

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Effets immunomodulateurs des effluents municipaux traités non-désinfectés
de la région de Gatineau et des effluents municipaux traités non-désinfectés
et désinfectés de l'île de Montréal chez la truite Arc-en-ciel (*Oncorhynchus
mykiss*)

Par
Caroline Müller

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

Jury d'évaluation

Examineur externe	Dr Robert L.Roy Institut Maurice-Lamontagne
Examineur interne	Dr Daniel Cyr INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Michel Fournier INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Les effluents municipaux constituent l'une des principales sources de contamination aquatique ponctuelle et non contrôlée et le déversement de ces eaux représente une source mondiale majeure de pollution. Cette contamination consiste en un mélange complexe de substances chimiques parmi lesquelles on retrouve des éléments nutritifs, tel que l'azote ammoniacale, des ions majeurs, des métaux tels que le cuivre et le zinc ainsi que des substances organiques dont plus particulièrement des surfactants anioniques. Les stations d'épuration des eaux usées de 2 des 3 plus grands centres urbains du Québec sont à l'étude, soit celle de la région de Gatineau et celle de la communauté urbaine de Montréal (CUM). La station d'épuration des eaux usées de la région de Gatineau traite les eaux usées de cette région par le procédé des boues activées. Au cœur même de son territoire se trouve la rivière des Outaouais, qui reçoit les rejets d'eaux usées de la station. La rivière des Outaouais est le principal tributaire du fleuve Saint-Laurent. Ses charges toxiques ont donc une importance capitale sur celles du fleuve Saint-Laurent. Le cours principal de la rivière des Outaouais est le deuxième corridor récréo-touristique en importance après le fleuve Saint-Laurent. La station d'épuration des eaux usées de la CUM traite un volume d'eaux représentant 50% des eaux usées traitées du Québec et déverse ses eaux dans le fleuve Saint-Laurent. Avec sa capacité d'environ 7,6 millions de mètres cubes par jour, il s'agit, jusqu'à maintenant, de la plus importante station de traitement primaire physico-chimique en Amérique. L'absence de procédés de désinfection des effluents municipaux de ces stations d'épuration est un des principaux problèmes de la qualité de l'eau au Québec.

L'interaction des contaminants présents dans les eaux usées peut modifier la compétence immunitaire des poissons et engendrer par le fait même une immunosuppression, une prolifération cellulaire incontrôlable et des changements dans les mécanismes de défenses contre des pathogènes. Des paramètres immunologiques ont été utilisés comme

biomarqueurs afin d'évaluer l'impact des effluents municipaux sur la réponse immunitaire. Il s'agit de la transformation lymphoblastique, de la phagocytose ainsi que de la cytotoxicité cellulaire. La phagocytose a été analysée par la cytométrie en flux en utilisant des billes de latex fluorescentes comme antigènes. Les réponses prolifératrices à la phytohemagglutinine (PHA) et au lipopolysaccharide (LPS) par les lymphocytes du pronéphros ont été déterminées par l'incorporation de ^3H -thymidine à travers la réplication de l'ADN. La cytotoxicité cellulaire a été effectuée, en cytométrie en flux, avec des cellules cytotoxiques naturelles (NCC) et des cellules YAC-1 transformées agissant comme cibles. La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) a servi d'espèce sentinelle pour cette étude. Son système immunitaire bien étudié et sa sensibilité éprouvée aux contaminants aquatiques font aussi d'elle un choix logique pour des essais de toxicité.

Les eaux usées de la région de Gatineau ont, à des concentrations comparables à celles rapportées en milieu naturel pollué, modulé à la baisse la prolifération cellulaire des lymphocytes B et T ainsi que stimulé l'activité cytotoxique des NCC.

Les leucocytes du pronéphros des truites ont été exposés aux effluents traités non désinfectés de la région de Gatineau et de la CUM ainsi qu'aux eaux traitées et désinfectées à l'acide péracétique, à l'ozone et aux ultra-violets de la CUM. Il y a eu immunostimulation de la phagocytose chez les phagocytes exposés aux effluents de la région de Gatineau.

Cette étude est la première répertoriée sur les effets immunotoxiques reliés à une exposition *in vivo* et *in vitro* à l'effluent de la région de Gatineau.


Étudiant

Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

À mon directeur de recherche, Dr. Michel Fournier, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire ainsi que pour m'avoir donné la possibilité de participer à de nombreux projets et divers congrès.

À tous les membres du laboratoire, particulièrement pour leur soutien lors des journées d'expériences.

À tous ceux qui ont contribué à la réalisation du projet, soient Patrick Cejka et Luc Tremblay de la station d'épuration des eaux de Montréal, à Antonio Miguel de la station d'épuration des eaux de la région de Gatineau ainsi qu'au Dr. Sylvia Ruby et à Catherine Dimacacos de l'université Concordia.

À mes parents pour leurs encouragements et leur générosité ainsi qu'à ma famille et mes amis.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ACRONYMES ET ABRÉVIATIONS.....	xi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : PROBLÉMATIQUE DES EFFLUENTS MUNICIPAUX.....	3
1.1 Caractérisation des effluents municipaux.....	3
1.2 Contaminants retrouvés dans les effluents municipaux	4
1.2.1 Éléments nutritifs.....	5
1.2.2 Métaux Lourds.....	5
1.2.3 Polluants organiques persistants.....	6
1.2.4 Médicaments.....	7
1.2.5 Sédiments contaminés.....	8
CHAPITRE 2 : LES STATIONS D'ÉPURATION DES EAUX USÉES À L'ÉTUDE....	9
2.1 Station d'épuration des eaux usées de la région de Gatineau.....	9
2.2 Procédés de traitements des eaux usées de la région de Gatineau.....	9
2.2.1 Description de la chaîne de traitement liquide.....	10
2.2.2 Description de la chaîne de traitement des boues.....	11
2.3 Station d'épuration des eaux usées de la communauté urbaine de Montréal...	11
2.4 Procédés de traitements des eaux usées de la communauté urbaine de Montréal.....	11

2.4.1	Pompage.....	12
2.4.2	Dégrillage.....	12
2.4.3	Dessablage.....	12
2.4.4	Traitements physico-chimique.....	13
2.5	Problématique de la désinfection au chlore.....	13
CHAPITRE 3 : PROCÉDÉS DE DÉSINFECTIONS DES EAUX USÉES TRAITÉES.		15
3.1	Problématique concernant les eaux usées traitées non désinfectées.....	15
3.2	Désinfection à l’ozone.....	16
3.3	Désinfection au rayonnement ultraviolet.....	17
3.4	Désinfection à l’acide peroacétique.....	18
CHAPITRE 4 : BIOINDICATEUR : TRUITE ARC-EN-CIEL (<i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i>).....		19
CHAPITRE 5 : SYSTÈME IMMUNITAIRE		20
5.1	Les organes lymphoïdes	20
5.1.1	Les organes lymphoïdes centraux.....	20
5.1.2	Les organes et tissus lymphoïdes périphériques.....	20
5.2	Les cellules de l’immunité	21
5.2.1	Les lymphocytes.....	21
5.2.2	Les cellules cytotoxiques naturelles.....	22
5.2.3	Les cellules présentatrices d’antigènes.....	23
5.2.4	Les monocytes et macrophages.....	23
5.2.4	Les cellules dendritiques.....	24

5.2.6	Les granulocytes.....	25
5.3	Les molécules du système immunitaire.....	25
5.3.1	Les anticorps.....	25
5.3.2	Le système du complément.....	26
5.3.3	Les molécules d'adhésion.....	26
5.3.4	Les cytokines.....	26
5.4	Spéciation du système immunitaire des poissons.....	27
5.5	Les types d'immunité.....	29
5.5.1	L'immunité naturelle.....	29
5.5.2	L'immunité spécifique.....	29
5.5.3	L'immunité humorale.....	30
5.5.4	L'immunité à médiation cellulaire.....	30
5.6	Manifestation d'immunotoxicité.....	31
5.6.1	Immunosuppression.....	32
5.6.2	Hypersensibilité.....	33
5.6.3	Auto-immunité.....	33
CHAPITRE 6 : BIOMARQUEURS IMMUNOLOGIQUES.....		35
6.1	La phagocytose.....	36
6.2	L'activité cytotoxique naturelle.....	37
6.3	La transformation lymphoblastique.....	37

CHAPITRE 7 : EFFETS DES EFFLUENTS MUNICIPAUX CHEZ LES POISSONS..	39
7.1 Mécanismes d'action du stress sur le système immunitaire.....	39
7.2 Effets des contaminants des effluents municipaux.....	40
CHAPITRE 8 : CONTRIBUTION PERSONNELLES AUX ARTICLES.....	46
1 ^e article : Effects of municipal sewage effluent by the Outaouais sewage treatment plant on immune function of rainbow trout (<i>Oncorhynchus Mykiss</i>).....	47
2 ^e article : <i>In vitro</i> effects of municipal sewage effluent by the Outaouais and Montreal sewage treatment plant, on the immune function, and disinfection efficiency of ozone, UV radiation and peracetic acid of Montreal municipal wastewater.....	70
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	93
BIBLIOGRAPHIE.....	95

LISTE DES FIGURES

1^e article: EFFECTS OF MUNICIPAL SEWAGE EFFLUENT BY THE OUTAOUAIS
SEWAGE TREATMENT PLAN ON IMMUNE FUNCTION OF RAINBOW TROUT
(*Oncorhynchus Mykiss*)

Figure 1. Ratio weight/length of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to various concentrations of Gatineau municipal effluents, following a 30-day exposure period.

Figure 2. Phagocytosis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to various concentrations of Gatineau municipal effluents, following a 30-day exposure period.

Figure 3. NCC cytotoxic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to various concentrations of Gatineau municipal effluents, following a 30-day exposure period.

Figure 4. Effects of Gatineau municipal effluents on trout leukocyte mitogenesis. Effects of various concentrations of municipal effluents, following a 30-day exposure period, on the proliferation response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) head kidney leukocytes stimulated with PHA and LPS.

Figure 5. Normal response percent of the proliferation response of lymphocytes stimulated with PHA and LPS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to various concentrations of Gatineau municipal effluents for a 30-day exposure.

2° article : *IN VITRO* EFFECTS OF MUNICIPAL SEWAGE EFFLUENT BY THE OUTAOUAIS AND MONTREAL SEWAGE TREATMENT PLANT, ON THE IMMUNE FUNCTION, AND DISINFECTION EFFICIENCY OF OZONE, UV RADIATION, AND PERACETIC ACID OF MONTREAL MUNICIPAL WASTEWATER

Figure 1. Phagocytosis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes exposed *in vitro* to various concentrations of Gatineau municipal effluents.

Figure 2. Phagocytosis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes exposed *in vitro* to various concentrations of Montreal municipal effluents.

Figure 3. NCC cytotoxic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes exposed *in vitro* to 0.1% concentration of Gatineau and Montreal municipal effluents.

Figure 4. Phagocytosis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes exposed *in vitro* to 0.1% concentration of Gatineau and Montreal municipal effluents, and three pilot disinfection treatments (Ozone, UV radiation and PAA) on Montreal municipal effluents.

Figure 5. NCC cytotoxic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes exposed *in vitro* to 0.1% concentration of Gatineau and Montreal (CUM) municipal effluents, and three pilot disinfection treatments (Ozone, UV radiation and PAA) on Montreal municipal effluents.

LISTE DES TABLEAUX

SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

Tableau 1. Substances fréquemment détectées dans les eaux usées municipales.....5

LISTE DES ACRONYMES ET ABRÉVIATIONS

AA	Acide acétique
ADCC	Cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendant
ADN	Acide désoxyribonucléique
APEO	Alkylphénol polyéthoxylate
BPC	Biphényle polychloré
BSA	Albumine de serum bovin
BCR	Récepteur des cellules B
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COD	Demande chimique en oxygène
CPA	Cellules présentatrices de l'antigène
CSF	Facteur de croissance hématopoïétique
CUM	Communauté urbaine de Montréal
DBO	Demande biochimique en oxygène
DDE	p,p'-2,2-bis(4-chlorophényl)-1,1-dichloroéthylène
DDT	p,p'1,1-bis(4-chlorophényl)-2,2,2-trichloroéthylène
DIO	Diocadecyloxacarbocyanine
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HSP	Protéines de chocs thermiques
ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire

Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IFN	Interféron
LFA	Fonctions leucocytaires associées
LPS	Lipopolysaccharide
MES	Matières en suspension
NCC	Cellules cytotoxiques naturelles
NK	Cellules tueuses naturelles
PAA	Acide péracétique
PHA	Phytohemmagglutinine
PI	Iodide de propidium
PM	Poids moléculaire
POP	Polluant organique persistant
SS	Solides en suspension
SVF	Sérum de veau foetal
TBT	Tributylétain
TCDD	Tétrachlorodibenzo
TCR	Récepteur des cellules T
TGF	Facteur de croissance des tumeurs
TNF	Facteur de nécrose des tumeurs
µg	Microgramme (10^{-6} g)
UV	Ultraviolet

INTRODUCTION

La pollution environnementale peut causer une altération de la croissance, de la résistance aux maladies, des fonctions reproductives et entraîner des conséquences à long terme pour la survie des poissons contaminés. La contamination de l'environnement aquatique avec des polluants comme les métaux lourds, les dioxines, les biphényles polychlorés et les pesticides a pour principale origine les sources anthropologiques telles que les industries, l'agriculture et les effluents municipaux. Les effluents municipaux contiennent un grand nombre de substances chimiques capables de moduler les fonctions physiologiques, métaboliques, telles que la croissance, la reproduction et l'immunité chez les poissons (Jobling et *al.*, 1996). Le système immunitaire s'avère un indicateur sensible face aux xénobiotiques (Fournier et *al.*, 2000) et constitue l'objet de la présente étude chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). L'altération du système immunitaire est reflétée par des changements entraînant une plus grande susceptibilité face à des maladies, des infections virales et des formations de tumeurs. La truite arc-en-ciel est le poisson étalon d'eau froide pour la recherche en toxicologie aquatique. Sa grande disponibilité, son coût peu élevé et la banque de données sur son système immunitaire font d'elle un choix logique pour des essais de toxicité (Environnement Canada, 1990).

L'objectif général de cette étude est d'établir un portrait du potentiel immunotoxique des rejets des stations d'épuration municipales, c'est-à-dire d'évaluer la toxicité des effluents traités, en laboratoire, en tenant compte des dilutions dans les milieux récepteurs. L'approche permet aussi de comparer les effluents municipaux traités désinfectés et non-désinfectés afin d'évaluer l'efficacité des traitements de désinfection (radiation ultraviolet, ozone et acide péracétique) et de comparer 2 des 3 plus grands centres urbains du Québec, soit la communauté urbaine de Montréal (CUM) et la région de Gatineau.

Une exposition *in vivo* aux effluents municipaux de la région de Gatineau à différentes concentrations nous a permis d'évaluer les effets modulateurs de ces eaux sur la réponse immunitaire de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Des expositions *in vitro* nous ont permis d'évaluer l'impact des procédés de désinfection sur l'immunotoxicité des effluents municipaux de la CUM et de la région de Gatineau, ainsi que de comparer la toxicité de ces deux grands centres urbains du Québec.

Les réponses immunitaires non spécifique et spécifique ont été évaluées afin de caractériser les effets immunomodulateurs des effluents municipaux. L'évaluation de l'immunité non-spécifique s'est effectuée par l'analyse en cytométrie de flux de l'activité phagocytaire des macrophages tissulaires et des neutrophiles sanguins ainsi que de l'activité cytotoxique naturelle des NCC (cellules cytotoxiques naturelles). L'évaluation de l'immunité à médiation cellulaire s'est faite à l'aide de la technique de la prolifération des lymphocytes induite par des mitogènes.

L'étude des effets des contaminants retrouvés dans les effluents municipaux sur le système immunitaire des poissons est un sujet important dans la recherche des impacts réels que ces polluants ont sur notre environnement et notre santé.

CHAPITRE 1 : PROBLÉMATIQUE DES EFFLUENTS MUNICIPAUX

1.1 Caractérisation des effluents municipaux

Les contaminants du milieu sont des agents potentiellement nocifs qui ont été libérés dans l'écosystème et qui ont pénétré dans les aliments, dans l'air, dans l'eau et dans le sol. Il y a trois catégories de contaminants, soit les produits chimiques, organiques ou inorganiques, les micro-organismes qui comprennent les bactéries, les protozoaires, les virus et les champignons, puis le rayonnement, qui comprend les types ionisant et non ionisant (Burns et *al.*, 1996).

Depuis la seconde guerre mondiale, la quantité et le nombre de produits chimiques fabriqués et utilisés ont considérablement augmenté. Plus d'un million de produits chimiques différents sont en vente dans le monde et près de 1 000 substances nouvelles arrivent chaque année sur le marché (Environnement Canada, 1996). Les produits chimiques fabriqués font partie intégrante de tous les aspects de la vie moderne. Les avantages de l'utilisation des produits chimiques sont nombreux : augmentation de la production et de la qualité des aliments, amélioration des médicaments, amélioration de l'efficacité des procédés de production industrielle et diversification des produits de consommation et des matériaux de construction. Bien que la plupart des produits chimiques présentent des avantages importants, les dérivés et les déchets de fabrication peuvent causer des problèmes dans l'environnement s'ils ne sont pas manipulés ou éliminés correctement (Environnement Canada, 1996).

Les effluents municipaux contiennent un grand nombre de composés chimiques pouvant être néfastes à la santé de la faune et de la flore aquatiques. Le déversement de ces eaux représente une source mondiale majeur de pollution (Environnement Canada, 1996). Cette contamination aquatique consiste en un mélange complexe de substances chimiques parmi lesquelles on retrouve des éléments nutritifs, des ions majeurs, des métaux ainsi que des substances organiques (tableau 1) (Environnement Canada, 1996). On peut aussi y trouver du pétrole et des graisses, des virus ou des bactéries pathogènes, des matières plastiques, des particules flottantes, des solides et des matières en suspension ou dissoutes qui augmentent la demande biologique en oxygène

(DBO) (Khan et Thulin, 1991, Ruffier, 1992). Les déchets industriels sont variés et dépendent des procédés utilisés par les usines dont ils proviennent. Les métaux lourds proviennent en général de l'exploitation minière et de la fonderie, les chlorophénols et les fongicides des usines de papier, plusieurs composés organiques proviennent de l'industrie chimique et les composés radioactifs proviennent des centrales nucléaires (Lester, 1987). D'autres substances, reconnues pour être toxiques et hautement bioaccumulables, semblent être omniprésentes et ont été détectées à des concentrations significatives par rapport aux critères de qualité pour la prévention de la contamination des organismes aquatiques. C'est le cas pour les biphényles polychlorés (BPC), les dioxines et les furannes chlorés, et dans une moindre mesure, pour le mercure. Ces substances peuvent contaminer la chair ou les tissus des poissons, mollusques et crustacés, les rendant impropres à une consommation sans restriction (Arkoosh et *al.*, 1998). Pour la faune terrestre piscivore, ces substances peuvent être plus dommageables puisque la quantité de poissons consommée par cette faune est plus élevée que celle consommée par les humains et qu'elle consomme les organismes en entier, incluant les tissus où la bioaccumulation est plus élevée que dans la chair (Ministère de l'environnement du Québec et environnement du Canada, 2001).

Les toxiques rejetés via les effluents municipaux traités par les stations d'épuration peuvent donc entraîner de nombreux problèmes pour la faune aquatique en raison de la résistance complète ou partielle à leur élimination ou biodégradation durant le processus de traitement des eaux (Desbrow et *al.*, 1998). Aussi, des bactéries, telle qu'*Escherichia coli*, peuvent contribuer de manières significatives à augmenter la biodisponibilité de certains toxiques préalablement conjugués en plus d'apporter diverses génotoxines (Desbrow et *al.*, 1998).

1.2 Contaminants retrouvés dans les effluents municipaux

Tableau 1 : Substances fréquemment détectées dans les eaux usées municipales (Environnement Canada, 1996)

<u>Éléments nutritifs</u>	<u>Ions majeurs</u>	<u>Métaux</u>	<u>Substances organiques</u>
Azote ammoniacale	Chlorures	Aluminium	BPC, HAP
Nitrites et nitrates	Fluorures	Arsenic	Dioxines, furannes
Phosphores	Sulfates	Bore	Pesticides
		Cuivre	Surfactants anioniques
		Fer	
		Mercure	
		Zinc	

1.2.1 Éléments nutritifs

Les éléments nutritifs sont des éléments chimiques ou des composés simples formés de ces éléments (ex., les composés azotés ou phosphorés), qui sont essentiels à la croissance et à la reproduction des plantes (Environnement Canada, 1996). Certains polluants inorganiques ne sont pas particulièrement toxiques, mais sont un danger pour l'environnement car ils sont employés d'une façon trop intensive. C'est dans cette catégorie que se situe les engrais, tels que les nitrates et les phosphates. Les nitrates et les phosphates augmentent le développement des algues dans l'eau de surface, de ce fait le niveau de l'oxygène de l'eau diminue causant ainsi l'eutrophisation du milieu. Le nitrate peut aussi être transformé en une substance cancérigène, les nitrosamines (Ruffier, 1992). L'ammoniaque est quant à lui un des polluants le plus commun retrouvé dans les rejets d'eaux usées (Environnement Canada, 1996).

1.2.2 Métaux lourds

De nombreux métaux sont essentiels à la vie (ex., cuivre, zinc, fer), mais sont toxiques à fortes doses. D'autres, comme le cadmium, le plomb et le mercure, ne sont pas essentiels aux organismes vivants et ont un pouvoir toxique à des concentrations relativement faibles (Burns et al., 1996). Le cuivre, l'aluminium, l'arsenic et le sélénium sont d'autres métaux présents dans l'environnement aquatique pouvant affecter la santé des poissons. Les principales sources

anthropiques de métaux sont les diverses sources ponctuelles industrielles, y compris les activités d'exploitation minière actuelles et passées, les fonderies, les fours de fusion et les incinérateurs (Environnement Canada, 1996). Les métaux lourds sont considérés comme les plus puissantes substances immunotoxiques parmi les produits inorganiques. Ils sont toxiques et immunomodulateurs à de très faibles concentrations (Kouassi et *al.*, 2001).

1.2.3 Polluants organiques persistants

Les composés organiques qui sont dangereux pour l'environnement sont tous d'origine synthétique et n'existent que depuis le siècle dernier. Les polluants organiques persistants (POP) se caractérisent par leur toxicité, leur persistance dans l'environnement et leur bioaccumulation (Burns et *al.*, 1996). En général, il s'agit de composés organochlorés et d'autres composés organiques synthétiques qui sont utilisés comme pesticides (dieldrine, mirex, toxaphène) ou à d'autres fins (ex., BPC, DDT et TBT) (Environnement Canada, 1996). Les BPC, tout comme le DDT, a été interdit d'utilisation dans les années 70-80, mais est toujours présent dans l'environnement, y compris dans l'écosystème fluvial, car ses processus de dégradation ou de transformation en substances inoffensifs sont très lents (Voccia et *al.*, 1999). Ce sont des sous-produits accidentels (ex., dioxines et furannes) ou des dérivés d'une combustion incomplète, soit naturellement, soit à la suite d'activités humaines (ex., HAP) (Arkoosh et *al.*, 1998). Le 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) représente la dioxine la plus toxique et peut causer des cancers, avoir des effets sur la reproduction et sur le système immunitaire. D'autres POP sont des métabolites toxiques dérivés d'un composé d'origine (ex., le DDE et le DDD qui proviennent du DDT). Les POP sont caractérisés par leur faible solubilité dans l'eau, leur grande solubilité dans les graisses et, dans bien des cas, leur grande volatilité (Burns et *al.*, 1996). Ils sont transportés dans l'eau, en général, liés à des particules organiques pouvant se fixer dans les tissus adipeux des organismes. Les émissions anthropiques sont associées à des procédés industriels, à l'utilisation et à l'application de pesticides ou de certains produits, à l'élimination de déchets, à des fuites ou à des déversements, ainsi qu'à la combustion de produits pétroliers et de déchets (Environnement Canada, 1996). Les pesticides peuvent être groupés en trois classes générales, soit les insecticides, spécialement les organochlorés, les organophosphorés et les carbamates, les

herbicides et les fongicides (Voccia *et al.*, 1999). Les surfactants sont des molécules organiques qui entrent dans la composition de centaines de produits utilisés, dont les agents nettoyants autant à des fins domestiques qu'industriels (Arukwe *et al.*, 1999). Les nonylphénols et les alkylphénols polyéthoxylates (APEOs), présents dans les effluents, représentent le deuxième groupe le plus important de surfactants non ioniques dans la production industrielle (Yadatie et Male, 2001). Leurs effets biologiques aux concentrations constatées dans l'environnement sont peu connus, si ce n'est leur activité en tant que xénoestrogène (Stoffel *et al.*, 2000).

1.2.4 Médicaments

Plusieurs dizaines de milliers de médicaments différents sont rejetés dans les eaux usées chaque année. Après consommation, les substances pharmaceutiques sont excrétées par les patients sous forme métabolisées ou non, et se retrouvent ainsi dans les eaux usées et ensuite, selon leur biodégradabilité, dans l'environnement. Certains de ces médicaments sont des substances oestrogéniques qui perturbent le système endocrinien en mimant complètement ou partiellement l'action d'hormone spécifiques telles que les oestrogènes. Ces substances bloquent et modifient la liaison de l'hormone à son récepteur ainsi que la production d'hormones naturelles et interfèrent avec la fabrication et la fonction des récepteurs hormonaux (Mémoire Escarné, 2001). Cette activité oestrogénique peut être expliquée par la présence d'hormones naturelles (17 β -estradiol et oestrone) et, à un degré moindre, aux hormones synthétiques dérivant d'agents contraceptifs (17 α -éthinylesttradiol) (Vos *et al.*, 2000). Le p-nonylphenol et le bisphenol A sont aussi des modulateurs endocriniens, puisqu'ils peuvent interagir avec les récepteurs oestrogéniques chez les organismes aquatiques (Gagné *et al.*, 2001). Les modulateurs endocriniens incluent aussi des composés de plusieurs classes chimiques, tels que les métaux lourds, les BPC, dioxines, etc. (Fournier *et al.*, 2000a).

1.2.5 Sédiments contaminés

Des métaux ou des POP dont la toxicité est préoccupante peuvent être présents sous forme dissoute ou liés à des particules. Les produits chimiques peu solubles dans l'eau se trouvent principalement fixés à des matières particulaires (Environnement Canada, 1996). Les sédiments sont en général considérés comme des réservoirs où les contaminants s'accumulent avec le temps. Une fois dans les sédiments, les produits chimiques sont habituellement moins accessibles aux organismes ou au transport vers d'autres secteurs, à moins qu'ils ne soient remis en suspension à la suite de perturbations (Environnement Canada, 1996). Cependant, les organismes benthiques peuvent être exposés à la contamination et représenter un vecteur important qui permet aux contaminants des sédiments d'entrer dans les chaînes alimentaires. Les effets imputables aux sédiments contaminés sont semblables à ceux décrits dans le cas des POP, des métaux lourds et des hydrocarbures.

D'après le ministère de l'environnement du Québec, il y a pour quelques substances des dépassements fréquents des critères de qualité dont certains atteignent de fortes amplitudes. C'est le cas pour l'azote ammoniacal, le phosphore, le sulfure d'hydrogène, l'aluminium, l'argent, le chrome, le cuivre, deux insecticides (le diazinon et le chlorpyrifos) et plus particulièrement pour les surfactants (Environnement Canada, 1996).

CHAPITRE 2 : STATIONS D'ÉPURATION MUNICIPALES

Les stations d'épuration des eaux usées de 2 des 3 plus grands centres urbains du Québec sont à l'étude, soit celle de la région de Gatineau et celle de la communauté urbaine de Montréal.

2.1 Station d'épuration des eaux usées de la région de Gatineau

Située à la limite ouest du Québec, la région de Gatineau regroupe 4.5% de la population du Québec. L'usine d'épuration régionale de la communauté urbaine de Gatineau a été mise en service au mois d'octobre 1982. Elle occupe un site de 135 acres dans l'ancien village de Templeton (Gatineau) et traite les eaux usées des municipalités de la région de Gatineau. Au cœur même de son territoire se retrouve la rivière des Outaouais, qui reçoit les rejets d'eaux usées de la station d'épuration de Gatineau (Ministère de l'environnement du Québec et Environnement Canada, 2001). La rivière des Outaouais est le principal tributaire du fleuve St-Laurent. Ses charges toxiques ont donc une importance capitale sur celles du fleuve St-Laurent. Le cours principal de la rivière des Outaouais est le deuxième corridor récréo-touristique en importance après le fleuve St-Laurent. L'usine déverse dans la rivière des Outaouais un débit de l'ordre de 136 000 m³/jour et de 400 000 m³/jour lors de fortes précipitations ou du dégel printanier, assurant ainsi la desserte de 230 000 personnes. Les sources de ces eaux sont multiples, soit commerciales, institutionnelles, résidentielles, sanitaires, eaux de ruissellement. Il y a un très faible apport des eaux usées industrielles de la région (Environnement Canada, 1996).

2.2 Procédés de traitements des eaux usées de la région de Gatineau (Données tirées du rapport produit en 1997 par la firme Axor-Experts Conseils inc.)

Il s'agit d'un traitement biologique des eaux usées dont le principe est de faire dégrader les substances organiques présentes dans l'eau par les microorganismes qu'elles

contiennent et que l'on cultive à cet effet. Les boues biologiques résultent de la transformation des matières organiques contenues dans les eaux usées. Le principe est d'introduire de l'eau résiduaire dans un réacteur, où est entretenu une culture bactérienne (boue active) aérobie en suspension. Les bactéries se développent dans des bassins alimentés d'une part en eaux usées à traiter et d'autre part en oxygène par des apports d'air.

2.2.1 Description de la chaîne de traitement liquide

Les eaux sont acheminées vers l'usine d'épuration par un intercepteur gravitaire. À leur arrivée les solides grossiers sont d'abord enlevés dans les deux dégrilleurs. Les eaux usées sont pompées par la suite dans le canal principal. L'affluent se sépare en amont des deux dessableurs.

Les eaux usées ainsi prétraitées sont ensuite acheminées dans les deux décanteurs primaires. La décantation primaire est un traitement physico-chimique qui permet d'éliminer environ 70% des matières en suspension. Ces matières en suspension se déposent au fond du bassin, ce qui forment les boues primaires. L'effluent des décanteurs est ensuite dirigé vers les bassins d'aération du traitement secondaire. L'aération est un traitement biologique qui permet la dégradation, par des micro-organismes retrouvés naturellement dans l'eau, des matières organiques.

Le liquide des bassins est ensuite acheminé dans les trois décanteurs secondaires. Lors de la décantation secondaire, il y a clarification, ce qui permet de séparer, par décantation, l'eau épurée et les boues biologiques.

L'effluent traité est ensuite combiné avec toutes les dérivations avant de passer dans un dernier canal près du bâtiment de chloration. De ce dernier canal, l'effluent traité est

ensuite acheminé vers la rivière Outaouais par l'émissaire existant de 2750 mm de diamètre.

2.2.2 Description de la chaîne de traitement des boues

Les déchets en provenance des dégrilleurs et des dessableurs sont transportés pour leur disposition finale dans un site d'enfouissement sanitaire. Seule la boue secondaire est envoyée dans les épaisseurs. Ceci a pour objectif de réduire leur volume par épaissement et de diminuer leur pouvoir de fermentation par stabilisation biologique et thermique. La boue est donc transformée en granules fertilisants.

2.3 Station d'épuration des eaux usées de la communauté urbaine de Montréal (Données tirées du rapport produit en 2002 par Purene)

La station d'épuration des eaux usées de la communauté urbaine de Montréal (CUM) traite un volume d'eaux représentant 50% des eaux usées traitées du Québec. Avec sa capacité d'environ 7,6 millions de mètres cubes par jour, il s'agit, jusqu'à maintenant, de la plus importante station de traitement primaire physico-chimique en Amérique. La CUM traite quotidiennement un débit de l'ordre de 2 500 000 m³ d'effluents et en temps de pluie de l'ordre de 7 600 000 m³. La station d'épuration de la CUM est localisé à la pointe est de l'île et déverse ses eaux usées dans le fleuve St-Laurent à l'île aux Vaches, via un émissaire de 4,4 Km (Boulay et Boulay, 1999). Les eaux sont traitées par un procédé physico-chimique. Ce traitement favorise l'élimination d'une proportion importante de matières en suspension ainsi que des toxiques qui y ont adhéés.

2.4 Procédés de traitements des eaux usées de la communauté urbaine de Montréal (Données tirées du rapport produit en 2002 par Purene)

Les réseaux de drainage sont développés en un système séparatif. Celui-ci est constitué d'un égout collecteur sanitaire pour le captage des eaux usées résidentielles, industrielles, commerciales et institutionnelles et d'un égout collecteur pluvial qui sert à capter les eaux de pluie. Les eaux usées sont acheminées jusqu'à la station via les intercepteurs nord, sud-ouest et sud-est.

2.4.1 Pompage

Les eaux usées acheminées à la station par les intercepteurs nord, à 27 mètres de profondeur, et sud-est, à 43 mètres de profondeur, sont relevées au niveau du sol à la station de pompage. La station de pompage, avec ses 17 pompes de puissance variant de 2800 à 5150 chevaux-vapeur, est considérée comme l'une des plus importantes en usage dans le monde.

2.4.2 Dégrillage

C'est dans la salle des grilles du bâtiment de prétraitement que s'effectue l'opération de dégrillage des eaux usées. Huit grilles retiennent les plus gros solides contenus dans les eaux usées. Les résidus captés par des barreaux légèrement inclinés et espacés de 25 millimètres sont transportés par convoyeurs vers des presses rotatives pour en réduire le volume et le contenu en humidité. Les résidus de dégrillage sont ensuite transportés par camion vers un site d'enfouissement sanitaire.

2.4.3 Dessablage

Le dessablage est réalisé à l'aide de 14 dessableurs aérés, ayant chacun 7,6 mètres de largeur sur 67 mètres de longueur. L'opération de dessablage a pour fonction d'enlever les matières abrasives, sables et autres particules lourdes, qui pourraient endommager les équipements mécaniques de traitement des boues et embourber les canaux et les bassins.

2.4.4 Traitements physico-chimique

Cette partie du traitement n'a été mise en service continu qu'à partir de la mi-septembre 1988. La Station d'épuration des eaux usées ajoute une étape au procédé pour réduire le phosphore se trouvant dans ces eaux. Un coagulant, le chlorure ferrique ou l'alun, est ajouté en amont des grilles pour déstabiliser les fines particules. Un polymère anionique injecté à la sortie des dessableurs permet d'agglomérer ainsi les particules déstabilisées pour en faire des floccs, qui sédimenteront rapidement dans les décanteurs. Ces produits chimiques sont injectés respectivement de façon proportionnelle à la charge de phosphore total et au débit d'eau brute. En plus de l'enlèvement du phosphore, la déphosphatation chimique aurait un effet bénéfique sur l'enlèvement des métaux. Par contre, elle semble entraîner une augmentation de la concentration du métal utilisé comme coagulant (Ministère de l'Environnement du Québec et Environnement Canada, 2001).

Les floccs et les autres matières se déposant au fond des décanteurs forment les boues. Les matières flottant en surface des décanteurs sont les écumes. Ces boues et écumes sont pompées vers le bâtiment des boues pour y être traitées.

L'effluent de la Station est déversé dans le fleuve Saint-Laurent par deux émissaires parallèles, chacun de six mètres de diamètre sur environ quatre kilomètres de longueur. Les eaux traitées se jettent dans le chenal de navigation du fleuve, en face de l'île aux Vaches (Boulay et Boulay, 1999).

2.5 Problématique de la désinfection au chlore

On révèle l'absence de désinfection des effluents municipaux de ces stations, les systèmes utilisant la chloration étant proscrits. En effet, les concentrations de chlore qui persistent dans les eaux usées après leur désinfection ont un effet toxique sur la vie aquatique. La chloration des eaux usées traitées entraîne la formation de substances potentiellement cancérigènes pour l'humain, tels que les trihalométhanes (Grizzle et *al.*, 1988).

En dernière étape de traitement, il était prévu d'effectuer une désinfection des eaux traitées à l'aide d'hypochlorite de sodium avant leur rejet au fleuve. Le moratoire du gouvernement du Québec sur la désinfection des eaux usées traitées au chlore a reporté l'utilisation de ce traitement. Depuis sa mise en service, les stations n'effectuent pas de désinfection. Environ 50 % des coliformes sont retirés présentement des eaux usées par le traitement physico-chimique, ce qui ne permet toutefois pas la baignade et les activités de contact dans la partie du fleuve influencée par le panache de diffusion de l'émissaire. De plus, il y a des débordements des réseaux d'égouts (par les déversoirs) au moment de fortes précipitations et du dégel (Purenne, 2002).

CHAPITRE 3 : PROCÉDÉS DE DÉSINFECTION DES EAUX USÉES TRAITÉES

3.1 Problématique concernant les eaux usées traitées non désinfectées

Les interventions en assainissement municipal réalisées au Québec depuis 1979 ont eu des effets positifs sur la qualité des cours d'eau. Les stations d'épuration construites dans le cadre de ces programmes d'assainissement ont été conçues de façon à réduire particulièrement les principaux contaminants des eaux usées municipales, soit les paramètres conventionnels (DBO, MES, phosphore et coliformes fécaux) (Ministère de l'environnement, 2001). Le traitement des eaux usées non-désinfectées enlèvent une partie des toxiques, mais une concentration élevée de ces composés, tels que les BPC, HAP, surfactants, solvants et métaux, est suffisamment élevée pour être un problème environnemental (Kosmala et *al.*, 1998). Bien que ces stations puissent atteindre un certain rendement à l'égard de l'enlèvement des autres contaminants potentiellement présents dans les eaux usées municipales, elles ne peuvent les éliminer complètement. Il est démontré qu'il y a perturbation des caractéristiques de la reproduction chez les poissons et les mollusques près des émissaires d'eaux usées, suivant une perturbation de leur système endocrinien et immunitaire (Kouassi et *al.*, 2001). Ces répercussions se font généralement sentir à l'échelle locale, avec certaines conséquences transfrontalières. La gestion des eaux usées est importante pour la protection de la santé et de l'environnement des citoyens et pour le développement durable du pays. Les impacts des eaux usées traitées non-désinfectées peuvent amener à la restriction des usages récréatifs (ex., fermetures de plages), de la consommation de poissons et de mollusques et de la consommation d'eau potable, ainsi qu'à l'enrichissement en substances nutritives conduisant au développement indésirable d'algues et à l'eutrophisation des plans d'eau, à la dégradation de l'esthétique, à la dégradation et la perte de l'habitat du poisson et de la faune, ainsi qu'à la réduction des populations aquatiques et fauniques (Ministère de l'environnement, 2001).

L'absence de procédés de désinfection des effluents municipaux des stations d'épuration de la région de Gatineau et de la CUM est un des principaux problèmes de la qualité de l'eau au Québec. À elle seule, la station de la CUM, qui compte pour 50% de la capacité de traitement de l'eau de tout le Québec, rejette dans le fleuve St-Laurent les eaux non-désinfectées de 1,8 million de personnes (Purenne, 2002). Au Québec, 60 % des eaux usées traitées sont rejetées sans désinfection. Ces rejets représentent une source de contamination bactériologique et toxique de première importance du fleuve Saint-Laurent (Environnement Canada, 1996).

La désinfection est nécessaire quand des usages récréatifs doivent être protégés dans le cours d'eau recevant les eaux traitées. Une telle désinfection est effectuée dans 40 % des stations d'épuration des eaux usées. Elle est exigée par le ministère de l'Environnement lorsque la protection des usages le requiert, seulement durant les périodes de l'année où cela est nécessaire. Seuls les moyens de désinfection qui ne présentent pas d'effets nocifs pour la vie aquatique et qui ne génèrent pas de sous-produits indésirables pour la santé humaine sont admis (Ministère de l'environnement, 2001).

3.2 Désinfection à l'ozone

L'ozone est un gaz instable que l'on doit générer sur place, dans les stations d'épuration, au moyen d'une décharge électrique produite dans de l'air ou de l'oxygène. L'opération consiste à transformer l'oxygène sous forme «O₂» en oxygène sous forme «O₃». Cette transformation est catalysée par le contact avec des surfaces solides ou des substances chimiques, ainsi que sous l'effet de la chaleur. Parmi les avantages de l'ozone, citons son action très rapide et efficace sur les bactéries et les virus (Gerh et Nicell, 1996). L'ozonation ne nécessite aucun transport de produits chimiques et est plus sécuritaire pour le personnel de la station d'épuration que la chloration.

Au plan environnemental, l'ozonation des eaux usées constitue une solution avantageuse car la matière organique est oxydée à l'oxygène plutôt qu'au chlore, ce qui prévient ainsi la formation de produits organochlorés. Aussi, même si l'ozone résiduel est très toxique pour la vie aquatique, il est rarement trouvé en quantité significative après la désinfection des eaux usées car l'ozone résiduel réagit très rapidement avec les différentes substances contenues dans les eaux (Gehr et *al.*, 2003). De toute façon, parce qu'il est instable, l'ozone résiduel est rapidement détruit. Les désavantages de l'ozonation des eaux usées sont essentiellement d'ordre économique, puisqu'elle entraîne des coûts élevés d'investissement et d'exploitation (Gehr et *al.*, 2003). L'ozonation est donc un moyen de désinfection des eaux usées intéressant, mais ses coûts la rendent généralement peu attrayante.

3.3 Désinfection au rayonnement ultraviolet

Le rayonnement ultraviolet pour la désinfection des eaux usées constitue une technique de plus en plus répandue. Elle consiste à faire passer les eaux dans un canal ouvert muni de lampes à rayons ultraviolets. Les principaux avantages de cette technologie sont que les UV n'ont pas d'impact notable sur l'environnement car ils ne nécessitent aucun ajout de produit chimique et ne forme pas de sous-produits, de même que la simplicité et la sécurité d'exploitation comparativement aux méthodes chimiques (Tremblay, 2002). De plus, son efficacité semble être supérieure à la chloration pour inactiver les virus puisque les longueurs d'ondes émises permettent de pénétrer le noyau des cellules et l'ADN, afin d'inactiver les micro-organismes (Gehr et *al.*, 2003). Toutefois, l'efficacité de cette technologie diminue lorsque la concentration en matières en suspension augmente. Au plan économique, les coûts se situent dans une gamme comparable aux systèmes de chloration. Le rayonnement ultraviolet est donc un moyen de désinfection très intéressant. Si on le compare à la chloration, on se rend compte, qu'à coûts comparables, le rayonnement ultraviolet est plus efficace pour inactiver les virus, plus sécuritaire pour le personnel de la station d'épuration, de même que pour le public (aucun transport de produits chimiques) et moins dommageable pour l'environnement (Gehr et *al.*, 2003).

3.4 Désinfection à l'acide péracétique

L'acide péracétique (PAA) est un fort désinfectant avec un large spectre d'activités antimicrobiennes (Kitis, 2004). Due à l'efficacité de ses activités antibactérienne, antivirale et fongicide démontrée par plusieurs industries, l'utilisation de l'acide péracétique comme désinfectant des eaux usées a retenue beaucoup d'attention ces dernières années. Les avantages de l'acide péracétique sont la facilité d'implantation du traitement, l'absence de toxiques, de résidus mutagènes et de sous-produits persistants ainsi qu'un temps de contact très court (Wagner et *al.*, 2002). Les principaux désavantages associés à l'utilisation de l'acide péracétique sont l'augmentation des composés organiques dans les effluents due à l'acide acétique (AA) ainsi qu'au potentiel de recroissance microbienne, l'acide acétique étant déjà présente dans les eaux usées et aussi formée après la décomposition de APP. Il y a aussi un coût élevé à son utilisation, ce qui est dû en partie à la production mondiale limité d'APP (Kitis, 2004).

CHAPITRE 4 : BIOINDICATEUR : TRUITE ARC-EN-CIEL (*Oncorhynchus mykiss*)

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) provient de l'ouest de l'Amérique du Nord, essentiellement de l'ouest des montagnes rocheuses. Cependant cette espèce fréquente désormais les eaux de toutes les provinces canadiennes à la suite de diffusion tant intentionnelles que non délibérés (Environnement Canada, 1990). Ce poisson prospère dans la plupart des eaux froides et douces (lacs, ruisseaux et cours d'eau). La truite arc-en-ciel a été introduite dans le monde entier avec beaucoup de succès et est sans doute aujourd'hui l'espèce de salmonidés la plus répandue (Environnement Canada, 1990). La truite arc-en-ciel est également devenue, dans le monde entier, le poisson d'eau froide étalon pour les études sur la pollution des eaux douces et la recherche en toxicologie aquatique. Son élevage est bien implanté dans les écloséries et les établissements commerciaux d'aquaculture ce qui en facilite grandement sa disponibilité et son coût peu élevé. Une banque de données toxicologiques d'une ampleur appréciable a été constituée pour cette espèce (Environnement Canada, 1990). Son système immunitaire bien étudié et sa sensibilité éprouvée aux contaminants aquatiques font aussi d'elle un choix logique pour des essais de toxicité normalisés en eau douce et froide.

CHAPITRE 5 : SYSTÈME IMMUNITAIRE

5.1 Les organes lymphoïdes

5.1.1 Les organes lymphoïdes centraux

Les leucocytes sont issus des cellules souches hématopoïétiques totipotentes, présentes successivement dans le sac vitellin, le foie et la rate chez l'embryon puis la moelle osseuse chez l'enfant et l'adulte. Les cellules hématopoïétiques totipotentes se différencient en progéniteurs déterminés, à l'origine de toutes les cellules sanguines, soit les hématies, plaquettes, monocytes, macrophages, lymphocytes pro-T et lymphocytes pro-B. Les cellules souches hématopoïétiques se différencient en cellules souches lymphoïdes qui donnent naissance aux lymphocytes pro-T et aux lymphocytes pro-B (Janeway et Travers, 1997).

Les organes lymphoïdes centraux sont les organes de maturation et le site majeur de la lymphopoïèse. À partir des lymphocytes pro-T issues de la moelle osseuse, le thymus produit les lymphocytes T alors que c'est dans la moelle osseuse elle-même qu'a lieu la différenciation et la maturation des lymphocytes pro-B (Roitt, 1990). Au cours de leur développement dans les organes lymphoïdes centraux, les leucocytes se différencient et vont acquérir leur compétence. C'est là que seront sélectionnées les cellules utiles, soit celles qui possèdent la capacité de reconnaître les antigènes étrangers à l'organisme. À l'issue de leur maturation, les leucocytes sélectionnés sont libérés dans la circulation sanguine.

5.1.2 Les organes et tissus lymphoïdes périphériques

Ces organes reliés entre eux par la circulation sanguine et la circulation lymphatique sont les ganglions lymphatiques, la rate ainsi que des accumulations de tissu lymphoïde distribué principalement au niveau des muqueuses, le système immunitaire commun aux muqueuses ou MALT 9 (Mucosa-associated lymphoïd tissue) (Janeway et Travers, 1997). Ce sont les organes dans lesquels se déroulent les réactions immunitaires. Les lymphocytes T et B sont prêts à proliférer en réponse aux diverses stimulations antigéniques. Ces organes et tissus sont colonisés

par les leucocytes immunocompétents produits dans les organes centraux. Leur organisation permet les interactions de l'antigène avec les cellules. Les organes lymphoïdes secondaires assurent une partie importante du renouvellement des cellules immunitaires au cours des divisions cellulaires qui sont déclenchées par la reconnaissance de l'antigène et ont pour but d'amplifier la réponse immunitaire une fois qu'elle a été initiée (Janeway et Travers, 1997).

5.2 Les cellules de l'immunité

5.2.1 Les lymphocytes

Les lymphocytes sont présents dans le sang, la lymphe et tous les organes lymphoïdes. Dans le sang, ils représentent 20 à 40 % des leucocytes (McGeown, 2003). Les lymphocytes ont une taille variable. On distingue parfois les petits lymphocytes qui ont le diamètre d'un globule rouge (6 à 8 μ) et les grands lymphocytes, de 10 à 15 μ de diamètre.

Ce sont des cellules à noyau arrondi ou ovoïde. La chromatine est dense, sans nucléole. Les lymphocytes sont divisés en deux sous-populations, soit les cellules B qui mûrissent en cellules plasmiques produisant des anticorps spécifiques et les cellules T, qui contribuent à la régulation des fonctions des cellules B (Janeway et Travers, 1997). Les cellules T regroupent les cellules T auxiliaires, qui favorisent les fonctions effectrices des cellules B ou T et les cellules T cytotoxiques qui lysent les cellules. Le récepteur pour l'antigène des lymphocytes B, le BCR (B cell receptor), une immunoglobuline membranaire (Igm) (Kouassi et *al.*, 2001). À la surface de chaque lymphocyte B on trouve environ 10^5 molécules de BCR. Toutes ces molécules sont identiques puisque chaque lymphocyte B ne synthétise qu'une seule variété d'Igm. Par leur BCR, les lymphocytes B reconnaissent directement les antigènes, qu'ils soient solubles et circulant dans le milieu intérieur ou qu'ils soient particuliers (parasite, bactérie, virus ou cellule). Les lymphocytes B expriment les molécules du CMH de classe I et les molécules CMH de classe II, ce qui en fait des cellules présentatrices d'antigènes (Janeway et Travers, 1997). Les lymphocytes B possèdent également des récepteurs CR (complement receptor) pour le composant C3 du complément et des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines G (RFc Igm). Le

récepteur pour l'antigène des lymphocytes T est le TCR (T cell receptor). Contrairement aux lymphocytes B, le récepteur des lymphocytes T ne reconnaît que des antigènes protéiques. Ces protéines doivent être découpées en peptides pour être ensuite associées à des molécules de CMH. Les lymphocytes T expriment également à leur surface la molécule CD3, qui module la transduction du signal, étroitement associée au TCR qui module la reconnaissance de l'antigène (Roitt, 1990). Les lymphocytes T expriment aussi la molécule CD2, un facteur d'adhésion qui se lie au récepteur LFA3 des cellule présentatrices d'antigène. On distingue deux populations principales de lymphocytes T d'après la présence de protéines membranaires spécifiques : les lymphocytes CD8 et CD4. Les lymphocytes T CD8 sont les lymphocytes cytotoxiques (lymphocytes Tc). Ils reconnaissent l'antigène présenté par une molécule CMH de classe I. Les antigènes présentés sont des antigènes endogènes, produit par la cellule. La reconnaissance est le premier signal d'activation. Un second signal permet l'expression du pouvoir cytotoxique du lymphocyte Tc. Les lymphocytes T CD4 sont des lymphocytes helpers ou auxiliaires (lymphocytes Th) (Janeway et Travers, 1997). Ces derniers reconnaissent l'antigène si celui-ci leur est présenté par une molécule CMH de classe II. Les antigènes présentés sont des antigènes exogènes qui ont été endocytés par les cellules présentatrices d'antigènes. Ils ont pour rôle d'activer les macrophages, les lymphocytes B et Tc. Les lymphocytes Th se différencient soit en Th1 soit en Th2. Les lymphocytes Th1 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation cellulaire. Les lymphocytes Th2 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation humorale (Kouassi et *al.*, 2001).

5.2.2 Les cellules cytotoxiques naturelles

Les cellules NK (Natural Killer), ou cellules tueuses naturelles, sont des lymphocytes ne portant aucun marqueur B ou T. Ce sont de grandes cellules qui contiennent un cytoplasme granulaire. Elles sont mononucléées (pléomorphisme) et n'ont pas de vacuoles (McGeown, 2003). Ces cellules exercent un effet cytotoxique direct sur les cellules anormales, soit les cellules infectées par des virus ou des cellules cancéreuses (Kouassi et *al.*, 2001). Un récepteur membranaire détecte l'absence de molécules CMH de classe I à la surface des cellules cibles. Les cellules NK expriment également des récepteurs pour le fragment Fc des IgG (RFc Ig), des anticorps

reconnaissant un antigène fixé sur la cellule cible, permettant la fixation de la cellule NK et son activité cytotoxique (Janeway et Travers, 1997). Il s'agit de la cytotoxicité cellulaire anticorps dépendant ou ADCC (antibody-dependant cell cytotoxicity). Elles sont capables de reconnaître les changements qui se produisent à la surface des cellules infectées par certains virus et de certaines cellules tumorales, et d'induire spontanément la lyse des cellules (Brousseau et *al.*, 1998). Chez les vertébrés, elles sont localisées dans le sang et dans la rate. Elles jouent aussi un rôle dans le développement des Th-1 par le relâchement d'IFN- γ .

5.2.3 Les cellules présentatrices d'antigènes

Toutes les cellules nucléées de l'organisme, exprimant les molécules CMH classe I, sont aptes à présenter l'antigène aux lymphocytes cytotoxiques (Tc). Ce ne sont pas des cellules présentatrices de l'antigène (CPA), mais des cellules cibles puisque la reconnaissance est la première étape de leur destruction (Janeway et Travers, 1997). Les CPA sont des cellules diverses qui ont en commun la faculté d'exprimer les molécules CMH de classe II. Ces cellules peuvent endocyter les antigènes protéiques, les découper en peptides, les associer aux molécules CMH de classe II. L'ensemble migre vers la membrane cytoplasmique pour être présenté aux lymphocytes T auxiliaires. La plupart des CPA expriment également sur leur membrane des molécules d'adhésion ICAM ou LFA3 (Janeway et Travers, 1997).

5.2.4 Les monocytes et macrophages

Les principales cellules présentatrices d'antigènes sont les phagocytes mononucléés, comprenant les monocytes et les macrophages. Les monocytes, précurseur médullaire et forme circulante dans sont de grandes cellules de 15 à 20 μ de diamètre. Leur noyau est irrégulier, réniforme parfois lobé mais non segmenté. Le cytoplasme est de forme très irrégulière et contient de nombreuses et fines granulations (McGeown, 2003). Les macrophages (forme tissulaire) adoptent des morphologies spécifiques de l'organe où ils ont élu domicile : les histiocytes du tissu conjonctif, les cellules de Kupffer du foie, les macrophages alvéolaires du poumon, les astrocytes du système nerveux central. Outre la présentation d'antigène, ces cellules ont des fonctions au

niveau de la phagocytose, de la production de cytokines et autres facteurs d'immunomodulation comme les leucotriènes et les lipoxygénases (Secombes et Fletcher, 1992). Morphologiquement. Les monocytes/macrophages possèdent les caractéristiques suivantes, soit la présence à la membrane de molécules du CMH de classe II et la présence à la membrane de récepteurs de type I et II (CD64 et CD32) pour le Fc des IgG et pour certains fragments de clivage de C3 (pour l'opsonisation et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps) (Janeway et Travers, 1997).

5.2.5 Les cellules Dendritiques

Il y a aussi les cellules dendritiques présentes dans les zones T des tissus lymphoïdes : les cellules de Langerhans de la peau captent l'antigène et le transportent par voie lymphatique vers les zones T des tissus lymphoïdes où elles se différencient en cellules dendritiques. Les cellules dendritiques se caractérisent par une morphologie étoilée, avec des ramifications permettant un contact optimal avec les substances ou microorganismes pénétrant dans l'organisme (McGeown, 2003). Elles ont la capacité d'internaliser ceux-ci, de les modifier pour les présenter aux lymphocytes T. Elles expriment des molécules du CMH de classe I et de classe II, des molécules de co-stimulation (CD80/CD86) ou d'interaction avec les lymphocytes T (CD40) et peuvent produire des cytokines au contact de ceux-ci (Janeway et Travers, 1997, McGeown, 2003).

Les cellules dendritiques folliculaires des ganglions lymphatiques et de la rate possèdent des récepteurs pour le fragment Fc des IgG ou pour le fragment C3 du complément (Janeway et Travers, 1997). Grâce à ces récepteurs, elles peuvent fixer les complexes antigènes-anticorps et présenter l'antigène aux lymphocytes B, renforçant ainsi la production d'anticorps et la pérennité car ces antigènes peuvent persister plusieurs mois à la surface des cellules dendritiques folliculaires. Les cellules endothéliales ou épithéliales qui après stimulation par l'interféron γ , expriment les molécules CMH de classe II (Janeway et Travers, 1997).

5.2.6 Les granulocytes

Ce sont des cellules polynucléaires qui représentent la plus grande partie des leucocytes. Ces cellules ont un noyau multilobé, irrégulier et de nombreux granules intracytoplasmique (McGeown, 2003) Il y a trois types de granulocytes dont les neutrophiles, qui représentent près de 70 % des leucocytes. Les polynucléaires neutrophiles sont de taille moyenne (10 à 14 μ). Leur noyau a de 2 à 5 lobes, la chromatine est assez dense. Le cytoplasme est abondant et contient de fines granulations neutrophiles, marrons (McGeown, 2003).

Ces derniers sont impliqués dans la réponse inflammatoire aiguë et montrent une activité phagocytaire (Roitt, 1990). Les neutrophiles sont de première importance dans la défense naturelle et sont les plus nombreux dans le sang. Les éosinophiles représentent quant à eux environ 4 % des leucocytes et sont considérés importants pour la défense contre les infections parasitaires. Ce sont des cellules de taille moyenne (10 à 15 μ), comportant un noyau à 2 lobes réunis par un pont chromatinien incurvé. La chromatine est dense, il n'y a pas de nucléoles. Les basophiles, qui ne constituent pas plus de 1% des leucocytes, semblent participer à la protection des surfaces muqueuses (Janeway et Travers, 1997). Les polynucléaires basophiles ont un noyau assez volumineux, souvent incisé. Le cytoplasme et le noyau sont recouverts de grosses granulations (Janeway et Travers, 1997).

5.3 Les molécules du système immunitaire

5.3.1 Les anticorps

Les anticorps sont des immunoglobulines constituées de glycoprotéines comprenant quatre chaînes, deux chaînes lourdes identiques et deux chaînes légères identiques réunies entre elles par des ponts disulfure (Janeway et Travers, 1997). Les anticorps sont synthétisés par les plasmocytes avant d'être transportés dans le sang et la lymphe pour se lier à l'antigène afin de former des immuns complexes qui seront éliminés par les phagocytes.

5.3.2 Le système du complément

Le système du complément est constitué par un ensemble de protéines plasmatiques dont la C3 qui s'avère la plus importante en quantité et en activités, ainsi que de 5 protéines membranaires à fonctions régulatrices (Janeway et Travers, 1997). Sous l'effet d'une cascade de réactions et d'une boucle d'amplification, il est largement responsable de la lyse des cellules étrangères. Les conséquences physiologiques de l'activation du complément sont l'opsonisation, l'activation cellulaire et la lyse (Janeway et Travers, 1997).

5.3.3 Les molécules d'adhésion

Ces molécules sont exprimées par les cellules de l'immunité, soit en permanence ou induites par l'activation de la cellule ou par l'action de cytokines. Les molécules d'adhésion cellulaire interviennent dans la migration, l'activation et les fonctions effectrices des lymphocytes. Elles appartiennent à diverses classes moléculaires, les sélectines, les intégrines, d'autres appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Roitt, 1990). Les sélectines engagent l'interaction entre le leucocyte et l'endothélium vasculaire. Elles peuvent être exprimées soit sur les leucocytes, soit sur l'endothélium vasculaire. Les intégrines et les membres de la superfamille des Ig vont faire passer la cellule vers le tissu lymphoïde. Ces deux familles jouent un rôle important dans les interactions des lymphocytes avec les CPA et avec les cellules cibles (Kouassi et *al.*, 2001).

5.3.4 Les cytokines

Elles peuvent exercer leurs effets sur les cellules qui les ont produites (effet autocrine), sur d'autres cellules (effet paracrine) ou encore agissent à distance sur des organes ou tissus (effet endocrine). Ce sont de petites glycoprotéines (PM situé entre 10 et 50 kDa). On ne les trouve généralement pas dans les cellules au repos et elles ne sont produites qu'à la suite d'une activation. Les lymphocytes Th sont les principales cellules productrices, mais d'autres cellules

en produisent, tels que les macrophages, les CPA, les fibroblastes, les cellules de l'endothélium vasculaire et les cellules épithéliales (Janeway et Travers, 1997). Impliquées dans la régulation des fonctions immunitaires, elles interviennent aussi dans l'hématopoïèse, l'hémostase, le métabolisme, etc. Les principales cytokines sont les interleukines (IL-1 à IL-21), les interférons (IFN α , β et γ), les facteurs de croissance hématopoïétiques (les CSF), les facteurs de nécrose des tumeurs (TNF α et TNF β) et le facteur de croissance des tumeurs (TGF β) (Janeway et Travers, 1997).

5.4 Spécification du système immunitaire des poissons

Les téléostéens présentent des structures et des réponses immunitaires complexes se rapprochant de celles des vertébrés supérieurs (Esteban et *al.*, 1998). Il y a par contre des différences. Le poisson ne possède pas de moelle osseuse ni de ganglions lymphatiques. Chez les poissons osseux (Osteichthyes), les organes hématopoïétiques sont la rate, le rein antérieur et le thymus. Le rein de ces poissons représente l'organe hématopoïétique le plus actif ainsi que celui possédant le plus de leucocytes (Zapata et *al.*, 1996). Il joue un rôle au niveau de la filtration, d'où son implication dans le phénomène de rétention des antigènes.

La première ligne de défense est représentée par les cellules épithéliales recouvrant les branchies, la peau et l'intestin. Cet épithélium sécrète une couche de mucus qui contient des facteurs de défense humorale, tels que les anticorps, le complément et les lysozymes produits par les cellules du système immunitaire (Lamche et Burkhardt-Holm, 1999). Le lysozyme attaque spécifiquement les structures contenant de l'acide muramique et possède des propriétés antibactériennes, antivirales et antiparasitaires (Alexander et Ingram, 1992). La peau, qui est l'une des principales barrières aux invasions des micro-organismes, contient des éléments du système immunitaire. Les cellules immunocompétentes de la peau peuvent être résidentes, tels que les kératinocytes et les cellules endothéliales, recrutées, comme les monocytes et les granulocytes et finalement de type circulant, telles les cellules T et dendritiques (Salo, 2000). La peau des poissons est une membrane très délicate et diffère de celle des mammifères. La couche

extérieure, le cuticule, est acellulaire et très vulnérable aux attaques extérieures. Au niveau de l'épiderme des poissons, les cellules de malpighie sont les composantes cellulaires fondamentales et sont comparables aux kératinocytes de la peau des humains. Les cellules de malpighie sont capables de se diviser en toutes les couches cellulaires de l'épiderme et ne contiennent pas de kératine (Salo, 2002).

Toujours dans la première ligne de défense des poissons, la transferrine, une glycoprotéine pouvant se lier au fer, peut jouer un rôle important dans la résistance contre un grand nombre d'infections bactériennes. Les lectines, protéines qui reconnaissent spécifiquement et relient entre eux des déterminants hydrocarbonés de la surface cellulaire, peuvent avoir un rôle d'opsonisation au niveau de la première ligne de défense des poissons (Sanchez-Dardon *et al.*, 1999).

La morphologie des lymphocytes est similaire chez tous les vertébrés, mais il y a plusieurs variations de taille. Les cellules cytotoxiques naturelles (NCC) du poisson ressemblent aux cellules tueuses naturelles (NK) des mammifères (Evans *et al.*, 1984). Les trois types de granulocytes sont présents autant chez les mammifères que chez le poisson. Les poissons aussi produisent des cytokines. Au niveau de la deuxième ligne de défense, les interférons, des protéines ayant des propriétés antivirales, sont retrouvés chez les poissons et sont comparables à ceux des mammifères (Graham et Secombes, 1990). En effet, ces derniers induisent la synthèse de protéines à activité antivirale et inhibent la synthèse protéique et est en partie spécifique aux protéines virales empêchant ainsi la réplication de virus (Alexander et Ingram, 1992). La protéine C-réactive est un composant du sérum des poissons téléostéens. Cette protéine a pour fonction de s'agglutiner aux pathogènes et d'actionner le complément qui par la suite, déclenchera la phagocytose ou la lyse du pathogène, ce qui fait qu'elle est capable de déclencher la réponse naturelle. Les deux voies d'activation du complément, soit la voie classique et la voie alterne, sont présentes dans le système immunitaire des poissons téléostéens (Kaastrup et Koch, 1983). Les protéines de choc thermique (heat shock proteins, HSP) sont d'autres facteurs solubles présents dans le sérum des poissons (Zapata *et al.*, 1996).

5.5 Les types d'immunité

5.5.1 L'immunité naturelle

L'immunité naturelle, ou non-spécifique, est caractérisée par sa mise en jeu rapide. Cette immunité correspond à la deuxième ligne de défense chez les poissons (Salo, 2000). Elle comprend essentiellement deux types de réponses, soit la phagocytose, c'est-à-dire l'ingestion et la destruction des éléments étrangers et les réactions inflammatoires, c'est-à-dire la cascade de réactions qui surviennent en réponse à une blessure ou à une infection localisée et qui font intervenir, entre autres, des cellules capables de phagocytose (Brousseau et *al.*, 1998). Elle ne requiert pas une reconnaissance spécifique du pathogène. Cette immunité est primordiale pour les poissons et ces derniers dépensent beaucoup plus d'énergie pour cette immunité que pour l'immunité spécifique. Les phagocytes mononucléés, les neutrophiles, les voies du complément et les lymphocytes NK contribuent à l'immunité naturelle (Kouassi et *al.*, 2001).

5.5.2 L'immunité spécifique

Cette immunité est dirigée vers un agent par lequel l'organisme a déjà été sensibilisé. Il est prouvé que les poissons possèdent des lymphocytes analogues aux cellules B et T et par conséquent les réponses humorales et cellulaires. Elle est caractérisée par un ensemble de molécules de structure extrêmement diversifiée appartenant toutes à la superfamille des immunoglobulines (Ig), soit les anticorps, les récepteurs d'antigène des lymphocytes T et les molécules du CMH (Kouassi et *al.*, 2001). Cette immunité représente la troisième ligne de défense et est caractérisée par la spécificité de la réaction, la formation de cellules mémoires et par la reconnaissance du soi et du non-soi par les lymphocytes (Salo, 2000).

5.5.3 L'immunité humorale

Cette immunité est caractérisée par la production d'anticorps qui réagissent spécifiquement avec des antigènes. Suite à une stimulation antigénique, les cellules B prolifèrent et se différencient en cellules plasmiques qui synthétisent et sécrètent des anticorps. Quelques cellules B se différencient en cellules mémoire afin d'assurer une réponse plus rapide lors d'une seconde exposition au même antigène (Janeway et Travers, 1997). Les molécules d'Ig existent sous forme soluble (les anticorps répartis en cinq classes de fonctions biologiques différentes chez l'homme : IgM, IgG, IgA, IgD et IgE) et sous forme de récepteurs membranaires des lymphocytes B (BCR) (Kouassi et *al.*, 2001). Les anticorps des poissons sont des immunoglobulines de classe Ig M-like (Köllner et *al.*, 2002). Les immunoglobulines aident à la défense antimicrobienne en neutralisant les virus dans les compartiments de fluide, par l'opsonisation des microbes et jouent un rôle dans la lyse des microbes médiée par le complément. Le rôle des immunoglobulines est essentiellement de protéger l'organisme contre les maladies infectieuses au travers de différents mécanismes : neutralisation, opsonisation, fixation de lymphocytes cytotoxiques, système du complément, etc. (Brousseau et *al.*, 1998). Les cellules B sont localisées principalement au niveau du rein antérieur et de la rate chez le poisson.

5.5.4 L'immunité à médiation cellulaire

L'immunité à médiation cellulaire est caractérisée par la sensibilisation des cellules T suite à la présentation d'un antigène ainsi que par la différenciation et la prolifération des cellules T en cellules T effectrices, de régulation et de mémoire. Les cellules T cytotoxiques peuvent lyser des cellules tumorales en relâchant des lymphotoxines. Cette immunité est impliquée dans la régulation du fonctionnement du système immunitaire, dans l'hypersensibilité retardée, dans les rejets de greffe et dans la résistance aux infections (Brousseau et *al.*, 1998).

5.6 Manifestation d'immunotoxicité

Le système immunitaire contribue au maintien de l'intégrité de l'organisme hôte en éliminant les constituants étrangers et les constituants du soi modifiés. Il est la cible d'une variété de constituants de l'environnement, soit les substances chimiques étrangères à l'organisme (ou les xénobiotiques), tels que des médicaments et leurs métabolites, des polluants industriels, etc. Ces agents peuvent agir sur les composantes du système immunitaire et interférer ainsi avec leurs fonctions de protection de l'organisme. L'immunotoxicité peut être définie comme l'ensemble des effets délétères provoqués par un xénobiotique ou par tout autre constituant biologique ou physique de l'environnement sur le système immunitaire à la suite d'une exposition professionnelle, environnementale ou thérapeutique (Kouassi et *al.*, 2001). Différents types d'effets immunotoxiques sont possibles, incluant l'immunosuppression qui peut favoriser les infections et les tumeurs, l'immunostimulation, l'hypersensibilité et l'auto-immunité (Kouassi et *al.*, 2001). Un même agent immunotoxique peut agir comme antigène, afin d'induire une hypersensibilité spécifique, ou comme immunomodulateur, pour modifier la réponse immunitaire à un ensemble d'antigènes de l'environnement. Au cours des dix dernières années, les résultats de nombreuses études menées surtout sur des animaux de laboratoire ont clairement démontré que l'interaction de produits chimiques et du système immunitaire peut causer des problèmes de santé. Ces effets néfastes peuvent découler de l'action toxique directe de ces produits sur différentes composantes du système immunitaire, ou encore être favorisés par d'autres systèmes physiologiques, tels que les systèmes endocrinien et nerveux (Chilmonczyk et *al.*, 1997). Les polluants retrouvés dans les effluents peuvent créer une érosion de certains tissus externes tels que la mâchoire, les nageoires et l'épiderme (Escher et *al.*, 1999). Les conséquences de l'exposition à des eaux usées se répercutent aussi au niveau des organes internes. Le foie et la rate peuvent présenter des masses différentes comparativement au groupe témoin (Escher et *al.*, 1999). Des signes d'inflammation au foie ainsi que la nécrose d'hépatocytes ont été observés (Bucher et Hofer, 1993).

5.6.1 Immunosuppression

Une diminution de la résistance vis-à-vis des infections microbiennes, virales et parasitaires signale généralement un effet immunosuppresseur des xénobiotiques (Kouassi et *al.*, 2001). Parmi les polluants chimiques de l'environnement, plusieurs composés organochlorés possèdent des propriétés immunosuppressives qui se traduisent généralement par une baisse de la résistance aux infections bactériennes et virales, aussi bien dans des études animales que chez l'humain. Les conséquences d'une immunosuppression chimique sont complexes, généralement caractérisées par l'induction d'une réponse qualitativement anormale. Parmi les composés organochlorés, ce sont les substances de structure moléculaire similaire à la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) qui possèdent le potentiel immunotoxique le plus élevé. Ce sous-groupe comprend les congénères de BPC non-ortho et mono-ortho substitués ainsi que les congénères de PCDD et de PCDF portant des atomes de chlore en position 2,3,7 et 8 (Kouassi et *al.*, 2001). Ces molécules se lient au récepteur Ah, un récepteur intracellulaire liant les hydrocarbures aromatiques, et le complexe ligand-récepteur ainsi formé interagit avec l'ADN pour contrôler l'expression des gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Kouassi et *al.*, 2001). Chez presque toutes les espèces étudiées, les substances similaires à la 2,3,7,8-TCDD produisent une myélosuppression, une immunosuppression, une atrophie du thymus et une inhibition des composantes du système du complément (Kouassi et *al.*, 2001). Certains métaux (mercure, cadmium, plomb) possèdent des propriétés immunosuppressives qui proviennent en partie de leurs effets cytotoxiques par induction d'apoptose et/ou de nécrose dans les cellules du système immunitaire, entraînant une diminution de la résistance aux infections. La forme méthylée du mercure est 10 fois plus cytotoxique que sa forme inorganique sur les lymphocytes T et les monocytes humains en culture, en raison notamment de la plus grande liposolubilité des formes organiques. Dans l'eau le mercure s'accumule dans les sédiments et dans des conditions anaérobiques, peut être méthylé par des bactéries méthanogéniques (Atlas et Bartha, 1981).

5.6.2 Hypersensibilité

Certains médicaments (ex. pénicillines) et de nombreux xénobiotiques de l'environnement et du milieu professionnel sont aussi susceptibles d'induire des réactions d'hypersensibilité, ces substances chimiques ou leurs produits de biotransformation jouant le rôle d'haptène (Kouassi et *al.*, 2001). Les réactions allergiques résultent d'une seconde exposition au même antigène ou des expositions ultérieures. Certains xénobiotiques, particulièrement les métaux (nickel, béryllium, dérivés de platine), les activateurs d'époxyde, les diisocyanates et certains antibiotiques et anesthésiques locaux induisent de l'hypersensibilité immédiate impliquant la production d'anticorps de classe IgE qui se fixent sur les mastocytes et entraînent le relargage des molécules préformées comme l'histamine et l'héparine. Les réactions d'hypersensibilité retardée rencontrées couramment sont celles induites par le nickel et le béryllium, le chrome, le mercure et le cobalt. Les réactions d'hypersensibilité implique généralement que les réponses immunitaires sont déclenchées par un produit chimique et que l'attaque médiée par les anticorps et les cellules T est dirigée directement contre les peptides haptènes (Boelsterli, 2003).

5.6.3 Auto-immunité

Les maladies auto-immunes provoquées par des xénobiotiques sont la conséquence d'une dérégulation du système immunitaire, consistant en une réponse dirigée contre les constituants du soi (Kouassi et *al.*, 2001). Celles-ci peuvent systémiques ou spécifiques d'organes. Les métaux lourds, tel que le mercure et l'or sont connus pour leur capacité d'induire des glomérulonéphrites. Des études expérimentales réalisées sur des lignées cellulaires indiquent que le mercure à faibles concentrations peut augmenter la survie des lymphocytes T activés et les neutrophiles humains, en inhibant la mort cellulaire par apoptose. Ces observations suggèrent que l'exposition au mercure peut entraîner l'accumulation excessive de cellules immunitaires qui sont destinées à mourir normalement, et que cet effet pourrait contribuer aux réactions auto-immunes induites par ce métal lourd (Mémoire Escarné, 2001). Quelques xénobiotiques peuvent précipiter l'auto-

immunité en intervenant directement avec le système immunitaire, c'est-à-dire, en déséquilibrant l'induction de la tolérance des cellules T aux soi ou en stimulant directement le relâchement de cytokines par les cellules T. L'auto-immunité induite par des contaminants est le résultat d'une modification des tissus et cellules immunitaires de l'hôte par le contaminant et non celui du contaminant agissant à titre d'antigène/haptène (Boelsterli, 2003).

CHAPITRE 6 : BIOMARQUEURS IMMUNOLOGIQUES

L'immunotoxicologie est une discipline récente, mais les recherches en immunotoxicologie relèvent que de nombreuses molécules de l'environnement sont susceptibles d'altérer l'immunité naturelle et l'immunité spécifique, entraînant ainsi un risque pour la santé des individus et des populations. (Kouassi et *al.*, 2001). Ces études font ressortir les paramètres de la réponse immunitaire qui représentent les indicateurs les plus pertinents de l'atteinte, ou des conséquences de l'atteinte, reliées à l'exposition à ces xénobiotiques.

L'interaction des contaminants présents dans les eaux usées peut modifier la compétence immunitaire des poissons et engendrer par le fait même une immunosuppression, une prolifération cellulaire incontrôlable et des changements dans les mécanismes de défenses contre des pathogènes. Bien que des altérations profondes du système immunitaire se traduisent rapidement par une morbidité, voire une mortalité, importante chez les organismes concernés, elles sont bien souvent précédées de changements subtils dans certains de ces composants, changements que l'on peut envisager d'utiliser comme indicateurs précoces de toxicité ou comme indicateurs (Brousseau et *al.*, 1998). Le stress peut stimuler certains aspects du système immunitaire et en supprimer d'autres et ces effets changent tout le temps. Il est tout à fait possible que lorsque la phagocytose augmente après un stress, la capacité de tuer de d'autres cellules diminuent au même moment. Il est donc nécessaire de mesurer une variété d'indicateurs pour les fonctions immunes, puisque la suppression de certains composants du système immunitaire peut être compensé par la stimulation de d'autres (Voccia et *al.*, 1999). Des paramètres immunologiques sont donc utilisés comme biomarqueurs permettant d'évaluer l'impact des facteurs environnementaux sur la réponse immunitaire. Toutefois, il n'est pas possible d'identifier le contaminant responsable de l'effet, puisqu'aucune réponse immunitaire spécifique d'un contaminant n'a été déterminée jusqu'à présent (Brousseau et *al.*, 1998). L'utilisation de plusieurs tests plutôt qu'un seul se justifie, entre autre, par le

fait que l'altération d'une composante du système immunitaire entraîne souvent la mise en jeu de mécanismes compensatoires impliquant d'autres composantes du système immunitaire pour restaurer un état normal. Les contaminants environnementaux affectent très rarement qu'un seul paramètre ou une seule fonction du système immunitaire (Köller *et al.*, 2002). Des interactions entre les différents mécanismes immunitaires, une possible surréaction du système immunitaire, ou une compensation d'une fonction immune supprimée par une autre, peuvent en être les raisons (Zelikoff *et al.*, 1994).

La phagocytose et l'activité cytotoxique naturelle sont des expériences concernant l'immunité non-spécifique. L'immunité innée peut aussi être évaluée par divers autres essais tels que les réactions inflammatoires, la flambée oxydative et l'activité des lysozymes. Toutes ces réponses immunitaires participent à la deuxième ligne de défense du poisson. La compétence du système immunitaire spécifique sera évaluée par la transformation lymphoblastique, mais peut aussi être évaluée, entre autre, par la réaction mixte de leucocytes, l'activité des cellules sécrétant des anticorps et la résistance aux pathogènes.

6.1 La phagocytose

La phagocytose est une fonction très importante du système immunitaire et par conséquent à la résistance aux maladies chez les poissons. Elle joue un rôle au niveau de l'immunité non-spécifique en internalisant et en détruisant des micro-organismes, ainsi qu'un rôle au niveau du système immunitaire spécifique à travers la présentation de l'antigène et la production de cytokines (Pegg et Iwama, 1996). Ces fonctions sont effectuées par les phagocytes mononucléés, les macrophages tissulaires, et les leucocytes polymorphonucléés, les neutrophiles sanguins. Les phagocytes reconnaissent les micro-organismes, souvent opsonisés, puis les attachent à leur surface cellulaire afin de les ingérer par un mécanisme d'activation du système contractile actine/myosine, qui va permettre l'extension des pseudopodes autour de la particule étrangère (Roitt, 1990).

Cette dernière est ingérée à l'intérieur d'une vacuole intracytoplasmique, le phagosome, avec qui des granule cytoplasmiques fusionneront pour libérer des enzymes ou des substances bactéricides. Suite à la phagocytose, la destruction des pathogènes requiert la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) d'après le processus de l'explosion respiratoire. Ce mécanisme de défense non-spécifique a été bien caractérisé chez les poissons téléostéens (Seeley et Weeks-Perkins, 1991).

6.2 L'activité cytotoxique naturelle

Les cellules cytotoxiques naturelles sont présentes au niveau du rein antérieur et postérieur, de la rate, la paroi intestinale et le sang périphérique. Les NCC du poisson partagent certaines propriétés biophysiques avec les cellules tueuses naturelles (NK) des mammifères (Sanchez-Dorion et *al.*, 1999). Ces cellules exercent leur action cytotoxique spontanément sur les cellules infectées par des virus et sur les cellules cancéreuses selon deux mécanismes différents, soient par apoptose ou nécrose (Mémoire Hébert, 2004) Puisque les NCC des poissons participent à la protection contre les virus, parasites et maladies néoplastiques, ces défenses peuvent être en danger quand les poissons sont exposés aux contaminants retrouvés dans les eaux usées.

6.3 La transformation lymphoblastique

La transformation lymphoblastique des cellules B et T permet de déterminer la sensibilité aux toxiques de l'immunité spécifique en mesurant la prolifération des lymphocytes (Brousseau et *al.*, 1998). Les réponses prolifératives aux mitogènes sont considérées comme un indicateur du statut fonctionnel des lymphocytes. L'activation des lymphocytes dépend d'abord de la reconnaissance simultanée de l'antigène et de la molécule du CMH de classe I (lymphocytes T cytotoxiques) ou de classe II (lymphocytes T auxiliaires). La reconnaissance de l'antigène constitue le premier signal, mais pour que le lymphocyte soit activé, un second signal est nécessaire, il est fourni par des molécules

d'adhésion et par des cytokines. Le lymphocyte activé est le siège de modifications morphologiques et physiologiques considérables, tels que l'augmentation de la taille et du nombre de ribosomes et d'autres organelles intracytoplasmiques, apparition de lysosomes et de vacuoles de pinocytose. Le lymphoblaste qui se divise donne naissance à deux types de lymphocytes, soit les lymphocytes effecteurs et les lymphocytes mémoire (Janeway et Travers, 1997). Les lymphocytes B effecteurs se transforment en plasmocytes qui vont produire les anticorps. Les lymphocytes T effecteurs synthétisent des cytokines et deviennent les acteurs de l'immunité à médiation cellulaire. Pour les lymphocytes mémoire, un nouveau contact avec l'antigène entraîne une réponse secondaire (Janeway et Travers, 1997). Les cellules mémoire sont immédiatement activées, les lymphocytes effecteurs sont plus nombreux, la réponse secondaire est donc plus rapide, plus intense que la réponse primaire. La transformation lymphoblastique peut être obtenue *in vitro* par l'action d'autres agents que l'antigène. Le lipopolysaccharide (LPS) stimule les lymphocytes B, la phytohémagglutinine (PHA) et la concanavaline A (Con A) stimulent les lymphocytes T (Brousseau et *al.*, 1996).

CHAPITRE 7 : EFFETS DES CONTAMINANTS SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

7.1 Mécanismes d'action du stress sur le système immunitaire

Il a été démontré que les poissons exposés aux métaux sont plus susceptibles aux infections bactériennes et virales. Le mécanisme impliqué dans cette augmentation de la susceptibilité n'est pas clair, mais plusieurs considèrent que les métaux et autres polluants chimiques de l'environnement peuvent agir comme agent stressant et moduler les mécanismes de défense via le système neuro-endocrinien (Auperin et *al.*, 1997). Il a d'ailleurs été bien établi que le stress est l'un des plus importants facteurs contribuant à augmenter la susceptibilité des poissons aux pathogènes (Chilmonczyk et *al.*, 1997).

Chez les vertébrés, l'homéostasie est assurée par l'action coordonnée du système nerveux et du système endocrinien. Chez les poissons, les processus d'adaptation aux conditions régnant dans le milieu s'accompagnent de changements aux niveau cellulaire et physiologique, changements contrôlés par trois catégories d'hormone, soit les corticostéroïdes, catécholamines et opioïdes (Salo, 2000). Ces hormones sont susceptibles d'avoir des effets directs ou indirects sur le système immunitaire (Brousseau et *al.*, 1998). Le stress est transmis et communiqué via les systèmes nerveux et endocrinien. Les réponses du système neuroendocrinien dépendent de chaque type de stress, mais il y a le rôle dominant des catécholamines et du cortisol (Webster et *al.*, 2002). La première réponse au stress est le relâchement des hormones de stress qui est suivie par les effets et actions immédiates de ces hormone au niveau sanguin et tissulaire. La troisième réponse au stress s'étend au niveau de l'organisme et de la population (Narnaware et Baker, 1996). Il y a, en outre, inhibition de la croissance, de la reproduction et altération des compétences immunitaires. L'immunosuppression venant d'un stress est largement médiée par le cortisol. Il a été démontré qu'il y a la présence de récepteurs des glucocorticoïdes spécifique du cortisol au niveau des leucocytes (Chilmonczyk et *al.*, 1997). Le cortisol induit l'apoptose chez les lymphocytes B, mais inhibent l'apoptose

chez les granulocytes de la carpe (*Cyprinus carpio*). Il a été démontré que le cortisol joue en tant que régulateur, inhibiteur de quelques composantes des réponses immunitaires et augmentent d'autres composantes qui peuvent être fonctionnelles dans des situations stressantes. Chez quelques espèces de poissons, des paramètres de défenses non-spécifiques, telle que la phagocytose, diminuent sous l'influence d'un stress. La diminution du nombre de lymphocytes B circulants et l'augmentation du nombre de granulocytes circulant a aussi été démontré.(Salo, 2000). Le cortisol, dont le taux plasmatique augmente en réponse à un stress réduit le nombre de lymphocytes circulants chez les Salmonidés (Ralph et *al.*, 1987). La production accrue de catécholamines suite à un stress conduit à une mobilisation des granulocytes et macrophages sanguins qui montrent une activité de phagocytose plus élevée (Faisal et *al.*, 1989). D'après plusieurs études effectuées chez les vertébrés supérieurs, le cortisol diminue les lymphocytes circulants. Bien que le cortisol soit reconnu pour ces effets chroniques, d'autres médiateurs participent à la phase aiguë, telles que les catécholamines et d'autres neurotransmetteurs autonomes (Narnaware et *al.*, 1996).

Narnaware et *al* (1996) rapporte que le stress cause une diminution du nombre de lymphocytes/thrombocytes circulant et une augmentation du nombre de leucocytes granulaires chez les téléostéens. Un stress chez la truite cause aussi un déclin de l'activité phagocytaire des macrophages du pronéphros. Il est suggéré que ces changements soient causés par des transmetteurs du système nerveux autonome qui induit des changements au niveau de la circulation des leucocytes. La lymphocytopenie induite par le stress est fréquemment observée chez le poisson (Pickering, 1984).

7.2 Effets des contaminants des effluents municipaux

La toxicité d'un effluent municipal peut avoir différentes origines. Elle peut provenir de contaminants contenus dans l'affluent de la station que le traitement ne réussit pas à détruire, ou de produits ajoutés, comme le chlore, lors du traitement. Elle peut résulter du changement dans les caractéristiques physico-chimiques de l'eau (transformation de

l'azote organique en azote ammoniacal) et modifiée par des caractéristiques environnementales du milieu récepteur (ex., dureté, pH, température) (Environnement Canada, 1996). Elle peut aussi être le résultat de l'effet combiné de plusieurs contaminants, puisqu'un polluant agissant seul n'est pas nécessairement nocif, mais en combinaison avec d'autres, il peut induire un stress (Khan et Thulin, 1991). Les effets immunotoxiques des xénobiotiques incluent des effets histopathologiques des tissus et organes immunitaires, la pathologie cellulaire, l'altération de la maturation des cellules immunocompétentes, des changements au niveau des sous-populations des cellules B et T ainsi que des altérations fonctionnelles des cellules immunocompétentes (Voccia et al., 1999).

Les poissons vivent de manière très étroite avec leur environnement puisque leurs cellules épidermales sont en contact direct avec toutes les substances présentes dans l'eau (Lamche et Burkhardt-Holm, 2000). Ce contact intime facilite l'entrée des substances à travers le mucus et la peau (ex., ions). Par contre cela peut devenir un désavantage lorsque des contaminants entrent dans l'environnement aquatique. Il est d'un consensus général que les xénobiotiques peuvent causer, directement ou indirectement, des effets délétères sur les quatre principaux systèmes physiologiques, soit endocrinien, reproductif, nerveux et immunitaires (Fournier et al., 2000a). L'exposition d'animaux aux contaminants toxiques de l'environnement, tels que les métaux lourds et les organochlorés, peuvent entraîner une immunosuppression. En utilisant des modèles de laboratoire, tels que des rats, les xénobiotiques induisant une immunosuppression ont été associés à une diminution des réponses humorales et cellulaires, en compromettant la prolifération lymphocytaire et en diminuant le poids du thymus (Fournier et al., 2000a). De plus, des tests *in vitro* ont démontrés que la phagocytose, la prolifération lymphocytaire en réponses aux mitogènes et les récepteurs aux cytokines ont sévèrement été réduits, indiquant que les phases afférente et efférente des réponses immunitaires peuvent être affectées (Fournier et al., 2000a).

Plusieurs études indiquent que les pesticides sont de fort immunomodulateur et qu'ils peuvent être un risque pour la santé publique. Parmi ceux-ci citons le lindane, qui est reconnu pour induire l'inhibition de la phagocytose chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Siwicki et Duran, 1994) et la réduction de la prolifération des cellules B (Dunier et al., 1994). Le lindane interagit avec les protéines du cytosquelette, lesquelles peuvent amener la lyse des cellules (Verma et Singhal, 1991). Le malathion, quant à lui, engendre une réduction du nombre de lymphocyte chez le poisson-chat (*Ictalurus punctatus*) (Mémoire d'Escarné, 2001). Parmi les insecticides organochlorés, la dieldrine, le mirex et le toxaphène est connu pour s'accumuler au niveau des organes lymphoïdes, lesquels jouent un rôle important dans la phase inductive des réponses immunitaires (Voccia et al., 1999). La toxicité de la dieldrine sur les réponses immunitaires à médiation cellulaire peuvent s'expliquer par la capacité réduite des cellules présentatrices d'antigènes (ex. macrophages), à prendre et à présenter un antigène (Krzystyniak et al., 1989). Chez les insecticides organophosphorés, le trichlorfon entraîne une diminution de la phagocytose des neutrophiles et une diminution de l'activité des lysozymes chez la carpe. De plus, des études *in vitro* chez la carpe indiquent que la prolifération des leucocytes du rein antérieur de la carpe sont inhibé par le trichlorfon et le dichlorvos (Voccia et al., 1999). Le malathion a stimulé les fonctions des macrophages et les réponses immunitaires à médiation cellulaire primaire.

Parmi les polluants chimiques de l'environnement, plusieurs organochlorés, tels les BPC et les dioxines, possèdent des propriétés immunosuppressives (Kouassi et al., 2001). Chez presque toutes les espèces étudiées, les substances similaires à la 2,3,7,8-TCDD produisent une myélosuppression, une immunosuppression, une atrophie du thymus et une inhibition des composantes du système du complément. Ces molécules se lient au récepteur Ah et le complexe ligand-récepteur ainsi formé interagit avec l'ADN pour contrôler l'expression des gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Kouassi et al., 2001). Des études ont associés cette immunosuppression avec l'induction du cytochrome P450. Week et al. (1987) ont démontré que l'exposition de

poissons à des HAP dans le milieu naturel et au laboratoire entraînait une altération significative mais réversibles de diverses fonctions chez les macrophages tels que la phagocytose des micro-organismes, la chémotaxie, la pinocytose, l'accumulation de mélanine, etc. Il y a réduction du nombre de cellules sécrétrices d'anticorps chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) exposée à du phénol, du formol ou des détergents (Anderson et al., 1984). Il a été démontré que les salmonidés juvéniles ont une forte tendance à bioaccumuler les hydrocarbures chlorés et aromatiques, d'importantes classes de xénobiotiques (Arkoosh et al., 1998). De plus, l'exposition à ces contaminants entraîne une immunosuppression et augmente la susceptibilité des maladies chez les salmonidés juvéniles (Arkoosh et al., 1998).

L'oestradiol a été reconnue comme étant un stimulant de l'involution du thymus. La présence de récepteurs oestrogéniques a été détectée au niveau des thymocytes et des lymphocytes, d'où la susceptibilité de ces produits à interférer avec le système immunitaire (Lewis et Lech, 1996). Certains contaminants environnementaux possèdent un potentiel oestrogénique (Miles-Richardson et al., 1999). Ces polluants environnementaux incluent des insecticides organochlorés, tel que le chordecone, et d'autres substance chimiques telles que le nonylphénol et le bisphénol A. Ces composées miment l'action oestrogénique en se liant aux récepteurs estrogéniques, affectant ainsi le développement et la reproduction des espèces (Miles-Richardson et al., 1999, Danzo, 1997). L'immunosuppression et une incidence aux maladies infectieuses ont été associés à la présence de perturbateurs endocriniens (Vos et al., 2000b). Une diminution modérée de la croissance des gonades dû à la présences d'oestrogènes synthétiques et naturels a été observé chez des truites exposées dans le fleuve Saint-Laurent (Desbrow et al., 1998). Ces derniers affectent aussi le systèmes endocriniens. On peut observer chez des truites mâles une induction significative de la vitellogénine, une masse hépatique élevée, un retard marqué de la croissance des gonades et une intersexualité (masculinisation et féminisation (Jobling et al., 1996, Jobling et al., 1998, Sheahan et al., 2002).

Plusieurs données au niveau de la littérature démontrent que les métaux lourds sont la source majeure de polluants aquatiques. Certains de ces métaux, comme le mercure, le cadmium et le plomb, possèdent des propriétés immunosuppressives qui proviennent en partie de leurs effets cytotoxiques, par induction d'apoptose et/ou nécrose dans les cellules du système immunitaire, ce qui tend à diminuer la résistance des organismes aux pathogènes (Zelikoff, 1993). L'immunotoxicité des métaux lourds peut aller jusqu'au développement de maladies auto-immunes (Brousseau *et al.*, 1998). Chez le poisson, le méthyle mercure, la forme organique du mercure, est plus toxique que la forme inorganique (Moore, 1991). Il a été démontré que le mercure affecte la réponse immunitaire non-spécifique, que le chlorure de mercure et le méthyle mercure affectent la capacité phagocytaire des macrophages du pronéphros et des neutrophiles sanguins (Vocchia *et al.*, 1994). Le manganèse est connu comme un stimulateur de la phagocytose (Dunier *et al.*, 1988). Cossarini-Dunier *et al.* (1988), ont démontré une stimulation de la phagocytose par le manganèse chez la carpe, alors que Dunier et Siwicki (1994) ont observé une inhibition de cette fonction lors d'une exposition chronique de truites arc-en-ciel à du lindane. Il a été démontré par Vocchia *et al.* en 1996 que le chlorure de cadmium a un effet direct sur la phagocytose et la transformation. Les poissons exposés aux métaux sont donc plus susceptibles aux infections et maladies. Certains considèrent que les métaux, et autres polluants environnementaux, agissent à titre de stress et modulent les mécanismes de défenses via le système neuro-endocrinien (Chilmonczyk *et al.*, 1997), affaiblissant ainsi le système immunitaire du poisson et sa capacité de défense envers les bio-agresseurs. Le cadmium provoque un accroissement du nombre d'anticorps sériques chez la truite ainsi qu'une baisse de la réponse phagocytaire et une diminution de la réponse lymphoblastique chez le Carassin Doré (Mémoire Escarné, 2001). Une exposition au cadmium peut aussi amener une diminution des hématocrites, d'hémoglobine et d'érythrocytes par rapport aux poissons témoins (Gill et Pant, 1985). L'augmentation de la sensibilité aux infections bactériennes est un phénomène qui a été rapporté chez différentes espèces suite à une exposition au cuivre, au cadmium et aux

phénols (Brousseau et *al.*, 1998). Suite à une exposition au chlorure de zinc, la mitose est inhibée et le degré d'inhibition est directement relié à la concentration du zinc dans l'eau (Sanchez-Dardon et *al.*, 1999). Chez les poissons, le cadmium, le mercure et le zinc augmentent la production du mucus, provoquent l'asphyxie, induisent l'hypocalcémie et des blessures aux branchies, des changements au niveau sérique, affectent les lymphocytes au niveau membranaire et nucléaire et peuvent causer des atrophies au niveau du rein (Sanchez-Dardon et *al.*, 1999).

Le stress, tels que les eaux usées, imposé aux poissons a un effet d'inhibition sur la phagocytose et un effet de stimulation sur la production de superoxide. La diminution des fonctions immunitaires due au stress a été rapportée par plusieurs autres auteurs et est souvent considérée comme une conséquence générale d'une contamination environnementale (Sanders et *al.*, 1996). De plus, la stimulation des fonctions immunitaires due au stress a aussi été observée comme un élément transitoire qui augmente le nombre d'anticorps produit par les cellules du rein antérieur 24 heures suivant le stress. (Pegg et Iwana, 1996). Les maladies auto-immunes provoquées par des xénobiotiques sont la conséquence d'une dérégulation du système immunitaire, consistant en une réponse dirigée contre les constituants du soi (Sanders et *al.*, 1996). De nombreux xénobiotiques de l'environnement sont susceptibles d'induire des réactions d'hypersensibilité.

CHAPITRE 8

CONTRIBUTION PERSONNELLE AUX ARTICLES

Le premier article caractérise les effets immunomodulateurs des effluents municipaux de la région de Gatineau d'après une approche *in vivo*. Le deuxième article évalue l'efficacité des traitements de désinfection des eaux usées de la communauté urbaine de Montréal (CUM) et tente de comparer la toxicité des effluents municipaux non-désinfectés de la région de Gatineau et ceux de la CUM, le tout selon une approche *in vitro*. Pour le premier article j'ai contribué à l'installation et à l'entretien des aquariums. Pour les deux articles, j'ai supervisé les journées de sacrifices et d'expériences suite aux expositions *in vivo et in vitro*. J'ai participé aux manipulations des trois essais immunologiques et collecté les données de la phagocytose et de la cytotoxicité cellulaire à l'aide du cytomètre de flux. Pour l'essai de la transformation lymphoblastique, j'ai recueillis les cellules et collecté les données à l'aide du compteur à scintillation β . J'ai analysé les résultats et leurs statistiques (utilisation du programme Statistica version 6) ainsi qu'interprété les résultats. J'ai effectué la rédaction de toutes les sections des deux articles.

Effects of municipal sewage effluent from the Gatineau sewage treatment plant on immune function of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

¹Müller, C., ²Ruby, S., ¹Cyr, D. and ¹Fournier, M.

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

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

Key words: municipal effluents, immunotoxicity, rainbow trout, phagocytosis, NCC,
lymphocytes

RÉSUMÉ

Les stress subléthaux, telle que la pollution, causent une altération de la croissance, de la résistance aux maladies, des fonctions reproductives et entraînent des conséquences à long terme pour la survie des poissons contaminés. La contamination de l'environnement aquatique avec des polluants comme les métaux lourds, les dioxines, les biphényles polychlorés et les pesticides a pour principale origine les sources anthropologiques telles que les industries, l'agriculture et les effluents municipaux. Le but de cette étude consiste à déterminer comment une exposition de truites Arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) aux effluents municipaux de la région de Gatineau, à des concentrations comparables à celles rapportées en milieu naturel pollué, interfère avec les fonctions immunitaires. Quatre groupe de 15 truites Arc-en-ciel juvéniles ont été exposés à des concentrations de 0.1%, 1% et 10% des effluents municipaux de la région de Gatineau pour une période de 30 jours. Le pronéphros des poissons a été prélevé et trois paramètres immunologiques ont été utilisés comme biomarqueurs de toxicité, soit la transformation lymphoblastique, l'essai de la phagocytose ainsi que la cytotoxicité cellulaire. La phagocytose a été analysée par la cytométrie en flux en utilisant des billes de latex fluorescentes comme pathogènes. Les réponses prolifératrices à la phytohemagglutinine (PHA) et au lipopolysaccharide (LPS) par les lymphocytes du pronéphros ont été déterminées par l'incorporation de ³H-thymidine à travers la réplication de l'ADN. La cytotoxicité cellulaire a été effectuée, en cytométrie en flux, avec des cellules NCC et des cellules YAC-1 transformées agissant comme cibles. La prolifération lymphocytaire, suite à une stimulation au PHA, a diminuée chez les poissons des groupes 1% et 10%. La prolifération lymphocytaire stimulée par LPS a diminuée chez les truites exposées à une concentration de 1% des eaux usées de la région de Gatineau. Ces résultats suggèrent que l'activité lymphocytaire est supprimée suite à une exposition aux effluents municipaux. L'activité cytotoxique des NCC a augmentée chez les truites exposées à une concentration de 10% de l'effluent, suggérant ainsi une immunostimulation des cellules NCC des poissons. L'altération de l'immunité non-spécifique et spécifique entraîne un risque pour la santé des individus et celle des populations. Cette étude est la première répertoriée sur les effets immunotoxiques reliés à une exposition *in vivo* à l'effluent de la région de Gatineau.

ABSTRACT

Sublethal stressors such as pollution cause reduction in growth, resistance to disease, reproductive function and behavioural capabilities and have long-term consequences for survival of fish populations. In particular, changes in environmental conditions associated with municipal wastewater has been shown to adversely affect aquatic organisms, and lead to an increase in parasitism. Contamination of the aquatic environment with pollutants such as heavy metals, dioxins, polychlorinated biphenyl's and pesticides originates from anthropogenic sources such as industries, agriculture and city sewage. The aim of the present research program is to examine how an exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to municipal effluents, released by the Gatineau sewage treatment plant, interferes with immunological functions. Four groups of 15 juvenile rainbow trout were exposed to 0.1%, 1% and 10% dilutions of Gatineau municipal effluent for a period of 30 days. Fish kidneys were collected and three immunological parameters were used as biomarkers of toxicity corresponding to phagocytosis functional assay, lymphoblastic transformation and also cell cytotoxicity. Phagocytosis by kidney macrophages was measured by flow cytometry using fluorescent latex beads. Proliferative responses to phytohemagglutinin (PHA) and lipopolysaccharide (LPS) by kidney lymphocytes were determined by ³H-thymidine incorporation into replicating DNA. The cell cytotoxicity assays were performed, in flow cytometry, with NCC cells and YAC-1 transformed cells as target. LPS stimulation of lymphocyte proliferation was decreased in trout exposed to 1% and 10% effluent concentrations. PHA stimulation of lymphocyte proliferation was decreased in trout exposed to 1% effluent concentration. These data suggest that lymphocytes are suppressed by effluent exposure. The NCC activity was increased in trout exposed to 10% effluent dilution, suggesting an immunostimulation of NCC cells. This study is the first documented evidence of *in vivo* alteration of immune function in fish caused by Gatineau municipal effluent.

INTRODUCTION

Many xenobiotics have been shown to be present in aquatic ecosystems where they pose a potential health hazard to wildlife and are known to affect the organs and tissues of fish. These include pesticides, heavy metals, polychlorinated biphenyls, pulp mill effluents, petroleum hydrocarbons dioxin, furan, PHA, drug metabolites, disinfection by-products, etc (Khan and Thulin, 1991, Cross *et al.*, 1985). Today, there is no doubt that contamination of aquatic ecosystems has occurred in many countries as a result of the wide use of chemical compounds originates from anthropogenic sources such as industries, agriculture and city sewage (Cross *et al.*, 1985). However, the increasing human population is the main source of pollution of the aquatic environment affecting fish and human health as well (Zelikoff, 1995).

A variety of pollutants in the aquatic environment can alter a fish's defence mechanisms. Coagulation of mucus, damage to tissue barriers and depression of cellular and humoral immunity may occur (Khan and Thulin, 1991). In response to these xenobiotics, the immune system can react in different way such as immunosuppression that increase susceptibility to infection cancer or tumor and also immunoenhancement that are related to hypersensitivity, allergies and autoimmune disease (Burns *et al.*, 1996). Both directions can bear danger and result in toxicity (Boelsterli, 2003).

The health of fish affects many aspects of our life and reflects the quality of our aquatic environment (Köllner *et al.*, 2002). The rainbow trout immune system is highly sensitive to this pollutants (Bickham *et al.*, 2000). There is evidence that fish may be a useful biological model for environmental monitoring using immunological endpoints. Most studies provide evidence for the applicability of the fish immune response to serve as a model for higher vertebrates in immunotoxicological studies (Ruffier, 1992). The kidney is an important lympho-myeloid organ in teleosts. This is the main site of erythrocyte,

granulocyte, B lymphocyte and monocytes differentiation, and also contains T lymphocytes and non specific cells (NCC) (Zapata and Cooper, 1990).

Host defense mechanisms in fish, as in mammals, can be divided into specific and non-specific immunity. Nonspecific immunity refers to generalized host defense mechanisms such as phagocytosis and NCC activity. Phagocytes are a very important part of the immune system, and therefore disease resistance, in fish (Köllner *et al.*, 2002). They play a role in both the non-specific immune system by engulfing and destroying microorganisms, as well as play a role in the specific immune system through antigen presentation and cytokine production (Pegg and Iwama, 1996). NCC cells play a role in tumor resistance, host immunity to viral infections, and in the regulation of lymphoid and other hematopoietic cell populations (Brousseau *et al.*, 1998). This natural resistance is normally effective enough to protect fish from infectious diseases until specific immune responses are being induced (Köllner *et al.*, 2002). The immune response against foreign antigens always starts with an activation and subsequent proliferation of leukocyte populations, which will be involved in the immune response. The first cells to be activated are monocytes/macrophages and neutrophilic granulocytes followed by B- and T-lymphocytes (Köllner, 2002).

The primary characteristics of specific immunity are the ability of lymphocytes to recognize and respond to antigens in a highly specific manner and the establishment of immunological memory perpetuated by long-lived lymphocytes (Burns *et al.*, 1996). These immunocompetent cells require continued proliferation and differentiation for self-renewal and protection of the host against pathogens (Brousseau *et al.*, 1998). Immune dysfunction has been recognized as a sublethal effect of chemical contamination exposure, affecting both cellular and humoral aspects of the immune system (Dean *et al.*, 1990).

The objective of this study was to evaluate *in vivo* the toxicity of Gatineau municipal effluents to know what are their impact on the immune response cell of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The effluents arise from many different sources. Wastewater contains domestic wastes, commercial and institutional wastes, few industrial wastes, groundwater infiltration, and surface runoff (White and Rasmussen, 1998). Gatineau treatment plants treated their effluents with biological processes before discharging it, but at present there is no disinfection. The effluent, therefore, still contains significant levels of suspended solids (SS), biochemical oxygen demand (BOD), and chemical oxygen demand (COD) (Wagner *et al.*, 2002).

MATERIALS AND METHODS

Fish

Exposure to municipal effluent and leukocyte collections were performed using juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (AQUIPRO, QC, CAN), with a mean weight of 10 g (\pm SE).

Water Parameters

During the experiment, water quality parameters such as temperature, dissolved oxygen, pH and conductivity were measured with a Multi 340i set (HOSKIN SCIENTIFIC, MTL, QC). Data concerning nitrite, nitrate and ammonia concentrations were analysed using commercial kits (HAGEN, MTL, QC).

Animal Conditions

Fish were acclimated for 10 days at 14°C, with a photoperiod of 12 h light/12h dark, in 90L glass aquaria containing dechlorinated city water. They were fed daily at a rate of 1% body weight with commercial G1 food (AQUIPRO, QC, CAN). Half of the water was renewed every two days to remove food and wastes products from the aquaria.

Exposure Conditions

Four groups of 15 juvenile rainbow trout were exposed to 0.1%, 1% and 10% dilutions of Gatineau municipal effluents for a period of 30 days. The control group was exposed to dechlorinated city water. Half of water was renewed each two days (static conditions).

Preparation of Cell Suspension

Fish were anaesthetized with MS222 (0.1%) (Boreal Laboratories, Ont., CAN.) and the head-kidney was removed under sterile conditions and mashed with a 2 ml glass grinder (Wheaton Scientific, New Jersey, USA) containing 1 ml of sterile RPMI 1640 (Bio

Media, Qc, CAN) supplemented with heparin (10 U/ml) (Organon Teknika, Ont. CAN.), 10 % (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS) (Bio Media), penicillin (100 U/ml)/ streptomycin (100mg/ml) (Bio Media) and HEPES (10 mM) (Bio Media). The cell suspension then was transferred to a 15 ml sterile polypropylene conical tube (17-120 mm) (Sarsted, NC, USA) and RPMIc was added to a final volume of 5ml.

Isolation of leukocytes

Suspensions of head-kidney cells were layered over 5 ml of Lympholyte Poly (Cedarlane Laboratories, Ont., CAN) in a 15 ml sterile polypropylene conical tube, and centrifuged at 275 x g for 30 min at 20°C. After centrifugation, the bands of leucocytes above the Lympholyte Poly interfaces were collected with a sterile Pasteur pipette (Sarstedt) and transferred to a 15 ml sterile polypropylene conical tube. The cells were washed twice in RPMIc, counted and adjusted to 10^6 cells/ml in RPMIc. Cell viability was determined by the trypan blue exclusion test (0.4%) (Sigma Chemical Co., MO, USA). Viable and dead cells were determined microscopically with an hemacytometer (Brightline, PA, USA).

The immunological assays were done according to the methods of Brousseau *et al.*, 1998.

Phagocytosis Assay

500 µl of each cell leukocyte suspensions (1×10^6 cells/ml) were incubated, in 5 ml polypropylene round bottom tubes (Sarstedt), for 18 hrs at 20 °C with fluorescein labelled

latex beads ($d= 1.86\mu\text{m}$) (Polysciences, PA, USA) at a 100:1 ratio (beads:cell). Following the incubation period, non ingested beads were separated from the phagocytes by centrifuging ($150 \times g$ at 4°C for 8 minutes) over a layer of 3% of bovine serum albumin (BSA) (Sigma Chemical Co.) in RPMI supplement. The cell pellet was then resuspended in 0.5% formaldehyde (Sigma Chemical Co.), and diluted in Hematall (Becton Dickinson, CA, USA). Cells were analysed by flux cytometry using a FACScan (Becton Dickinson, CA, USA). For each sample, 5 000 individual cells were recorded. The fluorescence setting was established using a suspension of fluorescein labelled latex beads in RPMI supplement. The events showing a fluorescence intensity corresponding to the cumulative fluorescence of 1 beads or more (M1) and 3 beads or more (M2) were considered for phagocytic activity. The fluorescence histograms of cell number *versus* fluorescence intensity were analysed and phagocytic activity was expressed as the percentage of cells that had ingested 1 beads or more and 3 beads or more. Data are expressed in percentage of phagocytosis. These biomarkers represent the percentage of macrophages (one bead or more) and active phagocytic activity of macrophages (three beads or more).

Mitogenic Assay

A volume of 100 μl of 1×10^6 cells/ml were stimulated with 20 $\mu\text{g/ml}$ of phytohemagglutinin (PHA) (Sigma Chemical Co.) or 200 $\mu\text{g/ml}$ of lipopolysaccharide (LPS) (Sigma Chemical Co.), into 96 microwell plates (Sarstedt) and incubated for 72 hours. Mitogens were prepared with sterile L-15 medium supplemented with 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS), HEPES (10 mM), penicillin (100U/ml)/streptomycin (100mg/ml) and 2-mercaptoethanol (5 $\mu\text{l/l}$) (Sigma Chemical Co.). Unstimulated cells were incubated with supplemented L-15 medium only and all samples were tested in triplicate. After the incubation, a volume of 0.5 μCi per well of (^3H)-methylthymidine (ICN Biomedicals, CA., USA) was added in each well and incubated for 18 hours. The cells were collected on a filter using a cell harvester (Skatron Instruments As, Lier, Norway). Each filter was placed in a vial containing 4 ml of scintillation liquid.

Radioactivity was determined with β -scintillation counter (LKB Wallac 1217 Rackbeta) (ChemGen Corp., MD, USA). The results were expressed as the DPM and as stimulation index (SI).

Cell cytotoxicity assay

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

Contact between effector and target cells was done in 5 ml polypropylene round bottom tubes at three different effector:target ratios: 10:1, 20:1 and 40:1. Equal volumes of cellular suspensions were centrifuged at 350 x g for 5 min. Cell pellets were then resuspended in 150 μ l propidium iodide (PI) (Sigma Chemical Co.) and 150 μ l of supplemented RPMI. Cells were re-centrifuged at 350 x g for 5 min, covered with paraffin, protected from light and incubated at 15°C for 18 hours. Cells were analysed by flow cytometry using a FACScan and 2 500 events were recorded. Analyses were done using a live gate on YAC-1 cells. Data are expressed in percentage of lysis.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean (\pm SE) and are tested for normality and homogeneity of variance. Data were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) and an unpaired Student's t-test. Significance was established at $P < 0.05$.

RESULTS

Water Parameters

The temperature, dissolved oxygen, pH and conductivity were stable for the dose response exposure. Nitrite, nitrate and ammonia were above the recommended concentration.

Measure of weights and lengths

Differences between control (0,13) and effluent exposed groups (0.1%: 0,13, 1%: 0,11, 10%: 0,12) were not significant. The ratio weight/length was similar between control and effluent exposed groups (Figure 1). Consequently, the ratio mass/lengths demonstrated any modulation compared to the control.

Phagocytosis

No significant differences were observed for the phagocytosis of one fluorescent beads or more and three fluorescent beads or more among control and effluent exposed groups for 1 bead + (control: 21.34% 0.1%: 18.73%, 1%: 22% and 10%: 22,33%) and 3 beads + (control: 7,57% 0.1%: 6,58%, 1%: 7,61% and 10%: 7,79%) (Figure 2). Phagocytes in fish exposed to undisinfected sewage effluent demonstrated any immunomodulation.

NCC Assay

There was an increase in the percent of lysis in trout exposed to the concentration 10% of sewage effluent for the ratios 20:1 (control: 34.33%, 10%: 56.90%) and 40:1 (control: 41.98%, 10%: 66.84%). No significant differences were found in trout exposed to 0.1% and 1% of municipal effluent concentrations for all ratios (10:1-20:1-40:1) (Figure 3).

Mitogenic Assay

B lymphocytes proliferation (LPS) in fish exposed to the dilutions 1% (2572.3 DPM) and 10% (2473.84 DPM) sewage effluent showed a significant decrease in the DPM (control: 6783.32 DPM). T lymphocytes proliferation (PHA) in fish exposed to 1% (1372.93 DPM) sewage effluent showed a significant decrease in DPM (control: 4510.71). B and T lymphocytes proliferation in fish exposed to 0.1% of sewage effluent demonstrated any immunomodulation. Unstimulated cells (normal, natural division) showed no significant difference among all groups tested (Figure 4).

Proliferation was expressed as the stimulation index (SI), the ratio of stimulated cells (with mitogens) to unstimulated cells (with media alone). There is a decrease in the normal response of the trout leukocytes exposed to the dilutions 0,1% (3.47), 1% (4.81) and 10% (3.97) of sewage effluent for B lymphocytes (LPS) comparatively to control (7.04) and 0.1% (0.76) of sewage effluent for T lymphocytes (PHA) comparatively to control (4.64) (Figure 5).

DISCUSSION

Effects of the municipal effluents on non specific immune function

No significant effects were observed for phagocytosis in trout leukocytes (Fig. 2), but phagocytes are known to play a role in toxicity mechanisms. Phagocytosis is the first step in the accessory function of monocytes and macrophages to stimulate lymphocyte responses. Phagocytosed particles are processed and presented as antigenic peptides in association with class II MHC molecules on the surface of phagocytes. Inhibition of phagocytosis disturbs the clearance of bacteria, the processing and presentation of antigens but also cytokine secretion and subsequently the activation of lymphocyte-based specific immune response (Köllner *et al.*, 2002). Neutrophils can be involved in the toxicity of xenobiotics by releasing mediators (e.g. cytokines). Neutrophils can also metabolize various chemicals through their myeloperoxidases. PMNs must first receive a signal upon which they will accumulate in the particular tissue (Boelsterli, 2003).

There was an increase in the percent of lysis in trout leukocytes exposed to Gatineau municipal effluents (10% concentration, Fig. 3). Specific cell cytotoxicity which has only recently been shown in fish is involved in the immune response against viral infection and cancer cells, where a system of MHC class I matching effector and target cell is required (MHC class I restriction of cytotoxicity) (Nakanishi *et al.*, 1999). In contrast to xenobiotics such as TCDD, other contaminants can enhance the function of the immune system. Such an immunostimulatory effect can get out of control and result in harmful reactions.

Effects of the municipal effluents on specific immune function

Municipal effluents caused a significant inhibition of the proliferative response (Fig. 4) and the stimulation index (Fig. 5) of the head kidney lymphocytes indicating a reduced cellular specific immune response. Figure 4 shows an immunosuppression for T lymphocytes at 1% and 10% dilutions of Gatineau effluents as well as an immunostimulation of B lymphocytes at 1% dilution. We also observed that at the 0.1%, 1% and 10% dilutions of Gatineau effluents have a immunosuppressive effect and that the 0.1% had a stronger immunosuppressive effect than the 1% and 10% (Fig. 5).

Since sewage water is a mixture of contaminants, a number of xenobiotics can suppress the maturation and development of immune cells and thus cause immunosuppression (this involves both cells of the innate immune system and antigen-specific cells). As this general hematopoietic cell destruction will also include the lymphocyte precursor cells (T and B cells), it is plausible that most of the specific immune system will be compromised (Boelsterli, 2003). Immunosuppression can also be caused by other mechanisms and can occur in other parts of the immune system. A widely cited example is the toxicologically important group of dioxins, including polychlorinated dibenzodioxins, dibenzofurans, and biphenyls. Among these xenobiotics, TCDD is the most powerful agent that has been implicated in causing dramatic immunosuppressant effects (Hsieh et al., 2004). In trout, suppression of immune function was in direct correlation with the known toxicity of chemicals whether it was heavy metals, pulp mill effluents or more complex chemical mixtures (Fournier et al., 2000).

Antibodies are produced by B-lymphocytes after stimulation with antigenic peptides presented in association with MHC class II molecules on accessory cells. Strong antigens, like bacterial LPS, induce an antibody response by direct activation of B-lymphocytes. In fish, secreted antibodies are of immunoglobulin class M (IgM) only (Anderson et al., 1989). Inhibition of various functions of antibodies therefore results in an increased susceptibility to infectious diseases.

In conclusion this study demonstrates that municipal effluent produce an opposite effect on the immune system at the concentration tested. Pollutants seldom affect a single parameter or function (Köllner et al., 2002). This can be explain by the interaction between different immune mechanisms, a possible overreaction of the immune system, or the compensation of a suppressed immune function by another (Zelikoff, 1995). The stimulation of immune function due to stress has also been observed. Stress may stimulate some aspects of the immune system while suppressing others and these effects change over time (Pegg and Iwana, 1996).

Municipal effluents can induce immunostimulating or immunosuppressive effects which may result in immunopathologic effects on different lymphoid organs (Anderson et al., 1984). These effects of pollutants on the killing ability of fish leucocytes may have important consequences for parasitic infections. Fish leucocytes have an array of mechanisms that are able to kill micro-organisms (Chilmonczyk et al., 1997).

As pollutants continue to be released into the aquatic environment, the prevalence of diseases and abnormalities may eventually increase. Consequently, it is not surprising that long-term exposure to toxic substances that suppress the immune response is associated with a variety of diseases and abnormalities in aquatic animals (Khan and Thulin, 1991). A concern of environmental toxicologist is the potential for additive or synergistic effects, due to the complex mixture of pollutants released into aquatic systems, for example, by waste water effluents (Lamche and Burkhardt-Holm, 2000).

Our study indicates that municipal effluent are immunomodulatory and that they may be a risk for public health. This study is also the first documented evidence of *in vivo* alteration of immune function in fish caused by Gatineau municipal effluent.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Antonio Miguel of the sewage treatment plant of Gatineau for supplying wastewater and for his advice. We also thank Cathy Dimacacos from Concordia University and Nancy Hébert from INRS-IAF.

REFERENCES

- Anderson, D.P., Van Muiswinkel, W.B. and Roberson, B.S. 1984. Effects of chemically induced immune modulation on infectious diseases of fish. P. 187-211., In Kende, M., Gainer, J. and Chirigos, M., Eds. Chemical Regulations of immunity in Veterinary Medicine. Alan R. Liss, New York.
- Anderson, D.P., Dixon, O.W., Bodammer, J.E. and Lizzio, E.F. 1989. Suppression of antibody-producing cells in rainbow trout spleen sections exposed to copper in vitro. J. Aquat. Anim. Health, vol. 1, p. 57-61.
- Boelsterli, U.A. 2003. Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of how Chemicals disrupt Biological Targets. Taylor and Francis Group. New York.
- Brousseau, P., Payette, Y., Blakley, B., Boermans, H., Flipo, D., Tryphonas, H. and Fournier, M. 1998. Manual of immunological methods. Boston, USA : CRP Press, 141 p.
- Bickham, J.W., Sandfhu, S. Hébert, P.D.N., Chikhi, L. and Athwal, R. 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. Mutation research, vol. 463 p. 33-51.
- Burns, L.A., Meade, B.J. and Munson, A.E. 1996. Toxic responses of the immune system. In: Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons, by Klaassen, C.D., Amdur, M.O., Doull, J. New York: Mc Millan, p.355-402.
- Chilmonczyk, S., Voccia, I., Tarazona, J.V. and Monge, D. 1997. Flow cytometric analysis of fish leucocyte populations exposed to pollutants and pathogens: modulatory effects induced by experimental procedures. Ecotoxicology: Responses. Biomarkers and Risk Assessment, an OECD workshop (J.T. Zelikoff, ed). SOS Publications, USA. Ch. 11, p. 171-184.
- Cross, F.A, Peter, D.S. and Schaaf, W.E. 1985. Implication of waste disposal in coastal waters on fish population. American Society for Testing and Materials, special technical publication, p. 383-399.
- Dean, J. H., Cornacoff, J. B. and Luster, M. I. 1990. Toxicity to the immune system. Immunopharmacology Reviews, vol. 1, p. 377-408.

Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H. and Brousseau, P. 2000. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. Amer. Zool., vol. 40, p. 412-420.

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

Hsieh, C-Y., Tsai, M-H., Ryan, D.K. and Pancorbo, O.C. 2004. Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fisheri* in the Microtox chronic toxicity test. Science of the Total Environment, vol. 320, no. 1, p. 37-50.

Hoole, D. 1997. The effects of pollutants on the immune response of fish: implications for helminth parasites. Parasitologia, vol. 39, p.219-225.

Khan, R.A. and Thulin, J. 1991. Influence of Pollution on Parasites of Aquatic Animals. Advances in Parasitology, vol. 30, p. 201-237.

Köllner, B., Wasserrab, B., Kotterba, G. and Fisher, U. 2002. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)-how can environmental influences be detected. Toxicology Letters, vol. 131, no. 1-2, p. 83-95.

Lamche, G. and Burkhardt-Holm, P. 2000. Nonylphenol provokes a vesiculation of the golgi apparatus in three fish epidermis cultures. Ecotoxicology et Environmental Safety, vol. 47, p. 137-148.

Nakanishi, T. Aoyagi, K., Xia, C., Dijkstra, J.M. and Ototake, M. 1999. Specific cell-mediated immunity in fish. Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 72, p. 101-109.

Narnaware, Y.K.O. and Baker, B.I. 1996. Evidence that cortisol may protect against the immediate effects of stress on circulating leukocytes in the trout. General and Comparative Endocrinology, vol. 103, p. 359-366.

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

Ruffier, P. 1992. Toxic Substances in Municipal Wastewater :A Guidance Manual for Negotiating Permits. Lewis Publishers, Inc. USA. P. 215.

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

White, P.A. and Rasmussen, J.B. 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface water. Mutation Research, vol. 410, p. 223-236.

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

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

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Ratio of weight/length of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to various concentrations of Gatineau municipal effluents, following a 30-day exposure period (n=15) (means \pm S.E.).

Figure 2. Phagocytosis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to various concentrations of Gatineau municipal effluents, following a 30-day exposure period. Data are express as percentage of phagocytes (1 beads +) and active macrophage activity (3 beads +) (n=15).

Figure 3. NCC cytotoxic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to various concentrations of Gatineau municipal effluents, following a 30-day exposure period. * indicates a significant difference ($p < 0.05$) from control; ** indicates a significant difference from control ($p < 0.01$), determined by ANOVA, (n=15).

Figure 4. Effects of Gatineau municipal effluents on trout leukocyte mitogenesis. Effects of various concentrations of municipal effluents, following a 30-day exposure period, on the proliferation response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) head kidney leukocytes stimulated with PHA and LPS. * Indicates a significant difference ($p < 0.05$) from control; ** indicates a significant difference from control ($p < 0.01$), determined by ANOVA, (n=15).

Figure 5. Normal response percent of the proliferation response of lymphocytes stimulated with PHA and LPS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to various concentrations of Gatineau municipal effluents for a 30-day exposure. * Indicates a significant difference ($p < 0.05$) from control; ** indicates a significant difference from control ($p < 0.01$), *** indicates a significant difference from control ($p < 0.001$) determined by ANOVA, (n=15).

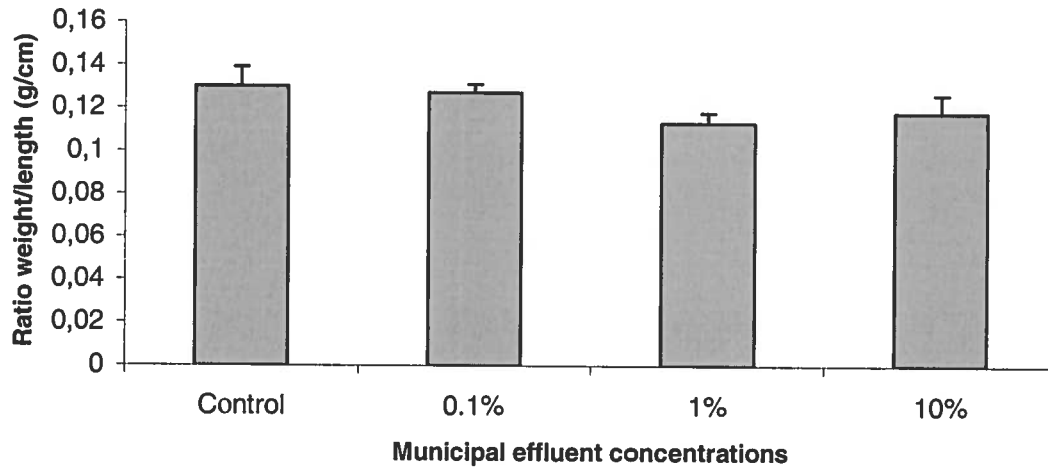


Figure 1

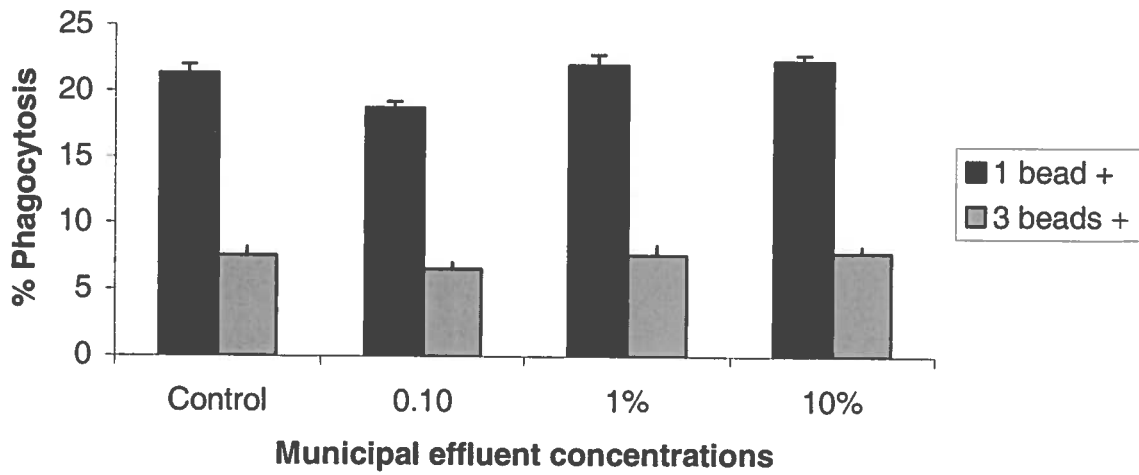


Figure 2

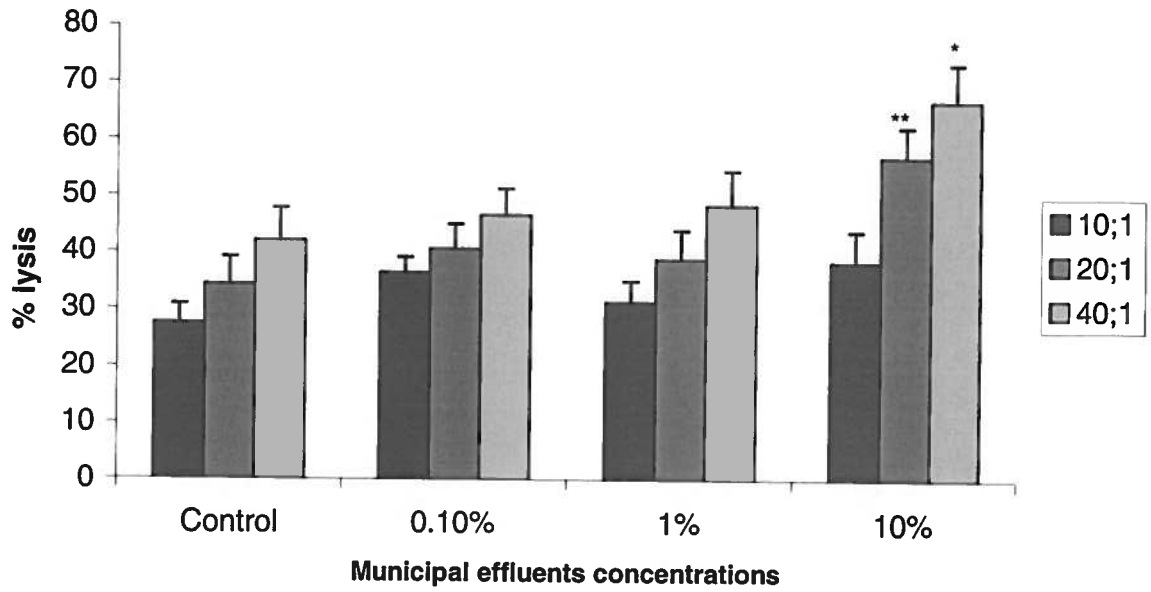


Figure 3

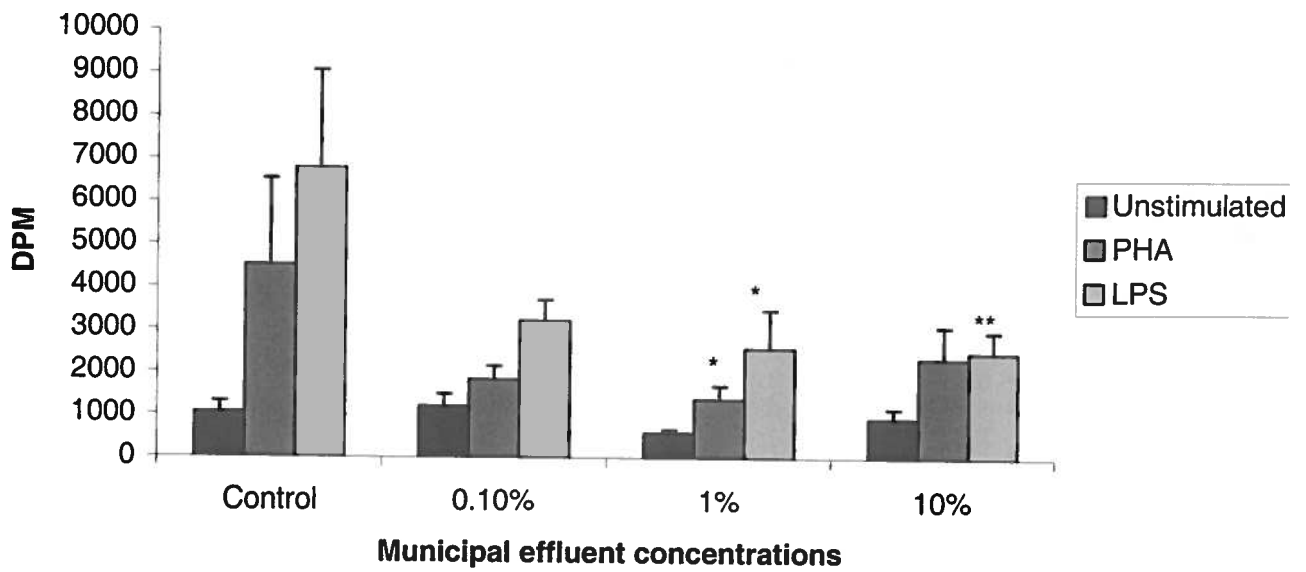


Figure 4

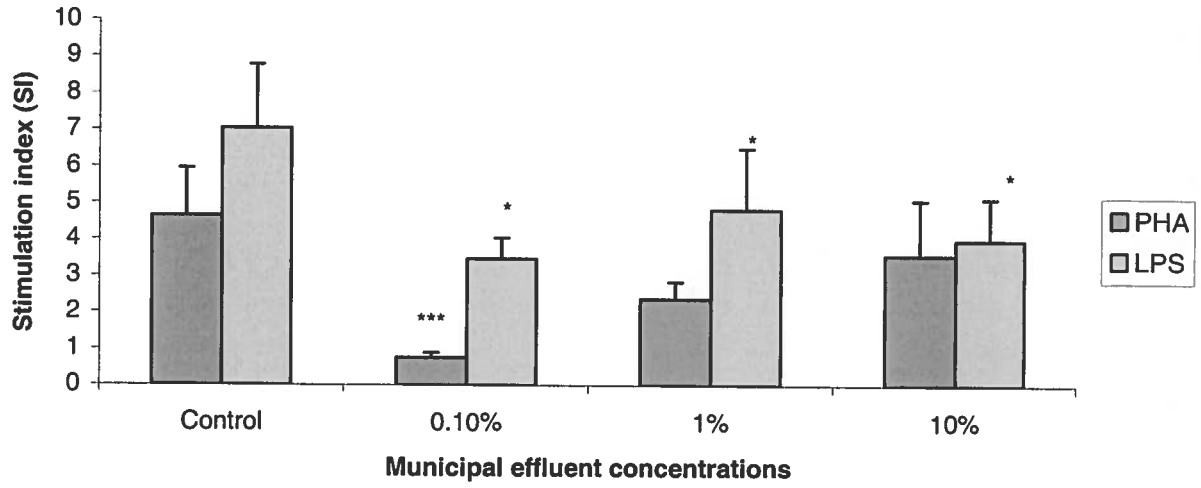


Figure 5

***In vitro* effects of disinfected and non-disinfected sewage effluents from two municipalities on the immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).**

¹Müller, C., ²Ruby, S., ¹Cyr, D. and ¹Fournier, M.

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

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

Key words: municipal effluents, immunotoxicity, rainbow trout, disinfection, Peracetic acid, Ultraviolet irradiation, Ozone

RÉSUMÉ

L'augmentation de la population est une des sources principales de pollution aquatique affectant la santé des poissons et celle des individus. Les effluents municipaux sont connus pour comporter plusieurs contaminants pouvant être relâchés dans l'environnement aquatique. Cette contamination consiste en un mélange complexe de polluants, tels que des métaux lourds, des biphényles polychlorés, des dioxines et des pesticides. Le premier objectif de cette étude consiste à comparer les effluents traités non-désinfectés de la région de Gatineau avec ceux de la communauté urbaine de Montréal (CUM). Le deuxième objectif consiste à évaluer l'impact des procédés de désinfection sur la toxicité des eaux. Les procédés de désinfection correspondent à l'ozone, aux radiations ultra-violet et à l'acide péracétique. L'absence de procédés de désinfection des eaux de ces deux stations d'épuration est un des principaux problèmes de la qualité de l'eau au Québec. Le traitement de désinfection par le chlore est proscrit à cause de la formation de trihalométhane, un sous-produit toxique pour l'environnement. Des expositions *in vitro* des cellules du pronéphros de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) avec des concentrations environnementales des effluents traités non-désinfectés et désinfectés ont été effectuées. Deux paramètres immunologiques ont été utilisés comme biomarqueurs de la toxicité, soit la phagocytose et la cytotoxicité cellulaire. La phagocytose a été analysée par la cytométrie en flux en utilisant des billes de latex fluorescentes comme pathogènes. La cytotoxicité cellulaire a été effectuée, en cytométrie en flux, avec des cellules NCC et des cellules YAC-1 transformées agissant comme cibles. Le pourcentage de l'activité phagocytaire est significativement supérieur chez les poissons exposés aux effluents de Gatineau. L'activité cytotoxique cellulaire est similaire entre les eaux traitées de Gatineau et de Montréal ainsi qu'avec les eaux désinfectées de Montréal. Ces données suggèrent que les eaux de Gatineau ont un potentiel toxique supérieur à ceux de Montréal et que les procédés de désinfection ne modulent pas les fonctions immunitaires. L'altération de l'immunité entraîne un risque pour la santé des individus et celle des populations. Cette étude est la première répertoriée sur les effets immunotoxiques reliés à une exposition *in vitro* à l'effluent de la région de Gatineau et de Montréal.

ABSTRACT

The increasing human population is the main source of pollution of the aquatic environment affecting fish and human health as well. Municipal effluents are known to contain many chemicals that can be released in the aquatic ecosystem. This contamination of the aquatic environment is done with pollutants such as heavy metals, dioxins, polychlorinated biphenyl's and pesticides. The first objective of the present study is to examine and compare how an exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to municipal effluents, released by the Gatineau and Montreal sewage treatment plant, interferes with immunological functions. The second objective of the present research is to evaluate the effects of three pilot disinfection treatments on the toxicity of the Montreal municipal effluent using an *in vitro* approach. The treatments tested correspond to ultraviolet, ozone and peracetic acid. Effectively, since 1980, the purification station of Gatineau and Montreal cannot use chlorinate to treat the municipal sewage because of its numerous impacts on the environment. Even if the sewage treatment facility also proceed to physical or biological treatments to clean municipal sewages, the municipal effluents contain many complex sublethal stressors and also many bacteria, virus, parasites or protozoa. Fish head kidney cells were exposed *in vitro* to various concentrations of municipal effluents and two immunological parameters were used as biomarkers of toxicity corresponding to a phagocytosis functional assay, and a cell cytotoxicity assay. Phagocytosis by kidney phagocytes was measured by flow cytometry using fluorescent latex beads. The cell cytotoxicity assays were performed, in flow cytometry, with NCC cells and YAC-1 transformed cells as target. The percentage of phagocytic activity was significantly increased in fish exposed to Gatineau municipal effluent and the NCC activity was similar among Montreal municipal effluent, disinfected Montreal municipal effluent and Gatineau municipal effluent. These data suggest that Gatineau effluent has a greater toxic potential than Montreal effluent and that the disinfection treatments doesn't disturb the immune response. In response to these pollutants, the immune system can react in different ways such as immunosuppression that increase susceptibility to infection cancer or tumor and also immunoenhancement that are related to hypersensitivity and autoimmune disease. This study is the first documented evidence of *in vitro* alteration of immune function in fish caused by Gatineau and Montreal municipal effluent.

INTRODUCTION

The increasing human population is the main source of pollution of the aquatic environment affecting fish and human health as well (Zelikoff, 1995). Municipal effluents are known to contain many chemicals that can be released in the aquatic ecosystem (Risso-de Faverney *et al.*, 2001). Many countries are facing serious ecological and toxicological problems resulting from the discharge of this complex effluents containing toxic chemicals substances (Hsieh *et al.*, 2004). Contaminants can either suppress the function of specific components of the immune system, thereby making the organism more sensitive to infections, or, alternatively, overstimulate the immune system, which will result in hyper sensitivity including immunoallergic reactions either against specific drugs or other xenobiotics or autoimmunity (Boelsterli, 2003).

UV radiation is now the most common alternative to chlorination for wastewater disinfection in North America. When exposed to UV light, adjacent thymine bases on the nucleic acid strands dimerize. Thus accurate transcription of this DNA strand cannot occur, and the bacterial cell cannot divide. Similar mechanisms apply to inactivation of viruses (Gehr *et al.*, 2003). The advantages of the UV disinfection are a low dose to reach disinfection criteria, any disinfectant by-product and simple technology. The major disadvantages are the unstable efficiency, a complex maintenance and the loss of mercury by the UV lamp (Tremblay, 2002).

Although ozone has been a popular and successful disinfectant for drinking water, it has not been widely used for wastewater disinfection due to operation and maintenance

problems of first generation systems and the high costs involved (Gehr *et al.*, 2003). Ozone is a potent oxidizer damaging virus proteins and cellular membrane of bacteria and is know to reduce the color, smell, pesticides, organophosphates and detergents (Tremblay, 2002).

The first objective of this study was to evaluate *in vitro* the toxicity of Gatineau municipal effluents and Montreal Urban Community (MUC) effluents to know what are their impact on the immune response cell of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The effluents arise from many different sources. Wastewater from Montreal contains domestic wastes, commercial and institutional wastes, industrial wastes, groundwater infiltration, and surface runoff (White and Rasmussen, 1998). The composition of Gatineau's wastewater contains the same things than Montreal' wastewater, but it receive few industrial wastewaters. Gatineau and Montreal urban community treated their effluents before discharging them, but at present there is no disinfection. Although municipal effluents are treated by different process. Gatineau effluents use a biologically processes for the treatment. In its treatment plant, the MUC uses physicochemical processes only, that is, primary sedimentation assisted by coagulation with alum, ferric chloride, or both and a polyelectrolyte (Wagner *et al.*, 2002). The effluent, therefore, still contains significant levels of suspended solids (SS), biochemical oxygen demand (BOD), and chemical oxygen demand (COD) (Wagner *et al.*, 2002).

The second objective of this study is to evaluate the disinfection efficacy of three pilot disinfection treatments. The research has been carried out through a *in vitro* approach considering the treatment of ozone, ultraviolet radiation (UV), and peracetic acid (PAA). Since chlorination has been banned for wastewater disinfection in the province of Quebec, municipalities are seeking alternatives that are simple to operate, produce few or no by-products, and exhibit attractive economics. Gatineau and CUM treatment plants investigate ozone, UV radiation and peracetic acid as alternatives to chlorine disinfection. PAA is the peroxide of acetic acid (AA). PAA is a strong oxidant and disinfectant (Wagner *et al.*, 2002). Due to its bactericidal, virucidal, fungicidal and sporicidal effectiveness as demonstrated in various industries, the use of PAA as a disinfectant for wastewater effluents has been drawing more attention in recent years. Major advantages of PAA are the ease of implementing treatment, absence of persistent toxic or mutagenic residuals or by-products, no quenching requirement and short contact time (Kitis, 2004).

Major disadvantages associated with PAA disinfection are the increase of organic content in the effluent, the potential microbial regrowth due to remaining acetic acid (AA is also a product of decomposed PAA), and the lower efficiency against some viruses and parasites (Kitis, 2004).

The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) has been extensively used in aquatic toxicological research, thus trout head kidney leukocytes were employed as a convenient model in the present study. In fish, many physiological functions, including growth, reproduction, immunity, and osmoregulation, are affected by environmental and physical stresses (Auperin et al., 1997). The kidney is an important lympho-myeloid organ in teleosts. This is the main site of erythrocyte, granulocyte, B lymphocyte and monocytes differentiation, and contains also T lymphocytes and non specific cells (NCC) (Zapata and Cooper, 1990). The sublethal effects on the non specific immune response was studied through phagocytosis and cell cytotoxicity assay. Phagocytosis, that involves macrophages and neutrophile cells, is a non-specific immune function whereby phagocytes internalize, kill, and digest invading microorganisms. Cell cytotoxicity are done by natural cytotoxic cells (NCC) that play a role in tumor resistance, host immunity to viral infections, and the regulation of lymphoid and other hematopoietic cell populations (Brousseau and al., 1998). In fish, the first line of defense against infectious microorganisms is based on a broad range of non-specific humoral and cellular immune mechanisms (innate immunity) which without prior specific activation can act in forming a more static barrier (Köllner et al., 2002). The immune response against foreign antigens always starts with an activation and subsequent proliferation of leukocyte populations, which will be involved in the immune response. The first cells to be activated are monocytes/macrophages and neutrophilic granulocytes followed by B- and T-lymphocytes (Köllner, 2002). In fish various manifestations of immunomodulation can be produced by pollutants. Both suppression and enhancement of the defense mechanisms have been demonstrated in fish exposed to metals and other pollutants (Chilmonczyk et al., 1997).

MATERIALS AND METHODS

Fish

Exposure *in vitro* to municipal effluent and leukocyte collections were performed using juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (AQUIPRO, Qc, Can), weighing approximately 15-20 g.

Animals Conditions

Fish were acclimated for 10 days at 14°C, with a photoperiod of 12 h light/12h dark, in 90L glass aquaria containing dechlorinated city water. They were fed daily at a rate of 1 % body weight with commercial G1 food (AQUIPRO, Qc, Can). The fish were acclimated at the Montreal urban community wastewater treatment plant and experiments were carried out at the Institut national de recherche scientifique (INRS) of Pointe-Claire.

Preparation of Cell Suspension

Fish were anaesthetized with MS222 (0.1%) (Boreal Laboratories, Ont., CAN.). The head-kidney was removed under sterile conditions and mashed with a 2 ml glass grinder (Wheaton Scientific, New Jersey, USA) containing 1 ml of sterile RPMI 1640 (Bio Media, Qc, CAN) supplemented with heparin (10 U/ml) (Organon Teknika, Ont. CAN.), 10 % (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS) (Bio Media), penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100mg/ml) (Bio Media) and HEPES (10 mM) (Bio Media). The cell suspension was then transferred to a 15 ml sterile polypropylene conical tube (17-120 mm) (Sarsted, NC, USA) and RPMIc was added to a final volume of 5ml.

Leukocytes Populations Isolations

Suspensions of head-kidney cells were layered over 5 ml of Lympholyte Poly (Cedarlane Laboratories, Ont., CAN) into a 15 ml sterile polypropylene conical tube and centrifuged at $275 \times g$ for 30 min at 20 °C. After centrifugation, the bands of leucocytes above the Lympholyte Poly interfaces were collected with a sterile Pasteur pipette (Sarstedt) and transferred to a 15 ml sterile polypropylene conical tube. The cells were washed twice in RPMIc, counted and adjusted to 10^6 cells/ml in RPMIc. Cell viability was determined by the trypan blue exclusion test (0.4%) (Sigma Chemical Co., MO, USA). Viable and dead cells were determined microscopically with an hemacytometer (Brightline, PA, USA).

Preparation of the Disinfection Solutions

We evaluated the effect of three different solutions, as use of PAA, UV radiation and ozone. The preparation of the Montreal effluent disinfection was done by Hébert et al, 2004 in our laboratory.

In order to reduce heterogeneity, this operation was done with 150 L sample of Montreal sewage effluent and subsequently separated to form each treatment. For each treatment, the level of total coliforms and enterococci was measured before and after the disinfection process. UV disinfection process was done by Trojan Technologies inc (London, Ont., CAN). Sewage effluents were disinfected using medium pressure system with a dose of 30 mWs/cm² and a quick contact time. Ozone disinfection was done by the laboratories of Robert Hausler (UQAM), (Mtl, Qc, CAN). Wastewaters were disinfected using a dose of 18 mg/L and a contact time of 18 minutes. Peracetic acid was supplied by Solvay Interlox Inc (Houston, Texas, USA) and the disinfection was performed in INRS-IAF (Mtl, Qc, Can). The disinfection was done using the protocol assessed by Wagner and al. (2002). In brief, disinfection involved a dose of 1.6 mg/L of PAA using a contact time of two hours and finally quench residual peroxy compounds. Each treatment was divided into 1L and 4L polypropylene bottles (Nalgene Brand Products, Rochester, N.Y., USA). All aliquot were frozen at -20°C.

Samples of treated Gatineau effluents and treated Montreal undisinfected and disinfected effluents were thawed and pooled. Each pooled sample was filtered through a sterile membrane (pores of 0,22µm diameter) on a filtration unit (Millipore). This samples was diluted in RPMIc. Control cells were exposed to RPMIc and véhicule cells were exposed to dechlorinated municipal water diluted in RPMIc, at the same tested dilutions of effluents (0.1%, 1% and 10%).

Exposure Conditions

For the first objective, Gatineau and MUC effluents (treated and undisinfected) were tested at 0.1%, 1% and 10% dilutions. The concentration respectively correspond to the lowest dilution measured for these effluents in the receiving water, the intermediary and the highest dilutions measured for these effluents in the receiving water.

For the second objective, undisinfected Gatineau effluent and undisinfected MUC and disinfected effluents were tested at 0.1% v/v, corresponding to the lowest dilution measured for these effluents in the receiving water.

The immunological assays were done according to the methods of Brousseau and *al.*, 1998.

Phagocytosis Assay

A 500 aliquot µl of each leukocyte cell suspensions (1×10^6 cells/ml) was incubated, in 5 ml polypropylene round bottom tubes (Sarstedt), for 18 hrs at 20 °C with fluorescein labelled latex beads ($d= 1.86\mu\text{m}$) (Polysciences, PA, USA) at a 100:1 ratio (beads:cell). The same volume of Gatineau and MUC effluents solutions (including the three disinfection solutions) at the concentration 0.1%, 1%,and 10% was added in each tube. Cells were exposed to control, negative control and effluents, with 5 replicates. The cells were incubated for 18 h. Following the incubation period, non ingested beads were separated from the phagocytes by centrifuging ($150 \times g$ at 4 °C for 8 minutes) over a

layer of 3% of bovine serum albumin (BSA) (Sigma Chemical Co.) in RPMI. The cells pellet was then resuspended in 0.5% formaldehyde (Sigma Chemical Co.) and diluted in Hemataill (Becton Dickinson, CA, USA). Cells were analysed by flux cytometry using a FACScan (Becton Dickinson, CA, USA). For each sample, 5 000 individual cells were recorded. The fluorescence setting was established using a suspension of fluorescein labelled latex beads in RPMI. The events showing a fluorescence intensity corresponding to the cumulative fluorescence of 1 bead or more (M1) and 3 beads or more (M2) were considered for phagocytic activity. The fluorescence histograms of cell number *versus* fluorescence intensity were analysed and phagocytic activity was expressed as the percentage of cells that had ingested 1 or more beads and 3 or more beads. Data are expressed in percentage of phagocytosis. These biomarkers represent the percentage of macrophages (one or more bead) and active phagocytic of macrophages (three or more beads).

Cell Cytotoxicity Assay

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

Contact between effector and target cells was done into 5 ml polypropylene round bottom tubes at three different effector:target ratios: 10:1, 20:1 and 40:1. Equal volumes of cellular suspensions were centrifugated at 350 x g for 5 min. Cell pellets were then resuspended in 150 μ l propidium iodide (PI) (Sigma Chemical Co.), 150 μ l of supplemented RPMI and 300 μ l of each dilution of undisinfected Gatineau and Montreal effluents and disinfected Montreal effluents were added in each tube. Cells were exposed

to control, negative control and effluents, with 5 replicates for each ratio. Cells were centrifuged at 350 x g for 5 minutes, covered with paraffin, protected from light and incubated at 15°C for 18 hours. Cells were analysed by flow cytometry using a FACScan and 2 500 events were recorded. Analyses were done using a live gate on YAC-1 cells. Data are expressed in percentage of lysis.

Statistical Analysis

Data are represented as mean (\pm SE) (Standard deviation) and are tested for normality, homogeneity of variance. Data were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) and the unpaired Student's t-test. Significance was established at $P < 0.05$.

RESULTS

Effects of the municipal effluents on phagocytosis

The results obtained in figure 1 and 2 show that the Gatineau effluent (0,1%: 17.11%) is a stronger inducer of phagocytosis than Montreal effluent (0,1%: 15.22%) (control : 11.95%). No significant difference among control group and 1% and 10% dilutions of Gatineau and Montreal undisinfected effluents.

Effects of the municipal effluents on cell cytotoxicity

There were no significant differences between the groups for all ratios (10:1- 20:1 – 40:1) (Fig. 3). Cell cytotoxicity in fish exposed to Gatineau and Montreal undisinfected effluents demonstrated any immunomodulation.

Effects of the undisinfected and disinfected municipal effluents on phagocytosis

Figure 4 shows the result of Gatineau and Montreal urban community wastewater undisinfected and the Montreal urban community wastewater disinfected with PAA, UV and O₃. The results indicates the phagocytosis of one or more fluorescent beads and three or more fluorescent beads. No significant effects was observed between control and undisinfected and disinfected Montreal effluent exposed groups. Significant effects were observed between control (10.74%) and undisinfected Gatineau effluent (11.95%).

Effects of the undisinfected and disinfected municipal effluents on cell cytotoxicity

There were no significant differences between the groups for all ratios (10:1- 20:1 – 40:1) after the *in vitro* exposure (Fig. 3) and there was no effect observed for all three disinfection process (UV, PAA, Ozone) (Fig. 5). Consequently, the ozone disinfection, peracetic acid UV radiations disinfection process demonstrated any differences with the undisinfectated sewage effluent for the cell cytotoxicity.

DISCUSSION

Effects of the municipal effluents on phagocytosis

Following a 18 hours exposure to this municipal effluent concentrations, the Gatineau effluent showed a stronger induction of immunostimulation than the Montreal effluent (Figs. 1 and 2) for the 0.1% dilution. Hence our results can indicate that the chemicals present in Gatineau effluents are more immunotoxic than those present in Montreal effluent. Municipal effluent are a mixture of several chemicals, the composition and concentration of which depend on the source and the treatment (Gagné and Blaise, 1999). The difference in effects observed may be due to differences in the concentration of the chemicals present which have different mechanisms of toxicity (White and Rasmussen, 1997). In summary, these wastewaters are released by cities having different population size, treatment and sources.

The 0.1% dilution, corresponding to the lowest dilution measured for these effluents in the receiving water, have a immunostimulatory effects than the intermediary and highest dilutions, for Gatineau effluent (Fig.1). It is interesting to note that stimulation of immune function by low effluent concentrations is commonly observed. Our results indicate that these municipal effluent do have an effect on phagocyte function. This may not be due to simple suppression of phagocytosis. Other aspects of phagocyte function such as superoxide production may be diminished to compensate for increases in phagocytosis.

Previous studies have shown that exposure of fishes to PAHs in their natural environment, as well as in the laboratory, have resulted in significant but reversible changes in various functions of the macrophages (Fournier *et al.*, 2000). Metal pollutants are among the most toxic and persistent pollutants in wastewater discharges and receiving waters (Hsieh *et al.*, 2004). The stimulation of phagocytic cells

produces an increase in respiratory activity in which oxygen is converted into reactive oxygen intermediates such as H_2O_2 and O_2 (Hoole, 1997). The generation of these substances has been monitored by chemiluminescence and the reduction of nitro blue tetrazolium. In addition, recent evidence suggests that fish leucocytes are also able to generate nitric oxide which is effective against micro-organisms (Hoole, 1997).

Effects of the municipal effluents on cell cytotoxicity

No effect was observed between control group and fish exposed to Gatineau and Montreal wastewaters (Fig.3). Specific cell cytotoxicity which has only recently been shown in fish is involved in the immune response against viral infection and cancer cells, where a system of MHC class I matching effector and target cell is required (MHC class I restriction of cytotoxicity) (Nakanishi *et al.*, 1999). NCC activity appeared to be less affected by pollutants than the phagocytosis.

Effects of the undisinfected and disinfected municipal effluents on phagocytosis and cell cytotoxicity activity

At the concentration tested (0.1%) *in vitro*, neither ozone, UV radiation and peracetic acid had an influence on phagocytosis nor the cell cytotoxicity by the head kidney leucocytes. PAA was recommended in combination with ultraviolet (UV) irradiation for wastewater disinfection (Kitis, 2004). The idea of using PAA disinfection in combination with a short UV exposure came from consideration of the fact that the retention time in UV reactors is generally limited. If it would be possible to allow wastewater to be in

contact with PAA for a relatively longer time and, afterwards, to expose the wastewater to a short UV irradiation shock, a sufficient reduction in microbials could be achieved in a shorter retention time (Kitis, 2003).

Furthermore, it should be noted that earlier tests in our laboratory done by Hébert (Mémoire Hébert, 2004) in our laboratory, shown that undisinfected Montreal wastewater *in vivo* exposure modulated the phagocytosis but not the disinfected wastewater (UV, ozone and PAA). This data as also been confirmed by Escarné (Mémoire escarné, 2001), in our laboratory, which showed an increased in the phagocytosis of cells exposed *in vivo* to Montreal effluent. Immune functions are affected and disturbed by pollutants effluents Montreal. In contrast to the *in vitro* determination of single cellular based functions such as phagocytosis, the *in vivo* stimulation of the entire immune system reflects the capacity of complex immune functions. Moreover, the treatment of PAA and UV prove to be more effective than the ozone treatment. Disinfected effluents produce less physiological effects compared to those undisinfected (Gagné and Blaise, 1993).

In conclusion, our study showed that treated but undisinfected Gatineau effluents do modulate the non specific immune response. Gatineau effluents caused the strongest modulation of immune system. As pollutants continue to be released into the aquatic environment, the prevalence of diseases and abnormalities may eventually increase. Long-term exposure to toxic substances that modulate the immune response is associated with a variety of diseases and abnormalities in aquatic animals (Khan and Thulin, 1991). Immunosuppression was observed in individuals, projection of this effect through modeling has demonstrated that ability to mount an immune response not only affects the individual but also has varying and depressing impacts on population dynamics (Norman *et al*, 1994). Disinfection is important in order to produce water which could be suitable for contact aquatic sports, and as a raw potable water source to communities downstream (Gehr *et al*, 2003). One concern of environmental toxicologist are potential additive or synergistic

effects, due to the complex mixture of pollutants released into aquatic systems, for example, by wastewater effluents (Lamche and Burkhardt-Holm, 2000). This study will help us to evaluate the health of the environment and the ecosystem.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Antonio Miguel of the Gatineau Sewage Treatment Plant for supplying wastewater and for his advice. We also thank Patrick Cejka from the Montreal Urban Community Wastewater Treatment Plant and Nancy Hébert and Hari Salo from INRS-IAF.

REFERENCES

- Anderson, D.P., Dixon, O.W. and Van Ginkel, F.W. 1984. Suppression of bath immunization in rainbow trout by contaminant bath pretreatments. In Kende M., Gainer, J. et Chirigos, M. (eds.), Chemical Regulation of Immunity in Veterinary Medicine. Alan R. Liss Inc., New York, 289-293.
- Auperin, B. Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Foster, A. and Prunet, P. 1997. Effect of confinement stress on circulating levels of growth hormone and two prolactins in freshwater-adapted Tilapia (*Oreochromis niloticus*). General and Comparative Endocrinology, vol. 108, p. 35-44.
- Boelsterli, U.A. 2003. Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of how Chemicals disrupt Biological Targets. Taylor and Francis Group. New York.
- Brousseau, P., Payette, Y., Blakley, B., Boermans, H., Flipo, D., Tryphonas, H. and Fournier, M. 1998. Manual of immunological methods. Boston, USA : CRP Press, 141 p.
- Chilmonczyk, S., Voccia, I., Tarazona, J.V. and Monge, D. 1997. Flow cytometric analysis of fish leucocyte populations exposed to pollutants and pathogens: modulatory effects induced by experimental procedures. Ecotoxicology: Responses, Biomarkers and Risk Assessment, an OECD workshop (J.T. Zelikoff, ed). SOS Publications, USA. Ch. 11, p. 171-184.
- Escarné, R., Cyr, D.G., Finsson, K., Marcogliese, D.J., Bernier, J. and Fournier, M. 1999. Effect of municipal sewage effluent on the immune and thyroid function of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Unpublished.
- Fournier, M. Cyr, D. Brousseau, P. and Tryphonas, H. 2000. Biomarkers in immunotoxicology : Evolutionary perspective. In L. Guillett and Crain, D. (ed.). Environmental Endocrine Disruptors. NY : Taylor and Francis Publishers. P. 335.
- Gagné, F. and Blaise, C. 1999. Toxicological effects of municipal wastewaters to rainbow trout hepatocytes. Bull. Environ. Contam. Toxicol, vol. 63, p. 503-510.
- Gehr, R., Wagner, M., Veerasubramanian, P. and Payment, P. 2003. Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater. Water Research, vol. 37, no. 19, p. 4573-4586.

Hébert, N., Ruby, S., Bernier, J., Cyr, D., Pellerin, J., Hausler, R., Gagné, F., Blaise, C. and Fournier, M. 2004. Effects of disinfected sewage effluent on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Nonpublished.

Hsieh, C-Y., Tsai, M-H., Ryan, D.K. and Pancorbo, O.C. 2004. Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fisheri* in the microtox chronic toxicity test. Science of the total environment, vol. 320, no. 1, p. 37-50

Kitis, M. 2004. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. Environment International, vol. 30, no. 1, p. 47-55.

Köllner, B., Wasserrab, B., Kotterba, G. and Fisher, U. 2002. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)-how can environmental influences be detected. Toxicology Letters, vol. 131, no. 1-2, p. 83-95.

Lamche, G. and Burkhardt-Holm, P. 2000. Nonylphenol provokes a vesiculation of the golgi apparatus in three fish epidermis cultures. Ecotoxicology et Environmental Safety, vol. 47, p. 137-148.

Mémoire de Hébert, N. 2004. Modulation de la réponse immunitaire de truites Arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) engendrée par une exposition aux effluents municipaux de l'île de Montréal ou aux substances d'intérêt prioritaires (4-nonylphénol) générées par les stations d'épuration. Non publié.

Mémoire de Escarné, R. 2001. Effet des effluents municipaux de l'île de Montréal sur la fonction immunitaire du Queue à tâche noir (*Notropis hudsonius*) (*in situ*) et de la truite Arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (En laboratoire). Non publié.

Nakanishi, T. Aoyagi, K., Xia, C., Dijkstra, J.M. and Ototake, M. 1999. Specific cell-mediated immunity in fish. Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 72, p. 101-109.

Norman, R. Begon, M. and Bowers, R. G. 1994. The population dynamics of microparasites and vertebrate hosts: the importance of immunity and recovery. Theoretical Population Biology, vol. 46, p. 96-119.

Risso-de Faverney, C. Devaux, A., Lafaurie, M., Girad, P.P. and Rahmani, R. 2001. Toxic effects of wastewaters collected at upstream and downstream sites of a purification

station in cultures of rainbow trout hepatocytes. Arch. Environ. Contam. Toxicol., vol. 41, p. 129-141.

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

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

White, P.A. and Rasmussen, J.B. 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface water. Mutation Research, vol. 410, p. 223-236.

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

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

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Phagocytosis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes exposed *in vitro* to various concentrations of Gatineau municipal effluents. Data are expressed as percentage of phagocytes (1 bead +) and active macrophage activity (3 beads +). * Indicates a significant difference ($p < 0.05$) from control, (n=5).

Figure 2. Phagocytosis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes exposed *in vitro* to various concentrations of Montreal municipal effluents. Data are expressed as percentage of phagocytes (1 bead +) and active macrophage activity (3 beads +), (n=15).

Figure 3. NCC cytotoxic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes exposed *in vitro* to 0.1% concentration of Gatineau and Montreal municipal effluents, (n=5).

Figure 4. Phagocytosis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes exposed *in vitro* to 0.1% concentration of Gatineau and Montreal municipal effluents, and three pilot disinfection treatments (Ozone, UV radiation and PAA) on Montreal municipal effluents. * Indicates a significant difference ($p < 0.05$) from control, (n=5).

Figure 5. NCC cytotoxic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes exposed *in vitro* to 0.1% concentration of Gatineau and Montreal (CUM) municipal effluents, and three pilot disinfection treatments (Ozone, UV radiation and PAA) on Montreal municipal effluents, (n=5).

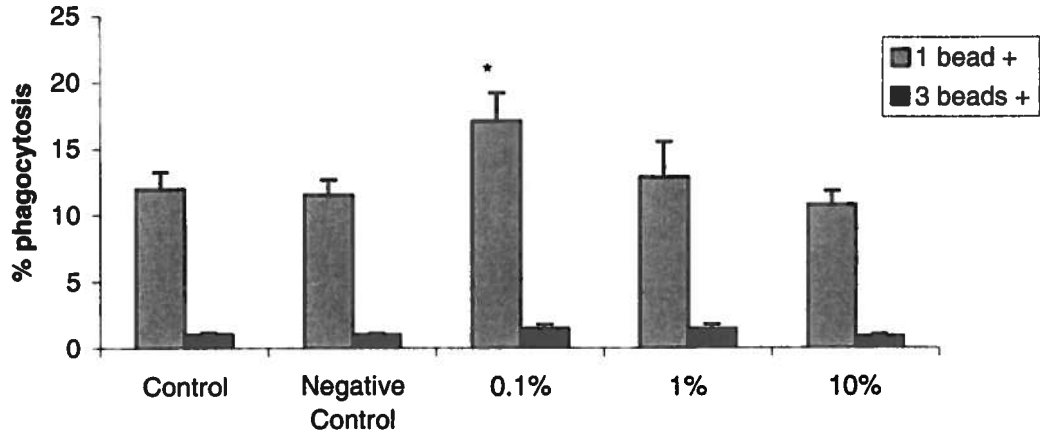


Figure 1

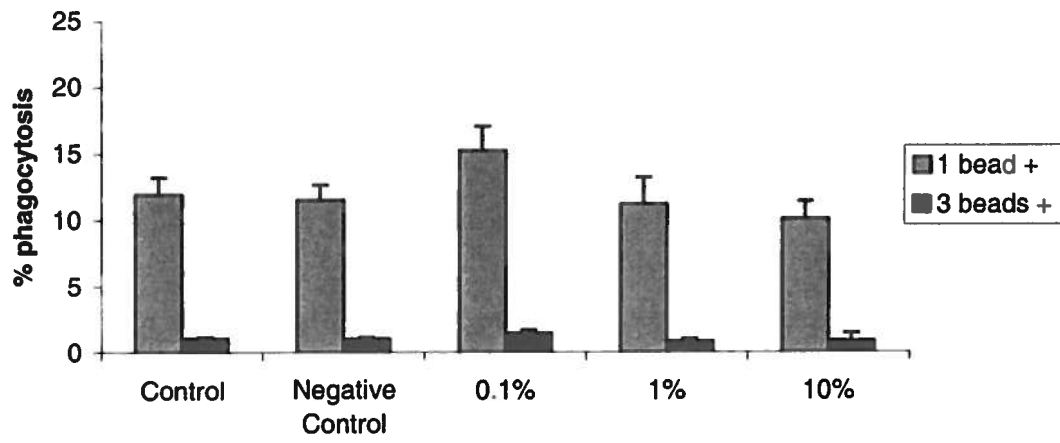


Figure 2

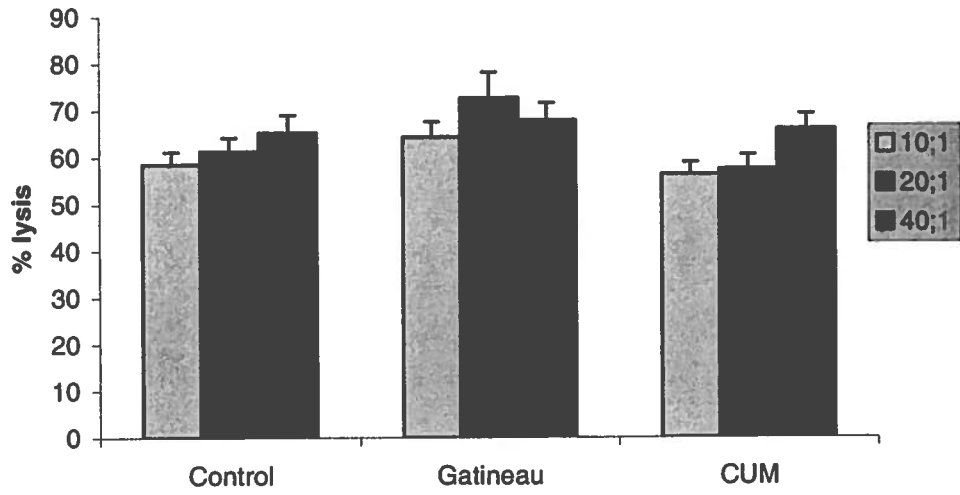


Figure 3

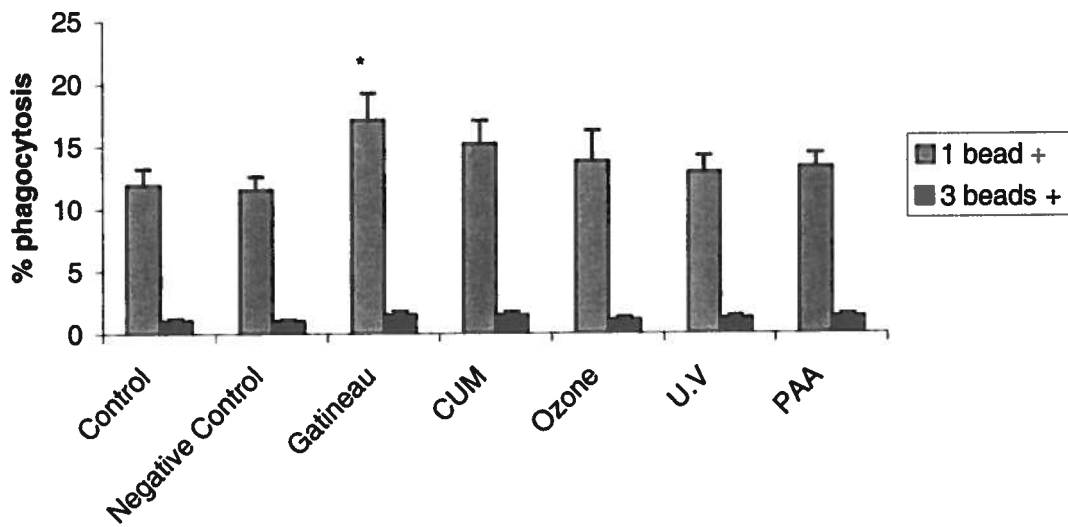


Figure 4

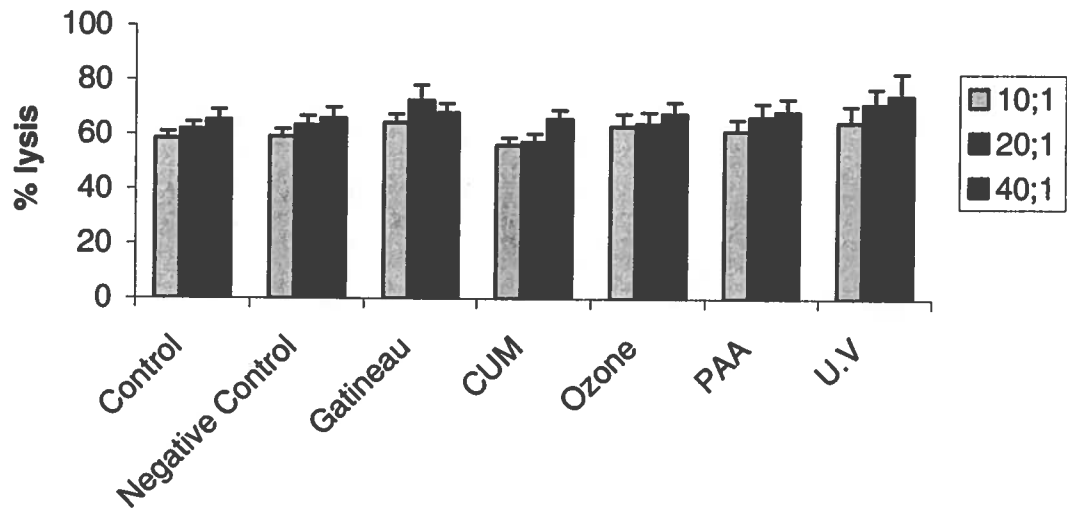


Figure 5

BIBLIOGRAPHIE

Anderson, D.P., Dixon, O.W. et Van Ginkel, F.W. 1984. Suppression of bath immunization in rainbow trout by contaminant bath pretreatments. Dans: Kende M., Gainer, J. et Chirigos, M. (eds.), Chemical Regulation of Immunity in Veterinary Medicine. Alan R. Liss Inc., New York, 289-293.

Anderson, D.P., Dixon, O.W., Bodammer, J.E. et Lizzio, E.F. 1989. Suppression of antibody-producing cells in rainbow trout spleen sections exposed to copper in vitro. J. Aquat. Anim. Health, vol. 1, p. 57-61.

Arkoosh, M.R., Casillas, E., Clemons, E., Kagley, A.N., Olson, R., Reno, P. et Stein, J. E. 1998. Effect of pollution on fish diseases: potential impacts on salmonid populations. Journal of Aquatic Animal Health, vol. 10, p. 182-190.

Arukwe, A., Thibaut, R., Ingebrigtsen, K., Celius, T., Goksoyr, A. et Cravedi, J-P. 1999. In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*salmo salar*). Aquatic Toxicology, vol. 49, p. 289-304.

Atlas, R. et Bartha, R. 1981. Microbial Ecology : Fundamentals and applications. Addison-Wesley Publ. Co., p. 415.

Auperin, B. Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Foster, A et Prunet, P. 1997. Effect of confinement stress on circulating levels of growth hormone and two prolactins in freshwater-adapted Tilapia (*Oreochromis niloticus*). General and Comparative Endocrinology, vol. 108, p. 35-44.

Axor-Experts Conseils inc. 1997. Informations générales. Communauté Urbaine de l'Outaouais. Usine d'épuration des eaux usées. Optimisation du procédé et augmentation de la capacité de traitement

Biagini, R.E. 1998. Epidemiology studies in immunotoxicity evaluations. Toxicology, vol 129, p. 37-54.

Bickham, J.W., Sandfhu, S. Hébert, P.D.N., Chikhi, L. et Athwal, R. 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. Mutation research, vol. 463, p. 33-51.

Biron, C.A., Byron, K.S. et Sullivan, J.L. 1990. Severe herpes infections in an adolescent without natural killer cells. Journal Medecine, vol. 320, p. 1731-1735.

Boelsterli, U.A. 2003. Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of how Chemicals disrupt Biological Targets. Taylor and Francis Group. New York.

Boulay, P. et Boulay, J. 1999. Procédé de traitement. Station d'épuration des eaux usées. Communauté Urbaine de Montréal. Mtl, Qc : Une publication du Service de l'Environnement.

Brousseau, P., Payette, Y., Blakley, B., Boermans, H., Flippe, D., Tryphonas, H. et Fournier, M. 1998. Manual of immunological methods. Boston, USA : CRP Press, 141 p.

Bucher, F. et Hofer, R. 1993. The effects of treated domestic sewage on three organs (gills, kidney, liver) of brown trout (*Salmo trutta*). Wat. Res., vol. 27, no. 2, p. 255-261.

Burns, L.A., Meade, B.J. et Munson, A.E. 1996. Toxic responses of the immune system. Dans: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, by Klaassen, C.D., Amdur, M.O., Doull, J. New York: Mc Millan, p.355-402.

Chilmonczyk, S., Voccia, I., Tarazona, J.V. et Monge, D. 1997. Flow cytometric analysis of fish leucocyte populations exposed to pollutants and pathogens: modulatory effects induced by experimental procedures. Ecotoxicology: Responses, Biomarkers and Risk

Assessment, an OECD workshop (J.T. Zelikoff, ed). SOS Publications, USA. Ch. 11, p. 171-184.

Cossarini-Dunier, M., Demael, A., Lepot, D. et Guerin, V. 1988. Effect of manganese ions on the immune response of carp (*Cyprinus Carpio*) against *Yersinia ruckeri*. Dev. Comp. Immunol., vol. 12, p. 573-579.

Cross, F.A, Peter, D.S. et Schaaf, W.E. 1985. Implication of waste disposal in coastal waters on fish population. American Society for Testing and Material, Special Technical Publication, p. 383-399.

Dean, J. H., Cornacoff, J. B. et Luster, M. I. 1990. Toxicity to the immune system. Immunopharmacology Reviews, vol. 1, p. 377-408.

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

Dunier, M. et Siwicki, A.K. 1994. Effect of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity 1. Effect of lindane on antibody secreting cells (ASC) measured by ELISPOT assay. Ecotoxicol. Environ. Saf., vol. 27, p. 1-6.

Environnement Canada. 1990. Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel. Série de la protection de l'environnement. Rapport SPE 1/RM/13. Ottawa, On.

Environnement Canada. 1996. L'état de l'environnement au Canada. Ottawa : Travaux publics et Services gouvernementaux Canada. Ottawa, On.

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

Esteban, M.A., Mulero, V., Munoz, J. et Meseguer, J. 1998. Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. Cell Tissue Res., vol. 293, p. 133-141.

Evans, D.L. Graves, S.S., Cobb, D. et Dawe, D.L. 1984. Non-specific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). II. Parameters of target cell lysis and specificity. Dev. Comp. Immunol., vol. 8, p. 303-312.

Faisal, M., Chiapelle, F., Ahmed, I.I., Cooper, E.L. et Weiner, H., 1989. Social confrontation stress in aggressive fish is associated with an endogenous opioid-mediated suppression of proliferative responses to mitogens and nonspecific cytotoxicity. Brain Behav. Immun., Vol. 3, p. 223-233.

- Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boerman, H. et Brousseau, P. 2000a. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. Amer. Zool., vol. 40, p. 212-220.
- Fournier, M. Cyr, D. Brousseau, P. et Tryphonas, H. 2000. Biomarkers in immunotoxicology : Evolutionary perspective. Dans L. Guillett and Crain, D. (ed.). Environmental Endocrine Disruptors. NY : Taylor and Francis Publishers. p. 335.
- Gagné, F. et Blaise, C. 1999. Toxicological effects of municipal wastewaters to rainbow trout hepatocytes. Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 63, p. 503-510.
- Gagné, F., Blaise, C., Salazar, M., Salazar, S. et Hansen, P.D. 2001. Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, vol. 128, p. 213-225.
- Gehr, R., Wagner, M., Veerasubramanian, P. et Payment, P. 2003. Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater. Water Research, vol. 37, no. 19, p. 4573-4586.
- Gill, T.S. et Pant, J.C. 1985. Erythrocytic and leucocytic responses to cadmium poisoning in freshwater fish, *Puntius conchonus*. Environ. Res., vol. 36, p. 327-336.
- Hoole, D. 1997. The effects of pollutants on the immune response of fish: implications for helminth parasites. Parassitologia, vol. 39, p.219-225.

- Hsieh, C-Y., Tsai, M-H., Ryan, D.K. et Pancorbo, O.C. 2004. Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fisheri* in the microtox chronic toxicity test. Science of the total environment, vol. 320, no. 1, p. 37-50
- Janeway, C.A. et Travers, P. (éd). 1997. Immunobiologie. 2^e édition. Paris: DeBoeck et Larcier, 582p.
- Jobling, S. Sheahan, D. Osborne, J. A., Matthiessen, P. et Sumpter, J. P. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Estrogenic Alkylphenolic Chemicals. Environ. Toxicol. Chem., vol. 15, no 2, p. 194-196.
- Jobling, S., Tyler, C.R., Nolan, M. Sumpter, J.P. 1998. The identification of estrogenic effects in wild fish. R&D Technical Report W1119. Bristol, UK: Environment Agency. 115 p.
- Khan, R.A. et Thulin, J. 1991. Influence of Pollution on Parasites of Aquatic Animals. Advances in Parasitology, Vol. 30, p. 201-237.
- Kitis, M. 2004. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. Environment International, Vol. 30, no. 1, p. 47-55.
- Köllner, B., Wasserrab, B., Kotterba, G. et Fisher, U. 2002. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)-how can environmental influences be detected. Toxicology Letters, vol. 131, no. 1-2, p, 83-95.
- Kosmala, A., Migeon, B., Flammarion, P. et Garric, J. 1998. Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using the fish biomarker ethoxyresorufin-O-

deethylase : field and on site experiments. Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 41, p. 19-28.

Kouassi, E. Ayotte, P., Roy, R., Fournier, M. et Revillard, J-P. 2001. Effets des contaminants de l'environnement sur le système immunitaire. Bulletin d'information en santé environnementale., vol. 12, no. 2, p. 1-4.

Krzystyniak, K., Flipo, D., Mansour, S. et Fournier, M. 1989. Suppression of avidin processing and presentation by mouse macrophages after Sublethal exposure to dieldrin. Int. J. Immunopharmacol., vol. 18, p. 157-166.

Lamche, G. et Burkhardt-Holm, P. 2000. Nonylphenol provokes a vesiculation of the golgi apparatus in three fish epidermis cultures. Ecotoxicology et Environmental Safety, vol. 47, p. 137-148.

Lester, J.N. 1987. Heavy Metals in wastewater and Sludge Treatment Processes. Vol.II. Traitment and Disposal. CRC Press, Inc. 155 p. USA

Lewis, S.K. et Lech, J.J. 1996. Uptake, Disposition, and Persistence of Nonylphenol from Water in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Xenobiotica, vol. 26, no. 8, p. 813-819.

Luebke, R.W., Hodson, P.V., Faisal, M., Ross, P.S., Grasman, K.A. et Zelikoff, J. 1997. Aquatic pollution-induced immunotoxicity in Wildlife Species. Fundamental and Applied Toxicology, vol. 37, p. 1-15.

Mémoire de Hébert, N. 2004. Modulation de la réponse immunitaire de truites Arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) engendrée par une exposition aux effluents municipaux de l'île de Montréal ou aux substances d'intérêt prioritaires (4-nonylphénol) générées par les stations d'épuration. Non publié.

Mémoire de Escarné, R. 2001. Effet des effluents municipaux de l'île de Montréal sur la fonction immunitaire du Queue à tâche noir (*Notropis hudsonius*) (*in situ*) et de la truite Arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (En laboratoire). Non publié.

Miles-Richardson, S.R., Kramer, V.J., Fitzgerald, S.D., Render, J.A., Yamini, B., Barbee, S.J. et Giesy, J.P. 1999. Effects of waterborne exposure of 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Aquatic Toxicology. Vol. 47, p. 129-145.

Ministère de l'Environnement du Québec et Environnement Canada. 2001. Évaluation du potentiel toxique des effluents des stations d'épuration municipales du Québec-Rapport final. Saint-Laurent Vision 2002, phase III-volet Industriel et Urbain.

Moore, J.W. 1991. Inorganic Contaminants of Surface Water. Springer- Verlag, New York.

Nakanishi, T. Aoyagi, K., Xia, C., Dijkstra, J.M. et Ototake, M. 1999. Specific cell-mediated immunity in fish. Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 72, p. 101-109.

Narnaware, Y.K. et Baker, B.I. 1996. Evidence that cortisol may protect against the immediate effects of stress on circulating leukocytes in the trout. General and Comparative Endocrinology, vol. 103, p. 359-366.

Norman, R. Begon, M. et Bowers, R. G. 1994. The population dynamics of microparasites and vertebrate hosts: the importance of immunity and recovery. Theoretical Population Biology, vol. 46, p. 96-119.

Pegg, J.R. et Iwana, G.K. 1996. The effects of stress and cortisol on phagocyte function in juvenile salmonids. In Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Bayne, C.J., Secombes, C.J.,

Zelikoff, J.T., Twerdok, L.E. and Anderson, D.P. (ed.). Modulators of Immune Responses : The Evolutionary Trail, vol.2. Fair Haven, N.J. : SOS Publications, p.233-239.

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

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

Ralph, A.T., Maule, A. G., Schreck, C. B. et Kaatari, S. L. 1987. Cortisol mediated suppression of salmonid lymphocyte responses *in vitro*. Dev. Comp. Immunol., Vol. 11, p. 565-576.

Risso-de Faverney, C. Devaux, A., Lafaurie, M., Girad, P.P. et Rahmani, R. 2001. Toxic effects of wastewaters collected at upstream and downstream sites of a purification station in cultures of rainbow trout hepatocytes. Arch. Environ. Contam. Toxicol., vol. 41, p. 129-141.

Roitt, I. 1990. Immunologie. Editions Pradel, Paris. 287p.

Ruffier. P. 1992. Toxic Substances in Municipal Wastewater :A Guidance Manual for Negotiating Permits. Lewis Publishers, Inc. USA. P. 215

Salo H. 2000. "Effects of Ultraviolet Radiation on the Immune System of Fish". Jyvaskyla studies in biological and environmental science. Jyvaskyla : University of Jyvaskyla. Finlande.

Sanchez-Darnon, J. Voccia, I. Hontela, A., Chilmonczyk, S., Dunier, M., Boermans, H., Blakley, B. et Fournier, M. 1999. Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vivo. Environ. Toxicol. Chem., vol. 18, no. 7, p. 1492-1497.

Sanders, S.M., Farrell, A.P. Kocan, R.M. et Kennedy, C.J. 1996. Investigations of the effects of environmental contamination and pathogens on immunological and hematological parameters in Pacific herring, *clupea harengus pallasii*, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Dans: Barton, B. et Mackinlay, D., editors. Contaminant Effects on Fish Symposium Proceedings. American Fisheries Society, Physiology Section, p. 53-58. Maryland.

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

Siwicki, A. K. et Dunier, M. 1994. Effects of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity. Ecotox. Env. safety, vol. 27, p. 316-323.

Snyder, R. 1984. The benzene problem in historical perspective. Appl. Toxicology., vol. 4, p. 692-699.

Stoffel, M. H. Wahli, T., Friess, A. E. et Burkhardt-Holm, P. 2000. Exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to nonylphenol is associated with an increased chloride cell fractional surface area. Schweiz Arch. Tierheilkd., vol. 142, no. 5, p. 263-267.

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

Verma, S.P. et Singhal, A. 1991. Low levels of the pesticides, delta-hexachlorocyclohexane, lyses human erythrocytes and alters the organization of membrane lipids and proteins as revealed by Raman spectroscopy. Biochem. Biophys. Acta., vol. 1070, p. 265-273.

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

Voccia, I., Sanchez-Dardon, J., Dunier, M., Anderson, P., Fournier, M. et Hontela, A. 1996. In vivo effects of cadmium chloride on the immune response and cortisol of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In *Modulators of Immune Responses, the evolutionary trail*. Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Bayne, C.J., Secombes, C.C., Zelikoff, J.T., Twerdok, L.E. Anderson, D.P., Eds. SOS Publishers, NJ.

Voccia, I., Blakley, B., Brousseau, P. et Fournier, M. 1999. Immunotoxicity of pesticides : a review. Toxicology and Industrial Health, vol. 15, p. 119-132.

Vogt, R.F. et Schulte, P.A. 1993. Immune markers in epidemiologic field studies. Dans: Schulte, P.A. Perrera eds., Molecular Epidemiology. P. 588.

Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefogrd, O. Lambré, C., Tarazona, J. V., Brandt, I. et Vethaak, A. D. 2000. Critical Reviews in Toxicology, vol. 30, no. 14, p. 71-133.

Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J.V., Brandt, I. et Vethaak, A.D. 2000b. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. Critical Reviews in Toxicology, vol. 30, p. 71-133.

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

Webster, J.I., Tonelli, L. et Sternberg, E.M. 2002. Neuroendocrine regulation of immunity. Annu. Rev. Immunol., vol. 20, p. 125-63.

Weeks, B.A., Keisler, A.S., Warinner, J.E. et Mathews, E.S. 1987. Preliminary evaluation of macrophage pinocytosis as a fish health monitor. Mar. Environ. Res., vol. 22, p. 205-213.

White, P.A. et Rasmussen, J.B. 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface water. Mutation Research, vol. 410, p. 223-236.

Yadete, F. et Male, R. 2002. Effects of 4-nonylphenol on gene expression of pituitary hormones in juvenil atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquatic Toxicology, vol. 58, p. 113-129.

Zapata, A.G., Chiba, A. et Varas, A. 1996. Cells and tissues of the immune system of fish. In Iwana, G. et Nakanishi, T. 9éd). The fish immune system: Organism, Pathogen, and Environment. San Diego, Ca. Academic Press, p. 1-62.

Zelikoff, J.T. 1993. Metal pollution-induced immunomodulation in fish. Annual Review of Fish Diseases. Faisal, M. et Hetrick, F.M, editors. Pergamon Press, New York, p. 305-325.

Zelikoff, J.T. 1994. Fish immunotoxicologie. Dans: Dean, J.H., Luster, M.I., Munswon, A.E. and Kimber, I. (ed.). Immunotoxicology and immunopharmacology. NY : Raven Press, p. 71-95.

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

