur un écosystème entier.

Dans ce contexte, les chercheurs en toxicologie de l'environnement ont développé des indicateurs qui permettent de mesurer si un paramètre physiologique précis a été perturbé. Les biomarqueurs sont ainsi définis comme les changements structuraux ou fonctionnels observables et mesurables qui apparaissent après pénétration de substances polluantes dans l'organisme (Lagadic et al. 1997).

Les biomarqueurs permettent donc de détecter les changements précoces provoqués par un toxique sur une espèce sentinelle. Ces changements d'ordre génétique, enzymatique, histologique ou fonctionnel, permettent de prédire les conséquences sur la santé de l'individu et, par extension, de la population (Figure 9).



**Figure 9 : Durée de réponse et niveau d'intégration des biomarqueurs en écotoxicologie. D'après (Ramade 2007).**

Il existe 3 principaux types de biomarqueurs en fonction des mécanismes de toxicité impliqués (Lagadic et al. 1997) (Figure 10) :

- **Les biomarqueurs d'exposition** : Ils permettent la mise en évidence d'une exposition actuelle ou passée à un polluant, et sont généralement issus de l'interaction d'un toxique avec une molécule biologique. Par exemple les adduits d'ADN sont utilisés comme biomarqueurs d'exposition à des substances cancérigènes ou génotoxiques.
- **Les biomarqueurs d'effet** : Ils sont utilisés pour montrer qu'un xénobiotique a pénétré dans l'organisme et y a exercé un effet, toxique ou non. Les modifications induites par cette substance peuvent être biochimiques, histologiques ou cellulaires. Par exemple, la modification de l'activité spécifique d'une cellule, comme la phagocytose, constitue un biomarqueur d'effet.
- **Les biomarqueurs de sensibilité** : Ils concernent principalement les modifications génétiques qui occurrent dans certaines populations ayant acquis un système de résistance à un toxique.

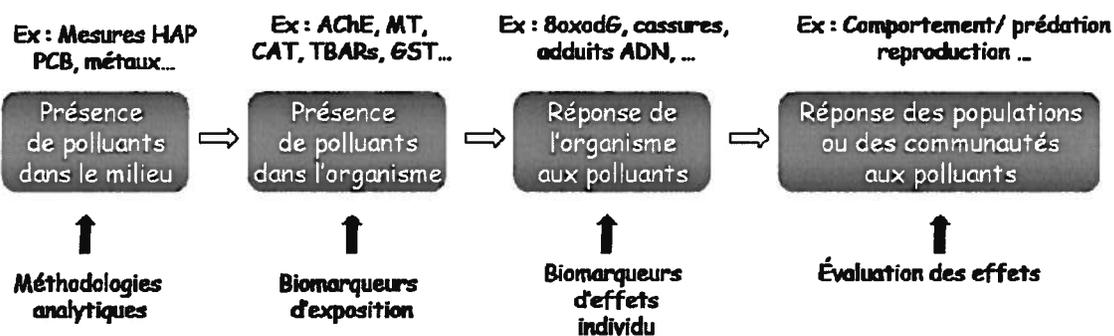


Figure 10 : Intégration des biomarqueurs dans la démarche d'analyse écotoxicologique, d'après (Lagadic et al. 1997)

Dans nos travaux nous avons principalement utilisé des biomarqueurs d'effets car ils permettent de mettre en évidence un impact d'un mélange de polluants sur une fonction biologique précise, et permettent donc de mieux prédire les effets des rejets urbains sur l'individu.

### ***II.1.c Limites du modèle bivalve***

Malgré ses nombreux attraits et l'augmentation de son utilisation en recherche ou en surveillance, il existe plusieurs limites au modèle bivalve pour les études écotoxicologiques. Il convient de prendre en compte ces contraintes lors de la mise en place des protocoles expérimentaux, notamment *in situ*.

Tout d'abord, ce sont des animaux qui ont un métabolisme fortement influencé par les saisons et les facteurs abiotiques de leur environnement (Lemaire et al. 2006). Par exemple, la saison, les cycles tidaux, la température, le pH et la salinité peuvent modifier les réponses physiologiques aux polluants (Lagadic et al. 1997; Bocchetti et al. 2008; Farris et al. 2006).

D'autre part, certains facteurs physiologiques peuvent influencer fortement les mesures de biomarqueurs d'effet, comme l'âge, la taille de la moule, son état de santé (ex. parasitisme) et même la densité d'animaux dans l'aquarium (Paterson 1983; Tessier et al. 1996.). De même, les biomarqueurs peuvent être fortement influencés par les caractéristiques physicochimiques de l'eau, ou l'état de santé de l'animal.

Par ailleurs, les bivalves sont des espèces relativement peu sensibles à certains polluants. Ils disposent en effets de systèmes de détoxification leur permettant de vivre dans des eaux polluées, comme les enzymes de biotransformations de phase I et II, des systèmes antioxydants, le mécanisme de défense multixenobiotiques, etc. (Lagadic et al. 1997; Pain et al. 2003). Cette résistance constitue donc une limite lorsque vient la phase d'évaluation du risque écologique d'une contamination. Néanmoins, cette caractéristique des bivalves est un des aspects qui rend ces animaux utilisables pour certaines études, car ils peuvent survivre dans des milieux dont on veut suivre la contamination.

Enfin, les bivalves d'eau douce ont un cycle de vie particulier, ce qui les rend difficiles à cultiver et donc à utiliser en grand nombre en recherche. En effet, les larves glochidies qui sont relâchées par la femelle doivent impérativement passer par un stade parasitaire, dans les tissus d'un poisson spécifique, afin de se

métamorphoser en juvénile (Matteson 1948; Clarke 1981; Farris et al. 2006). Cette particularité du développement est une des causes de la sensibilité des bivalves d'eau douce face au changement de leur habitat : si l'espèce de poisson-hôte disparaît (aménagement des rives, construction de barrages, etc.), le cycle de reproduction est interrompu (Richter et al. 1997).

## *II.2 L'immunotoxicologie*

### ***II.2.a Aspects fonctionnels de l'immunité des mollusques bivalves***

La fonction principale du système immunitaire est la protection de l'organisme contre les agents infectieux et les cellules cancéreuses ainsi que le rejet de corps étrangers ou leur séquestration. Ces fonctions sont accomplies tout d'abord grâce à un système de reconnaissance du soi et du non-soi, basé sur des récepteurs cellulaires. Cette reconnaissance permet la mise en place d'une réponse des cellules immunitaires capables d'éliminer ou neutraliser l'élément invasif.

Très brièvement, chez les vertébrés le système immunitaire est multifonctionnel et fait appel à un réseau de cellules lymphoïdes et non lymphoïdes, qui communiquent entre elles grâce à des contacts directs ou via des messagers chimiques (cytokines). Les cellules immunitaires se développent de cellules souches pluripotentes et se différencient ensuite en populations distinctes sur le plan morphologique et fonctionnel dans des organes spécialisés. Les réponses sont à la fois adaptatives (avec mémoire) et innées (sans mémoire). La réponse adaptative repose principalement sur les lymphocytes qui sont spécifiquement dirigés vers la destruction d'un agent unique. Cette réponse spécifique se distingue en une réponse humorales et une réponse cellulaire. Les réponses innées sont quant à elles médiées par les phagocytes mononucléaires (macrophages) et les granulocytes qui reconnaissent des structures étrangères de façon non-spécifique et qui répondent par la phagocytose et l'inflammation. Ces deux processus peuvent être augmentés

par les produits des lymphocytes comme les anticorps opsonisants et les cytokines. De plus, les cellules cytotoxiques 'Natural Killer' (NK) sont issues des lymphocytes et peuvent reconnaître les changements des marqueurs de surface des cellules infectées par un virus ou les cellules tumorales pour ensuite les détruire.

Le système immunitaire des bivalves, comme les autres invertébrés, possède de nombreuses caractéristiques communes avec celui des vertébrés. Même s'il existe une grande diversité parmi les invertébrés, la principale différence est l'absence de réponse adaptative au niveau des lymphocytes B, responsables de la production d'anticorps. Leur immunité est donc basée sur la reconnaissance du non-soi par les hémocytes (le type cellulaire circulant dans l'hémolymphe) et des processus de réponses cellulaires et humorales (Galloway et al. 2001). Ces différents mécanismes protègent ainsi les bivalves contre les divers organismes pathogènes présents dans l'environnement, comme les bactéries (ex. *Vibrio sp.* chez la plupart des bivalves) et les parasites nématodes (ex. *Bucephalus spp.* chez l'huître) ou protozoaires (ex. *Perkinsus marinus* ou « Dermo » de l'huître) (Pruzzo et al. 2005; Mydlarz et al. 2006).

1. **Reconnaissance** : Comme d'autres invertébrés, les bivalves possèdent des molécules d'adhérence, les lectines, qui permettent la reconnaissance du soi et du non-soi, en se liant réversiblement aux protéines glycosylées des cellules étrangères. Les propriétés des lectines et leurs rôles de reconnaissance dans la défense des bivalves sont bien documentées chez plusieurs espèces commerciales comme les moules et les huîtres (Mydlarz et al. 2006).
2. **Réponses cellulaires** : Les hémocytes sont à la base de l'ensemble de la réponse immunitaire. Ils possèdent à leur surface différentes lectines, et peuvent également en sécréter dans l'hémolymphe (Pipe 1990). L'activité de phagocytose est ensuite activée par la formation d'un complexe entre la lectine et son ligant, tel qu'une protéine de surface d'un parasite protozoaire ou métazoaire (Hine 1999; Martins-Souza et al. 2006). Il existe plusieurs sous-types d'hémocytes décrits chez différentes espèces de

bivalves marins, et qui semblent avoir des fonctions spécifiques (Wootton et al. 2003). Ils ont été classifiés par des méthodes microscopiques, moléculaires et immunologiques. On distingue donc les **hyalinocytes** qui sont de petites cellules agranulaires avec un fort ratio nucléocytoplasmique et les **granulocytes** qui sont de grandes cellules qui contiennent des granules cytoplasmiques acidophiles (Pipe et al. 1995; Wootton et al. 2003; Tiscar et al. 2004). Ces cellules sont mobiles dans l'hémolymphe et ont des capacités de phagocytose, de coagulation et de chimiotactisme. Leur capacité de détruire un type spécifique de bactérie repose sur leur affinité pour les molécules produites par la bactérie, la présence de molécules opsonisantes appropriées, et la capacité de l'hémocyte à englober la bactérie (Canesi et al. 2002a). En effet, la **phagocytose** semble le principal mécanisme de destruction des pathogènes chez les bivalves. Notamment, le contact hémocyte-bactérie induit une destruction rapide de la bactérie, surtout si celle-ci est présente habituellement dans le filtrat issu de l'alimentation. De plus, il a été montré récemment que les bivalves possèdent dans leur hémolymphe un complexe cytotoxique capable de détruire des cellules cibles eucaryotes, comme les parasites protozoaires (Hubert et al. 1997; Malagoli et al. 2005). Cette fonction immunitaire des hémocytes basée sur un complexe protéique lytique semble similaire à l'activité des lymphocytes **Natural Killer** présents chez les vertébrés.

3. **Réponses humorales** : Les bivalves possèdent un arsenal de défenses humorales comme les agglutinines, les espèces réactives de l'oxygène (ROS), les peptides antimicrobiens et les lysozymes (Canesi et al. 2002a). Particulièrement, les **lysozymes** sont des enzymes capables de digérer la paroi des bactéries en coupant la liaison glycosidique  $\beta$  (1-4) des chaînes de polysaccharides. Les lysozymes des bivalves jouent un rôle autant immunitaire que digestif, qui agissent de façon complémentaire car les

bactéries ingérées représentent à la fois de la nourriture et une menace infectieuse. Chez les bivalves, les lysozymes peuvent inhiber la croissance de bactéries pathogènes en détruisant le peptidoglycane de leur paroi, et ont la propriété d'agir dans un large spectre de températures (Pipe 1990; Roch 1999; Mydlarz et al. 2006). L'oxyde nitrique (NO) joue également un rôle primordial dans l'immunité humorale contre les infections bactériennes et parasitaires (Smith et al. 2000; Tafalla et al. 2003; Villamil et al. 2007)}. Le NO est produit dans les hémocytes par des NO-synthases lors de la phagocytose, et peut ensuite réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour former le peroxy-nitrite, une molécule fortement bactéricide (Fang 1997; Gourdon et al. 2001). Par ailleurs, comme chez les vertébrés, le NO est considéré comme une molécule immunomodulatrice capable de médier les effets des estrogènes et des opioïdes sur l'immunité ainsi que les processus inflammatoires (Galloway et al. 2001; Stefano et al. 2003). D'autre part, l'enzyme cyclo-oxygénase (COX) est également présente dans de nombreux tissus chez les bivalves (Gagné et al. 2005a). Cependant, aucune étude n'a démontré la présence des deux isoformes que l'on retrouve chez les vertébrés, COX-1 et COX-2. En produisant des prostaglandines à partir de l'oxydation de l'acide arachidonique, elle initie les processus inflammatoires, mais elle semble également indispensable dans les voies de signalisations nécessaires à l'activité bactéricide des hémocytes (Canesi et al. 2002b).

Il existe d'autres mécanismes de réponse tels l'encapsulation et la production de nacre (biominéralisation), mais ils ne concernent que des pathogènes ou des corps étrangers trop volumineux pour être phagocytés par un hémocyte. Ces phénomènes ne seront donc pas abordés dans ce mémoire. Par ailleurs, de récentes études ont montré que les bivalves peuvent produire des molécules antivirales. En effet, l'hémolymphe acellulaire de l'huître *C.gigas* peut inhiber *in vitro* l'infection par

l'herpes simplex et le virus de la pancréatique nécrotique infectieuse dans des cellules de mammifères et de poissons, respectivement (Olicard et al. 2005). Cependant jusqu'à aujourd'hui, aucune substance bioactive n'a été clairement purifiée.

**Les médiateurs chimiques** : Plusieurs travaux ont montré l'importance des médiateurs chimiques dans le fonctionnement des cellules immunitaires chez les bivalves, comme la différenciation et la multiplication des hémocytes, ainsi que la phagocytose. Il existe une grande variété de médiateurs chimiques comme l'ACTH (corticotropinreleasing hormon), des monoamines (épinephrine, norépinephrine and dopamine), des glucocorticoïdes, des radicaux libres, le NO, les prostaglandines, des cytokines (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) et des opioïdes. (Tiscar et al. 2004). Ces molécules peuvent être sécrétées par les hémocytes eux-mêmes, ce qui suggère que les processus de réaction au stress, d'inflammation et d'immunité sont intégrés dans un même type cellulaire (Galloway et al. 2001). Par ailleurs, plusieurs travaux ont montré récemment que la production de la certains de ces médiateurs est influencée par les estrogènes, et donc par le statut reproducteur des bivalves. Notamment, la production de NO et de prostaglandines peut être stimulée par l'estradiol (Stefano et al. 2003; Croll et al. 2007). Ces interactions étroites entre les différents systèmes physiologiques suggèrent que chez les bivalves, des substances perturbant le fonctionnement hormonal pourraient également avoir des impacts sur les fonctions immunitaires des hémocytes.

## ***II.2.b Altération des fonctions immunitaires par les polluants aquatiques***

La problématique des polluants capables de perturber l'immunité a été mise en évidence en premier lieu chez les vertébrés, et les humains en particulier. En effet de nos jours, on observe une augmentation de l'incidence de maladies associées à un dérèglement du système immunitaire, comme les allergies et les hypersensibilités, principalement chez les enfants (Peat et al. 1994). Les contaminants chimiques présents dans l'environnement pourraient contribuer à ces perturbations, car ils sont connus depuis longtemps pour affecter le système immunitaire. Par exemple les métaux lourds, les pesticides, les HAP ou les dioxines ont été impliqués dans des désordres immunologiques chez des personnes exposées pendant de longues périodes à ces produits (Daniel et al. 2001). Or, la résistance aux maladies est dépendante de multiples mécanismes immunitaires que différentes substances polluantes pourraient perturber. Notamment, les pathogènes extracellulaires (ex. *Streptococcus pneumoniae* ou agent viral) ou intracellulaires facultatifs (ex. *Lysteria monocytogenes*) peuvent infecter plus facilement les individus subissant une diminution de l'efficacité phagocytaire ou des facteurs humoraux (Guo et al. 2000; Lee et al. 2002a). Quant aux pathogènes intracellulaires, ils peuvent se multiplier lorsque l'immunité cellulaire (basée sur les lymphocytes T chez les mammifères) est affectée (Luster et al. 2006). Il reste cependant difficile de déterminer le degré d'altération d'un paramètre immunitaire qui est nécessaire pour induire le développement d'une maladie. Cependant, si une assez grande population est exposée et que la charge en pathogènes ou en cellules tumorales est suffisante, on peut considérer que de petits changements d'efficacité immunitaire pourraient augmenter significativement l'incidence d'une maladie dans la population (Germolec 2004). Les études les plus complètes reliant l'exposition à des contaminants chimiques et l'augmentation de la prévalence de maladies infectieuses concernent les organochlorés. Par exemple dans l'arctique québécois, l'incidence d'otites moyenne

est plus élevée chez les enfants nourris au lait maternel que chez ceux nourris au lait commercial. De plus, ces otites étaient accompagnées d'une immunosuppression, soit une diminution de leucocytes et d'IgA sériques (Dewailly et al. 2000). D'autres études en Caroline du Nord ont montré que la prévalence de zona (herpes zoster) était plus élevée dans des populations exposées aux pesticides organochlorés, et que plusieurs compétences immunitaires étaient diminuées (prolifération lymphoblastique, nombre de lymphocytes NK) (Arndt et al. 1999).

Pour évaluer le risque immunotoxique de contaminants chimiques présents dans notre environnement, différentes études ont utilisé des modèles animaux en laboratoire et en milieu naturel. Les résultats obtenus suggèrent que certains composés chimiques altèrent les réponses immunitaires cellulaires et humorales, la prolifération des lymphocytes et diminuent le poids du thymus. Chez les animaux sauvages, on a observé une corrélation négative entre la dose de contaminants bioaccumulés dans les tissus et l'activité de phagocytose (Fournier et al. 2000). Les mécanismes impliqués dans l'immunité sont donc devenus, ces dernières années, des biomarqueurs permettant de détecter des effets toxiques précoces.

Dans ce contexte, les bivalves constituent un modèle particulièrement intéressant. En effet, de nombreuses substances chimiques présentes dans l'environnement ont été identifiées comme capables d'affecter une ou plusieurs fonctions de leur système immunitaire (Pipe et al. 1995; Galloway et al. 2001; Mydlarz et al. 2006) (Tableau 3). Comme on peut le remarquer, un grand nombre de ces substances se retrouvent dans les rejets urbains, suggérant que ces derniers peuvent perturber l'immunité de bivalves, et ainsi diminuer leur résistance aux infections et leur survie. Les mécanismes cellulaires et moléculaires de toxicité envers les processus immunitaires sont extrêmement variés, et la plupart restent encore à élucider. Néanmoins depuis les vingt dernières années, de nombreuses études ont permis d'identifier des effets fonctionnels capables d'altérer la résistance aux infections.

Type de substance	Exemples de molécules
Hydrocarbures Aromatiques Polyhalogénés	Poylchorobyphényles, Polybromobyphényles, Tétrachlorodibenzodioxine
Métaux	Plomb, Arsenic, Méthylmercure
Solvants	Benzène, Toluène
Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	Benzo(a)pyrène, diméthylbenzanthracène
Pesticides	Chlordane, Carbofurane, Malathion
Mélanges complexes	Effluents urbains, Sédiments
Gas oxydants	Oxyde d'azote, ozone, dioxyde de sulphure
Substances biologiques	Estrogènes, mycotoxines, alcaloïdes végétaux
Particules	Silice, amiante
Amines aromatiques	Benzidène, acétyl d'aminofluorène
Organoétains	Butylétains, phénylétains

**Tableau 3 : Composés chimiques susceptibles de perturber un ou plusieurs paramètres immunitaires chez les bivalves (Galloway et al. 2001).**

Les études d'immunotoxicologie environnementale comprennent différents niveaux d'évaluation afin de déterminer précisément le risque des contaminants. Il peut s'agir d'études *in vitro* sur des hémocytes, avec mesure de biomarqueurs tels que l'efficacité de leurs fonctions immunitaires (ex. phagocytose, sécrétion de lysozymes), ou l'activité de certaines enzymes (ex. NO-synthase, COX). A un niveau d'intégration supérieur, les effets de certaines substances peuvent être testés lors d'exposition *in vivo* par injection ou dilution dans l'eau d'aquarium. Ainsi les mêmes biomarqueurs peuvent être mesurés, ainsi que les réactions physiologiques

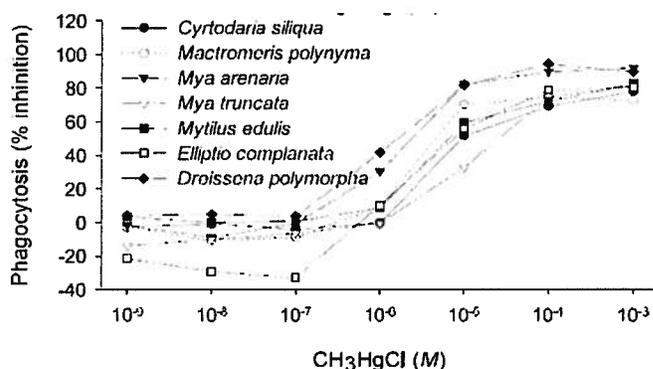
impliquées dans l'immunité, comme la densité d'hémocytes circulants dans l'hémolymphe, ou les paramètres humoraux de l'immunité. Enfin, des études *in situ* expérimentales ou observationnelles peuvent permettre d'intégrer les effets complexes de mélanges de polluants et les paramètres écologiques.

Ainsi il a été démontré que certains mélanges de polluants, comme les rejets urbains traités (Akaishi et al. 2007), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les métaux lourds (Fisher et al. 2000) peuvent provoquer une augmentation du nombre d'hémocytes circulants, ce qui est considéré comme une réponse physiologique au stress aigu chez les bivalves (Malagoli et al. 2007; Monari et al. 2007). D'une manière générale, l'exposition *in vitro* à des contaminants précis comme des métaux (cadmium, cuivre), ou des hydrocarbures conduit généralement à une augmentation de ce paramètre, qui peut s'expliquer par une synthèse cellulaire accrue, ou à une migration d'hémocytes des tissus vers l'hémolymphe (Pipe et al. 1995). À l'inverse une exposition à des rejets urbains non traités, et donc plus concentrés en contaminants et micro-organismes, peut provoquer une diminution de la densité d'hémocytes, et s'accompagne d'une diminution de la viabilité cellulaire (Akaishi et al. 2007). L'activité de phagocytose est un biomarqueur immunitaire largement utilisé chez de nombreuses espèces, et s'est montré sensible à divers polluants ou mélanges de polluants (Fournier et al. 2000). La présence de micro-organismes provoque généralement une augmentation de cette activité, notamment à cause de la présence de facteurs bactériens capables d'activer les processus cellulaires d'internalisation (Canesi et al. 2002a). Cependant, les études *in vitro* et *in vivo* tendent à montrer que plusieurs contaminants chimiques inhibent cette fonction aux concentrations les plus élevées comme les HAP (Grundy et al.; Wootton et al. 2003), les organoétains (Bouchard et al. 1999), les pesticides (Gagnaire et al. 2004), les métaux (Sauvé et al. 2002), et les xenoestrogènes (Canesi et al. 2006; Gauthier-Clerc et al. 2006; Canesi et al. 2007). La diminution de cette fonction cellulaire semble être due à une interaction des contaminants avec la membrane cellulaire, qui se déforme pour internaliser les organismes étrangers (Canesi et al. 2007a). Enfin,

l'activité phagocytaire peut également fortement varier selon la saison, ce qui suggère une influence hormonale physiologique (Lemaire et al. 2006). Les polluants chimiques et les micro-organismes peuvent également affecter les paramètres humoraux de l'immunité, qui dépendent de l'activité des hémocytes. Notamment, la reconnaissance de facteurs bactériens dans l'hémolymphe stimule la sécrétion de molécules bactéricides comme le NO et les lysozymes (Chu et al. 1989; Gourdon et al. 2001; Hong et al. 2006; Li et al. 2008a). Cependant, les contaminants chimiques peuvent modifier la réponse humorale qui risque alors d'être inadaptée lors d'une infection bactérienne. Notamment, des études *in-vitro* et *in-vivo* chez *M.edulis* ont montré que les xenoestrogènes, les PCB, le triclosan et les médicaments hypolipémiants peuvent stimuler la sécrétion de lysozymes extracellulaire en déstabilisant la membrane lysosomale (Canesi et al. 2007a; Canesi et al. 2007b; Canesi et al. 2007c). Cependant, cette sécrétion induite de lysozymes n'augmente pas le niveau de défense antimicrobienne, mais empêche au contraire une réponse immunitaire adéquate lors d'une infection bactérienne (Canesi et al. 2003). Par ailleurs, l'expression du gène codant pour le lysozyme chez les bivalves semble également être modulée par l'action des contaminants, comme le mercure ou les HAP (Dondero et al. 2006). La sécrétion de NO, qui participe aux défenses antibactériennes par son action de précurseur bactéricide et son rôle de médiateur inflammatoire, peut également être perturbée par l'exposition à des doses environnementales de composés chimiques. Notamment, sa production induite par l'activation des récepteurs à estrogènes laisse envisager des effets perturbateurs des xenoestrogènes évacués dans les rejets urbains (Stefano et al. 2003; Canesi et al. 2006).

Les effets des contaminants sur la réponse immunitaire des bivalves ont été principalement mesurés sur les espèces marines d'intérêt économique, comme la moule bleue (*Mytilus edulis*) ou l'huître (*Crassostrea gigas*). Cependant, quelques études ont utilisées la moule d'eau douce *Elliptio complanata* comme modèle pour évaluer l'activité de phagocytose (Blaise et al. 2002; Sauvé et al. 2002; Gagné et al.

2006). On peut notamment constater que les hémocytes de *E.complanata* sont sensibles aux mêmes concentrations d'un métalloïde comme le méthylmercure que les autres espèces de bivalves, ce qui justifie son utilisation dans des études d'immuno-écotoxicologie (Figure 11).



**Figure 11 : Inhibition de la phagocytose par le méthylmercure chez différentes espèces de bivalves marines et d'eau douce, dont *E.complanata* (Sauvé et al. 2002).**

Comme les autres bivalves, la moule d'eau douce est donc susceptible de subir des perturbations immunologiques si elle est exposée à des polluants complexes comme les rejets urbains. Ces altérations des systèmes de défense pourraient conduire au développement de néoplasies ou d'infection par les micro-organismes contenus dans les effluents. De plus, leurs sédentarités et leurs capacités à accumuler les particules les rendent particulièrement à risque de cette pollution puisque elles seront exposées de manière continue durant tous leurs cycles de vie. Pourtant, aucune étude n'a été réalisée pour caractériser les prévalences de pathologies des moules dans les rivières polluées.

Alors que l'immunité permet la survie au niveau individuel, la reproduction assure quant à elle la pérennité des populations des bivalves à long terme. Hors, on sait depuis plusieurs décennies que de nombreuses substances chimiques rejetées dans l'environnement peuvent perturber les systèmes hormonaux contrôlant la

reproduction. Dans le but d'évaluer le risque écotoxicologique des effluents urbains sur la santé d'*Elliptio complanata*, il convient donc d'étudier s'il existe un risque de perturbation endocrinienne chez cette espèce de moule d'eau douce.

### II.3 La perturbation endocrinienne

#### II.3.a Métabolisme des stéroïdes sexuels chez les bivalves

Comme les vertébrés, de nombreux invertébrés aquatiques produisent des stéroïdes sexuels (Oehlmann et al. 2003).

Estrogènes	17 $\beta$ -œstradiol
	estrone
	estriol
Androgènes	testostérone
	11-keto-testostérone
	5 $\alpha$ -dihydrotestosterone
	3 $\alpha$ -androstane-17 $\beta$ -diol
	androsterone
	dehydroepiandrosterone (DHEA)
	androstenedione
Progestérones	pregnenolone
	17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone
	progesterone
	17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone

Figure 12 : Principaux stéroïdes sexuels retrouvés chez les mollusques, d'après (Croll et al. 2007)

Comme chez les vertébrés, les œstrogènes sont présents en quantités plus importantes chez les femelles, alors que les mâles produisent plus d'androgènes. On retrouve ces hormones principalement dans la gonade, le manteau et le pied, et en moindre quantité dans l'hémolymphe (Gross et al. 2000). Les stéroïdes sexuels sont synthétisés dans les gonades et la glande digestive (ou hépatopancréas), principalement lors de la saison de reproduction (Figure 13). Ces fluctuations des niveaux de stéroïdes ont été corrélées avec le cycle de maturation sexuelle chez plusieurs espèces de bivalves. (Croll et al. 2007).

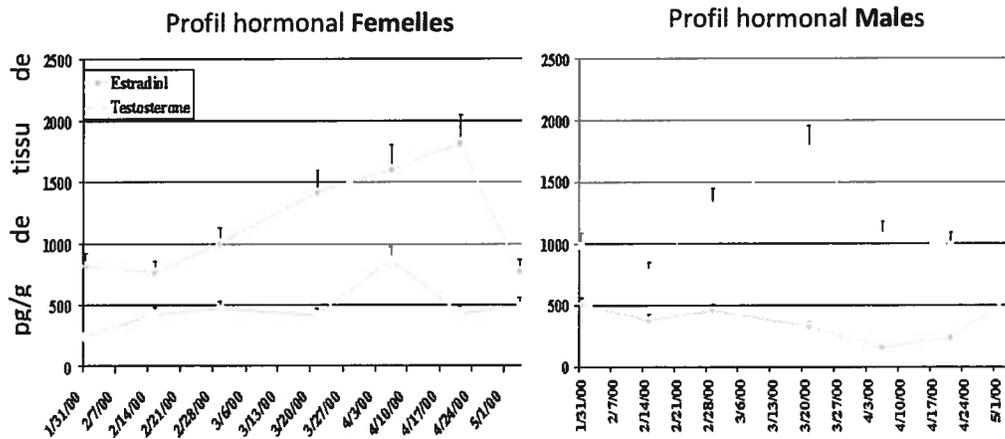


Figure 13 : Concentrations en hormones stéroïdes chez *Elliptio buckleyi* de janvier à mai, montrant clairement une augmentation lors de la saison de reproduction, d'après (Gross et al. 2000).

Plusieurs travaux ont démontré la présence de récepteurs à œstrogènes (ER) très similaires à ceux des mammifères dans plusieurs types cellulaires. Tout d'abord, il a été montré que les effets de l'œstrogène sur différentes voies de signalisation des hémocytes de bivalve peuvent être inactivés par le Tamoxifène, une molécule antagoniste de l'œstrogène (Canesi et al. 2006). De plus, des sites de fixation de l'œstrogène ont été identifiés dans la gonade d'*Elliptio complanata*, et une constante d'affinité a pu être calculée ( $K_d=0,4$  nM) (Gagné et al. 2001b). Ensuite la technique d'immunobuvardage (Western blot) a permis de mettre en évidence des ER dans la gonade, le pied et le ganglion podal en utilisant des anticorps anti-ER de mammifères (Won et al. 2005 ; Stefano et al. 2005). Enfin plus récemment les ER de type  $\alpha$  et  $\beta$  ont été observés en microscopie dans la gonade et les hémocytes par des techniques d'immunomarquage (Osada et al. 2003; Canesi et al. 2006). Par ailleurs, les œstrogènes semblent impliqués dans divers rôles physiologiques (Thornton et al. 2003): on leur attribue notamment un rôle important dans la différenciation sexuelle, la reproduction (Matsumoto et al. 1997; Oehlmann et al. 2003; Croll et al. 2007; Kohler et al. 2007) et le développement (Nice et al. 2000). On retrouve donc une

production importante d'œstradiol chez les femelles bivalves lors de la saison de reproduction, et des récepteurs qui peuvent médier leurs actions au niveau cellulaire.

Hghfsgh sfg dshgdsfg

Le rôle des estrogènes dans la physiologie des bivalves a conduit les chercheurs en écotoxicologie à s'intéresser à certains contaminants chimiques capables de se lier aux ER : les perturbateurs endocriniens. Il existe dans la littérature une certaine controverse sur l'activité des récepteurs à œstrogènes présents chez les mollusques. En effet, une minorité d'auteurs considère que malgré la présence d'hormones stéroïdiennes, de ER et de la vitellogénine dans les oeufs, l'activité de ces derniers ne serait pas contrôlée par la l'action de l'œstradiol (Won et al. 2005; Puinean et al. 2006a).

### ***II.3.b Les perturbateurs endocriniens***

#### ***II.3.b.1 Contexte et méthodes d'étude***

On définit comme perturbateur endocrinien toute substance qui interfère avec les fonctions du système hormonal, et risque d'influer négativement sur les processus de synthèse, de sécrétion, de transport, d'action ou d'élimination des hormones (Sonnenschein et al. 1998). Ces molécules peuvent avoir un impact négatif sur l'individu, sa progéniture et à l'échelle la population entière.

En 1996, la question de l'impact des perturbateurs endocriniens sur l'Homme est apparue sur le devant de la scène, quand le Dr. Theo Colburn et ses collègues ont écrit leur livre « The Stolen Futur ». Ce livre a eu des retombées politiques très importante, en partie parce que son avant-propos a été écrit par l'ancien vice-président des États-Unis, Al Gore. Depuis la publication de cet ouvrage, la littérature scientifique traitant des perturbateurs endocriniens a augmenté considérablement. Pourtant, les preuves des risques de perturbation endocrinienne chez les humains et les animaux sont apparues bien avant cette époque. Par exemple, des les années 1940 des études ont montré que les pesticides à base de DDT peuvent réduire la

fécondité des travailleurs agricoles, et même des oiseaux sauvages (notamment dans la région des grands lacs nord-américains) (Sonnenschein et al. 1998). Également, en 1971, l'usage du DES (diethylstilbestrol, un médicament utilisé pendant la grossesse pour éviter l'avortement spontané) a été incriminé dans de nombreuses malformations du système reproducteur chez les nouveau-nés (Solomon et al. 2000). De la même façon, des PCB et des dioxines, ainsi que plusieurs insecticides ont montré des effets à faible concentration sur le système reproducteur lors de diverses contaminations environnementales (Sonnenschein et al. 1998).

Les perturbateurs endocriniens dont l'action est la plus documentée pour les espèces aquatiques sont les analogues des stéroïdes sexuels, ou xénoestrogènes (Tableau 4). La question de leur impact dans le milieu aquatique a été soulevée lors de la découverte de poissons mâles « féminisés » (c'est-à-dire ayant des caractéristiques femelles) dans de nombreux cours d'eau en aval des villes du Royaume-Uni au cours des années 1990 (Sonnenschein et al. 1998). Or, les rejets des stations d'épuration municipales contiennent des concentrations importantes en xénoestrogènes. Ce lien causal a été confirmé par des expériences de terrain consistant à placer des poissons mâles en cage à différents sites en aval de stations d'épurations. Ces poissons ont subi des modifications de leur système reproducteur, comme une diminution de l'index gonado-somatique chez les mâles (ratio poids gonades/poids total) (Harries et al. 1997). De plus, des œufs peuvent être observés dans les gonades des poissons mâles exposés à des xénoestrogènes.

Famille chimique	Noms des molécules
<b>Stéroïdes</b>	<b>naturels</b> : œstradiol (E2), estriol (E3) and estrone (E1)] <b>synthétiques</b> ethinylestradiol (EE2), mestranol (MES)]
<b>Composés estrogéniques non stéroïdiens</b>	nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, nonylphenol carboxylates, octylphenol, octylphenol ethoxylates, benzophenone, bisphenol A
<b>Phytoestrogènes</b>	genistéine
<b>Pesticides</b>	endosulfane, DDT, dieldrine, alachlor, atrazine, nitrofène
<b>Biphényles polychlorés</b>	Congénères de BPC
<b>Plastifiants</b>	phtalates
<b>Métaux lourds</b>	mercure, cadmium et plomb

**Tableau 4 : Principaux produits chimiques ayant une action de perturbateur endocrinien chez les invertébrés (Matozzo et al. 2008)**

Plusieurs biomarqueurs ont été développés chez différentes espèces aquatiques afin de mesurer l'action des perturbateurs endocriniens comme l'Index Gonado-Somatique (rapport entre le poids de la gonade et le poids total), le sex ratio dans une population, l'activité de l'enzyme aromatasase, etc. de plus, les modifications histologiques sont généralement précédées de l'augmentation de la concentration plasmatique en vitellogénine (VTG), une protéine de l'œuf normalement retrouvée uniquement chez les femelles. La vitellogénine constitue le précurseur principal des réserves de l'embryon des espèces ovipares et est synthétisée par les hépatocytes chez les vertébrés lorsque les estrogènes se lient aux ER, principalement lors de la période de reproduction. Cette protéine est donc considérée depuis une dizaine d'années comme un biomarqueur sensible de l'activité estrogénique d'un contaminant ou d'un mélange chez les poissons principalement (Sumpter et al. 1995; Marin et al. 2004; Filby et al. 2007). Cependant, la VTG est également présente dans les œufs des bivalves. Elle est synthétisée par les cellules folliculaires dans la gonade, et s'accumule ensuite dans les ovocytes. La VTG des moules semble avoir une structure proche de celle des vertébrés comme les poissons. Notamment, l'ARNm de la VTG possède des séquences communes avec divers poissons, crustacés et nématodes, principalement dans sa partie N-terminale (Matsumoto et al. 1997).

Plusieurs études ont montré l'action des estrogènes sur la production de vitellogénine chez les bivalves. Notamment, des injections d'œstradiol ont induit la vitellogénèse chez l'huitre *Crassostrea gigas* (Osada et al. 2003). La vitellogénine est donc devenu depuis une dizaine d'années un biomarqueur d'exposition aux composés estrogéniques chez les bivalves (Matozzo et al. 2008). Jusqu'à présent, la seule méthode permettant la mesure de la VTG chez les bivalves est une méthode indirecte, l'ALP (Alkali-labile phosphates), basée sur le principe que la VTG est une molécule fortement phosphorylée (Byrne et al. 1989). Cette méthode a prouvé son efficacité chez les poissons (Kramer et al. 1998) et est utilisée depuis plusieurs années chez les bivalves (Blaise et al. 1999; Gagné et al. 2001b; Matozzo et al. 2008). Cependant, la phosphorylation de la VTG chez les mollusques semblent être moins intense, puisque la phosphatase n'est pas présente comme chez dans les vertébrés. Par contre, la phosphorylation de la protéine est plus élevée que le nombre de site moyen de phosphorylation des protéines en général (Byrne et al. 1989). D'autres méthodes sont explorées, notamment la quantification de l'ARNm de la VTG (Puinean et al. 2006a; Puinean et al. 2006b).

### ***II.3.b.2 Perturbation endocrinienne chez les bivalves***

Chez les bivalves, plusieurs substances estrogéniques peuvent perturber la reproduction et le développement, ce qui vient appuyer l'hypothèse selon laquelle les stéroïdes sexuels régulent la reproduction via les ER (Kohler et al. 2007). Étant donné leur statut d'espèces sentinelles, de nombreux chercheurs travaillent depuis plusieurs années à développer des biomarqueurs de perturbation endocrinienne chez les bivalves. L'impact des rejets urbains sur la reproduction des moules a notamment été évalué pendant un an dans le fleuve Saint-Laurent, ce qui a mis en évidence différentes modulation de l'activité gonadique comme une modification du sex-ratio en faveur des femelles, une augmentation de l'index gonado-somatique (GSI) et une augmentation de la production de la vitellogénine (Blaise et al. 2003). D'autres

expériences de mise en cage plus brèves ont montré une induction de la synthèse de VTG, accompagnée d'autres effets toxiques sur le métabolisme des monoamines, l'inflammation (Gagné et al. 2001b; Gagnon et al. 2006; Gagné et al. 2007b). Une étude *in vivo* a montré que le nonylphenol peut augmenter la sécrétion de VTG chez les mâles de *Tapes philippinarum* à des concentrations supérieures à 100µg/L ce qui correspond à des valeurs observées fréquemment dans les effluents municipaux (Matozzo et al. 2005). D'autres études ont montré une induction de la production de VTG après exposition à des composés chimiques comme des mélanges de HAP et le bisphénol A (Ortiz-Zarragoitia et al. 2006 ; Aarab et al. 2006).

Enfin, d'autres substances peuvent avoir des effets antagonistes de l'estrogène (E2), c'est-à-dire « masculinisants » chez les bivalves. Notamment, le TBT (tributyletain), un composé issu des peintures des bateaux connu pour ses effets androgéniques (masculinisants), est impliqué dans la formation d'individus imposex (possédant des caractéristiques mâles et femelles) chez les gastéropodes (Oehlmann et al. 2003). Chez les myes (*Mya arenaria*) vivant dans une baie du fiord du Saguenay contaminée par du TBT, on a observé un retardement de la maturation des gonades, ainsi qu'une diminution du GSI et de la production de VTG (Gagné et al. 2003). Un effet similaire, accompagné d'une augmentation de la proportion de mâles, a été observé chez la moule *M. edulis* proche du port d'Halifax qui est fortement pollué, notamment par du TBT (Hellou et al. 2003) issu des eaux usées municipales et des coques des navires.

Les deux chapitres précédents ont présenté comment les contaminants chimiques présents dans les rejets urbains peuvent altérer l'immunité et le déterminisme de la reproduction chez les bivalves. Cependant, la complexité des mécanismes endocriniens chez les bivalves et l'importance des rôles joués par les hémocytes suggèrent qu'il existe des liens entre l'équilibre hormonal et l'immunité chez ces invertébrés, qu'il convient de comprendre afin d'étudier leurs perturbations par des contaminants environnementaux.



### *III. Les liens entre systèmes immunitaire et endocrinien*

Aujourd'hui, un nombre croissant de données chez mammifères suggèrent une influence des hormones sexuelles sur le système immunitaire. Ceci est appuyé tout d'abord par le dimorphisme sexuel de certaines maladies auto-immunes humaines qui touchent préférentiellement les femmes, comme le lupus érythémateux ou l'arthrite rhumatoïde (Inadera 2006). De plus, différentes études de laboratoire ont montré l'importance des estrogènes sur le développement du thymus et de la rate, et la présence d'ER ( $\alpha$  et  $\beta$ ) actifs dans les leucocytes des rongeurs (Stygar et al. 2006). Ainsi, les xénoestrogènes peuvent modifier l'activité des cellules immunitaires via ces récepteurs et ainsi altérer leur fonction comme l'activité de phagocytose, de chimiotactisme et de production d'anticorps (Stefano et al. 2000; Sugita-Konishi et al. 2003).

Ainsi, les xénoestrogènes semble pouvoir perturber d'autres fonctions physiologiques que la reproduction, notamment le système immunitaire chez les vertébrés et en particulier chez les humains. Les perturbateurs endocriniens présents dans notre environnement pourraient donc contribuer à l'augmentation de la prévalence d'allergies observée dans la population (Inadera 2006).

### *III.1 Immunotoxicité des xenoestrogènes chez les bivalves*

Chez les bivalves aussi, les œstrogènes pourraient moduler l'immunité à différents niveaux. Notamment, des ER  $\alpha$  et  $\beta$  ont été détectés dans le cytoplasme et les lysosomes des hémocytes (Canesi et al. 2006). L'exposition *in vitro* des hémocytes de *M. edulis* à 25 nM de 17 $\beta$ -œstradiol (E2) stimule la phagocytose, la production intracellulaire et extracellulaire des radicaux de l'oxygène, et la synthèse de NOx (Canesi et al. 2006). Quand il est injecté *in vivo* à *M.arenaria* et *M.edulis*, l'E2 diminue les capacités de phagocytose, augmente la sécrétion extracellulaire de lysozymes et induit une déstabilisation de la membrane lysosomale (Canesi et al. 2006; Gauthier-Clerc et al. 2006). Ces résultats montrent qu'il existe une relation entre les stéroïdes sexuels et l'immunité. Pour l'instant peu d'études ont permis de comprendre quels sont les mécanismes impliqués. Il a cependant été démontré chez *Mytilus edulis* que l'estrogène et d'autres perturbateurs endocriniens peuvent moduler rapidement une voie de signalisation impliquée dans la réponse au stress dans les hémocytes. Cette voie, médiée par une tyrosine kinase, conduit à l'activation de protéines de réponse au stress connues pour jouer un rôle dans la réponse immunitaire comme la p38 MAPK, de ERK, de la PI3-Kinase ainsi que des activateurs de transcription (protéines STAT-like) (Canesi et al. 2004).

### *III.2 La vitellogénine comme acteur dans l'immunité*

Chez les espèces ovipares, un des médiateurs de l'impact des perturbateurs endocriniens sur le système immunitaire pourrait être la vitellogénine. En effet, cette protéine surproduite lors d'exposition aux xenoestrogènes a montré récemment des fonctions très intéressantes dans l'immunité de certaines espèces aquatiques. Chez les crustacés par exemple, une protéine possédant une séquence très proche de la VTG est impliquée dans la coagulation. Or on sait depuis quelques années que la coagulation de l'hémolymphe entre en jeu dans l'immunité antimicrobienne et antivirale chez plusieurs embranchements d'invertébrés (Iwanaga & Bok, 2005). Cette

protéine est produite dans de nombreux organes et se retrouve dans l'hémolymphe aussi bien des mâles que des femelles, et nécessite la sécrétion de la transglutaminase par les hémocytes pour polymériser et former un caillot (Hall et al. 1999; Iwanaga et al. 2005). Lorsque que l'on inhibe *in vivo* l'expression de cette lipoprotéine ou de la transglutaminase, par des techniques d'extinction de gène, on diminue fortement la résistance à l'infection contre la bactérie *Vibrio penaeicida* ou contre le virus du syndrome des points blancs est fortement diminuée (Maningas et al. 2008). Chez les poissons, de récentes études ont montré que cette la VTG possède des propriétés à la fois antibactérienne et hémagglutinante, et qu'elle peut être sécrétée chez les poissons males lorsqu'ils sont infectés par injection intraperitonéale de bactéries *E.coli* (Shi et al. 2006). De plus, une étude récente suggère fortement que la VTG joue un rôle dans l'opsonisation des bactéries par les macrophages (Li et al. 2008b). Ces fonctions immunitaires nouvellement attribuées à la VTG remettent en question son utilisation comme biomarqueur spécifique d'exposition aux xénoestrogènes chez le poisson mais en revanche, permet d'étudier les interactions entre l'immunité et l'endocrinologie. Le rôle de la vitellogénine dans le système immunitaire constituait un des objectifs de ce mémoire

Cette revue de littérature nous a permis de montrer l'intérêt de l'utilisation de la moule d'eau douce *E.complanata* comme espèce sentinelle en écotoxicologie. En particulier, son système immunitaire et son cycle reproducteur semblent être des paramètres prometteurs pour l'évaluation de la toxicité des rejets urbains.



## Chapitre II

### Expériences écotoxicologiques

L'objectif de notre étude écotoxicologique était de déterminer si les effluents urbains peuvent affecter la survie des moules au niveau individuel (immunité) et populationnel (reproduction). Notre démarche expérimentale a donc été d'exposer des moules d'eau douce *E.complanata* à différentes concentrations d'effluents urbains dans des conditions contrôlées et des conditions réelles dans le milieu récepteur, puis mesurer les paramètres immunitaires et endocriniens déjà utilisés en écotoxicologie chez d'autres espèces de bivalves. De plus, il nous intéressait de savoir s'il existe des liens entre les mécanismes hormonaux et l'immunité, et donc si la perturbation endocrinienne due aux rejets urbains pourrait être responsable de déséquilibres immunitaires. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons exposé des hémocytes *in vitro* aux hormones stéroïdiennes et à la vitellogénine afin d'évaluer si ces molécules peuvent influencer leurs fonctions immunitaires. L'originalité de l'approche pluridisciplinaire a nécessité une codirection pour ces travaux de maîtrise. Ainsi, l'expertise en immunologie apporté par l'équipe du Pr Fournier nous a permis de mesurer des paramètres précis par cytométrie en flux chez ce bivalve. D'autre part, l'équipe de Mr Gagné, spécialiste de la physiologie des bivalves, a apporté les outils nécessaires à la mesure des paramètres reproducteurs et des marqueurs biochimiques.

## ***I. Effets des rejets urbains sur le système immunitaire de la Moule *Elliptio complanata* : étude en laboratoire***

L'objectif de cette étude préliminaire au laboratoire était d'évaluer les effets de deux types d'effluents urbains traités différemment sur les compétences immunitaires et le système reproducteur de la moule d'eau douce *Elliptio complanata*. Cette expérience doit précéder l'étude dans le milieu naturel, car les conditions contrôlées en aquarium permettent de valider la méthodologie et de détecter à quelle concentration de l'effluent les effets apparaissent.

### ***III.3 Matériel et méthodes***

#### ***III.3.a Exposition des animaux au laboratoire***

Des effluents urbains ont été recueillis dans deux stations d'épuration de la ville de Laval rejetés dans la rivière des Mille-Îles. La station Fabreville (F) est située plus en amont de la rivière et emploie un traitement physico-chimique (Figure 2A). La station d'Auteuil (A) quant à elle se situe plus en aval dans la dernière section de la rivière avant qu'elle ne débouche dans le fleuve Saint-Laurent, mais emploie un système de traitement par biofiltration (Figure 2B). Ces deux stations disposent d'un système de désinfection aux rayons ultra-violet. Elles reçoivent principalement des eaux usées d'origine résidentielle mais également les effluents, prétraités ou non, d'usines des secteurs des produits métalliques, des meubles, de l'imprimerie, du textile, des vêtements et des produits alimentaires (Brouillette 2007). Des analyses chimiques exhaustives réalisées en février 2007 par le Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (CEAEQ) indiquent que les concentrations en produits chimiques sont pour la plupart du même ordre de grandeur dans les deux stations.

On peut cependant noter des variations journalières au sein d'une même station (Appendice III ; échantillons A et B).

Afin d'obtenir un mélange représentatif d'une journée complète, une pompe automatique a permis de prélever 50 litres d'effluent à intervalles réguliers pendant 24h. Des bassins d'exposition ont été préparés pour contenir 30 litres d'effluent concentré à 0, 1, 10, 20 et 35 % (v/v). Une partie des effluents non utilisée a été conservée à 4°C pour renouveler l'eau des bassins après 5 jours.

Des moules *Elliptio complanata* adultes ont été exposées dans les bassins pendant 12 jours, à raison de 8 moules par bassin. La température de l'eau a été maintenue à 15°C, et la pièce était éclairée selon une alternance lumière/obscurité de 16h/8h. Les animaux n'ont pas été nourris pendant l'expérience.

Après l'exposition, les moules ont été retirées des bassins pour en prélever l'hémolymphe dans le muscle adducteur postérieur, et ont ensuite été disséquées le jour même sur glace afin d'isoler la gonade. L'hémolymphe entière a permis de mesurer la concentration d'hémocytes et leur viabilité, ainsi que d'effectuer les tests fonctionnels d'immunocompétence (phagocytose et activité cytotoxique). Une partie de l'hémolymphe a été centrifugée afin de déterminer les paramètres immunitaires humoraux dans le plasma (surnageant) et l'inflammation dans les hémocytes (culot). L'activité reproductrice a été évaluée dans la gonade par la mesure de vitellogénine.

### ***III.3.b Mesure des biomarqueurs d'immunocompétence et de reproduction***

Les méthodes de mesure des biomarqueurs immunitaires et reproducteurs sont identiques à ceux décrits dans l'article scientifique (Cf. chapitre III.B.). Voir les appendices I et II pour des exemples de figures de cytométrie.

### ***III.3.c Analyse des données***

Les données issues de la mesure des biomarqueurs ont été traitées grâce au logiciel Statistica version 7.1 (StatSoft Inc.). L'effet de la concentration d'effluent sur les valeurs des biomarqueurs a été testé statistiquement par l'analyse de variance à un facteur (ANOVA). Lorsque l'ANOVA était significative, les groupes significativement différents du groupe témoin négatif (0%) ont été identifiés par le test des moindres carrés. Les données pour chaque groupe de moules furent analysées pour l'homogénéité des variances (test de Levene). En cas de variances hétérogènes, les données furent transformées en *log*. Les groupes exposés à l'effluent A et F n'ont pas été comparés, car les dosages ont été effectués lors de deux journées différentes.

## ***III.4 Résultats***

### ***III.4.a Analyses chimiques***

De façon générale, les concentrations en polluants organiques et inorganiques mesurées dans les deux effluents diffèrent peu. Cependant, l'effluent F semble avoir des charges plus élevées en COV, HAP, et produits pharmaceutiques alors que l'effluent A est caractérisé par des concentrations supérieures en stéroïdes, PCB et pesticides (cf. Appendice III pour les résultats détaillés).

### ***III.4.b Immunocompetence***

#### ***III.4.b.1 Concentration et viabilité des hémocytes***

La densité hémocytaire dans l'hémolymphe n'a pas varié de façon significative avec la concentration en effluent F. Cependant, on a pu observer une diminution de ce paramètre avec l'effluent A qui est significative pour les concentrations 10% et 35% (Figure 14).

La viabilité des hémocytes circulants n'est pas significativement influencée par l'exposition aux effluents des 2 stations d'épuration (Figure 15).

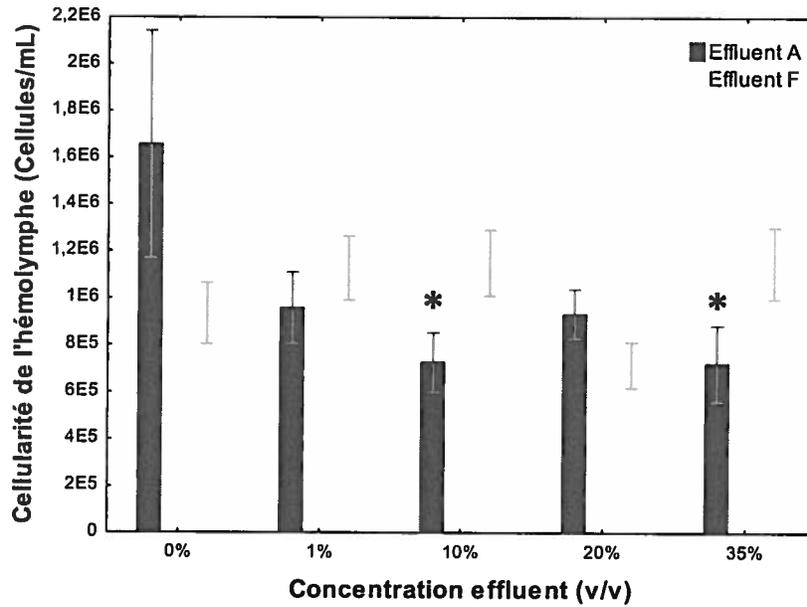


Figure 14 : Concentration en hémocytes totaux dans l'hémolymphe des moules exposées 12 jours aux effluents A et F. Les données représentent la moyenne  $\pm$  l'erreur standard. \* : différences statistiquement significative avec le groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ).

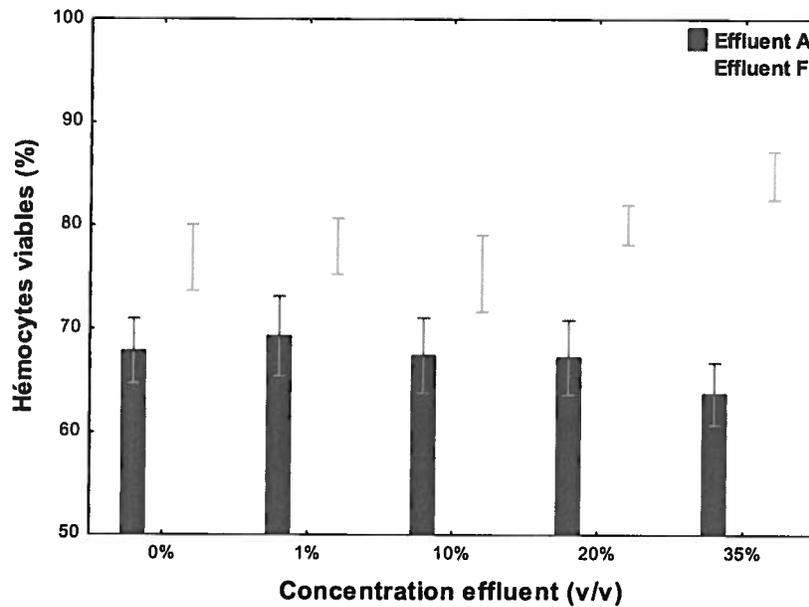
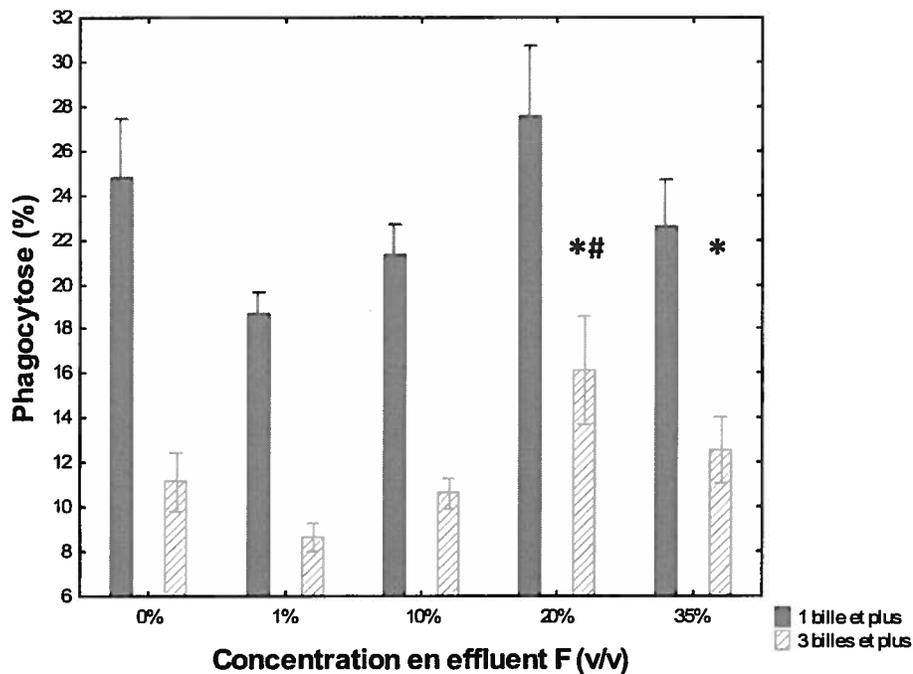


Figure 15 : Viabilité des hémocytes circulant dans l'hémolymphe des moules exposées 12 jours aux effluents A et F. Les données représentent la moyenne  $\pm$  l'erreur standard. \* : différences statistiquement significative avec le groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ).

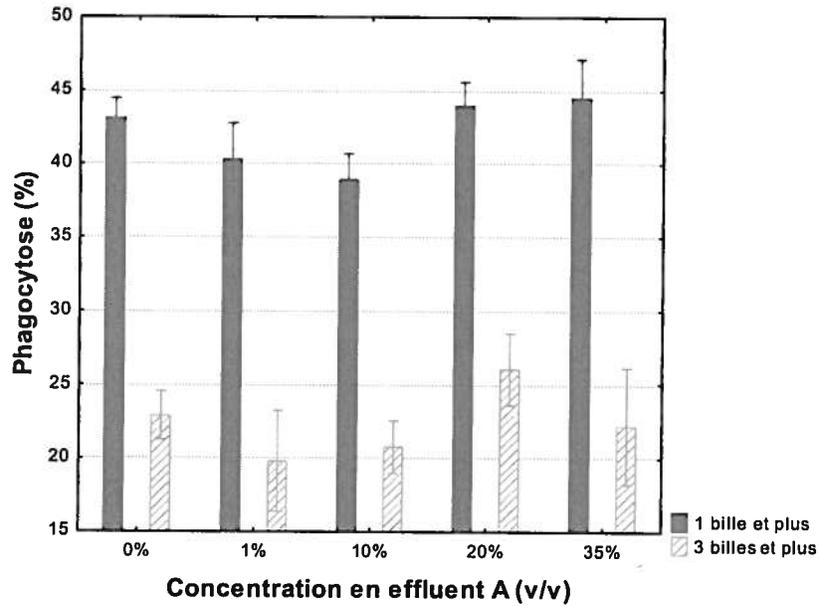
### III.4.b.2 *Phagocytose et capacité cytotoxique*

Pour la station de Fabreville, l'exposition aux différentes concentrations d'effluent a eu un effet sur la phagocytose ( $p < 0,05$ ). L'activité phagocytaire est apparue supérieure dans les bassins 20 et 35% par rapport aux bassins 1% et 10% (Figure 16). L'activité cytotoxique a également été modulée par l'exposition aux effluents. La proportion de cellules-cibles lysées a diminué avec la concentration en effluents, et est significativement inférieure au témoin négatif dans les bassins 10, 20 et 35% ( $p < 0,001$ ) (Figure 18).

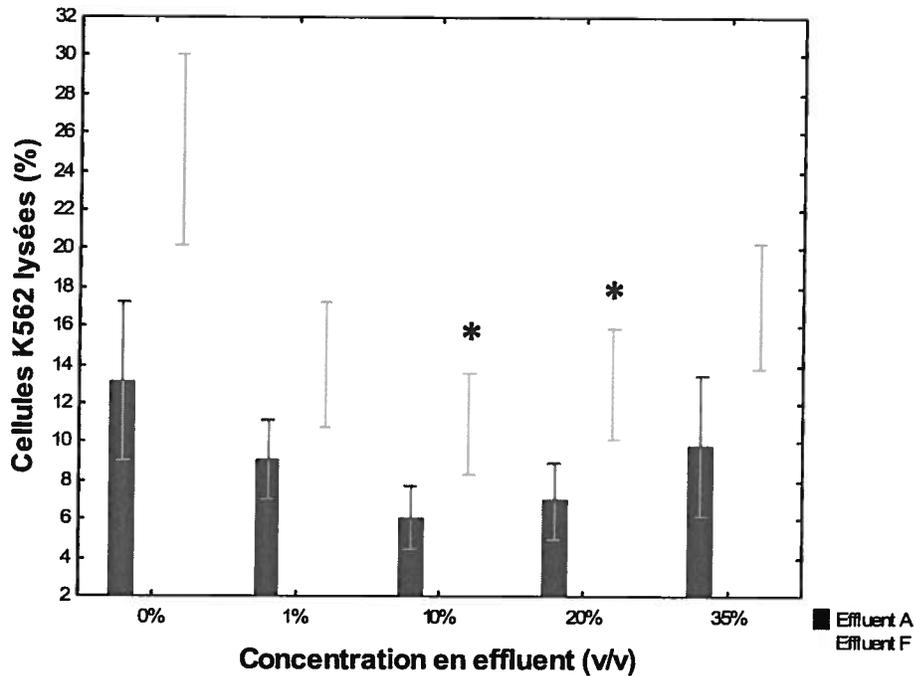
Pour la station d'Auteuil, les différentes concentrations d'effluents n'ont pas eu d'effets significatifs sur les activités cytotoxiques et phagocytaires (Figure 17 et Figure 18). Cependant, une tendance à la diminution de l'activité NK a été observée, principalement dans le bassin 10%.



**Figure 16 : Phagocytose de plus de 1 ou 3 billes par les hémocytes des moules exposées 12 jours à l'effluent F.** Les données représentent la moyenne  $\pm$  l'erreur standard. \* : différences statistiquement significative avec le groupe 1% ( $p \leq 0,05$ ). # : différences statistiquement significative avec le groupe 10% ( $p \leq 0,05$ )



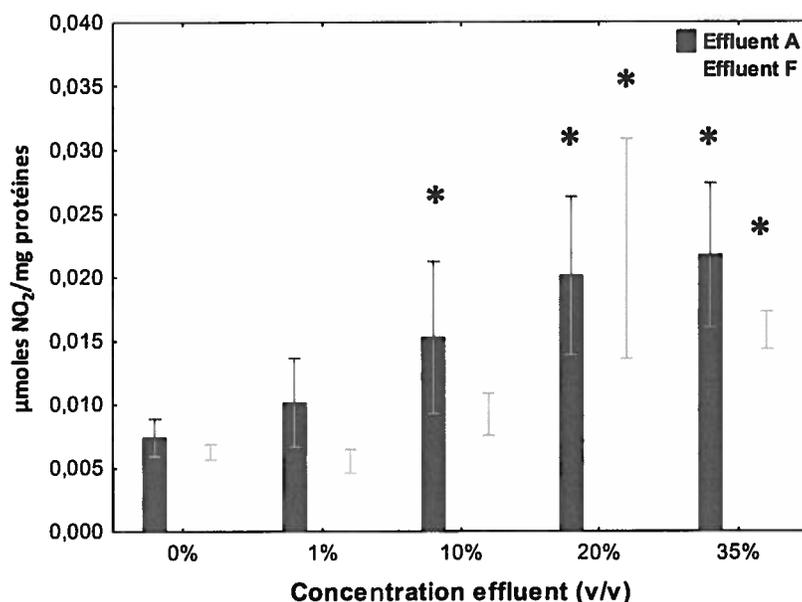
**Figure 17 : Phagocytose de plus de 1 ou 3 billes par les hémocytes des moules exposées 12 jours à l'effluent A.** Les données représentent la moyenne  $\pm$  l'erreur standard. \* : différences statistiquement significative avec le groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ).



**Figure 18 : Capacité cytotoxique des hémocytes des moules exposées 12 jours aux effluents A et F.** Les données représentent la moyenne  $\pm$  l'erreur standard. \* : différences statistiquement significative avec le groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ).

### III.4.b.3 Production d'oxyde nitrique

Pour les stations A et F, les concentrations de NO dans le plasma augmentent de façon dose-dépendante avec la concentration en effluent. Cette augmentation est significative dans les bassins 10, 20 et 35% (Figure 19). Dans les bassins 20 et 35%, l'augmentation est d'environ 3 à 4 fois la concentration mesurée chez les témoins négatifs et atteint des valeurs supérieures à 20  $\mu\text{M NO}_2/\text{mg}$  de protéines.



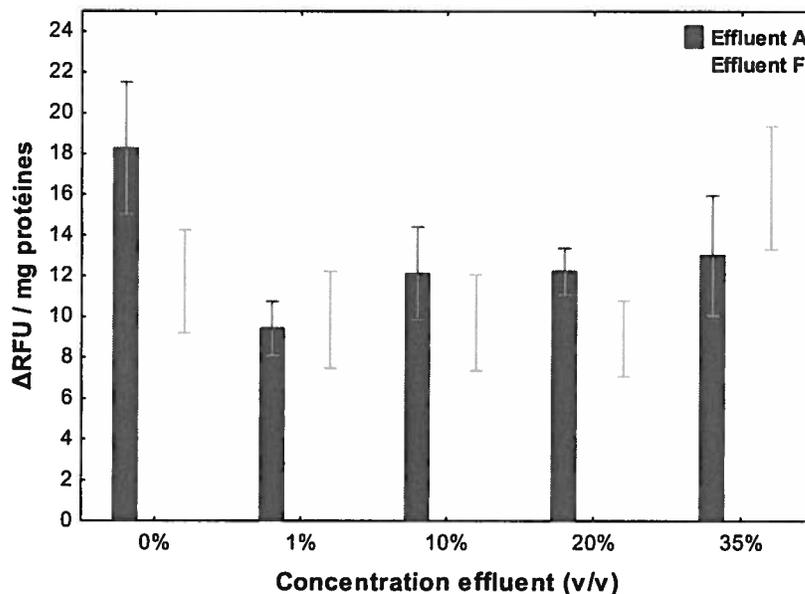
**Figure 19 : Concentration en oxyde nitrique dans l'hémolymphe des moules exposées 12 jours aux effluents A et F.** Les données représentent la moyenne  $\pm$  l'erreur standard. \* : différences statistiquement significative avec le groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ).

### III.4.b.4 Production de lysozymes

Les valeurs obtenues lors de la mesure de ce biomarqueur étaient proches de la limite inférieure de détection, et hors de la courbe standard. Les résultats ne sont donc pas interprétables et n'ont pas été présentés dans ce mémoire.

### III.4.b.5 Stress inflammatoire

Pour les deux effluents considérés, l'activité de la cyclo-oxygénase dans les hémocytes ne varie pas significativement entre les groupes d'exposition (Figure 20).



**Figure 20 : Activité cyclo-oxygénase dans les hémocytes des moules exposées 12 jours aux effluents A et F. Les données représentent la moyenne  $\pm$  l'erreur standard. \* : différences statistiquement significative avec le groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ).**

#### ***III.4.b.6 Corrélation entre les biomarqueurs***

Pour les deux effluents A et F, on observe des corrélations communes entre certains biomarqueurs du système immunitaire. Il existe ainsi une corrélation positive entre l'efficacité phagocytaire et la production de NO ainsi qu'entre l'activité NK et la cyclo-oxygénase (Tableau 5).

De plus, avec l'effluent F, il existe une corrélation négative entre la cellularité de l'hémolymphe et l'efficacité phagocytaire. Avec l'effluent A, on observe une corrélation positive entre viabilité cellulaire et l'efficacité phagocytaire.

Biomarqueur	Effluent	COX	NO	VIA	CELLS	PHAGO	NK
COX	A		NS	NS	NS	NS	$R^2 = .36$ $p = .024$
	F		NS	NS	NS	NS	$R^2 = .5046$ $p = .001$
NO	A			NS	NS	$R^2 = .14$ $p = .02$	NS
	F			NS	NS	$R^2 = .1186$ $p = .004$	NS
VIA	A				NS	$R^2 = .41$ $p = .010$	NS
	F				NS	NS	NS
CELLS	A					NS	NS
	F					$R^2 = -.4466$ $p = .004$	NS
PHAGO	A						NS
	F						NS

**Tableau 5 : Corrélation entre les biomarqueurs immunitaires mesurés dans les moules exposées 12 jours à l'effluent d'Auteuil. NS : Non significatif**

### III.4.c Production de vitellogénine

La production de vitellogénine dans la gonade n'a pas été modifiée selon l'exposition aux différentes dilutions de rejets urbains issus de la station de Fabreville (Figure 21).

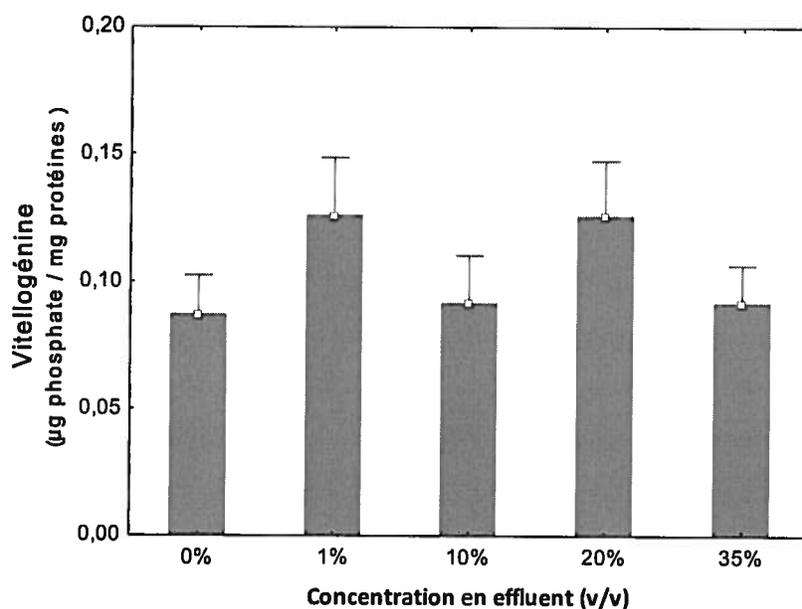


Figure 21 : Production de vitellogénine dans la gonade des moules exposées 12 jours à l'effluent F.

La production de VTG dans la gonade des moules exposées à l'effluent A n'a pas été mesurée.

### III.5 Discussion

Les expositions aux deux types d'effluents issus de traitements différents n'ont provoqué aucune mortalité parmi les moules exposées aux différentes concentrations. Des taux de survie élevés ont également été observés lors d'expositions de moules *M.edulis* à des concentrations inférieures à 50% de rejets urbains pendant 21 jours (Akaishi et al. 2007). Les effets mesurés au laboratoire grâce aux biomarqueurs correspondent donc à des effets sublétaux sur des animaux qui ont pu maintenir leur homéostasie malgré la présence de substances toxiques.

L'impact des effluents sur la concentration et la viabilité cellulaire des hémocytes semble différer entre les deux stations. En effet, alors que l'effluent A provoque une diminution du nombre d'hémocytes circulants aux concentrations supérieures à 10%, l'effluent F ne semble pas induire d'effet significatif sur ce paramètre. La diminution de la concentration en hémocytes dans l'hémolymphe peut être provoquée à la fois par une diminution de leur synthèse ou une augmentation de leur mortalité. Cette dernière hypothèse paraît cependant moins plausible, vu l'absence de diminution de la viabilité cellulaire mesurée par cytométrie en flux. On pourrait donc penser que les individus exposés à des concentrations importantes d'effluent A subissent une diminution de leur capacité à synthétiser les hémocytes, et à renouveler ainsi leur contingent de phagocytes fonctionnels. À partir de 7 jours d'expositions en aquarium à des concentrations importantes d'effluent urbain non traité, on observe une diminution de la concentration cellulaire chez *M.edulis* (Akaishi et al. 2007). Au contraire chez *E.complanata*, des concentrations supérieures à 20% d'effluent urbain traité par procédé physico-chimique induisent une augmentation de la densité d'hémocytes après 4 jours (Blaise et al. 2002). Par ailleurs, la plupart des expériences en aquarium et dans le milieu naturel montrent qu'en plus d'une infection bactérienne, les stress physiques, thermiques et chimiques induisent une augmentation de ce paramètre (Pipe et al. 1995; Malagoli et al. 2007; Monari et al. 2007). Ainsi, la circulation d'hémocytes plus abondants est considérée comme une

réponse physiologique appropriée lors d'un stress d'origine variée, car ces cellules peuvent participer au rétablissement de l'homéostasie grâce à leurs rôles dans l'immunité et les processus neuro-endocriniens. La baisse de la concentration en cellules immunitaires due à l'exposition à l'effluent A peut donc non seulement diminuer l'efficacité de la lutte contre les agents infectieux, mais aussi empêcher une réponse adaptée aux stress.

Les paramètres fonctionnels de l'immunité sont également perturbés lors des expositions aux rejets urbains. Les niveaux de d'activité de phagocytose n'ont pas différé entre les bassins, ce qui indique que la concentration en effluent urbain affecte peu ce paramètre immunitaire. Pourtant, des expériences de laboratoire ont montré que les rejets urbains peuvent inhiber l'activité de phagocytose, particulièrement lors d'expositions longues ou à des concentrations (Blaise et al. 2002; Akaishi et al. 2007). Les deux effluents contenaient des polluants susceptibles d'inhiber la phagocytose, comme les métaux lourds, les HAP, les PCB et les pesticides organochlorés (Galloway et al. 2001; Sauvé et al. 2002). Cependant, les fortes charges en micro-organismes peuvent induire une stimulation des mécanismes d'immunité cellulaire qui pourraient compenser l'inhibition due aux contaminants chimiques. Les deux index de phagocytose mesurés ( $\geq 1$  bille et  $\geq 3$  billes) suivent la même tendance, mais la phagocytose de 3 billes discrimine mieux les différents groupes, et semble donc plus intéressante à considérer comme biomarqueur d'immunotoxicité.

Par ailleurs, l'activité de lyse des cellules étrangères a été inhibée dans bassins contenant des concentrations d'effluent supérieures à 10%. Cette expérience constitue donc la première mise en évidence d'une perturbation de ce mécanisme immunitaire par un mélange complexe de polluants urbains chez les bivalves. La capacité cytotoxique des hémocytes semble représenter un mécanisme cellulaire de défense antiparasitaire, voire anti-virale et anti-tumorale (Hubert et al. 1997; Malagoli et al. 2005). La différence de sensibilité aux polluants entre phagocytose et cytotoxicité suggère que les hémocytes pourraient avoir une orientation fonctionnelle envers le mécanisme le plus « utile » dans la défense de l'organisme

dans un environnement donné. En effet, le fait que les moules ne possèdent qu'un seul type cellulaire assurant l'immunité pourrait imposer une priorisation des mécanismes de défense en fonction de l'agent pathogène auquel l'animal est exposé. Dans notre cas, les bactéries représentent la majorité des micro-organismes pathogènes présents dans les effluents urbains, alors que les parasites sont secondaires. Par exemple, une étude précédente a montré que l'effluent de Fabreville contient des bactéries hétérotrophes à une concentration de 10 millions de CFU/100mL, alors que le parasite *Giardia lamblia* n'est présent qu'à 100 kystes/L (Payment 2003).

La libération d'oxyde nitrique dans l'hémolymphe augmente avec la concentration en effluents urbains, et est proportionnelle à l'activité de phagocytose. Ces résultats sont cohérents sur le plan physiologique, car la production de NO et des autres ROS a lieu lors de la flambée oxydative initiée par la phagocytose (Gourdon et al. 2001; Tafalla et al. 2003). L'augmentation de la production de NO est très marquée dans les bassins contenant 20 et 35% d'effluents urbains, où l'on a mesuré des concentrations plasmatiques atteignant 3 ou 4 fois la valeur des témoins. Cette hausse de la teneur en NO augmente considérablement le pouvoir bactéricide de l'hémolymphe, grâce à la réaction avec le peroxyde d'hydrogène qui forme l'anion peroxy-nitrique (Fang 1997). Les moules exposées aux plus fortes concentrations d'effluents urbains semblent donc accroître leur capacité à lutter contre les bactéries en augmentant l'activité bactéricide de leur plasma, et en maintenant une activité de phagocytose normale. Dans le cas de l'effluent A, cette immunostimulation pourrait constituer une compensation de la baisse de synthèse des hémocytes permettant de conserver un système de défense efficace.

Dans notre expérience, l'activité de la cyclo-oxygénase dans les hémocytes ne semble pas être influencée par la concentration en effluents urbains. Cette enzyme a un rôle dans les processus inflammatoires en produisant les prostaglandines dans divers tissus. Son action dans les hémocytes, bien qu'elle ne soit pas encore complètement élucidée, semble être liée non seulement aux processus

inflammatoire, mais aussi à la destruction des bactéries (Canesi et al. 2002b). Dans plusieurs tissus de la moule, l'activité de la COX peut être inhibée après l'injection d'un anti-inflammatoire non stéroïdiens. Cependant, les rejets urbains, même s'ils contiennent des résidus de ces médicaments, induisent un stress inflammatoire dans les branchies et la gonade (Gagné et al. 2005b). L'absence d'induction de la COX dans notre expérience suggère que les hémocytes n'ont pas subi d'inflammation à cause des rejets urbains, même si aucun dosage ne permet de conclure sur l'activité de l'enzyme dans les tissus. La corrélation entre activité COX et NK chez les moules exposées aux 2 effluents peut suggérer une implication de la COX dans l'activité cytotoxique. Cependant, ces liens doivent être investigués par des études *in vitro*.

Enfin, la production de vitellogénine ne paraît pas différer selon les traitements aux différentes concentrations de rejets urbains. Pourtant, d'autres expériences *in vivo* ont montré que les effluents urbains peuvent induire une surproduction de VTG et ainsi augmenter les niveaux d'ALP dans la gonade et l'hémolymphe. L'exposition à des concentrations supérieures à 10% pendant 4 jours ont augmenté l'ALP dans la gonade de *E.complanata* (Gagné et al. 2001b). La même induction a été observée dans l'hémolymphe chez la moule zébrée exposée plus longtemps (112 jours) à 100% d'effluents issus d'un traitement tertiaire (Quinn et al. 2004). Des expériences de terrain utilisant la moule *E.complanata* ont confirmé l'estrogénicité des rejets urbains en milieu récepteur (Gagné et al. 2001b; Gagnon et al. 2006; Gagné et al. 2007b). Plusieurs substances détectées dans les effluents de Laval peuvent agir sur les ER et induire la production de VTG à de faibles concentrations. Notamment, le nonylphénol (NP) est présent dans les effluents A et F à des concentrations d'environ 2 µg/L et 4 µg/L, respectivement. Les concentrations en éthoxylates de nonylphénols (NPEO) atteignent des concentrations plus importantes d'environ 110 à 130 µg/L. Les concentrations en bisphénol A (BPA) étaient d'environ 80 à 90 ng/L. D'après la littérature, ces concentrations devraient être suffisantes pour stimuler la production de VTG chez la moule après une exposition de 12 jours. En effet, les résultats

d'études *in vivo* montrent qu'une augmentation de l'ALP est détectable dans l'hémolymphe de la moule *M.edulis* et du clam *Tapes philippinarum* après 7 jours à des concentrations entre 50 et 100 µg/L de NP (Matozzo et al. 2005; Ricciardi et al. 2008). Chez la moule zébrée, la concentration nécessaire pour induire une augmentation d'ALP dans la masse viscérale est comprise entre 5 et 500 µg/L (Quinn et al. 2006). L'exposition à 50 µg/L de BPA n'a pas entraîné d'augmentation de l'ALP dans la gonade de *M.edulis* après 3 semaines (Aarab et al. 2006). Encore aujourd'hui, il existe une grande diversité dans les méthodes de dosage de l'ALP, que ce soit dans la gonade, l'hémolymphe ou l'hépatopancréas. L'absence d'induction de ce biomarqueur dans la présente étude pourrait être due à une élimination plus rapide des xenoestrogènes chez l'espèce *E.complanata*, ou une plus faible sensibilité de la méthode de dosage dans la gonade. Dans notre expérience, l'ajout d'un groupe témoin positif ayant reçu de l'estradiol par injection aurait permis d'avoir une meilleure indication de la cause de l'absence d'induction de l'ALP. De plus, cette moule d'eau douce est hermaphrodite, alors que le sexe influe sur les concentrations physiologiques de VTG (Gagné et al. 2001a) ainsi que sur la réponse toxique aux composés estrogéniques (Matozzo et al. 2005). Ainsi, une évaluation préalable du sexe par histologie chez *Elliptio complanata* améliorerait la spécificité des résultats en permettant de déterminer la proportion de tissu femelle et male chez les hermaphrodites. Ainsi ces résultats montrent l'importance d'effectuer un travail de recherche fondamentale sur la production de vitellogénine chez les bivalves, et en particulier chez les espèces vivant en eau douce. Notamment, une caractérisation précise de la vitellogénine d'*E.complanata* par des techniques de protéomique est nécessaire, puisqu'il apparaît que des protéines proches de la vitellogénine sont impliqués dans différentes fonctions physiologiques comme la coagulation ou l'immunité (Hall et al. 1999; Iwanaga et al. 2005; Li et al. 2008b). Un projet très intéressant consisterait à produire un anticorps permettant la réalisation de western blots, et donc de détecter spécifiquement la protéine de l'œuf comme cela a déjà été fait il y a quelques années (Won et al. 2005). Par ailleurs, le développement de

méthode par RT-PCR pour déterminer l'induction du gène de la VTG paraît donc prometteur pour remplacer les tests biochimiques (Puinean et al. 2006a; Puinean et al. 2006b). Enfin, la mesure du niveau d'expression des récepteurs à l'E2, caractérisés récemment chez la moule *Mytilus edulis*, pourrait constituer un nouveau biomarqueur sensible aux xenoestrogènes (Canesi et al. 2006).

### *III.6 Conclusion de l'expérience*

L'expérience d'exposition de moules *Elliptio complanata* à deux effluents urbains issus de traitements différents a montré que certains paramètres immunitaires sont modulés dans des concentrations supérieures à 10%. Ces deux effluents, proches du point de vue de leur composition chimique, ont provoqué des effets très similaires, notamment une stimulation des processus immunitaires impliqués dans la lutte antibactérienne. Cette immunostimulation peut avoir des effets néfastes sur la résistance aux autres types d'agents infectieux (ex. parasites et virus), et sur les réserves énergétiques des animaux (Adamo 2004; Germolec 2004). Des tests spécifiques de résistance aux maladies, par exemple avec la bactérie pathogène du genre *Vibrio*, devraient donc être menés pour confirmer ces hypothèses (Saint-Jean et al. 2002; Akaishi et al. 2007). Les biomarqueurs immunitaires utilisés dans cette étude ont montré un effet global cohérent, et ont discriminé les groupes exposés aux différentes concentrations. Ils peuvent donc être repris pour d'autres études utilisant *E.complanata*.

Enfin, les effluents considérés ici n'ont pas provoqué de perturbation significative de la production de vitellogénine, malgré la présence de xéno-estrogènes. Ces résultats suggèrent que le déterminisme et les effets des hormones stéroïdiennes doivent encore être approfondis avant d'utiliser les bivalves comme espèce bio-indicatrice de la présence de xéno-estrogènes

Après cette étude préliminaire en aquarium qui a permis d'identifier le risque immunotoxique causé par rejets urbains, il est nécessaire d'effectuer une étude sur le terrain. En effet, les biomarqueurs sensibles et spécifiques développés précédemment devraient permettre d'évaluer finement les effets dans milieu naturel qui est beaucoup plus complexe à cause des nombreux facteurs environnementaux impliqués (variations physico-chimiques de l'eau, substrat, etc.). De plus, l'étude en aquarium a des limites intrinsèques : par exemple, les tests effectués à partir d'un échantillon ponctuel ne prennent pas en compte les variations horaires et saisonnières de la composition des effluents de stations d'épuration.

## ***IV. Article scientifique***

*An in-situ study of the impacts of urban wastewater on the immune and reproductive systems of the freshwater mussel *Elliptio complanata**

**Bertrand Bouchard<sup>1,2</sup>, François Gagné<sup>1</sup>, Marlène Fortier<sup>2</sup> and Michel Fournier<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Environment Canada, Fluvial Ecosystem Research, 105 McGill, 7th Floor, Montreal (Quebec) H2Y 2E7 CANADA

<sup>2</sup>INRS – Armand Frappier Institute, 31 boul. des Prairies, Laval (Québec) H7V 1B7 CANADA  
Email contact: [francois.gagne@ec.gc.ca](mailto:francois.gagne@ec.gc.ca)

---

**Article accepté pour publication.**

Référence :

Bouchard, B., Gagné, F., Fortier, M., Fournier, M., An *in-situ* study of the impacts of urban wastewater on the immune and reproductive systems of the freshwater mussel *Elliptio complanata*, *Comparative Biochemistry and Physiology* (2009)

doi:10.1016/j.cbpc.2009.04.002

<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6W89-4W1JW21-1/2/ca560fc9597228a784c037dfeeb34900>

---

## *IV.1 Abstract*

The goal of this study was to examine immune and endocrine-disrupting effects of municipal effluents on freshwater mussels. Mussels were planted in the Mille-Iles River (Québec) for 30 days that receives 2 urban wastewater treatment plants (WWTP) effluents, using a physicochemical (Fabreville, F) or a biofiltration treatments (Auteuil, A), both followed by UV disinfection. The reference sites were located upstream the inputs and 150 m upstream before the point source of discharge of each effluents. The mussels were analyzed for cellular and humoral immunocompetence, and for gonad activity. Though condition factor was not affected, the domestic wastewaters induced high mortality rate (60% at both downstream sites). Haemocyte count, phagocytosis and lysozyme secretion were induced by effluent F, indicative of activation by microbial factors. Conversely, effluent A caused an immunosuppression, characterized by reduced cell viability, phagocytosis and lysozyme release. Levels of bacteria in mussels' tissue were negatively correlated with phagocytosis, showing the importance of this process in defence against infection. Inflammation biomarkers, like extracellular secretion of nitric oxide and haemocyte cyclooxygenase activity, showed no difference between sites but were positively correlated with phagocytosis. The production of vitellogenin-like proteins (VTG) was significantly induced in the most downstream site of the river but was associated with gonad maturity and phagocytosis. However, the extraction of residual VTG revealed that VTG were higher at effluent F sites, suggesting estrogenic effect at these sites. The data support the hypothesis that VTG is involved in immunity, as it was recently demonstrated in fishes, and that the immune system status should be included when using the VTG biomarker to evaluate for the presence of xenoestrogens in the environment.

## *IV.2 Introduction*

The large majority of domestic and sometimes industrial wastewaters are processed in municipal wastewater treatment plants (WWTP) (OCDE 2004). As a consequence, the release of contaminants harmful for the freshwater ecosystems substantially decreased over the last 20 years. Notwithstanding these various wastewater treatments, these effluents are still considered a major source of pollution of both freshwater and marine ecosystems. In North America, the reduction in the populations of some freshwater molluscs was partly associated with the deterioration of the water quality by the WWTP effluents (Lydeard et al. 2004). Chemicals such as heavy metals, PAH, endocrine disruptors (e.g., nonylphenol, ethinylestradiol), and pharmaceuticals have the potential to be toxic to aquatic animals, especially to the immune and reproduction systems (Sonnenschein et al. 1998; Fournier et al. 2000). Despite this situation, relatively few studies were carried out to evaluate the influence of these effluents on the immune system of freshwater mussels.

Freshwater bivalves are benthic filter feeding animals, and thus directly exposed to the dissolved and particulate contaminants in water. Moreover, these organisms are sessile, dwell in the sediment-water interface and live for relatively long periods (up to 30 years), which makes them ideal sentinel species for ecotoxicological studies. The immunity of bivalves is based on phagocytosis of pathogens (Roch 1999) and the secretion of humoral factors (agglutinins, cytokines etc), but other cellular processes such as NK-like cytotoxicity have been described (Hubert et al. 1997; Malagoli et al. 2005). The humoral defences comprise the production of reactive species of oxygen (ROS), agglutinins (lectins), antimicrobial peptides and lysozymes (Canesi et al. 2002a). Lysozymes takes part in digestion and the nonspecific immune response against infectious bacteria in the bivalves (Mydlarz et al. 2006), and are secreted in

plasma by haemocytes after pathogen recognition or a physiologic stress (Pipe 1990; Carballal et al. 1997; Hong et al. 2006; Monari et al. 2007). Nitric oxide plays a main role in humoral immunity against bacteria and parasites (Smith et al. 2000; Tafalla et al. 2003; Villamil et al. 2007). NO is produced by NO-synthases in haemocytes during phagocytosis, and can react with hydrogen peroxide to form peroxynitrite, a highly potent bactericide (Fang 1997; Gourdon et al. 2001). Moreover, like in vertebrates, NO may act as an immunomodulator and mediate the effects of estrogens and opioids on immunity and inflammation (Galloway et al. 2001; Stefano et al. 2003). Cyclooxygenase (COX) is involved in the first step of arachidonic acid oxidation leading to the production of prostaglandins which is readily induced during inflammatory reactions in many tissues of the mussel. COX is also involved in the signalling pathways leading to haemocyte bactericidal activity (Canesi et al. 2002b). On the other hand, endocrine disruption in bivalves has been observed after exposure to individual estrogenic compounds and urban effluents (Quinn et al. 2004; Ortiz-Zarragoitia et al. 2006). Among all reproductive biomarkers used in ecotoxicological studies, the egg-yolk protein vitellogenin (VTG) production seems to be relatively sensitive to estrogen exposure (Gagné et al. 2001b; Aarab et al. 2006; Matozzo et al. 2008). Interestingly, VTG has recently been implied in several immune processes in fishes, such as opsonisation and phagocytosis of pathogen bacteria (Li et al. 2008b). Furthermore, this protein is overproduced in males during bacterial infection and showed antibacterial and hemagglutinating properties (Shi et al. 2006). Moreover, several recent studies showed that estradiol-17 $\beta$  can modulate immune functions of haemocytes via active estrogen receptors (Canesi et al. 2004; Canesi et al. 2006; Gauthier-Clerc et al. 2006). These findings suggest possible interactions between immune and endocrine systems in aquatic organisms.

The objective of this study was to examine the effects of municipal wastewaters on the immunity and the gametogenic status (reproduction) in caged freshwater mussels. The immune system was characterized at both cellular and humoral defences: phagocytosis, NK-like cytotoxicity, cyclooxygenase activity, NO and lysozyme secretion. In parallel, gametogenic activity was studied in terms of gonad maturity, gonad size and the levels of VTG-like proteins. An attempt was made to highlight relationships between the immune and reproductive status in experimentally caged mussels exposed *in situ* to municipal effluent dispersal plumes.

### *IV.3 Material and methods*

#### ***IV.3.a Mussel exposure experiment***

Wild freshwater mussels *Elliptio complanata* were collected in June in the Richelieu River, Quebec, Canada, which is under no direct sources of pollution. The animals were then maintained for 3 months in aquariums at 15°C, with a light/dark cycle of 16h/8h. They were fed daily with concentrates of phytoplankton (Phytoplex®) and laboratory-cultured algae. The mussels were then placed in experimental cages according to a standardized methodology (ASTM 2001). Briefly, 15 mussels were placed in cylindrical nets, which were attached to a PVC frame (1 m<sup>2</sup> surface area) cover by a rough net protecting from predators. Two cages were deployed at each study site for 4 weeks. The exposure experiment took place in the Mille-Iles River, located in Montreal area (Quebec, Canada), in October 2007 when the water temperature was approximately 16-20°C. Cages were immersed and attached to 20 kg cement blocks for 30 days. Mussels were placed at 5 sites in the Mille-Iles River, which receives the treated wastewaters of 2 WWTP (Fabreville : F, and Auteuil: A) from the urbanized island of Laval (Figure 1). The exact location of the effluent plume was determined by higher surface water conductivity in respect to the incoming river water. The reference site (Ref) was located upstream from the influence of the 2 wastewaters point of release in the river. Downstream the reference site, mussel cages were placed at one site located 150 m upstream the first WWTP F and 150 m downstream the effluent plume (UpF and DoF, respectively). Two others sets of cages were placed likewise further downstream the river i.e., 150 m upstream and downstream the point source of emission of the second WWTP A (UpA and DoA, respectively). Mortality (opening of the shells) was controlled each week at each sites with the exception of the Ref site which was approachable by boat. Proper location of cages in effluent plume was later confirmed by chemical and microbiological analyses (fecal and total coliforms) of duplicated water samples, processed by Bodycote and

Environment Canada, respectively. At the end of the experiment, mortalities and condition factor (calculated as body wet weight/shell length) were evaluated, and the amount of heterotrophic bacteria in total tissue of the mussels were measured (CEAEQ, Quebec) by homogenizing pools of 2 or 3 mussels per site.

### ***IV.3.b Immunocompetence evaluation***

#### ***IV.3.b.1 Haemocyte counts and viability***

Haemolymph was withdrawn from the posterior adductor muscle using a 5mL syringe with a 23G needle, and was preserved on ice. An aliquot of 1 mL was preserved at -80°C for biochemical biomarkers (COX, NO, lysozymes). Haemocyte count and viability were evaluated by flow cytometry (Guava EasyCyte plus Cytometer), using Viacount kit (GuavaTechnologies, Hayward, CA, USA). Briefly, an aliquot of 40µL of each suspension was mixed with 160µL of Viacount solution. After an incubation of 10 min in the dark at room temperature, the amounts of viable and dead cells were measured by cytometry following the supplied operation procedure.

#### ***IV.3.b.2 Phagocytosis***

Phagocytosis was monitored using a flow cytometric methodology described elsewhere (Brousseau et al. 2000). For each organism, a volume of 200 µL of haemolymph was placed in duplicate in a 96-well microplate and mixed with yellow latex FluoSpheres (mean diameter of 2 µm, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) at a haemocyte to bead ratio of 1:30. Samples were incubated at room temperature in the dark in saturated humidity atmosphere. After 18 h, the cells were harvested, washed and resuspended in 200 µL of PBS pre-diluted in water at 50 mOsm. A total of 5000 events were acquired for each sample. The data were then analyzed using the yellow fluorescence frequency distribution histogram of haemocytes. The results were expressed as the percentage (%) of haemocytes having engulfed 3 fluorescent beads or more (Brousseau et al. 2000).

#### **IV.3.b.3 Haemocyte cytotoxic activity**

The cytotoxic activity of haemocytes against eukaryotic cells was also evaluated by cytometry, using a method adapted for freshwater mussel (Brousseau et al. 1998). Briefly, K-562 cells were grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in RPMI medium containing 10% foetal bovine serum, 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 10mM HEPES-NaOH, pH 7.4. Cells were diluted in fresh medium at each plating (twice a week) and stained with 2µM of the cell dye DIO (3,39-dioctadecyloxycarbocyanine) for 20 min to ensure proper tagging of exponentially growing cells. Cells were exposed to haemocytes in pre-diluted PBS, at a ratio of 40:1 (haemocytes to DIO-stained cells). After incubation at 15°C for 3 h without CO<sub>2</sub>, cells were stained with 20 µg/mL propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry. The K-562 cells were gated for their green fluorescence (DIO dye) and mortality as determined by PI staining. The data were expressed as percentage of cell lysis. Controls consisted of K-562 incubated in pre-diluted PBS without haemocytes.

#### **IV.3.b.4 Lysozyme activity**

Lysozyme activity was measured in plasma according to the method of (Lee et al. 2002b). Briefly, 100 µL of plasma was added to 100 µL of a suspension of 0.3 mg/mL *Micrococcus lysodeikticus* in a 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.2. Chicken egg lysozymes (Sigma) were used as standard in order to express the results in ng lysozymes /ml of plasma. The results were then standardized by the protein concentration in plasma, using the protein-dye binding method (Bradford 1976) and using bovine serum albumin (Sigma) for calibration.

#### **IV.3.b.5 Nitric oxide production**

The production of nitric oxide was estimated by measuring the levels of nitrite concentration in the plasma. Because NO readily reacts with oxygen to give nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), a nitrate reductase pre-incubate step was added to measure the total nitrite concentration in the plasma (Verdon et al. 1995). Briefly, 50 µL of haemolymph were added in a 96 wells - microplate to 25 µL nitrate reductase

80U/L (Sigma) and 25µL NADPH at 3µM (Sigma) prepared in 25mM potassium phosphate pH 7.4. After incubation at room temperature for 30 minutes, the concentration of NO<sub>2</sub> was measured by addition of 100µL of Griess reagent (Sigma) to the wells. After a 30 min incubation at room temperature, the absorbance was read at 450 nm, and nitrite standards (Sigma) were used to express the results in µmol NO<sub>2</sub>/mg proteins.

#### ***IV.3.b.6 Cyclooxygenase activity***

The activity of cyclooxygenase (COX) in haemocytes was measured by the oxidation of the 2,7-dichlorofluorescin in the presence of arachidonic acid method (Fujimoto et al. 2002). Briefly, 1mL of haemolymph was centrifuged and the pellet of haemocytes was preserved at -80°C until analysis. This pellet was then resuspended in 250 µL of PBS (50 mOsm) where 50µL of the suspension was mixed with 200µL of Tris-HCl buffer 50mM, pH 8.0, containing 0.05% of Tween 20, 50µM of arachidonic acid, 2µM of dichlorofluorescin and 0.1 µg/mL horseradish peroxidase. The plates were incubated for 0, 10, 20 and 30 minutes at 30°C and fluorescence readings were taken at 485nm for excitation and 520nm for emission (Dynatech, Fluorolite 1000). The data were expressed as ΔRFU (increase of the relative unit of fluorescence)/(min X mg proteins).

#### ***IV.3.c Gonad activity***

Gonad activity was studied using the gonado-somatic (GSI; weight of gonad/soft tissue weight) and gonad maturation indexes, and the relative levels of VTG . Sex and gonad maturation were determined by microscopic examination of gonad smears at 400X enlargement. Levels of VTG-like proteins were determined in the gonad by indirect method alkali labile phosphate (ALP) assay (Gagné et al. 1998) with some modification. Gonad tissues were homogenised at 4 °C using a polytron in 25mM HEPES buffer at pH 7.5, containing 125 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol and 1 mM EDTA. The homogenate was then centrifuged at 10,000xg for 30 min at 4 °C. The supernatant was carefully removed. High molecular weight proteins were

precipitated in 35% acetone. After incubation for 10 min on ice, the protein pellet was obtained by centrifuging at 10,000×g for 5 min at 2 °C. The resulting pellet was reconstituted in 200µL NaOH 1 M and heated at 60°C for 30 min. Levels of alkali labile phosphates were measured spectrophotometrically at 880 nm using the molybdenum reagent for phosphate determination (Stanton 1968). Potassium phosphate was used as the standard. Total ALP was normalized to the total protein content of the gonad (Bradford 1976). Data were expressed as µg of phosphate x mg<sup>-1</sup> of protein.

#### ***IV.3.d Data analysis***

The biomarker data from each site (n=12 mussels) were analyzed for homogeneity of variances using the Levene's test. The data were log-transformed in the case of significant heterogeneity of variances and subject to an analysis of variance followed by the least-square difference test for group comparisons in respect to the upstream and/or reference sites. Correlations between immune and reproductive biomarkers were calculated using the Pearson-moment correlation method. Relationships between water parameters, bacterial counts and biomarkers were calculated by Kendall tau concordance test. All statistical analyses were performed using the Statistica software (version 7, Statsoft, France).

## *IV.4 Results*

### ***IV.4.a Surface water characteristics at the caging sites***

The physicochemical and bacteriological analyses of water at each site revealed several changes between upstream and downstream sites (Table 1). In particular, conductivity, pH, DOC and coliforms counts (fecal and total) were increased at both downstream sites (DoF and DoA) compared to the respective upstream sites (UpF and UpA). The amount of suspended matter was not significantly influenced by the effluents, but was higher at reference site suggesting input of suspended matter from the upstream site as well. After the release of wastewater from WWTP F, which uses a physicochemical treatment followed by UV disinfection, total coliforms (TC) increased from 900 to 5750 CFU/100mL and fecal coliforms (FC) from 235 to 395 CFU/100mL. Wastewater from WWTP A, treated by a biofiltration process followed by UV disinfection, caused a higher contamination by TC and FC which reached 14500 and 2900 CFU/100mL respectively. A previous evaluation of these WWTP showed that micro-organisms levels are 4 to 6 times higher in final effluent from WWTP A, both because higher contaminated influent and lower disinfection efficiency (Payment 2003). In 2004 and 2005, this WWTP did not respect the provincial regulations on release of FC for 3 months each year (Brouillette 2007).

### ***IV.4.b Bacterial levels in mussels***

The concentrations of heterotrophic bacteria in mussels' tissue differed significantly between sites (Table 1). The levels were low at sites Ref., DoF and UpA ( $< 10^6$ UFC/g), but high at the sites UpF and DoA ( $> 2.5 \times 10^6$ UFC/g). Conductivity was positively correlated with temperature, DOC, total coliforms and fecal coliforms counts. There was a significant correlation between fecal and total coliforms, and between temperature and DOC. Heterotrophic bacteria in mussels were negatively correlated with suspended matter in the water column.

#### ***IV.4.c Mortalities of the transplanted mussels***

No mortality was noted in the cages during the weekly inspections at the sites for the first 3 weeks of exposure. After the week 3, however, we observed a significant increase in mortality at the downstream sites (60% with DoF and DoA), compared to the upstream sites (8% UpF and 20% UpA, cf. Table 1). We observed some mortality (37%) in mussels at the reference site which was due to the fine sediments (mud) burrowing the cages which was latter corroborated by high amounts of mud in the paleal cavity during dissections. This site was thus inadequate to be considered as a non toxic reference, and so the downstream sites DoF and DoA were compared with upstream sites UpF and UpA, respectively. Condition factor showed no difference among sites (Figure 4C), but was positively correlated with suspended matter and negatively correlated with levels of heterotrophic bacteria in mussel's tissue (Table 2).

#### ***IV.4.d Immunocompetence***

Hemocyte cell counts were significantly increased at the downstream site DoF, compared to site UpF ( $p < 0.001$ ) (Figure 2A). Hemocyte viability dropped at 65 % and was significantly lower than the upstream site UpA ( $p < 0.001$ ) (Figure 2B). The proportion of cells able to ingest more than 3 beads significantly differed between the sites (Figure 2C). Phagocytosis activity was differentially affected at the study sites starting with immunostimulation and finishing with immunosuppression. On the one hand, mussels located at the DoF site had significantly higher phagocytic activity than those located at site UpF ( $p = 0.00008$ ). On the other hand, its activity was strongly decreased in the mussels exposed to the DoA sites, compared to the site UpA ( $p = 0.0009$ ). Moreover, there was a significant and negative correlation between bacteria levels in tissues and the phagocytic activity highlighting its role in the maintenance of bacteria levels in tissues. NK-like activity was however, not significantly affected over the study sites indicating no changes on cell-mediated

immunity. This parameter was positively correlated with conductivity, temperature and DOC. However, bactericide activity was significantly increased as revealed by lysozyme activity in cell-free haemolymph at the DoF site relative to its corresponding upstream site. As with phagocytosis activity, its activity was significantly decreased at the site DoA ( $p < 0.05$ ) in respect to the UpA site (Figure 3A) supporting immunosuppressive conditions in mussels. As with NK-like activity, neither the concentration in nitric oxide in the haemolymph nor changes in COX activities changed significantly throughout the sites under (Figures 3B and 3C). However, COX activity was significantly and positively correlated with nitric oxide concentration in the haemolymph, and cellular viability but was negatively correlated with the haemocyte counts (Table 2). Phagocytosis was positively correlated with cellular viability and the NO concentrations, and marginally correlated with COX activity ( $p=0.087$ ).

#### ***IV.4.e Gonad activity***

Gonad maturity index of caged mussels differed only at site UpF, which is significantly lower than Ref. site. All sites showed lower GSI values than the reference site, but no difference was noted between downstream sites and their respective upstream control site (Figure 4A). Moreover, GSI showed a positive correlation with suspended matter. The production of VTG in the gonad of the mussels followed the upstream-downstream gradient.-(ANOVA  $p=0.02$ ; Figure 5). The rise was deemed significant at the sites UpA and DoA. VTG was positively correlated with phagocytosis and marginally so with gonad maturity ( $p=0.013$  and  $p=0.078$ , respectively) (Table 2). The correlation between ALP and phagocytosis was more strongly significant at downstream sites (DoF and DoA) (Table 2). When VTG levels were corrected against these two parameters, the residual ALP levels showed a different pattern (Figure 5). Indeed, significantly higher VTG-like proteins were found at UpF and DoF compared to Ref. but the residual VTG levels at the most downstream sites remained low highlighting the influence of immune system on VTG levels.

## *IV.5 Discussion*

### ***IV.5.a Influence of water quality characteristics on mussels' health***

Despite UV disinfection processes, fecal and total coliforms counts (FC and TC) were much higher downstream from the WWTP discharges, thus confirming the release of large amounts of microorganisms. Recent reports assessed that several WWTP along the Mille-lles river are responsible for high FC which prevent recreational activities during summer (Payment 2003; Brouillette 2007). As expected, FC and TC were significantly correlated with conductivity which suggests a municipal origin. Among the measured water quality variables, the ones that affected the biological responses the most in mussels were the suspended matter loadings in water and mussel heterotrophic bacteria counts. However, mortality rates appeared not related to these parameters. Mortality rates appeared more strongly related to conductivity and dissolved organic carbon content (DOC) in surface waters with a possible influence of gonad maturation stage. Both conductivity and DOC tended to increase from upstream to downstream sites but they were systematically increased at the downstream sites. These results suggest that cumulative effects from incoming WWTP effluents and perhaps other sources are occurring in this river system. DOC was found to account for up to 50 % of the carbon demand in feral zebra mussels indicating a dietary intake of DOC in surface waters (Roditi et al. 2000). Moreover, they also found that zebra mussels absorb some (dissolved) metals-DOM complexes, reaching increased values of 32, 9 and 4-fold for cadmium, silver and mercury respectively in the presence of high molecular weight DOC. Relatively high levels of DOM (10-20 mg/L) was shown to adsorb hydrophobic organic compounds such as benzo(a)pyrene and tetrachlorobiphenyl and even reduce its bioavailability to *Daphnia magna* (Akkanen et al. 2003). In another study, low DOM levels < 10 mg/L could increase somewhat the bioavailability of organic chemicals (Haitzer et al. 1998) but substantial variation of bioconcentration factors was obtained with DOM from

different sources i.e., having different properties and quality. In a following study, the mean bioconcentration factors (BCFs) were higher than mean BCFs in the controls for 4 hydrophobic pollutants (BaP, tetrachlorobiphenyl, pentachlorophenol and naphthalene) but the variability of the data prevented to obtain statistically significant differences between the two groups (Haitzer et al. 2001). However, highly hydrophobic compounds such as benzo(a)pyrene appears less bioavailable to *Daphnia magna* when bound to either DOM, DOM of bacterial origin and particulate organic matter suggesting that less hydrophobic compounds might be at play (Gourlay et al. 2005). Although increased conductivity or water hardness could also reduce copper toxicity in mussel glochidia (Gillis et al. 2008), a decrease in xenobiotic conjugation enzyme activity (glutathione S-transferase) was observed with increasing conductivity in *Mytilus galloprovincialis* (Bebianno et al. 2007) suggesting that high conductivity might reduce xenobiotic elimination pathways and favour accumulation. Despite the presence of total and fecal coliforms in the river water downstream the emission of municipal effluents, their levels were not significantly correlated with total heterotrophic bacteria counts in mussels. This suggests that not only external environmental variables but internal physiological responses were also at play in caged mussels.

#### ***IV.5.b Immunomodulation by water contaminants***

##### ***IV.5.b.1 Cell-mediated immunity***

The impact of effluents on the density of haemocytes is very different depending on the WWTP considered. First, the mussels located downstream from effluent F had higher haemocyte counts than the mussels located upstream. A similar increase in HC was already observed after an *in situ* exposure of blue mussels to secondary treated sewage effluents (Akaishi et al. 2007). This phenomenon can be due to a proliferation of the cells or their movement from tissues into circulation (Pipe et al. 1995), and can have a positive impact on the mussels' resistance to infection. Other conditions like high temperatures, mechanical stress or change in salinity can also increase the

number of circulating haemocytes, showing that this can be considered as a first line defence response (Malagoli et al. 2007; Monari et al. 2007). Moreover in wild oysters, HC were increased at heavily contaminated sites, and positively correlated with PAH and trace metals (Fisher et al. 2000). Certainly, differential cell counts, discriminating haemocyte subtypes, would be interesting and may explain some changes in immune functional parameters. However, unlike in marine bivalves, it was never demonstrated that freshwater bivalve have several types of immune cells. Even if we did not distinguish different cell populations by cytometry (according to size or cell complexity), this must be further investigated in order to use these animals in immune-ecotoxicological studies. Although mussels exposed to effluent A showed no change in HC, we observed a strong decrease in haemocyte viability compared to mussels located at site UpA. This drop in cellular viability is unusual in field exposure to wastewater, but has been reported in laboratory exposure to untreated wastewater (Akaishi et al. 2007). This demonstrates that municipal effluent can eventually lead to immunosuppression. This was corroborated in the present study by the negative correlation between phagocytic activity and heterotrophic bacteria levels in mussels' tissue. Phagocytic activity was stimulated in mussels exposed to effluent F, but strongly inhibited downstream of effluent A where mussels were highly infected by microorganisms. These results thus confirm the trend observed for HC and cellular viability, indicative of opposite effects of the two municipal WWTP discharges considered in this field study. It was recently shown that *in situ* exposure of blue mussels to untreated wastewater for 90 days can induce a stimulation of phagocytic activity (Akaishi et al. 2007). This can be partly explained by the high contents of microorganisms in urban wastewater which are known to induce the activation of phagocytosis mechanisms through recognition of bacterial factors by haemocytes (Canesi et al. 2002a). However a long-term exposure to compounds which stimulate phagocytosis could have a negative effect on cell viability or mussel survival because of energy consumption and an impairment of haemocyte production. This is what may have happened in mussels exposed to effluent A.

Several studies showed that certain chemical contaminants found in urban wastewater can cause a severe decrease in phagocytosis activity, like PAH (Grundy et al.; Wootton et al. 2003), metals (Sauvé et al. 2002), xenoestrogens (Canesi et al.; Gauthier-Clerc et al.; Canesi et al.).

#### ***IV.5.b.2 Humoral-mediated immune response***

In bivalves, humoral defences are composed by an arsenal of antimicrobial substances commonly used as immune biomarker in ecotoxicology (Canesi et al. 2002a; Mydlarz et al. 2006). In our study, the only humoral factor that was significantly affected was lysozyme activity. The production of lysozymes was increased by exposure to effluent F, but strongly inhibited in mussels exposed to effluent A. Since the secretion of this group of bactericidal enzymes is stimulated by bacterial factors (Chu et al. 1989; Hong et al. 2006; Li et al. 2008a), the exposure to high levels of bacterial mixture is expected to stimulate their release in haemolymph, like observed at site DoF. However, several contaminants released in wastewater are known to modulate lysozyme release in very various ways. In vitro and injection experiments showed that their secretion was stimulated by estrogenic compounds, triclosan and blood lowering pharmaceuticals probably through an interaction with eukaryotic cell membranes (Canesi et al. 2007a; Canesi et al. 2007b; Canesi et al. 2007c). However this extracellular secretion may alter humoral immunity, because it was previously demonstrated that certain PCB congeners which induce a similar spontaneous lysozyme release prevented the bactericidal activity towards *E. Coli* (Canesi et al. 2003). In a field observational study on oysters, Oliver *et al.* (2001) reported that lysozyme secretion was positively correlated with Cu and PCB contents in tissues, but negatively correlated with Cd contents. Novel molecular techniques showed that lysozyme gene transcription is downregulated by mercury and hydrocarbons in *M.edulis* (Dondero et al. 2006). Even if the impact of complex mixtures is difficult to predict because of the various processes involved, urban wastewater could thus be responsible for the decrease in lysozyme production

observed at site DoA. In our study, lysozyme activity confirms the trend observed at the cellular level, suggesting that effluent F caused a stimulation of a wide panel of immune functions in mussels. On the other hand, results in mussels exposed to wastewater from WWTP A suggest that these animals were unable to set up an appropriate immune response to an environment heavily contaminated by infectious bacteria and other micro-organisms.

Despite the lack of induction of NO, a positive correlation between NO production and phagocytosis activity is in agreement with the contention that its production was closely linked with cell-mediated immune response (Gourdon et al. 2001). The absence of significant changes in NO levels in polluted sites could be explained by confounding factors, due to its involvement in several cellular functions. Particularly, estrogens can disturb NO secretion (Stefano et al. 2003; Canesi et al. 2006), suggesting that gonad maturity and GSI could interfere with this biomarker and that wastewater evaluated in the present study were not highly estrogenic (as supported by levels of VTG-like proteins). Induction of phagocytosis and NO secretion by estrogens in *E.complanata* were already shown in our laboratory (unpublished). Moreover, NO synthesis is closely linked with inflammatory processes. For example, an increased production of IL-1 can induce both COX and NO-synthase activity, and NO like other ROS produced during an oxidative stress induce the expression of the COX (Grisham et al. 1999). COX activity was related to NO production in the haemolymph albeit no induction of this pro-inflammatory enzyme in haemocytes at polluted sites (DoF and DoA) was observed. WWTP effluents were shown to induce COX activity in mussels' tissues like gills and gonad (Gagné et al. 2005b; Gagné et al. 2007b), however our results suggests that this inflammation does not affect circulating cells. COX may have other roles than inflammation in haemocytes, particularly an indispensable role in the biochemical pathway leading to bacterial killing by haemocytes, as shown in *Mytilus edulis* (Canesi et al. 2002b), which is supported by the positive correlation between COX and phagocytosis. This involvement in immune processes, influenced by various factors, could explain that

levels in haemocytes are different than in tissue. The complex roles of COX and NO show that they intervene in inflammation, immunity and reproduction in bivalves.

Finally, results from immunocompetence biomarkers showed that the effluent from Auteuil, which uses a biological filtration treatment, appears more immunotoxic than that in Fabreville, where there is a physical-chemical treatment. However, both treatments result in similar effluent quality regarding several groups of chemicals like trace metals (data not shown). But the comparison between upstream and downstream sites, regarding trace metals or coliforms, showed bigger changes around WWTP A, suggesting the exposure concentration was probably higher in mussels downstream of A than of F. As concentrations in effluent A was higher, the immunotoxic chemicals could have a stronger impact on the functions (Galloway et al. 2001; Canesi et al. 2003; Gagnaire et al. 2004; Canesi et al. 2007c). Finally, it must be considered that WWTP A releases its effluent downstream from several sources of contamination in the urban area (including WWTP F), and that mussels at site DoA were thus exposed to higher concentrations of potentially immunotoxic pollutants. This decompensation could decrease the mussel's ability to set up appropriate defence mechanisms against micro-organisms.

#### ***IV.5.c Gonad activity and links with immunity***

In this field experiment, gonado-somatic index did not differ between polluted and control sites, but showed higher values at Ref site, suggesting a lower gonad activity in mussels exposed in the polluted part of the river. Additionally, gonad maturity of transplanted mussels was relatively heterogeneous, which influenced VTG levels as shown by the correlation between these parameters. No difference was observed in VTG production between the polluted and control sites. ALP was previously shown to be increased in freshwater mussel species by urban wastewater during laboratory and *in situ* studies (Gagné et al. 2001b; Quinn et al. 2004; Gagnon et al. 2006). Other works showed higher ALP levels in mussels exposed to individual endocrine disruptors carried by WWTP effluents, like alkylphenols, PAHs or

nonylphenols (Matozzo et al. 2005; M. Ortiz-Zarragoitia 2006). The urban effluents included in this study may not have any endocrine disrupting effects to the transplanted mussels, either because of low concentrations of estrogenic compounds (data from chemical analysis not shown) or poor condition of mussels which were unable to stock significant amounts of gonadic VTG. A preliminary experiment with dilutions of these effluents from 0% to 35% (v/v) showed no dose-dependent induction of ALP, supporting the former hypothesis (unpublished). Interestingly, we observed an increasing trend in VTG production all along the river, from sites Ref to DoA, with a significant increase between DoF and UpA. This suggests that there may be an unidentified source of estrogenic effluents between the two WWTP, which was able to induce VTG production downstream. Moreover, VTG was marginally correlated with gonad maturity ( $p=0.078$ ), and positively so with phagocytosis ( $p=0.013$ ). Multiple regression was used to calculate VTG-like protein levels that were independent from changes in gonad maturity and phagocytic activity. Results showed a different pattern at the study sites, suggesting a greater effect of phagocytosis and maturation on ALP than wastewater. Residual ALP values were higher at sites UpF and DoF, independent of GSI suggesting that VTG may play another role outside the gonad. These results support the latter hypothesis that the effluents studied had little estrogenic effect, and suggest that the statistical relationship between VTG and phagocytosis might underlie in a physiological link between immune and reproductive systems. As mentioned, this phenomenon has been described in fish, showing that this VTG has opsonic and antibacterial properties (Shi et al. 2006; Li et al. 2008b). Laboratory studies on bivalves' immune cells are underway in our laboratory to test this hypothesis. If it is confirmed, these properties should be taken into account in ecotoxicological studies, because VTG may not be considered as only specific to xenoestrogens anymore.

#### ***IV.5.d Final conclusions***

This experiment in a river strongly impacted by urban effluents showed that WWTP have a strong impact on mussels' survival and immune functions. Moreover, links between phagocytosis and vitellogenin have been observed, suggesting that the immune status must be considered in field studies related to detection of environmental estrogens and the evaluation of VTG. Further work is recommended to elucidate the role of VTG and the status of the immune system in bivalves. The consequences of an immunodeficiency could be dramatic in mussels' population exposed to high concentrations of pathogens given that long-term stimulation of the immune system can increase energy expenses in animals, and have an impact on growth and energy reserves. An *in situ* eco-epidemiological study of infectious or neoplastic diseases in wild freshwater mussels living downstream of WWTP would also be of value to determine whether local populations are at risk by the release of effluents from WWTP.

#### ***IV.6 Acknowledgements***

The technical assistances of Michel Arsenault, Claude Lessard and Sophie Trépanier (Environment Canada) for caging experiments in the field are recognized. The authors thank Marlène Fortier (INRS), Chantale André, Kimberly Bull and Mélanie Douville (Environment Canada) for assisting in immune assays, and are also grateful to the Armand Frappier Foundation for the student grant attributed to Bertrand Bouchard. This work was financially supported by Environment Canada under the St.-Lawrence Action plan and the Canadian Environmental Protection Act initiatives and CIRÉ.

## IV.7 Tables & figures

**Table 1** : Water and mussels' characteristics at the different exposure sites (means). Water samples analyses were done in duplicate, mussel samples analysis were done in triplicate.

GPS : GPS position of the cages (<sup>o</sup>Latitude, <sup>o</sup>Longitude) C : Conductivity ( $\mu$ S), T : Temperature (<sup>o</sup>C), SPM : Suspended matter 0,7 $\mu$ M (mg/L), DOC : Dissolved organic carbon (mg C/L), TC : Total Coliforms (UFC/100 mL), FC : Faecal Coliforms (UFC/100 mL), NB : Quantity of transplanted mussels, MO : Mortality rates at the end of the experiment (%), HB : Heterotrophic bacteria in mussels (UFC/g)

**Table 2** : Correlations between immune and gonad biomarkers (Pearson's product moment correlations) and with water parameters (Kendall Tau Correlations). n = 60 mussels.

COX : Cyclooxygenase activity; LYSO : Lysozyme secretion; NO : Plasmatic nitric oxide; CELL: Haemocyte counts; VIA: Cell viability; PC: Phagocytic activity; NK: Cytotoxic activity; VTG: Vitellogenin-like proteins; GSI: Gonado-somatic index; SXM: Sexual maturity; CF: Condition Factor.

**Figure 1** : Map of the study area, showing the two WWTP Fabreville and Auteuil (green stars) and the exposure sites where mussel were immersed in cages (red arrows).

**Figure 2** : Cell-mediated immunocompetence of mussels exposed 30 days at different sites in the Mille-Îles River. n = 12 mussels at each site. # : significant difference from the reference site. \* : significant difference from the upstream site.

A: Haemocyte counts. B: Cell viability. C: Phagocytic activity. D: Cytotoxic capacity.

**Figure 3** : Humoral immune factors of mussels exposed 30 days at different sites in the Mille-Îles River. n = 12 mussels at each site. # : significant difference from the reference site. \* : significant difference from the upstream site.

A: lysozyme activity. B: Nitric oxide secretion. C: Cyclooxygenase activity.

**Figure 4** : Gonad activity and condition factor of mussels exposed 30 days at different sites in the Mille-Îles River. n = 12 mussels at each site. # : significant difference from the reference site. \* : significant difference from the upstream site.

A: Gonad maturity index. B: Gonado-somatic index. C: Condition factor.

**Figure 5** : VTG-like proteins in gonads of mussels exposed 30 days at different sites in the Mille-Îles River, and residual values from multiple regression against gonad maturity and phagocytosis. n = 12 mussels at each site. # : significant difference from the reference site. \* : significant difference from the upstream site.

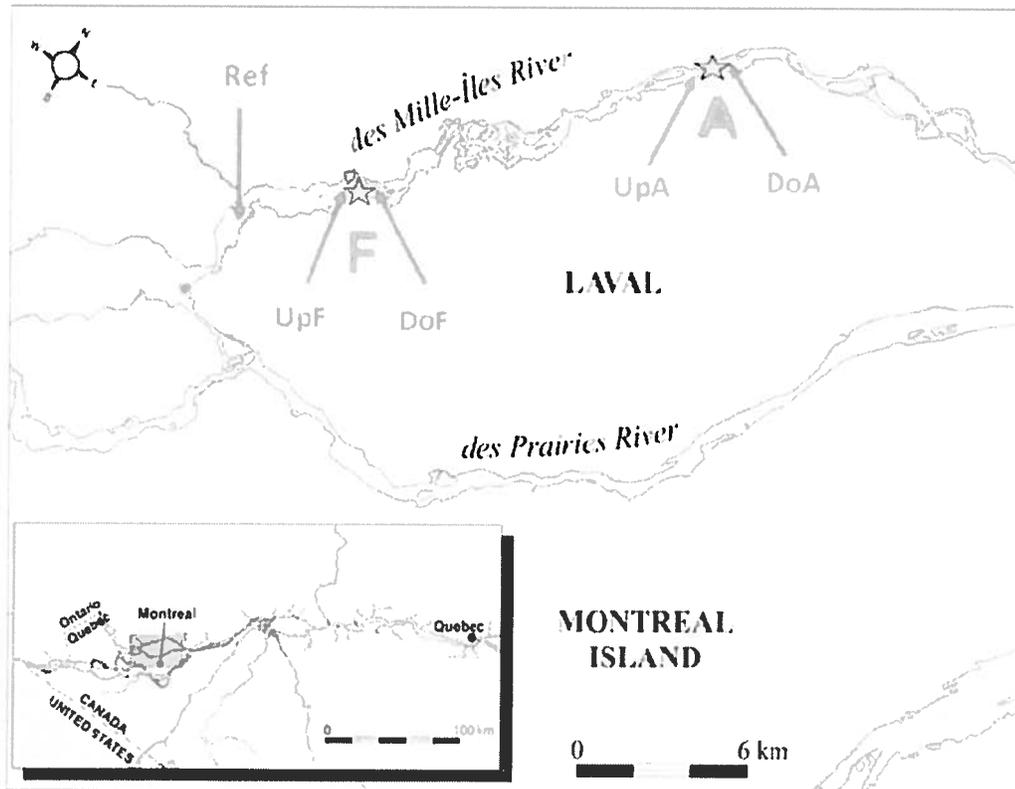
**TABLE 1**

Site	GPS	C	T	pH	SPM	COD	NB	MO	TC	FC	HB
Reference site	45.5526536,- 73.8838733	89,3	17,5	7,48	22,9	5,35	30	37	80	15,5	625000
Upstream Fabreville	45.5787642,- 73.8376867	106	17,9	6,87	5,3	5,55	24	8	900	235	3200000
Downstream Fabreville	45.5792983,- 73.8353300	219	18,5	7,32	7,2	6,71	30	60	5750	395	970000
Upstream Auteuil	45.6612636,- 73.7528517	140	18,3	6,65	11,8	5,63	30	20	190	17	570000
Downstream Auteuil	45.6627481,- 73.7503283	230	18,4	7,01	6	6,26	30	60	14500	2900	2700000

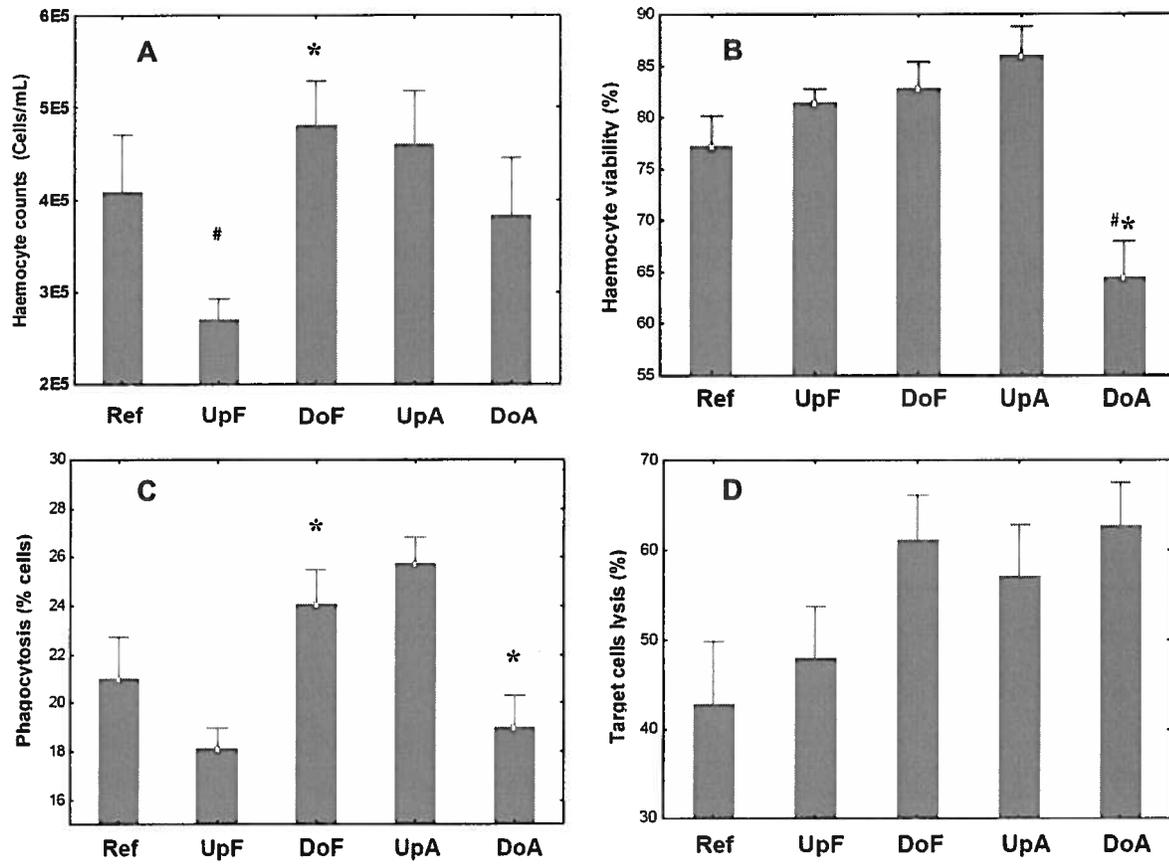
**TABLE 2**

	Pearson's product moment correlations										Kendall Tau Correlations									
	COX	LYSO	NO	CELL	VIA	PC	NK	VTG	GSI	SXM	CF	C	T	pH	SPM	COD	TC	FC	HB	
COX		0,31	0,70	0,44	0,46	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
LYSO			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
NO				0,39	0,33	0,31	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
CELL					NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
VIA						0,48	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
PC							NS	0,37	NS	NS	0,37	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
NK								NS	NS	NS	0,41	0,80	1,00	NS	NS	1,00	NS	NS	NS	
VTG									NS	NS	0,38	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
GSI										NS	NS	NS	NS	NS	0,80	NS	NS	NS	NS	
SXM											NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
CF												NS	NS	NS	0,80	NS	NS	NS	NS	

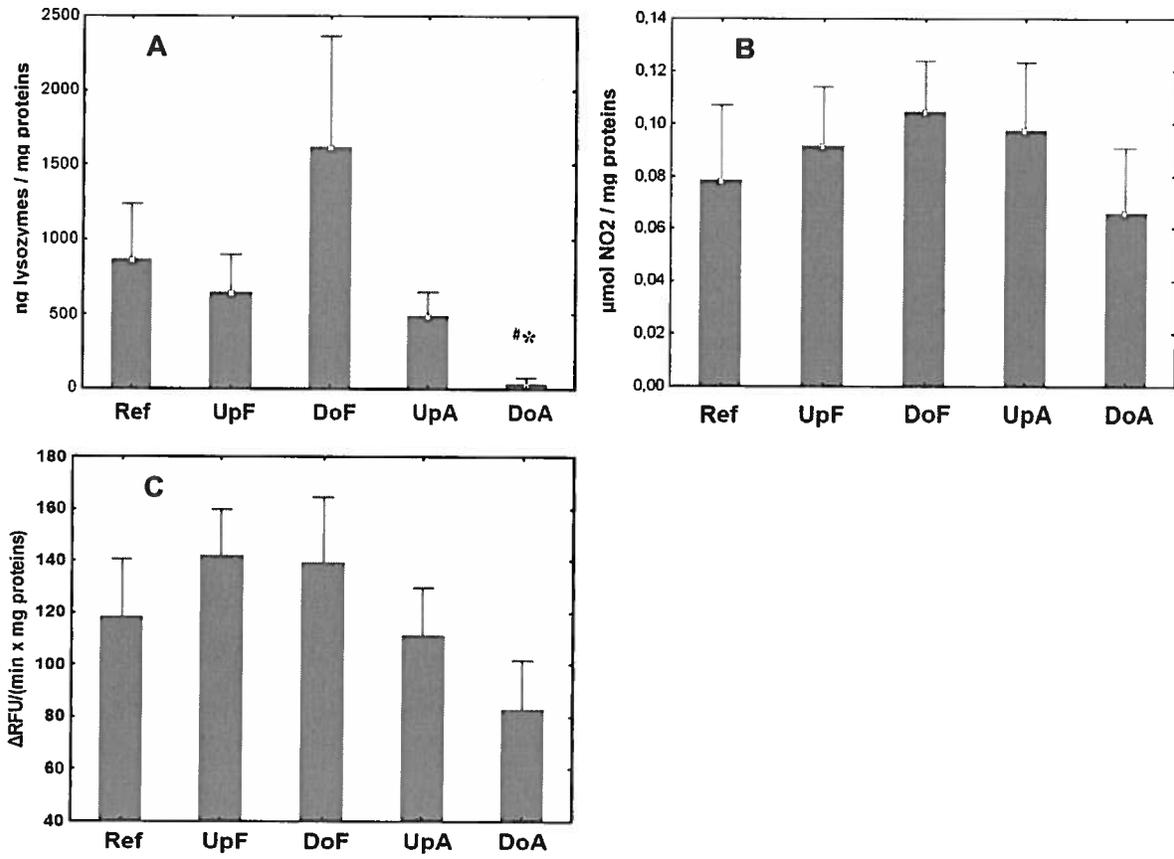
**FIGURE 1**



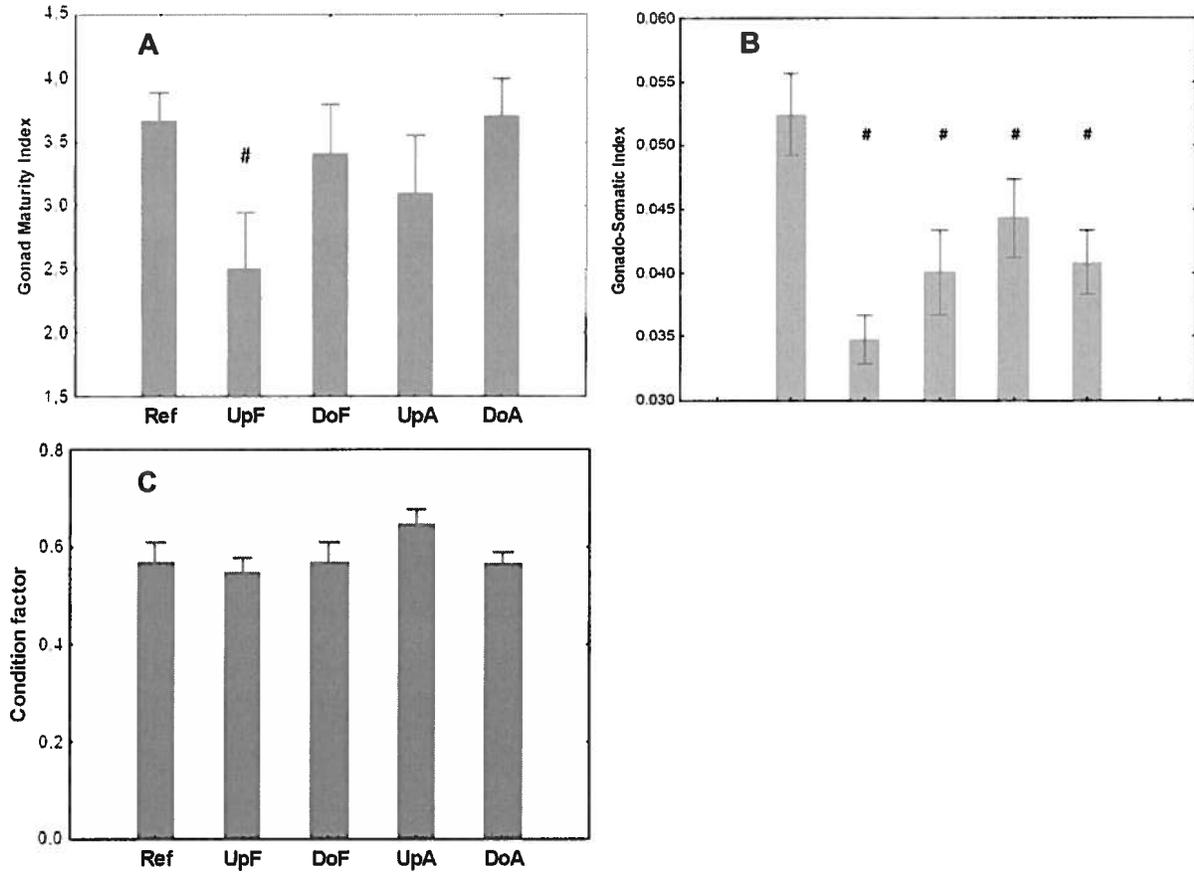
**FIGURE 2**



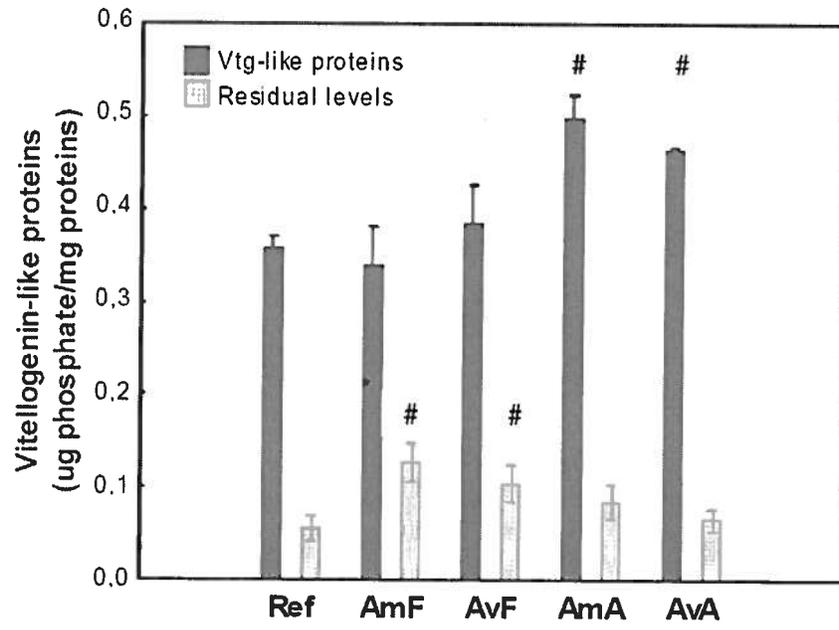
**FIGURE 3**



**FIGURE 4**



**FIGURE 5**



## IV.8 References

- Aarab N, Lemaire-Gony S, Unruh E, Hansen PD, Larsen BK, Andersen OK, Narbonne JF (2006) Preliminary study of responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether. *Aquatic Toxicology*, 78, (SUPPL.).
- Akaishi FM, St-Jean SD, Bishay F, Clarke J, Rabitto IdS, Ribeiro CA dO (2007) Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquatic Toxicology*, 82, (1), 1-14.
- Akkanen J, Kukkonen JV (2003) Measuring the bioavailability of two hydrophobic organic compounds in the presence of dissolved organic matter. *Environ Toxicol Chem*, 22, 518-524.
- ASTM (2001) *Standard Guide for Conducting in situ Field Bioassays with Marine, Estuarine and Freshwater Bivalves*, West Conshohocken, PA.
- Bebiano MJ, Lopes B, Guerra L, Hoarau P, Ferreira AM (2007) Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: effect of abiotic factors. *Environ Int*, 33, 550-558.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, (1-2), 248.
- Brouillette D (2007) Qualité de l'eau de la rivière des Mille Îles 2000-2005., En ligne, Adresse internet:  
[http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/eco\\_aqua/mille\\_iles/rapport\\_00-05.pdf](http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/eco_aqua/mille_iles/rapport_00-05.pdf).
- Brousseau P, Payette Y, Blakley B, Boermans H, Flipo D, Tryphomonas H, Fournier M eds. (1998) *Manual of Immunological Methods*. CRP Press, Boston, USA.
- Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Cyr D, Blakley B, Boermans H, Fournier M (2000) Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. *Toxicology Letters*, 142 145–156.
- Canesi L, Ciacci C, Betti M, Lorusso LC, Marchi B, Burattini S, Falcieri E, Gallo G (2004) Rapid effects of 17 $\beta$ -estradiol on cell signaling and function of *Mytilus* hemocytes. *General and Comparative Endocrinology*, 136, (1), 58.
- Canesi L, Ciacci C, Betti M, Scarpato A, Citterio B, Pruzzo C, Gallo G (2003) Effects of PCB congeners on the immune function of *Mytilus* hemocytes: alterations of tyrosine kinase-mediated cell signaling. *Aquatic Toxicology*, 63 293-306.
- Canesi L, Ciacci C, Lorusso LC, Betti M, Gallo G, Pojana G, Marcomini A (2007a) Effects of Triclosan on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and digestive gland enzyme activities: Possible modes of action on non target organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145, (3), 464-472.

- Canesi L, Ciacci C, Lorusso LC, Betti M, Guarnieri T, Tavolari S, Gallo G (2006) Immunomodulation by 17 $\beta$ -estradiol in bivalve hemocytes. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 291, (3), R664.
- Canesi L, Gallo G, Gavioli M, Pruzzo C (2002a) Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique*, 57, (6), 469-476.
- Canesi L, Lorusso LC, Ciacci C, Betti M, Regoli F, Poiana G, Gallo G, Marcomini A (2007b) Effects of blood lipid lowering pharmaceuticals (bezafibrate and gemfibrozil) on immune and digestive gland functions of the bivalve mollusc, *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 69, (6), 994-1002.
- Canesi L, Lorusso LC, Ciacci C, Betti M, Rocchi M, Pojana G, Marcomini A (2007c) Immunomodulation of *Mytilus* hemocytes by individual estrogenic chemicals and environmentally relevant mixtures of estrogens: In vitro and in vivo studies. *Aquatic Toxicology*, 81, (1), 36.
- Canesi L, Scarpato A, Betti M, Ciacci C, Pruzzo C, Gallo G (2002b) Bacterial killing by *mytilus* hemocyte monolayers as a model for investigating the signaling pathways involved in mussel immune defence. *Marine Environmental Research*, 54, (3-5), 547.
- Carballal MJ, Lopez C, Azevedo C, Villalba A (1997) Enzymes Involved in Defense Functions of Hemocytes of Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY*, 70, 96-105.
- Chu FE, Peyre JFL (1989) Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein in American oysters (*Crassostrea virginica*). *J Invertebr Pathol*, 54, 224-232.
- Dondero F, Piacentini L, Marsano F, Rebelo M, Vergani L, Venier P, Viarengo A (2006) Gene transcription profiling in pollutant exposed mussels (*Mytilus* spp.) using a new low-density oligonucleotide microarray. *Gene*, 376, (1), 24-36.
- Fang FC (1997) Mechanisms of Nitric Oxide-related Antimicrobial Activity. *J. Clin. Invest.*, 99, (12), 2818-2825.
- Fisher WS, Oliver LM, Winstead JT, Long ER (2000) A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquatic Toxicology*, 51, (1), 115-138.
- Fournier M, Cyr D, Blakley B, Boermans H, Brousseau P (2000) Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *American Zoologist*, 40, (3), 412.
- Fujimoto Y, Sakuma S, Inoue T, Uno E, Fujita T (2002) The endocrine disruptor nonylphenol preferentially blocks cyclooxygenase-1. *Life Sciences*, 70, (19), 2209.
- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Renault T (2004) In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 16, (4), 501-512.
- Gagné F, Bérubé E, Fournier M, Blaise C (2005) Inflammatory properties of municipal effluents to *Elliptio complanata* mussels - lack of effects from anti-inflammatory drugs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 141, 332-337.

- Gagné F, Blaise C (1998) Estrogenic properties of municipal and industrial wastewaters evaluated with a rapid and sensitive chemoluminescent in situ hybridization assay (CISH) in rainbow trout hepatocytes. *Aquatic Toxicol.*, 44, 83-91.
- Gagné F, Blaise C, Andre C, Gagnon C, Salazar M (2007) Neuroendocrine disruption and health effects in *Elliptio complanata* mussels exposed to aeration lagoons for wastewater treatment. *Chemosphere*, 68, (4), 731-743.
- Gagné F, Blaise C, Salazar M, Salazar S, Hansen PD (2001) Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 128, (3), 213.
- Gagnon C, Gagne F, Turcotte P, Saulnier I, Blaise C, Salazar MH, Salazar SM (2006) Exposure of caged mussels to metals in a primary-treated municipal wastewater plume. *Chemosphere*, 62, (6), 998.
- Galloway TS, Depledge MH (2001) Immunotoxicity in Invertebrates: Measurement and Ecotoxicological Relevance. *Ecotoxicology*, 10, (1), 5.
- Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Fournier M, Amiard JC (2006) Immunological and biochemical responses in *Mya arenaria* (Mollusca Bivalvia) exposed in vivo to estradiol-17[ $\beta$ ]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 144, (3), 228.
- Gillis PL, Mitchell RJ, Schwalb AN, McNichols KA, Mackie GL, Wood CM, Ackerman JD (2008) Sensitivity of the glochidia (larvae) of freshwater mussels to copper: assessing the effect of water hardness and dissolved organic carbon on the sensitivity of endangered species. *Aquat Toxicol*, 88, 137-145.
- Gourdon I, Guerin M-C, Torreilles J, Roch P (2001) Nitric Oxide Generation by Hemocytes of the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*, 5, (1), 1-6.
- Gourlay C, J.M.Mouchel, M.H.Tusseau-Vuillemin, J.Garric (2005) Influence of algal and bacterial particulate organic matter on benzo[a]pyrene bioaccumulation in *Daphnia magna*. *Sci Total Environ*, 346, 20-30.
- Grisham MB, Jourd'heuil D, Wink DA (1999) Nitric Oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am. J. Physiol.* , 276, G315-G321.
- Grundy MM, Ratcliffe NA, Moore MN (1996) Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, 42, (1-4), 187-190.
- Haitzer M, Akkanen J, Steinberg C, Kukkonen JV (2001) No enhancement in bioconcentration of organic contaminants by low levels of DOM. *Chemosphere*, 44, 165-171.
- Haitzer M, Höss S, Traunspurger W, Steinberg C (1998) Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms--a review. *Chemosphere* 37, 1335-1362.

- Hong X-T, Xiang L-X, Shao J-Z (2006) The immunostimulating effect of bacterial genomic DNA on the innate immune responses of bivalve mussel, *Hyriopsis cumingii* Lea. *Fish & Shellfish Immunology*, 21 357-364.
- Hubert F, Cooper EL, Roch P (1997) Structure and differential target sensitivity of the stimutable cytotoxic complex from hemolymph of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1361, (1), 29.
- Lee YC, Yang D (2002) Determination of lysozyme activities in a microplate format. *Analytical Biochemistry*, 310 223-224.
- Li H, Parisi M-G, Toubiana M, Cammarata M, Roch P (2008a) Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. *Fish & Shellfish Immunology*, 25, (1-2), 143-152.
- Li Z, Zhang S, Liu Q (2008b) Vitellogenin Functions as a Multivalent Pattern Recognition Receptor with an Opsonic Activity. *PLoS ONE*, 3, (4), e1940.
- Lydeard C, Cowie RH, Ponder WF, Bogan AE, Bouchet P, Clark SA, Cummings KS, Frest TJ, Gargominy O, Herbert DG, Hershler R, Perez KE, Roth B, Seddon M, Strong EE, Thompson FG (2004) The Global Decline of Nonmarine Mollusks. *BioScience*, 54, 321.
- M. Ortiz-Zarragoitia MPC (2006) Biomarkers of Exposure and Reproduction-Related Effects in Mussels Exposed to Endocrine Disruptors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 50, 361-369.
- Malagoli D, Casarini L, Sacchi S, Ottaviani E (2007) Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23, (1), 171-177.
- Malagoli D, Ottaviani E (2005) Cytotoxicity as a marker of mussel health status. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85, 359-362.
- Marin MG, Matozzo V (2004) Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Marine Pollution Bulletin*, 48, (9-10), 835-839.
- Matozzo V, Gagne F, Marin MG, Ricciardi F, Blaise C (2008) Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environment International*, 34 (4), 531-545.
- Matozzo V, Marin MG (2005) Can 4-nonylphenol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*? *Environmental Research*, 97 43-49.
- Monari M, Matozzo V, Foschi J, Cattani O, Serrazanetti GP, Marin MG (2007) Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22, (1-2), 98.
- Mydlarz LD, Jones LE, Harvell CD (2006) Innate Immunity, Environmental Drivers, and Disease Ecology of Marine and Freshwater Invertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, (1), 251-288.
- OCDE (2004) OECD Key environmental indicators. OECD Environment Directorate. Paris, France. 38 p.

- Oliver LM, Fisher WS, Winstead JT, Hemmer BL, Long ER (2001) Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. *Aquatic Toxicology*, 55, (3-4), 203-222.
- Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP (2006) Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disruptors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, (3), 361-369.
- Payment P (2003) Enlèvement des microorganismes pathogènes et des bactéries indicatrices par les stations de traitement des eaux usées municipales situées sur la rivière des Mille Îles. INRS - Institut Armand Frappier. Laval (QC), Canada. 122 p.
- Pipe RK (1990) Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochemical Journal*, 22, 595-603.
- Pipe RK, Coles JA (1995) Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology*, 5, (8), 581.
- Porte C, Janer G, Lorusso LC, Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP, Fossi MC, Canesi L (2006) Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 143 303-315.
- Quinn B, Gagné F, Costello M, McKenzie C, Wilson J, Mothersill C (2004) The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology*, 66 279-292.
- Roch P (1999) Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 172, (1-2), 125-145.
- Roditi HA, Fisher NS, Sañudo-Wilhelmy SA (2000) Uptake of dissolved organic carbon and trace elements by zebra mussels. *Nature* 407, 78-80.
- Sauvé S, Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Senécal L, Goudreau P, Fournier M (2002) Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology*, 58, (3-4), 189-200.
- Shi X, Zhang S, Pang Q (2006) Vitellogenin is a novel player in defense reactions. *Fish and Shellfish Immunology*, 20, (5), 769.
- Smith KL, Galloway TS, Depledge MH (2000) Neuro-endocrine biomarkers of pollution-induced stress in marine invertebrates. *Science of the Total Environment*, 262, (1-2), 185.
- Sonnenschein C, Soto AM (1998) An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 65, (1-6), 143-150.
- Stanton MG (1968) Colorimetric determination of inorganic phosphate in the presence of biological material and adenosine triphosphate. *Analytical Biochemistry*, 22, (1), 27.
- Stefano GB, Cadet P, Mantione K, Cho JJ, Jones D, Zhu W (2003) Estrogen Signaling at the Cell Surface Coupled to Nitric Oxide Release in *Mytilus edulis* Nervous System. *Endocrinology*, 144, (4), 1234-1240.
- Tafalla C, Gomez-Leon J, Novoa B, Figueras A (2003) Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 27 197-205.

- Verdon CP, Burton BA, Prior RL (1995) Sample Pretreatment with Nitrate Reductase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Quantitatively Reduces Nitrate While Avoiding Interference by NADP<sup>+</sup> When the Griess Reaction Is Used to Assay for Nitrite. *Analytical Biochemistry*, 224, (2), 502-508.
- Villamil L, Gomez-Leon J, Gomez-Chiarri M (2007) Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 31 968-977.
- Wootton EC, Dyrinda EA, Ratcliffe NA (2003) Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish & Shellfish Immunology*, 15, (3), 195.



## ***V. Étude des liens entre reproduction et immunité chez la moule d'eau douce***

D'après les hypothèses formulées précédemment (Cf. chapitre II.C.) la vitellogénine ainsi que les perturbateurs endocriniens pourraient influencer les fonctions immunitaires chez les crustacés et les poissons. Dans notre contexte, il convient de savoir si ces liens existent chez la moule d'eau douce afin de mieux interpréter les changements observés lors d'expositions aux rejets urbains. Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences d'exposition *in vitro* d'hémocytes à l'estradiol et à la vitellogénine isolée de gonades de moules, puis nous avons mesuré les modulations éventuelles de la capacité de phagocytose.

### ***V.1 Matériel et méthodes***

#### ***V.1.a Exposition des hémocytes***

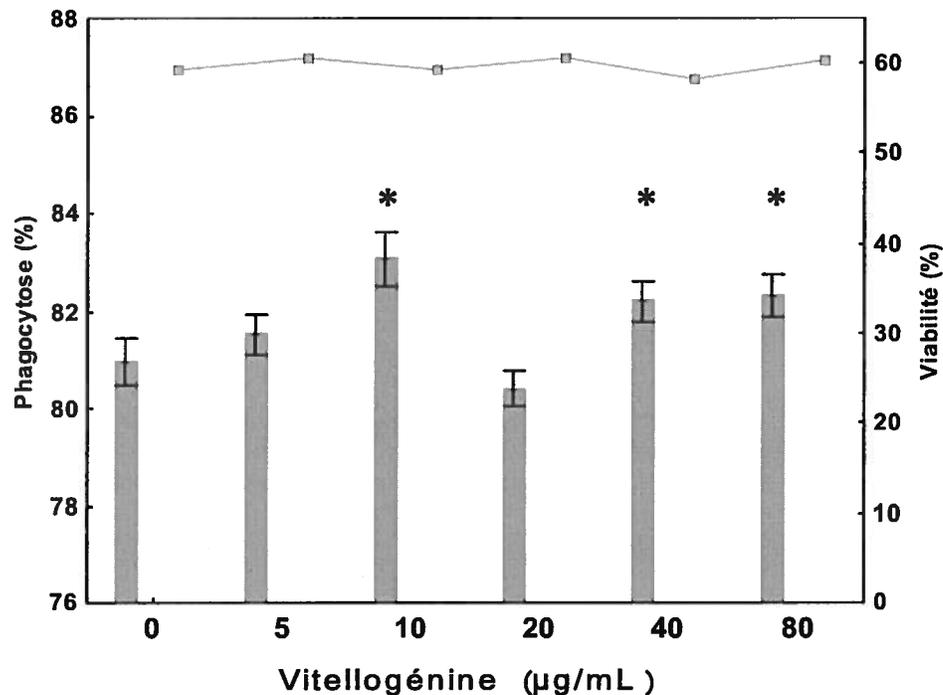
L'hémolymphe (environ 1mL) de moules *Elliptio complanata* a été ponctionnée dans le muscle adducteur postérieur. Après avoir mélangé les prélèvements, 150µL d'hémolymphe ont été déposés dans les puits d'une microplaque à 96 puits. Différentes solutions d'estradiol (E2, Sigma) ou de vitellogénine (VTG) isolée de la gonade d'une moule femelle mature sexuellement ont été préparées pour obtenir des concentrations finales de 0 à 100µM dans une solution de DMSO 0,2% pour l'E2, et de 0 à 80 µg/mL dans un tampon PBS 50 mOsm pour la VTG. 50µL de chacune des solutions ont été ajoutés aux suspensions d'hémocytes en 5 répliques. Après avoir été mélangées vigoureusement, les microplaques ont été placées à l'obscurité pendant 18h dans une étuve à 15°C.

#### ***V.1.b Mesure de l'immunocompétence***

L'activité phagocytaire et la viabilité cellulaire ont été mesurées selon les méthodes décrites précédemment (Cf. 1.III.3.b). Chacune des expériences a été répétée 2 fois avec 5 répliques.

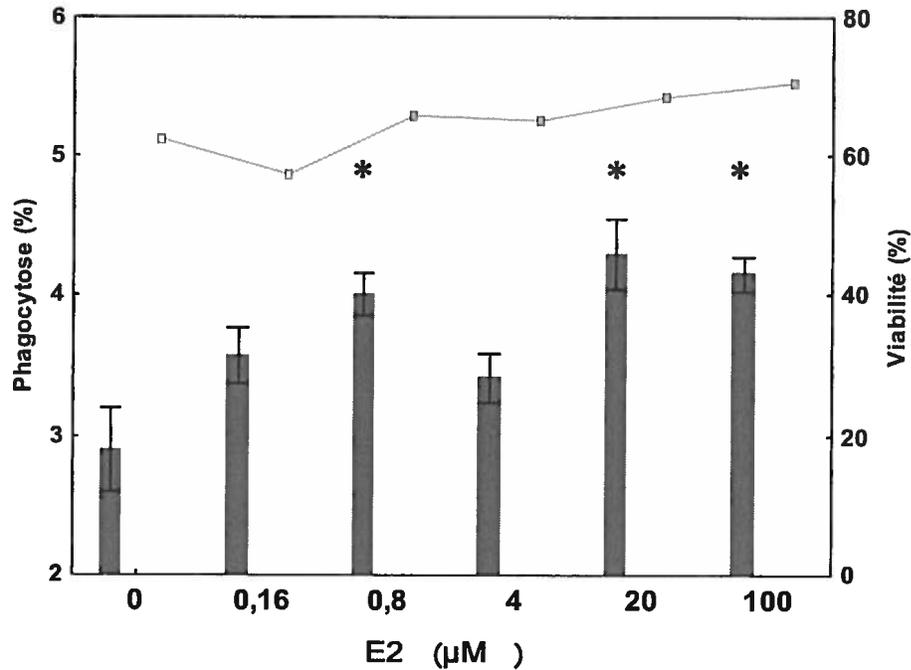
## V.2 Résultats

La viabilité cellulaire n'a pas été affectée par les différentes concentrations de VTG ou d'estradiol (ANOVA non significative). La phagocytose d'une bille et plus est augmentée en présence de vitellogénine de moule à des concentrations supérieures à 10 µg/mL (Figure 22). On note cependant que cette augmentation avec la dose n'est pas constante et qu'il y a une absence d'effet autour de 20 µg/mL. La phagocytose de 3 billes et plus n'a pas montré de différence significative entre les groupes (données non montrées).



**Figure 22 : Phagocytose de billes fluorescentes (barres) et viabilité (points carrés) des hémocytes de *E.complanata* exposés à la vitellogénine de moule femelle. Les données représentent la moyenne  $\pm$  l'erreur standard de 5 mesures. \* : différences statistiquement significative avec le groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ).**

La phagocytose de 1 bille et plus n'est pas influencée de façon significative par l'exposition à l'E2. En revanche, la phagocytose de plus de 3 billes est augmentée chez les hémocytes exposés à des concentrations supérieures à 0,8 $\mu$ M d'E2, même si la relation dose-réponse semble non linéaire (Figure 23).



**Figure 23 : Phagocytose de billes fluorescentes (barres) et viabilité (points carrés) des hémocytes de *E.complanata* exposés à l'estradiol (E2).** Les données représentent la moyenne  $\pm$  l'erreur standard de 5 mesures. \* : différences statistiquement significative avec le groupe témoin ( $p \leq 0.05$ ).

### V.3 Discussion

En présence de vitellogénine, la phagocytose de plus de 3 billes n'est pas modulée significativement. La capacité globale de phagocytose (phagocytose d'une bille et plus) est quant à elle augmentée dans les concentrations supérieures à 40  $\mu$ g/mL. Cependant, les effets mesurés étaient de faible intensité et représentent une augmentation de 3% de l'activité du groupe témoin. Par comparaison, les expériences effectuées sur des macrophages de poisson exposés à des concentrations de VTG

supérieures (100 µg/mL,) ont montré une stimulation de la phagocytose entre 16 et 53% (Li et al. 2008b). Ces mêmes travaux ont montré que la VTG augmente la phagocytose de bactéries par les macrophages, mais permet aussi l'opsonisation de ces agents pathogènes en se liant sur leurs protéines de surface (entre autres, lipopolysaccharide et  $\beta$ -1,3-glucane) (Li et al. 2008b). Dans nos expériences *in vitro* cependant, les billes de latex fluorescentes utilisées comme substrat ne possèdent pas les facteurs de reconnaissance bactériens connus pour stimuler la phagocytose, comme les lectines (Pipe 1990; Mydlarz et al. 2006). En plus de l'utilisation de concentrations de VTG trop faibles, l'absence de ces facteurs pourraient expliquer la faible intensité de la réponse observée dans nos expériences, car la VTG semble intervenir comme intermédiaire entre le phagocyte et l'élément étranger (Li et al. 2008b). D'autres expériences utilisant des mesures de phagocytose basées sur des agents microbiens reconnus par les hémocytes sont nécessaires pour déterminer avec précision si la VTG peut stimuler la phagocytose selon ces mêmes mécanismes. Notamment, l'utilisation de bactéries (*E.coli* ou *Vibrio*) marquées par une sonde fluorescente de type FITC pourrait permettre d'évaluer la capacité de phagocytose par microscopie. Il serait également intéressant d'utiliser les techniques de mesure par cytométrie de flux, qui permettent d'analyser un très grand nombre de cellules, mais cela nécessiterait une mise au point des protocoles. Des tests de phagocytose de bactéries *E.coli* fluorescentes mesurée par cytométrie en flux sont en cours actuellement dans notre laboratoire. La faible intensité de la réponse observée pourrait aussi être expliquée par un manque de pureté de la VTG utilisée. Des techniques de chromatographie, ou de membranes échangeuses d'ion pourraient améliorer la purification de la protéine, et permettre une meilleure réponse de l'activité de phagocytose. Plusieurs expériences devraient donc venir confirmer l'hypothèse d'un rôle de la VTG dans l'immunité chez les bivalves, car cela pourrait compromettre son utilisation comme biomarqueur spécifique des expositions aux xénoestrogènes. Par ailleurs, cela apporterait plus d'information sur les taux basaux de VTG mesurés dans le sang des mâles (Matozzo et al. 2005; Aarab et al. 2006)

comme cela a été effectué chez les poissons (Won et al. 2005), et amener de nouvelles hypothèses concernant les liens entre la maturation des gonades et la susceptibilité aux infections chez les femelles. Pour évaluer cette hypothèse *in vivo*, une protéine de VTG purifiée pourrait être injectée chez la moule, suivi d'un test de « challenge bactérien » déjà mis au point chez *Mytilus edulis* (Akaishi et al. 2007).

La deuxième expérimentation avait pour but d'évaluer l'influence de l'estradiol sur l'activité phagocytaire des hémocytes de moule. Les résultats obtenus montrent que l'activité non spécifique de phagocytose (une bille et plus) n'est pas modifiée par les différentes concentrations d'E2 utilisées. En revanche, l'efficacité phagocytaire (plus de 3 billes) est augmentée de 30 à 50% par rapport au témoin négatif chez les hémocytes exposés à des concentration supérieures à 20  $\mu\text{M}$ . Ces résultats sont concordants avec ceux d'autres expériences *in vitro* chez *M.edulis*, qui ont permis de démontrer que l'activité phagocytaire des hémocytes est modulée par l'E2 et divers xenoestrogènes, comme le bisphénol A ou le nonylphenol (Canesi et al. 2006; Canesi et al. 2007c). En mesurant par microscopie la phagocytose de zymosan colorés au rouge neutre, les auteurs ont montré que les composés estrogéniques stimulent fortement la phagocytose à des concentrations assez faibles (augmentation d'environ 20% à des concentrations de 1 à 5  $\mu\text{M}$ ). La mesure en parallèle de la stabilité des membranes des lysosomes a permis de montrer que ces effets stimulateurs ont lieu lorsque la déstabilisation des membrane est modérée et permet d'activer les phénomènes de fusion des membranes. Par contre, à des concentrations plus importantes d'estrogènes (à partir de 25 ou 100  $\mu\text{M}$ ), les expériences ont montré que les membranes lyzosomales sont trop déstabilisées pour permettre les phénomènes d'internalisation nécessaires à la phagocytose. Les différences dans l'intensité de la stimulation peut s'expliquer par le temps d'incubation plus court (60 min.) qui permet d'observer des phénomènes plus rapides, comme l'augmentation du calcium intracellulaire et la phosphorylation des enzymes impliquées dans la voie des STATS (Signal Transducers and Activators of Transcription) et des MAPK (Mitogen activated protein kinases) (Canesi et al., 2006). En revanche, les effets à plus long terme

peuvent être plus complexes et faire intervenir des actions au niveau membranaire et intracellulaires impliquant ou non les récepteurs à estrogènes. Il convient donc, afin de mieux distinguer les différences de sensibilité inter-spécifiques, de répéter les expériences dans des conditions standards et avec des techniques de laboratoire identiques. Notamment l'utilisation de marqueurs de la stabilité de la membrane lysosomale, comme la rétention du rouge neutre, permettent d'interpréter l'action des estrogènes sur le système vacuolaire lysosomal. Malgré l'activation à faible doses d'estrogènes *in vitro*, plusieurs expériences *in vivo* ont montré un effet inhibiteur des estrogènes sur l'activité de phagocytose chez les bivalves. L'injection de 10 à 20 nmoles d'E2 provoque chez *M. edulis* une baisse de 30% de la phagocytose mesurée par cytométrie après 48h (Gauthier-Clerc *et al.*, 2006). Une expérience similaire utilisant des doses d'E2 plus faibles a montré que la phagocytose, mesurée par microscopie, peut être inhibée 6h après l'injection, dès 100 pmoles d'E2 (Canesi *et al.*, 2006). Lorsque l'E2 est dilué dans l'eau de l'aquarium on observe une inhibition de la phagocytose (de l'ordre de 80%), mesurée par fluorescence en microplaque, à des concentrations supérieures à 200 ng/L après 30j (Champeau & Narbonne, 2006). Les effets inhibiteurs des estrogènes mesurés *in vivo* contrastent avec les effets observés *in vitro*, qui montraient une activation des mécanismes de fusion des membranes. Ces différences peuvent être dues à la diversité des actions physiologiques des estrogènes chez les bivalves, notamment leur rôle dans la sécrétion de modulateurs endogènes du système immunitaire (NO, prostaglandines, etc.) (Stefano *et al.* 2003). De plus dans la gonade et la glande digestive, l'estradiol module l'activité des enzymes de métabolisation qui estérifient les estrogènes et diminuent ainsi leurs concentrations sous forme libre dans l'hémolymphe (Janer *et al.* 2005). Chez les mammifères, les estrogènes présentent également une action globalement inhibitrice *in vivo*, avec diminution des fonctions de macrophages (Mantione 2008). Cependant, cette action dépend fortement de la dose d'estrogènes, et peut donc différer entre les individus femelles et males. Chez ces derniers en effet, de faibles doses

d'estrogènes pourraient stimuler la réponse immunitaire, et donc avoir un intérêt en clinique (Bird et al. sous presse).

Finalement, ces résultats suggèrent que les activités de défense des bivalves contre les agents infectieux dépendent, au moins en partie, du profil endocrinien et donc du statut reproducteur et du sexe de l'animal. Pour déterminer si les xenoestrogènes peuvent compromettre la résistance aux infections bactériennes, il serait intéressant de mettre en place des expériences d'injection de bactéries pathogènes et de lier la diminution des fonctions immunitaires au taux de morbidité/mortalité. Notamment, une telle susceptibilité aux infections a déjà été suggéré grâce à des expériences d'exposition aux effluents urbains chez *M.edulis*, et au Bisphénol A chez la souris (Sugita-Konishi et al. 2003).

Les résultats concernant la VTG et les stéroïdes sexuels montrent que les hémocytes sont sensibles à des substances endogènes impliquées dans la reproduction. Les variations annuelles de l'immunocompétence observées chez les bivalves pourraient donc être en partie expliquées par les cycles hormonaux, eux-mêmes dépendants fortement de facteurs physiques comme la température.

Ces résultats suggèrent également que les perturbations endocriniennes et immunitaires dues aux contaminants chimiques peuvent être reliées par plusieurs mécanismes. Ainsi, des animaux vivant en aval d'une source de contamination par des perturbateurs endocriniens pourraient subir des effets immunomodulateurs en plus de la perturbation de leur reproduction. Il convient de répéter ces travaux afin de confirmer les résultats avec d'autres espèces, et d'investiguer les mécanismes cellulaires impliqués. Aussi, les études écotoxicologiques futures devraient prendre en compte ces relations entre immunité et reproduction afin d'analyser plus finement le risque que représente les différentes sources de pollution aquatique. Il est donc nécessaire d'étudier ces interactions par des expériences au laboratoire (en aquarium), et sur le terrain.

## VI. Bilan des expériences

### VI.1 Expositions *in vivo* au laboratoire et en rivière

Les expositions *in-vivo* aux effluents des stations de Fabreville et d'Auteuil, effectuées au laboratoire et dans la rivière des Mille-Îles, ont induits des effets toxiques différents chez les moules. Tout d'abord, il a été montré dans des conditions contrôlées au laboratoire que certains biomarqueurs sont modulés significativement par l'exposition aux effluents urbains, tels l'activité phagocytaire, la capacité cytotoxique et la sécrétion de NO. D'autres biomarqueurs, au contraire, se sont révélés insensibles aux différentes concentrations allant jusqu'à 35% d'effluent après 12 jours d'exposition, comme la viabilité hémocytaire et l'activité de la cyclo-oxygénase. Ces expériences ont permis de connaître les valeurs de base de ces biomarqueurs nouvellement étudiés chez *Elliptio complanata*, ainsi que l'influence des effluents urbains dans des conditions environnementales contrôlées. Cette étape préliminaire avait pour objectif d'interpréter les changements observés lors de l'exposition à différents sites de la rivière des Mille-Îles, sans pour autant permettre de comparer directement les résultats de ces deux expériences étant donné les paramètres environnementaux très différents. La durée d'exposition était par exemple de 30 jours dans la rivière, soit 18 jours de plus que lors de l'exposition au laboratoire. Une période d'exposition aussi longue peut induire des mécanismes de toxicité chronique, comme une baisse du métabolisme cellulaire, ainsi que des remaniements tissulaires et des réserves énergétiques (Fournier et al. 2001; Akaishi et al. 2007; Gagné et al. 2007a). Les mécanismes de biotransformations peuvent également être induits à partir de 2 semaines d'exposition (Pain et al. 2003). De plus, les paramètres physico-chimiques de l'eau de la rivière connus pour influencer l'immunité des bivalves étaient différents de ceux de l'eau utilisée dans les

bassins d'exposition, comme la température, le pH et la saturation en oxygène (Mydlarz et al. 2006). Ces paramètres, suivis tout au long de l'exposition, furent par ailleurs non constants pendant la période d'exposition sur le terrain. Enfin, les effluents utilisés pour exposer les moules 12 jours au laboratoire étaient issus d'échantillonnages composites, collectés sur une période de 24 heures au mois de février. La composition chimique de l'effluent varie cependant en fonction de la période de la journée, et selon la saison (Laurin 2006). Ainsi, les moules placées dans la rivière 8 mois en automne ont probablement été exposées à des concentrations de polluants différentes de celles du laboratoire. D'autres conditions expérimentales, comme l'absence d'alimentation et la présence de substrat sablonneux au laboratoire, étaient différentes. Toutes ces différences expérimentales peuvent jouer directement sur les valeurs des biomarqueurs immunitaires et endocriniens, empêchant ainsi de comparer directement les résultats obtenus au cours des deux expériences.

Ceci justifie l'importance de comparer les biomarqueurs des animaux exposés aux effluents urbains avec les bassins témoins (au laboratoire) ou avec les sites amont et référence (dans la rivière). L'étude de l'influence d'un paramètre environnemental (chimique, physique ou biologique) sur ces biomarqueurs nécessite de mettre en place une expérience impliquant des moules exposées aux mêmes conditions, à l'exception du paramètre en question.

## VI.2 Les autres modèles expérimentaux

Afin de savoir si les impacts observés *in vivo* chez la moule sont applicables à d'autres espèces vivant dans la rivière des Mille-Iles, il serait particulièrement intéressant de comparer nos résultats avec ceux de nouvelles expositions utilisant d'autres embranchements animaux, invertébrés et vertébrés.

Les arthropodes et les annélides oligochètes constituent, à l'instar des mollusques, de bonnes espèces sentinelles d'invertébrés, notamment par leur caractère ubiquiste et par leur importance dans les chaînes trophiques des milieux dulçaquicoles (Moisan 2006). Différentes espèces sont utilisées pour l'évaluation des altérations immunitaires induites par les xénobiotiques, comme les métaux ou les composés organiques (Galloway et al. 2001; Mydlarz et al. 2006; Ward et al. 2006). Des études portant sur les perturbations endocriniennes ont également montré leur sensibilité aux perturbateurs endocriniens, comme les pesticides et herbicides, les alkylphenols, les PCB et les métaux lourds (Oehlmann et al. 2003 ; Gual 2005). La vitellogénine semble constituer, entre autres, un des biomarqueurs endocriniens d'intérêt chez ces embranchement d'invertébrés (Rodríguez et al. 2007; Matozzo et al. 2008). Cependant ces organismes sont principalement utilisés dans les expériences d'exposition au laboratoire, impliquant notamment l'espèce *Daphnia magna*, et peu d'expériences de transplantation en milieu naturel ont été réalisées jusqu'à présent (LeBlanc 2007; Martins et al. 2007). Les seules recherches portant sur les perturbations endocriniennes chez les copépodes sont soit observationnelles ou résultent d'expositions en conditions contrôlées (Hutchinson 2002; Rodríguez et al. 2007).

Les poissons sont également des modèles largement utilisés depuis de nombreuses années en écotoxicologie, aussi bien au laboratoire qu'en rivière. Les connaissances de leur physiologie, et particulièrement de leurs systèmes

immunitaires et endocriniens, sont très avancées par rapport aux modèles invertébrés notamment grâce aux similitudes avec les systèmes mammaliens (Metscher et al. 1999). Le modèle le plus utilisé au laboratoire est le poisson zébré *Danio rerio*, sur lequel de nombreux outils ont été développés : séquençage complet du génome, extinction de gènes, clonage et mutants phénotypiques (Martins et al. 2007; Sullivan et al. 2008). Le déterminisme de la production de la vitellogénine et de nombreux autres biomarqueurs de perturbation endocrinienne sont également bien développés chez cette espèce (Segner 2009). Cependant, des espèces plus ubiquitaires comme la truite (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta*, *Salvelinus fontinalis*...) sont utilisées dans les études dans le milieu naturel aussi bien qu'au laboratoire (Bernet et al. 2001; Todd et al. 2007). Elles ont notamment permis l'évaluation de la toxicité de nombreux effluents, et notamment les eaux usées des stations d'épuration au Canada (Hébert et al. 2008; Tarrant et al. 2008). De plus, les relations entre immunité et physiologie sexuelle sont étudiées depuis plusieurs années chez les poissons (Shi et al. 2006; Filby et al. 2007; Li et al. 2008b), ce qui rendrait leur utilisation intéressante lors d'une nouvelle étude dans la rivière des Mille-Iles dans le but de comparer les résultats obtenus avec *E.complanata*. Les poissons ont néanmoins une plus faible capacité à accumuler les xénobiotiques que les bivalves (Wang et al. 2008) et la nécessité de périodes d'exposition longues ainsi que le coût de les expériences limitent parfois leur utilisation dans les études de surveillance (Zhou et al. 2008).



## Conclusion et perspectives

Dans ce mémoire, nous avons pu détailler les effets potentiels de la pollution urbaine sur certains aspects de la santé d'une espèce sentinelle. Les perturbations immunitaires et endocriniennes décrites au laboratoire et dans le milieu naturel nécessitent d'être confirmées par d'autres travaux de recherche, comme l'incidence des maladies chez *Elliptio complanata*. De plus, les mécanismes cellulaires mis en jeu doivent être élucidés par des études *in vitro*, notamment l'influence des perturbateurs endocriniens sur la fonction immunitaire des bivalves.

Cependant, les conclusions de la revue bibliographique et des expériences d'expositions suggèrent fortement que les moules d'eau douce peuvent voir leur immunité et leur reproduction altérées par les rejets de stations d'épuration. Ces animaux représentent des espèces sentinelles intéressantes pour les études écotoxicologiques en milieu dulçaquicole, car leur système est apparu sensible à l'action des contaminants chimiques et microbiologiques. De plus, les relations entre l'immunité et le système endocrinien contrôlant la reproduction semblent reposer des mécanismes déjà mis en évidence chez d'autres espèces aquatiques. Les médiateurs chimiques, comme l'oxyde nitrique, les prostaglandines ou les estrogènes y jouent un rôle majeur. De plus, plusieurs résultats suggèrent que la vitellogénine contribue à l'immunité, alors que son rôle était limité au stockage d'énergie pour l'embryon.

Afin d'assurer la continuité de cette étude et de confirmer les tendances observées, des moules indigènes de la rivière des Mille-Îles ont été prélevées lors des expériences de terrain, ce qui permettra d'étudier les mécanismes biochimiques de résistance à la pollution urbaine. Déjà, l'étude du sex ratio a montré une prédominance de femelles en aval des stations d'épuration, suggérant une

féminisation des populations locales. Notre laboratoire poursuit en ce moment des expériences similaires dans la rivière des Prairies, où sont rejetés les effluents de la station La Pinière. Par la même occasion, des moules seront mises en cages afin de répéter le protocole de la présente étude autour du troisième effluent de la ville de Laval. Aux biomarqueurs utilisés dans notre étude, il conviendrait de caractériser les atteintes tissulaires des organes vitaux par méthodes histopathologiques, ce qui permettrait de faire des associations avec les perturbations immunitaires et endocriniennes.

Vu l'importance des moules d'eau douce dans le fonctionnement des lacs et des cours d'eau, et la valeur intrinsèque de la biodiversité qu'elles représentent, il paraît clair que la pollution due aux stations d'épuration nécessite d'être contrôlée par des réglementations basées sur des études écotoxicologiques rigoureuses. La régulation de la production des polluants à la source (ex. interdiction de la commercialisation de certaines substances), ainsi que les techniques de traitement des eaux usées doivent être améliorés à court terme. De plus, il convient d'augmenter la surveillance durable des populations d'invertébrés présents dans les milieux aquatiques afin de détecter les effets précoces des polluants sur les populations locales.

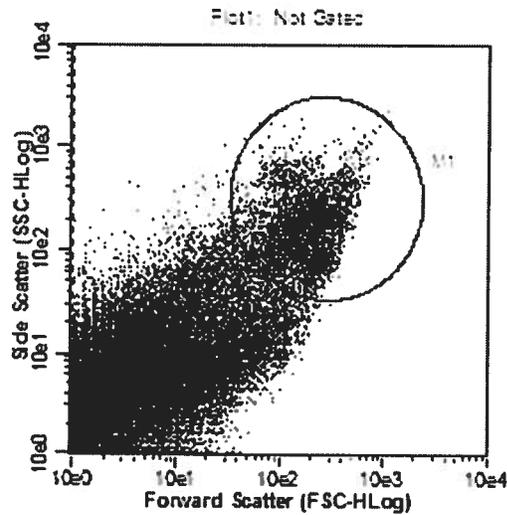
Les résultats de nos études illustrent bien le fait que les pollutions engendrées par les activités humaines ont des conséquences néfastes à court terme sur les animaux vivants dans notre environnement immédiat. Or ces dernières années, de nombreux travaux conduits sur l'immunité et la reproduction des bivalves ont démontré que ces invertébrés possèdent de nombreux modulateurs existants chez les mammifères, comme certains composés estrogéniques, catécholamines, cytokines ou prostaglandines. C'est pourquoi il faut considérer que les populations humaines sont à risques de perturbations immunitaires et endocriniennes. Certes, les doses d'exposition aux contaminants présents dans l'eau sont souvent très inférieures à celles des animaux aquatiques, les voies d'exposition sont très différentes, et les

voies de biotransformations plus importantes. Néanmoins, les risques écotoxicologiques ne doivent jamais être sortis du contexte de la santé publique. En effet, l'Homme se trouve au sommet des chaînes alimentaires et accumule donc tout au long de sa vie de grandes charges de contaminants. Ainsi les maladies particulièrement liées aux facteurs environnementaux, comme certains cancers, problèmes reproducteurs ou maladies auto-immunes doivent faire l'objet d'une surveillance épidémiologique rigoureuse. Ces données doivent être considérées comme des indicateurs potentiels des problèmes de santé environnementale, et aider à la mise en place de mesures efficaces.

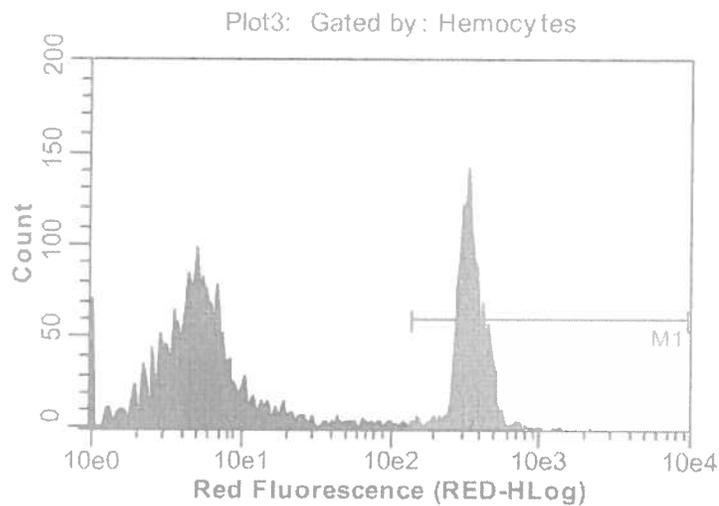


## Appendices

### Appendice A : Graphiques de comptes cellulaires et viabilité

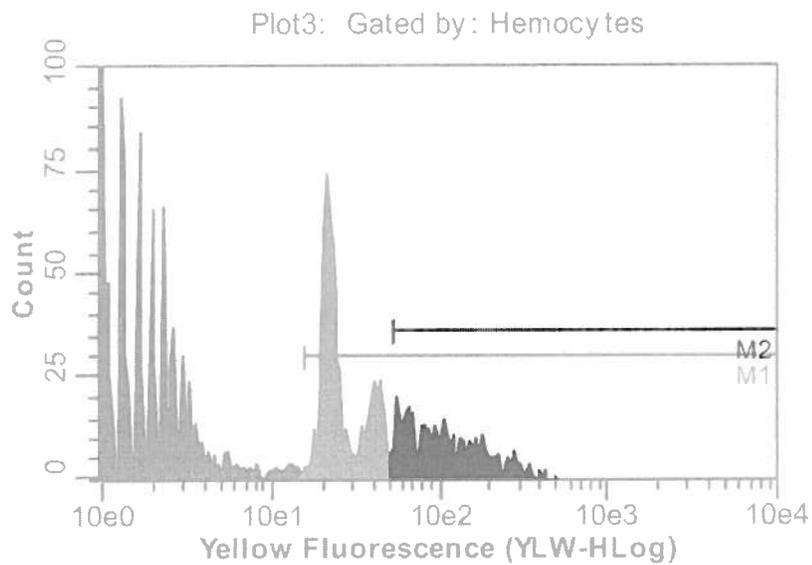


Graphique de distribution des cellules, montrant la taille des cellules (FSC) en fonction de leur complexité (SSC). Les hémocytes sont encerclés.



Histogramme de viabilité cellulaire, montrant les cellules mortes marquées au iodure de propidium fluorescentes rouges (marqueur M1)

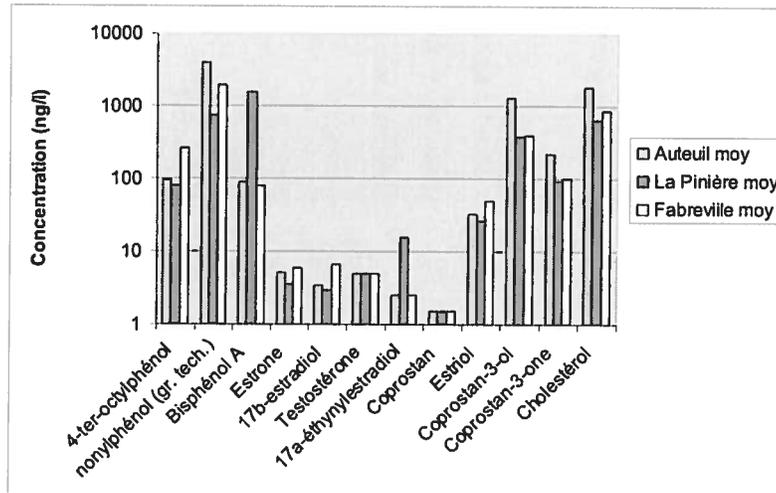
**Appendice B : Graphique de mesure de l'activité de phagocytose**



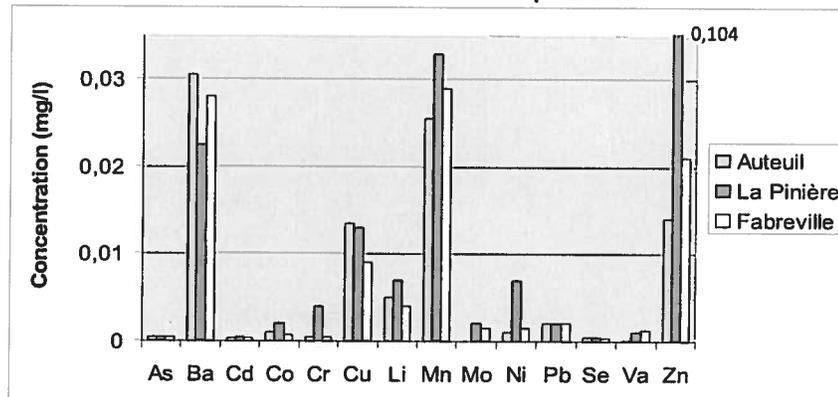
**Histogramme de phagocytose, montrant les cellules ayant phagocyté 1 bille et plus (marqueur M1 en bas) et 3 billes et plus (marqueur M2 en haut)**

## Appendice C : Analyses chimiques des effluents de Laval, QC

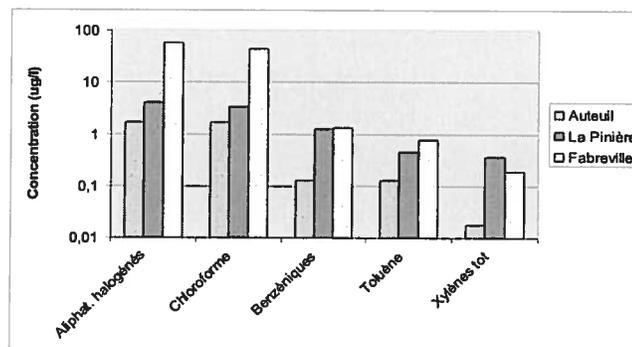
### Alkylphénols et hormones stéroïdiennes



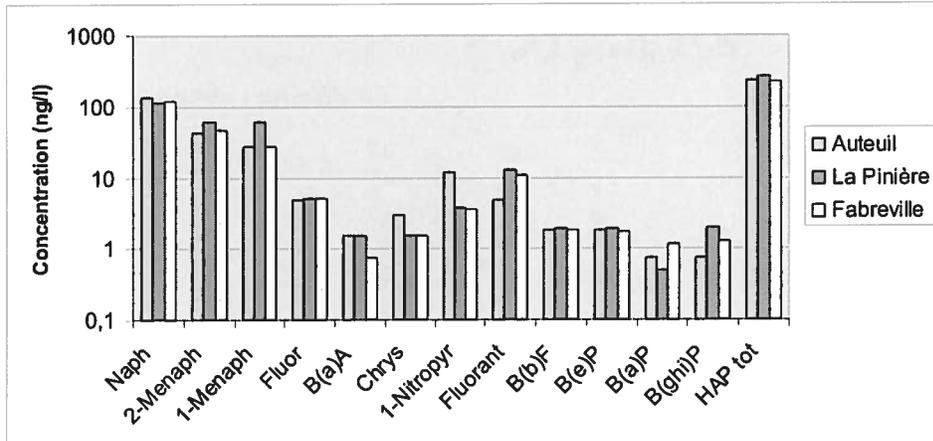
### Éléments traces métalliques



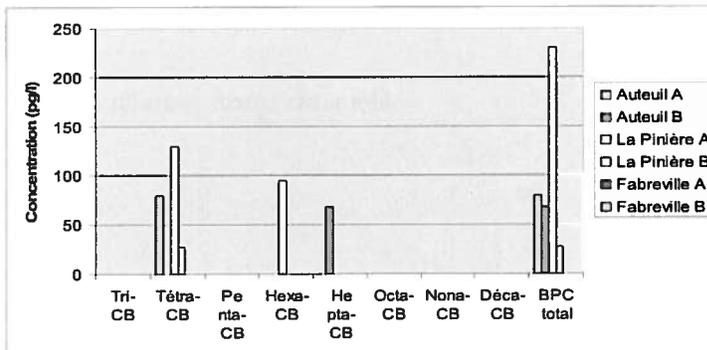
### Composés organiques volatils



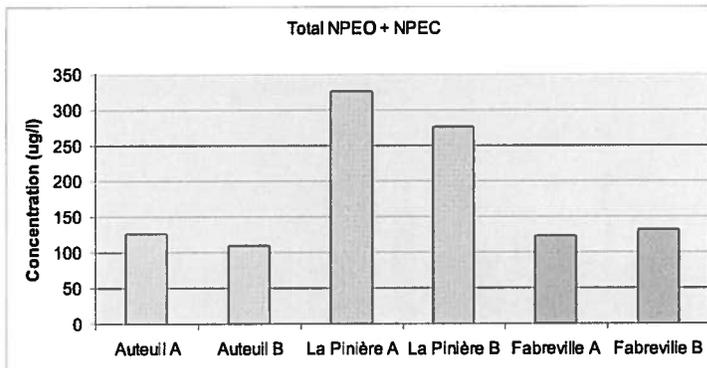
### Hydrocarbures aromatiques polycycliques



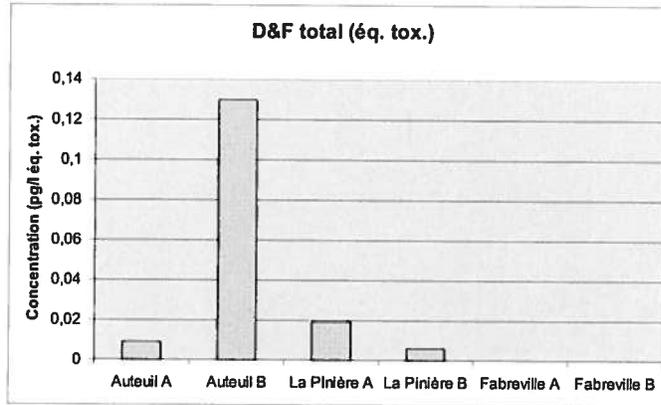
### Polychlorobiphényles



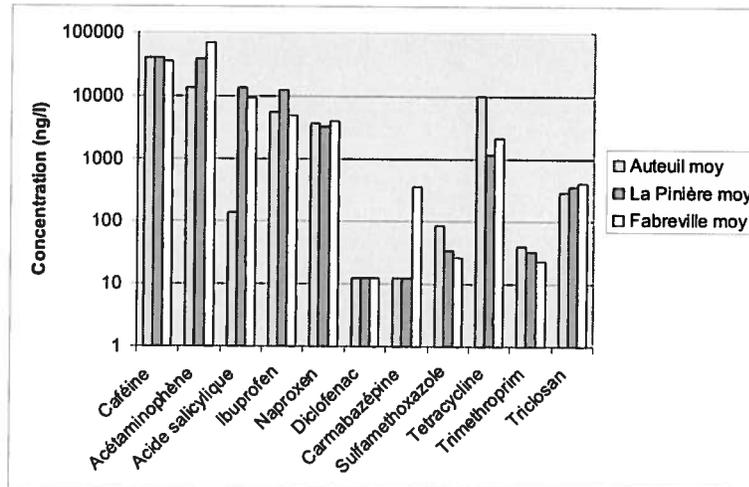
### Nonylphenols



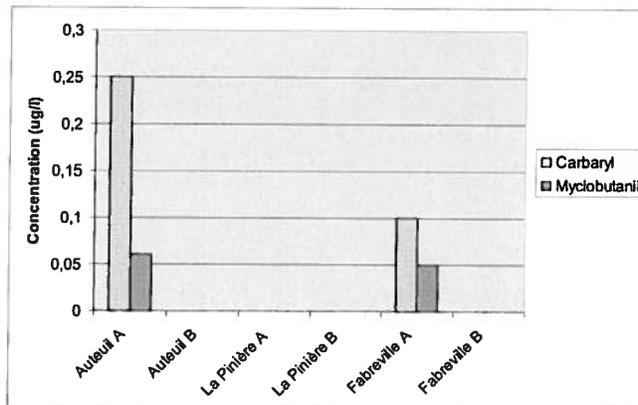
### Dioxines et Furanes



### Produits pharmaceutiques



### Pesticides





## Liste des références

- Aarab N, Lemaire-Gony S, Unruh E, Hansen PD, Larsen BK, Andersen OK, Narbonne JF (2006) Preliminary study of responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether. *Aquatic Toxicology*, 78.
- Adamo SA (2004) How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? *Animal Behaviour* 68, 1443-1449.
- Akaishi FM, St-Jean SD, Bishay F, Clarke J, Rabitto IdS, Ribeiro CA do (2007) Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquatic Toxicology*, 82, 1-14.
- Akkanen J, Kukkonen JV (2003) Measuring the bioavailability of two hydrophobic organic compounds in the presence of dissolved organic matter. *Environ Toxicol Chem*, 22, 518-524.
- Arndt V, Vine MF, Weigle K (1999) Environmental chemical exposures and risk of herpes zoster. *Environmental Health Perspectives*, 107, 835-841.
- ASTM (2001) Standard Guide for Conducting in situ Field Bioassays with Marine, Estuarine and Freshwater Bivalves, West Conshohocken, PA.
- Bebiano MJ, Lopes B, Guerra L, Hoarau P, Ferreira AM (2007) Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: effect of abiotic factors. *Environ Int*, 33, 550-558.
- Bernet D, Schmidt H, Wahli T, Burkhardt-Holm P (2001) Effluent from a sewage treatment works causes changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48, 140-147.
- Bernier B (2001) Guide pour l'étude des technologies conventionnelles de traitement des eaux usées d'origine domestique. [Electronic Article], Adresse internet: <http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/eaux-usees/domestique/Chap1PageGarde.pdf>
- Bird MD, Karavitis J, Kovacs EJ (sous presse) Sex differences and estrogen modulation of the cellular immune response after injury. *Cellular Immunology*, In Press, Corrected Proof.
- Blaise C, Gagné F, Pellerin J, Hansen PD (1999) Determination of vitellogenin-like properties in *Mya arenaria* hemolymph (Saguenay Fjord, Canada): A potential biomarker for endocrine disruption. *Environmental Toxicology*, 14, 455-465.
- Blaise C, Gagne F, Salazar M, Salazar S, Trottier S, Hansen PD (2003) Experimentally-induced feminisation of freshwater mussels after long-term exposure to a municipal effluent. *Fresenius Environmental Bulletin*, 12, 865-870.
- Blaise C, Trottier S, Gagne F, Lallement C, Hansen PD (2002) Immunocompetence of bivalve hemocytes as evaluated by miniaturized phagocytosis assay. *Environmental Toxicology*, 17, 160-169.
- Bocchetti R, Lamberti CV, Pisanelli B, Razzetti EM, Maggi C, Catalano B, Sesta G, Martuccio G, Gabellini M, Regoli F (2008) Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and

- mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic sea. *Marine Environmental Research*, 66, 24-26.
- Bouchard N, Pelletier É, Fournier M (1999) Effects of butyltin compounds on phagocytic activity of hemocytes from three marine bivalves. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 519-522.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Brouillette D (2007) Qualité de l'eau de la rivière des Mille Îles 2000-2005. [Electronic Article] 36 p, Adresse internet: [http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/eco\\_aqua/mille\\_iles/rapport\\_00-05.pdf](http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/eco_aqua/mille_iles/rapport_00-05.pdf)
- Brousseau P, Payette Y, Blakley B, Boermans H, Flipo D, Tryphomonas H, Fournier M eds. (1998) *Manual of Immunological Methods*. CRP Press, Boston, USA.
- Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Cyr D, Blakley B, Boermans H, Fournier M (2000) Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. *Toxicology Letters*, 142 145–156.
- Byrne BM, Gruber M, Ab G (1989) The evolution of egg yolk proteins. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 53, 33-69.
- Canesi L, Ciacci C, Betti M, Lorusso LC, Marchi B, Burattini S, Falcieri E, Gallo G (2004) Rapid effects of 17 $\beta$ -estradiol on cell signaling and function of *Mytilus* hemocytes. *General and Comparative Endocrinology*, 136, 58.
- Canesi L, Ciacci C, Betti M, Scarpato A, Citterio B, Pruzzo C, Gallo G (2003) Effects of PCB congeners on the immune function of *Mytilus* hemocytes: alterations of tyrosine kinase-mediated cell signaling. *Aquatic Toxicology*, 63 293-306.
- Canesi L, Ciacci C, Lorusso LC, Betti M, Gallo G, Pojana G, Marcomini A (2007a) Effects of Triclosan on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and digestive gland enzyme activities: Possible modes of action on non target organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145, 464-472.
- Canesi L, Ciacci C, Lorusso LC, Betti M, Guarnieri T, Tavolari S, Gallo G (2006) Immunomodulation by 17 $\beta$ -estradiol in bivalve hemocytes. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 291, R664.
- Canesi L, Gallo G, Gavioli M, Pruzzo C (2002a) Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique*, 57, 469-476.
- Canesi L, Lorusso LC, Ciacci C, Betti M, Regoli F, Poiana G, Gallo G, Marcomini A (2007b) Effects of blood lipid lowering pharmaceuticals (bezafibrate and gemfibrozil) on immune and digestive gland functions of the bivalve mollusc, *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 69, 994-1002.
- Canesi L, Lorusso LC, Ciacci C, Betti M, Rocchi M, Pojana G, Marcomini A (2007c) Immunomodulation of *Mytilus* hemocytes by individual estrogenic chemicals and environmentally relevant mixtures of estrogens: In vitro and in vivo studies. *Aquatic Toxicology*, 81, 36.

- Canesi L, Scarpato A, Betti M, Ciacci C, Pruzzo C, Gallo G (2002b) Bacterial killing by mytilus hemocyte monolayers as a model for investigating the signaling pathways involved in mussel immune defence. *Marine Environmental Research*, 54, 547.
- Carballal MJ, Lopez C, Azevedo C, Villalba A (1997) Enzymes Involved in Defense Functions of Hemocytes of Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY*, 70, 96-105.
- Chu FE, Peyre JFL (1989) Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein in American oysters (*Crassostrea virginica*). *J Invertebr Pathol*, 54, 224-232.
- Clarke AH (1981) *The freshwater molluscs of Canada*, 1ere edn. National Museum of Natural Sciences/National Museums of Canada, Ottawa.
- Coutellier A (2008) Les services publics de l'assainissement en 2004. Les dossiers IFEN, Numéro 10, [Electronic Article] 30 pp, Adresse internet: [www.ifen.fr/uploads/media/d10\\_enqueteEau\\_assainissement.pdf](http://www.ifen.fr/uploads/media/d10_enqueteEau_assainissement.pdf)
- Croll RP, Wang C (2007) Possible roles of sex steroids in the control of reproduction in bivalve molluscs. *Aquaculture*, 272, 76-86.
- Daniel V, Huber W, Bauer K, Suesal C, Conradt C, Opelz G (2001) Associations of blood levels of PCB, HCHs and HCB with numbers of lymphocyte subpopulations, in vitro lymphocyte response, plasma cytokine levels, and immunoglobulin autoantibodies. *Environmental Health Perspectives*, 109, 173-178.
- Dewailly E, Ayotte P, Bruneau S, Gingras S, Belles-Isles M, Roy R (2000) Susceptibility to infections and immune status in Inuit infants exposed to organochlorines. *Environmental Health Perspectives*, 108, 205-211.
- Dondero F, Piacentini L, Marsano F, Rebelo M, Vergani L, Venier P, Viarengo A (2006) Gene transcription profiling in pollutant exposed mussels (*Mytilus* spp.) using a new low-density oligonucleotide microarray. *Gene*, 376, 24-36.
- Fang FC (1997) Mechanisms of Nitric Oxide-related Antimicrobial Activity. *J. Clin. Invest.*, 99, 2818-2825.
- Farris JL, Hassel JHV eds. (2006) *Freshwater bivalve ecotoxicology*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Filby AL, Neuparth T, Thorpe KL, Owen R, Galloway TS, Tyler CR (2007) Health impacts of estrogens in the environment, considering complex mixture effects. *Environmental Health Perspectives*, 115, 1704-1710.
- Fisher WS, Oliver LM, Winstead JT, Long ER (2000) A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquatic Toxicology*, 51, 115-138.
- Fournier M, Cyr D, Blakley B, Boermans H, Brousseau P (2000) Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *American Zoologist*, 40, 412.
- Fournier M, Pellerin J, Clermont Y, Morin Y, Brousseau P (2001) Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology*, 161, 201-211.

- Fujimoto Y, Sakuma S, Inoue T, Uno E, Fujita T (2002) The endocrine disruptor nonylphenol preferentially blocks cyclooxygenase-1. *Life Sciences*, 70, 2209.
- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Renault T (2004) In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 16, 501-512.
- Gagné F, André C, Cejka P, Gagnon C, Blaise C (2007a) Toxicological effects of primary-treated urban wastewaters, before and after ozone treatment, on freshwater mussels (*Elliptio complanata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145, 542-552.
- Gagné F, Bérubé E, Fournier M, Blaise C (2005a) Inflammatory properties of municipal effluents to *Elliptio complanata* mussels -- lack of effects from anti-inflammatory drugs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141, 332-337.
- Gagné F, Bérubé E, Fournier M, Blaise C (2005b) Inflammatory properties of municipal effluents to *Elliptio complanata* mussels - lack of effects from anti-inflammatory drugs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 141, 332-337.
- Gagné F, Blaise C (1998) Estrogenic properties of municipal and industrial wastewaters evaluated with a rapid and sensitive chemoluminescent in situ hybridization assay (CISH) in rainbow trout hepatocytes. *Aquatic Toxicol.*, 44, 83-91.
- Gagné F, Blaise C, Andre C, Gagnon C, Salazar M (2007b) Neuroendocrine disruption and health effects in *Elliptio complanata* mussels exposed to aeration lagoons for wastewater treatment. *Chemosphere*, 68, 731-743.
- Gagné F, Blaise C, Andre C, Salazar M (2006) Effects of pharmaceutical products and municipal wastewaters on temperature-dependent mitochondrial electron transport activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 143, 388.
- Gagné F, Blaise C, Lachance B, Sunahara GI, Sabik H (2001a) Evidence of coprostanol estrogenicity to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Environmental Pollution*, 115, 97.
- Gagné F, Blaise C, Pellerin J, Pelletier E, Douville M, Gauthier-Clerc S, Viglino L (2003) Sex alteration in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in an intertidal zone of the Saint Lawrence River (Quebec, Canada). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 134, 189-198.
- Gagné F, Blaise C, Salazar M, Salazar S, Hansen PD (2001b) Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 128, 213.
- Gagnon C, Gagne F, Turcotte P, Saulnier I, Blaise C, Salazar MH, Salazar SM (2006) Exposure of caged mussels to metals in a primary-treated municipal wastewater plume. *Chemosphere*, 62, 998.
- Galloway TS, Depledge MH (2001) Immunotoxicity in Invertebrates: Measurement and Ecotoxicological Relevance. *Ecotoxicology*, 10, 5.
- Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Fournier M, Amiard JC (2006) Immunological and biochemical responses in *Mya arenaria* (Mollusca Bivalvia) exposed in vivo to

- estradiol-17[ $\beta$ ]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 144, 228.
- Germolec DR (2004) Sensitivity and predictivity in immunotoxicity testing: immune endpoints and disease resistance. *Toxicology Letters*, 149, 109-114.
- Gillis PL, Mitchell RJ, Schwalb AN, McNichols KA, Mackie GL, Wood CM, Ackerman JD (2008) Sensitivity of the glochidia (larvae) of freshwater mussels to copper: assessing the effect of water hardness and dissolved organic carbon on the sensitivity of endangered species. *Aquat Toxicol*, 88, 137-145.
- Gourdon I, Guerin M-C, Torreilles J, Roch P (2001) Nitric Oxide Generation by Hemocytes of the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*, 5, 1-6.
- Gourlay C, J.M.Mouchel, M.H.Tusseau-Vuillemin, J.Garric (2005) Influence of algal and bacterial particulate organic matter on benzo[a]pyrene bioaccumulation in *Daphnia magna*. *Sci Total Environ*, 346, 20-30.
- Grisham MB, Jourd'heuil D, Wink DA (1999) Nitric Oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am. J. Physiol.*, 276, G315-G321.
- Gross TS, Wieser CM, Kernaghan NJ, Ruessler DS (2000) Development and validation of procedures for monitoring endocrine and reproductive function in freshwater mussels. [Electronic Article], Adresse internet:  
<http://cars.er.usgs.gov/posters/Ecotoxicology/Endrocine/endrocine.html>
- Grundy MM, Ratcliffe NA, Moore MN (1996) Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, 42, 187-190.
- Guo TL, McCay JA, Brown RD, Musgrove DL, Germolec DR, Butterworth L, Munson AE, White KL (2000) Carbon tetrachloride is immunosuppressive and decreases host resistance to *Listeria monocytogenes* and *Streptococcus pneumoniae* in female B6C3F1 mice. *Toxicology*, 154, 85-101.
- Haitzer M, Akkanen J, Steinberg C, Kukkonen JV (2001) No enhancement in bioconcentration of organic contaminants by low levels of DOM. *Chemosphere*, 44, 165-171.
- Haitzer M, Höss S, Traunspurger W, Steinberg C (1998) Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms--a review. *Chemosphere* 37, 1335-1362.
- Hall M, Wang R, Van-Antwerpen R, Sottrup-Jensen L, Söderhäll K (1999) The crayfish plasma clotting protein: A vitellogenin-related protein responsible for clot. *PNAS*, 96, 1965-1970.
- Harries JE, Sheahan DA, Jobling S, Matthiessen P, Neall P, Sumpter JP, Tylor T, Zaman N (1997) Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 534-542.
- Hébert N, Gagné F, Cejka P, Bouchard B, Hausler R, Cyr DG, Blaise C, Fournier M (2008) Effects of ozone, ultraviolet and peracetic acid disinfection of a primary-treated municipal effluent on the Immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

- Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology, 148, 122-127.
- Hébert S (2005) Le Saint-Laurent - La qualité des eaux du fleuve 1990-2003.[Electronic Article] 28 p, Adresse internet:  
[http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/eco\\_aqua/fleuve/qualite90-03/index.htm](http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/eco_aqua/fleuve/qualite90-03/index.htm)
- Hellou J, Yeats P, Steller S, Gagné F (2003) Chemical contaminants and biological indicators of mussel health during gametogenesis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 2080-2087.
- Hine PM (1999) The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 9, 367-385.
- Hong X-T, Xiang L-X, Shao J-Z (2006) The immunostimulating effect of bacterial genomic DNA on the innate immune responses of bivalve mussel, *Hyriopsis cumingii* Lea. *Fish & Shellfish Immunology*, 21 357-364.
- Hubert F, Cooper EL, Roch P (1997) Structure and differential target sensitivity of the stimutable cytotoxic complex from hemolymph of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1361, 29.
- Hutchinson TH (2002) Reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in invertebrates: In vitro and in vivo approaches. *Toxicology Letters*, 131, 75-81.
- Inadera H (2006) The immune system as a target for environmental chemicals: Xenoestrogens and other compounds. *Toxicology Letters*, 164, 191-206.
- Iwanaga S, Bok LL (2005) Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 128-150.
- Janer G, Lavado R, Thibaut R, Porte C (2005) Effects of 17 $\beta$ -estradiol exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis* : A possible regulating role for steroid acyltransferases. *Aquatic Toxicology*, 75 32-42.
- Kohler HR, Kloas W, Schirling M, Lutz I, Reye AL, Langen JS, Triebkorn R, Nagel R, Schonfelder G (2007) Sex steroid receptor evolution and signalling in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology*, 16, 131-143.
- Kramer VJ, Miles-Richardson S, Pierens SL, Giesy JP (1998) Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17[ $\beta$ ]-estradiol. *Aquatic Toxicology*, 40, 335-360.
- Kryger J, Riisgard HU (1988) Filtration rate capacities in 6 species of European freshwater bivalves. *Oecologia*, 77, 34-38.
- Lagadic L, Caquet T, Amiard JC (1997) Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. Masson, Paris.
- LeBlanc GA (2007) Crustacean endocrine toxicology: A review. *Ecotoxicology*, 16, 61-81.
- Lee JE, Naqi SA, Kao E, Dietert RR (2002a) Embryonic exposure to lead: Comparison of immune and cellular responses in unchallenged and virally stressed chickens. *Archives of Toxicology*, 75, 717-724.
- Lee YC, Yang D (2002b) Determination of lysozyme activities in a microplate format. *Analytical Biochemistry*, 310 223-224.

- Lemaire N, Pellerin J, Fournier M, Girault L, Tamigneaux E, Cartier S, Pelletier E (2006) Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel *Mytilus* spp. from farm sites of eastern Quebec. *Aquaculture*, 261, 729-775.
- Li H, Parisi M-G, Toubiana M, Cammarata M, Roch P (2008a) Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 143-152.
- Li Z, Zhang S, Liu Q (2008b) Vitellogenin Functions as a Multivalent Pattern Recognition Receptor with an Opsonic Activity. *PLoS ONE*, 3, e1940.
- Luster MI, Park CG, Germolec DR (2006) Interpreting immunotoxicology data for risk assessment. In: *Immunotoxicology and Immunopharmacology* (eds. Luebke R, House RV, Kimber I), pp. 35-44. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Lydeard C, Cowie RH, Ponder WF, Bogan AE, Bouchet P, Clark SA, Cummings KS, Frest TJ, Gargominy O, Herbert DG, Hershler R, Perez KE, Roth B, Seddon M, Strong EE, Thompson FG (2004) The Global Decline of Nonmarine Mollusks. *BioScience*, 54, 321.
- M. Ortiz-Zarragoitia MPC (2006) Biomarkers of Exposure and Reproduction-Related Effects in Mussels Exposed to Endocrine Disruptors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 50, 361-369.
- Malagoli D, Casarini L, Sacchi S, Ottaviani E (2007) Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23, 171-177.
- Malagoli D, Ottaviani E (2005) Cytotoxicity as a marker of mussel health status. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85, 359-362.
- Maningas MBB, Kondo H, Hirono I, Saito-Taki T, Aoki T (2008) Essential function of transglutaminase and clotting protein in shrimp immunity. *Molecular Immunology*, 45, 1269-1275.
- Mantione KJ (2008) Estrogen's actions transcend a sole reproductive function in cell signaling. *Med Sci Monit*, ; (14, SC1-3.
- Marin MG, Matozzo V (2004) Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Marine Pollution Bulletin*, 48, 835-839.
- Martins-Souza R, Pereira C, Filho OM, Coelho P, Corrêa JA, Negrão-Corrêa D (2006) Differential lectin labelling of circulating hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* resistant or susceptible to *Schistosoma mansoni* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [Electronic Article], Adresse internet: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762006000900029&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762006000900029&lng=en)
- Martins J, Oliva Teles L, Vasconcelos V (2007) Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environment International*, 33, 414-425.
- Matozzo V, Gagne F, Marin MG, Ricciardi F, Blaise C (2008) Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environment International*, 34 531-545.
- Matozzo V, Marin MG (2005) Can 4-nonylphenol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*? *Environmental Research*, 97 43-49.

- Matsumoto T, Osada M, Osawa Y, Mori K (1997) Gonadal Estrogen Profile and Immunohistochemical Localization of Steroidogenic Enzymes in the Oyster and Scallop during Sexual Maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B*, 118, 811-817.
- Matteson MR (1948) Life History of *Elliptio complanatus* (Dillwyn, 1817). *American Midland Naturalist*, 40, 690-723.
- Metscher BD, Ahlberg PE (1999) Zebrafish in context: Uses of a laboratory model in comparative studies. *Developmental Biology*, 210, 1-14.
- Monari M, Matozzo V, Foschi J, Cattani O, Serrazanetti GP, Marin MG (2007) Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22, 98.
- Mulcrone R (2006) *Elliptio complanata*. *Animal Diversity Web*, [Electronic Article], Adresse internet:  
[http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Elliptio\\_complanata.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Elliptio_complanata.html).
- Mydlarz LD, Jones LE, Harvell CD (2006) Innate Immunity, Environmental Drivers, and Disease Ecology of Marine and Freshwater Invertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, 251-288.
- Nice HE, Thorndyke MC, Morrill D, Steele S, Crane M (2000) Development of *Crassostrea gigas* Larvae is Affected by 4-nonylphenol. *Marine Pollution Bulletin*, 40, 491.
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U (2003) Endocrine disruption in invertebrates. *Pure and Applied Chemistry*, 75, 2207-2218.
- Olicard C, Renault T, Torhy C, Benmansour A, Bourgougnon N (2005) Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Research*, 66, 147.
- Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP (2006) Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disrupters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, 361-369.
- Osada M, Takamura T, Sato H, Mori K (2003) Vitellogenin Synthesis in the Ovary of Scallop, *Patinopecten yessoensis*: Control by Estradiol-17 $\beta$  and the Central Nervous System. *Journal of experimental zoology*, 299A, 172-179.
- Pain S, Parant M (2003) Multixenobiotic defence mechanism (MXDM) in bivalves. *Comptes Rendus Biologies*, 326, 659-672.
- Paterson CG (1983) Effect of Aggregation on the Respiration Rate of the Freshwater Unionid Bivalve, *Elliptio complanata*. *Freshwater Invertebrate Biology*, 2, 139-146.
- Peat JK, Van Den Berg RH, Green WF, Mellis CM, Leeder SR, Wolcock AJ (1994) Changing prevalence of asthma in Australian children. *BMJ*, 308, 1591-1596.
- Pipe RK (1990) Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochemical Journal*, 22, 595-603.
- Pipe RK, Coles JA (1995) Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology*, 5, 581.

- Pruzzo C, Gallo G, Canesi L (2005) Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environmental Microbiology*, 7, 761-772.
- Puinean AM, Labadie P, Hill EM, Osada M, Kishida M, Nakao R, Novillo A, Callard IP, Rotchell JM (2006a) Laboratory exposure to 17[ $\beta$ ]-estradiol fails to induce vitellogenin and estrogen receptor gene expression in the marine invertebrate *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 79, 376-383.
- Puinean AM, Rotchell JM (2006b) Vitellogenin gene expression as a biomarker of endocrine disruption in the invertebrate, *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 62.
- Quinn B, Gagné F, Blaise C, Costello MJ, Wilson JG, Mothersill C (2006) Evaluation of the lethal and sub-lethal toxicity and potential endocrine disrupting effect of nonylphenol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 142, 118-127.
- Quinn B, Gagné F, Costello M, McKenzie C, Wilson J, Mothersill C (2004) The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology*, 66 279-292.
- Ramade F (2007) Introduction à l'écotoxicologie : fondements et applications. Lavoisier, Paris.
- Ricciardi F, Matozzo V, Marin MG (2008) Effects of 4-nonylphenol exposure in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and crabs (*Carcinus aestuarii*) with particular emphasis on vitellogenin induction. *Marine Pollution Bulletin*, 57, 365-372.
- Richter BD, Braun DP, Mendelson MA, Master LL (1997) Threats to Imperiled Freshwater Fauna. *Conservation Biology*, 11, 1081-1093.
- Roch P (1999) Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 172, 125-145.
- Roditi HA, Fisher NS, Sañudo-Wilhelmy SA (2000) Uptake of dissolved organic carbon and trace elements by zebra mussels. *Nature* 407, 78-80.
- Rodríguez EM, Medesani DA, Fingerman M (2007) Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: A review. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146, 661-671.
- Russell RW, Gobas FAPC (1989) Calibration of the Freshwater Mussel, *Elliptio complanata*, for Quantitative Biomonitoring of Hexachlorobenzene and Octachlorostyrene in Aquatic Systems. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 43, 576-582.
- Saint-Jean SD, Pelletier É, Courtenay SC (2002) Hemocyte functions and bacterial clearance affected in vivo by TBT and DBT in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine ecology progress series*, 236, 163-178.
- Sauvé S, Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Senécal L, Goudreau P, Fournier M (2002) Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology*, 58, 189-200.
- Segner H (2009) Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149, 187-195.

- Shi X, Zhang S, Pang Q (2006) Vitellogenin is a novel player in defense reactions. *Fish and Shellfish Immunology*, 20, 769.
- Smith KL, Galloway TS, Depledge MH (2000) Neuro-endocrine biomarkers of pollution-induced stress in marine invertebrates. *Science of the Total Environment*, 262, 185.
- Solomon GM, Schettler T (2000) Environment and health: 6. Endocrine disruption and potential human health implications. *CMAJ*, 163, 1471-1476.
- Sonnenschein C, Soto AM (1998) An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 65, 143-150.
- Stanton MG (1968) Colorimetric determination of inorganic phosphate in the presence of biological material and adenosine triphosphate. *Analytical Biochemistry*, 22, 27.
- Stefano GB, Cadet P, Mantione K, Cho JJ, Jones D, Zhu W (2003) Estrogen Signaling at the Cell Surface Coupled to Nitric Oxide Release in *Mytilus edulis* Nervous System. *Endocrinology*, 144, 1234-1240.
- Stefano GB, Prevot V, Beauvillain J-C, Cadet P, Fimiani C, Welters I, Fricchione GL, Breton C, Lassalle P, Salzet M, Bilfinger TV (2000) Cell-Surface Estrogen Receptors Mediate Calcium-Dependent Nitric Oxide Release in Human Endothelia. *Circulation*, 101, 1594-1597.
- Stygar D, Westlund P, Eriksson H, Sahlin L (2006) Identification of wild type and variants of oestrogen receptors in polymorphonuclear and mononuclear leucocytes. *Clinical Endocrinology*, 64, 74-81.
- Sugita-Konishi Y, Shimura S, Nishikawa T, Sunaga F, Naito H, Suzuki Y (2003) Effect of Bisphenol A on non-specific immunodefenses against non-pathogenic *Escherichia coli*. *Toxicology Letters*, 136, 217-227.
- Sullivan C, Kim CH (2008) Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish and Shellfish Immunology*, 25, 341-350.
- Sumpter JP, Jobling S (1995) Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*, 103, 173-178.
- Tafalla C, Gomez-Leon J, Novoa B, Figueras A (2003) Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 27, 197-205.
- Tarrant H, Mousakitis G, Wylde S, Tattersall N, Lyons A, Maloney M, Llewellyn N (2008) Raised plasma vitellogenin in male wild brown trout (*Salmo trutta*) near a wastewater treatment plant in Ireland. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1773-1779.
- Tessier L, Vaillancourt G, Pazdernik L (1996.) Laboratory study of cd and hg uptake by two Freshwater molluscs in relation to concentration, age and exposure time. *Water, Air and Soil Pollution*, 86, 347-357.
- Thornton JW, Need E, Crews D (2003) Resurrecting the ancestral steroid receptor: Ancient origin of estrogen signaling. *Science*, 301, 1714-1717.
- Tiscar PG, Mosca F (2004) Defense Mechanisms in Farmed Marine Molluscs. *Veterinary Research Communications*, 28, 57.

- Todd AS, McKnight DM, Jaros CL, Marchitto TM (2007) Effects of acid rock drainage on stocked rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): An In-Situ, caged fish experiment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 130, 111-127.
- Verdon CP, Burton BA, Prior RL (1995) Sample Pretreatment with Nitrate Reductase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Quantitatively Reduces Nitrate While Avoiding Interference by NADP<sup>+</sup> When the Griess Reaction Is Used to Assay for Nitrite. *Analytical Biochemistry*, 224, 502-508.
- Villamil L, Gomez-Leon J, Gomez-Chiarri M (2007) Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 31 968-977.
- Wang W-X, Rainbow PS (2008) Comparative approaches to understand metal bioaccumulation in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 148, 315-323.
- Ward RJS, McCrohan CR, White KN (2006) Influence of aqueous aluminium on the immune system of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Aquatic Toxicology*, 77, 222-228.
- Won SJ, Novillo A, Custodia N, Rie MT, Fitzgerald K, Osada M, Callard IP (2005) The freshwater mussel (*Elliptio complanata*) as a sentinel species: Vitellogenin and steroid receptors. *Integrative and Comparative Biology*, 45, 72.
- Wootton EC, Dyrinda EA, Ratcliffe NA (2003) Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish & Shellfish Immunology*, 15, 195.
- Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jiang G (2008) Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*, 606, 135-150.
-

