

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**ÉTUDE DU POTENTIEL TOXIQUE DES EAUX SOUTERRAINES DE
MERCIER : IMPACT DES ANCIENNES LAGUNES**

Par

Nadjet Benchalgo

Thèse présentée pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Pre. Cathy Vaillancourt, Ph.D
INRS-Armand-Frappier

Examineur externe

Pre. Lise Parent, Ph.D
TÉLUQ, Université du Québec

Examineur externe

Pre. Gaëlle Triffault-Bouchet, Ph.D
Ministère du Développement durable,
De l'Environnement, de la Faune et des Parcs

Directeur de recherche

Pr. Michel Fournier, Ph.D
INRS-Armand-Frappier

Codirecteur de recherche
Environnement Canada

Pr. François Gagné, Ph.D

REMERCIEMENTS

Avant de commencer ce manuscrit, je désire exprimer toute ma gratitude et mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont facilité mon parcours de doctorat et qui m'ont aidé de près ou de loin durant ces années d'étude.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux Professeures Lise Parent et Gaëlle Triffaut-Bouchet qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse malgré leurs nombreuses responsabilités. Ma gratitude et mes remerciements vont également à la Pre Cathy Vaillancourt, d'avoir accepté la présidence du jury d'évaluation. C'est tout un honneur pour moi.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse le Professeur Michel Fournier, qui m'a ouvert les portes de son laboratoire il y a cinq ans déjà (!), pour m'avoir dirigé avec enthousiasme tout au long de ces années, de sa confiance et de ses encouragements constants. De plus, il m'a donné la chance d'apprendre et d'approfondir l'art de la communication des résultats scientifiques lors de nombreux congrès auxquels il m'a permis d'assister. Je vous remercie également d'accorder à tous vos étudiants (es) toutes les facilités pour mener à bien leurs travaux.

Mes sincères remerciements vont à mon codirecteur le Dr François Gagné de m'avoir accueillie au sein de son Laboratoire au Centre Saint Laurent (Environnement Canada) où les expositions ont eu lieu et la partie des expérimentations sur les biomarqueurs biochimiques a été réalisée. Vos conseils judicieux dans la rédaction d'articles, vos suggestions et commentaires m'ont été très utiles dans des moments difficiles. Merci pour l'inspiration que vous avez été pour moi dans la réalisation de mes travaux.

J'en profite pour remercier également toutes les personnes qui ont participé de façon scientifique ou personnelle, à la concrétisation de ce travail de thèse. Je tiens à remercier Dre Pauline Brousseau pour ses conseils et orientations. Je remercie, également Mme Marlène Fortier assistance de recherche à l'INRS, Mme Sophie trépanier et Mme Julie Auclair, assistantes de recherche au Centre Saint Laurent, pour m'avoir fait profiter de leurs expériences et compétences techniques. Je remercie Julien Paquette et Michel Paquin du Ministère de l'Environnement de Québec de m'avoir aidé dans l'échantillonnage des eaux souterraines. Je remercie Mme Anne

Philippon pour le suivi de mon dossier, sa patience et sa disponibilité à répondre à toutes mes questions. Je tiens à remercier aussi Mr Michel Courcelles pour la formation en ENDNOTE et pour l'efficacité de son travail. Merci à Mme Danielle Chartrand pour la rapidité avec laquelle elle me transmettait les documents de référence demandée.

A toutes mes collègues du labo, passées ou présentes ... elles se reconnaîtront. Merci les filles pour votre amitié, pour l'ambiance et les encouragements. Un merci particulier à Hayet, Hamida et Gihane pour m'avoir permis de décrocher de temps en temps de mon projet de thèse, merci pour les après-midi ensemble dégustant un bon café avec des gâteaux traditionnels.

Enfin un grand merci tout spécial à toute ma famille qui m'a beaucoup soutenue tout au long de cette période, en particulier à mes enfants; Oussama, Yassamine, Maroua et Amel qui m'ont supporté, soutenu, encouragé tout au long de ces années. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance et le témoignage de mon amour. Merci à vous d'avoir supporté une maman à temps partiel. Je remercie mon mari pour sa patience, sa compréhension et son soutien sans qui, ce travail n'aurait pas pu voir le jour. Merci à mes parents, vous avez toujours su me motiver et m'encourager malgré la distance qui nous sépare.

Que ceux ou celles que j'aurais pu oublier puissent me pardonner!

«En effet, c'est dans l'eau que sont apparus les premiers signes de vie à la surface de notre planète. C'est aussi dans l'eau que se sont épanouies plusieurs centaines d'espèces animales. Même chez les espèces terrestres, c'est dans l'eau contenue dans chacune des cellules de ces organismes que se déroulent les réactions biochimiques nécessaires à la vie. La vie à la surface de notre planète a donc besoin d'une eau propre, car il est de plus en plus évident que la présence de contaminants dans l'eau peut interférer avec les processus vitaux».

Michel Fournier

RÉSUMÉ

Le déversement de 40000 m³ à 170000 m³ de déchets liquides dans une gravière désaffectée, situées dans la ville de Mercier à 20 km au sud de Montréal, a causé de sérieux problèmes de contamination des eaux souterraines. Les lagunes ainsi formées contenaient des produits provenant des industries, soit principalement des déchets d'industries chimiques et pétrochimiques. La présence de ces polluants organiques peut compromettre le système immunitaire des organismes aquatiques et altérer l'activité enzymatique impliquée dans les phases de biotransformation du xénobiotique.

Notre travail vise une étude écotoxicologique des eaux souterraines de Mercier. Dans un premier temps, nous avons examiné via des tests *in vitro*, l'effet immunotoxique de l'exposition des leucocytes de truites aux eaux souterraines, échantillonnées auprès de 13 puits situés dans le panache des lagunes. En effet, les résultats ont révélé que la capacité phagocytaire et l'efficacité phagocytaire ont été diminuées significativement pour 4 puits sur /13 et 6 puits sur /13 respectivement. La prolifération des lymphocytes B et T stimulée aux mitogènes a été augmentée parmi des échantillons. Dans un deuxième volet, les expériences *in vivo* ont permis de démontrer que les réponses étaient différentes selon la distance des puits échantillonnés. Une analyse factorielle discriminante faite pour classer et déterminer les différences entre les sites situés à des distances de (1,2 km), (2,7 km) et (5,4km) des lagunes, a révélé que le site d'échantillonnage à 2,7 km était le plus contaminé. Toutefois, l'activité phagocytaire a été stimulée chez les truites exposées à ces eaux ce qui suggère une immunostimulation. En plus, les lymphocytes T étaient plus sensibles à la réponse humorale que les lymphocytes B. D'autre part, une augmentation du nombre de cellules apoptotiques induites à la dexaméthaxone a été observée chez les truites exposées aux eaux souterraines de Mercier ce qui indique une plus grande susceptibilité du système immunitaire au stress. Une perturbation du cycle cellulaire des lymphocytes a été aussi mise en évidence chez les truites exposées aux eaux souterraines dans le panache, ce qui suggère une perte de son contrôle et son altération contribue à l'oncogénèse.

Dans un troisième temps, nous avons mis en évidence l'effet toxique de ces eaux par la mesure de deux types de biomarqueurs soient; les biomarqueurs de défense (éthoxyrésorufine O-dééthylase(EROD) et glutathion S-transférase (GST)) et ceux des lésions tissulaires (peroxydation lipidique (LPO) et les cassures de brins d'ADN). Les résultats ont montré une induction de l'activité EROD chez les poissons exposés aux eaux de puits à 1,17 km et 5,40 km, alors qu'une inhibition de l'activité a été enregistrée chez les poissons exposés aux eaux du puits à 2.74 km. Une inhibition de l'activité GST et une induction de la génotoxicité ont été observées en conséquence.

La solution choisie pour contrôler la contamination et restaurer la nappe phréatique de Mercier, était l'implantation des pièges hydrauliques d'où l'eau contaminée serait pompée, traitée puis rejetée dans les eaux de surface. Notre dernier volet vise à étudier l'immunotoxicité de ces eaux traitées et non traitées suite à une exposition *in vivo* des truites. Les résultats démontrent que les contaminants présents dans les eaux avant et après traitement peuvent moduler les compétences de bases comme la phagocytose et la prolifération des lymphocytes.

Dans l'ensemble, nos travaux suggèrent que le système immunitaire, le système de biotransformation, l'intégrité de l'ADN, le cycle cellulaire et l'apoptose peuvent être affectés par l'exposition aux eaux souterraine de Mercier. De plus, il ressort que les eaux traitées et rejetées dans les eaux de surface pourraient constituer une menace pour le système immunitaire des organismes qui y vivent.

Enfin, l'utilisation des biomarqueurs dans l'évaluation de la toxicité des eaux souterraines de Mercier n'aurait pas eu d'intérêt et de signification que dans le cadre d'une approche multi-marqueur. Seule cette approche a permis de fournir une expertise valable dans le contexte d'un mélange complexe de produits chimiques. Cela comprend donc une complémentarité de biomarqueurs liés à la génotoxicité, à l'immunotoxicité et à la biodégradation du toxique.

Nadjet Benchalgo, M.Sc.

Étudiante

Michel Fournier, Ph.D.

François Gagné, Ph.D.

Directeur et co-directeur

de recherche

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	VII
TABLE DES MATIERES.....	IX
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XVI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XVIII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE1: REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 Eaux souterraines et contaminations	4
1.2 Les contaminants organiques dans les eaux souterraines et toxicité.....	6
1.2.1 Les composés organiques volatiles (COV)	6
1.2.1.1 Le benzène	6
1.2.1.2 Le chlorure de vinyle	7
1.2.1.3 1,2-Dichloroéthane	8
1.2.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	10
1.2.3 Les pesticides.....	12
1.2.4 Les polychlorobiphényles (PCB)	12
1.3 Toxicité liée à un mélange de contaminants	14
1.4 Biodisponibilité des contaminants dans les eaux souterraines.....	15
1.5 Outils d'évaluation de la qualité d'un milieu aquatique.....	16
1.5.1 Approche chimique	16

1.5.2	Approche biologique	17
1.5.3	Approche biochimique	17
1.5.4	Exemples de biomarqueurs mesurés sur différentes espèces	20
1.5.5	Exemples de biomarqueurs mesurés chez le poisson	21
1.5.5.1	Biomarqueurs immunologiques	21
1.5.5.2	Biomarqueurs biochimiques	22
1.6	Modèle biologique: Oncorhynchus mykiss.....	29
1.6.1	Biologie de la truite	29
1.6.2	Morphologie générale et anatomie	30
1.6.3	Système immunitaire	30
CHAPITRE 2: CONTEXTE DE L'ÉTUDE		35
2.1.	Problématique de Mercier.....	37
2.2.	Objectifs de recherche.....	40
2.3.	Hypothèses.....	42
CHAPITRE 3: ALTÉRATIONS IMMUNOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES INDUITES CHEZ LA TRUITE APRÈS UNE EXPOSITION AUX EAUX SOUTERRAINES DE MERCIER		44
3.1.	Étude <i>in vitro</i> des effets immunotoxiques des eaux souterraines de Mercier sur les cellules immunitaires des truites arc-en-ciel.....	45
3.2.	Effets immunotoxiques d'un site d'incinération de déchets industriels sur la truite (Oncorhynchus mykiss) exposée aux eaux souterraines	76
3.3.	Étude des biomarqueurs chez la truite exposée aux eaux souterraines contaminées....	88
CHAPITRE 4: IMMUNOTOXICOLOGIE DES EAUX DE L'UTES CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL		97
4.1.	Étude <i>in vivo</i> des effets immunotoxiques d'une exposition aiguë de la truite aux eaux de l'UTES traitées et non traitées.....	98

CHAPITRE 5: DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	127
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	140
ANNEXES	159
ANNEXE A: RÉSULTATS DE L'ÉTUDE PILOTE	160
ANNEXE B: LETTRES DES ÉDITEURS	168
GLOSSAIRE	173

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE1: REVUE DE LITTÉRATURE	3
Figure 1.1. Statistique Canada, Estimations trimestrielles de la population du Canada, des provinces et des territoires	5
Figure 1.2. Fraction biodisponible et toxicité (Fent, 2003)	16
Figure 1.3. Schéma du métabolisme et de la détoxification des xénobiotiques	23
Figure 1.4. Cassure de brin d'ADN..	25
Figure 1.5. La distribution des cellules dans différentes phases du cycle cellulaire.	26
Figure 1.6. Le phénomène de l'apoptose	27
Figure 1.7. Schéma général de l'oxydation des acides aminés, des lipides et des acides nucléiques au cours du stress oxydant	28
Figure 1.8. Répartition d'Oncorhynchus mykiss dans le monde.	29
Figure 1.9. Anatomie de la truite arc-en-ciel.	30
Figure1.10. Aperçu schématique sur les différentes fonctions immunitaires chez les poissons osseux	34
CHAPITRE 2: CONTEXTE DE L'ÉTUDE	35
Figure 2.1. Les différentes zones A,B,C sources de contamination du site de Mercier.	38

Figure 2.2. Déplacement de la contamination dans le roc.	38
---------------------------------------------------------------	----

CHAPITRE 3: ALTÉRATIONS IMMUNOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES INDUITES CHEZ LA TRUITE APRÈS UNE EXPOSITION AUX EAUX SOUTERRAINES DE MERCIER 44

3.1. Étude in vitro des effets immunotoxiques des eaux souterraines de Mercier sur les cellules immunitaires des truites arc-en-ciel..... 45

Figure 1. Sampling Wells at different distances around Mercier lagoons in campaign October 2009.....	69
------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figure 2. Frequency of occurrence, mean and maximum of concentration for VOCs detected in Mercier groundwater in campaign October 2009	71
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figure 3. Phagocytic response of trout macrophages	72
----------------------------------------------------------	----

Figure 4. Immunoinefficiency of trout macrophages.....	73
--------------------------------------------------------	----

Figure 5. Effects of various concentrations of Mercier groundwater on trout leucocytes proliferation, stimulated with (a) PHA.	74
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figure 6. Effects of various concentrations of groundwater samples at different distances from Mercier lagoons on trout leucocytes proliferation, stimulated with (b) LPS.....	75
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

3.2. Effets immunotoxiques d'un site d'incinération de déchets industriels sur la truite (Oncorhynchus mykiss) exposée aux eaux souterraines 76

Figure 1. Map with sampling points around the city of Mercier during the 2010 sampling campaign.....	79
------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figure 2. Phagocytosis results for Rainbow Trout exposed to different concentrations of Mercier groundwater (at 1.17, 2.74 and 5.40 km) for 14 days.....	81
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figure 3. Lymphocytes proliferation stimulated with PHA (T lymphocytes and with LPS (B lymphocytes) in Rainbow Trout exposed for 14 days to Mercier groundwater (at 1.17, 2.74 and 5.40 km).....	82
Figure 4. Effects of the exposure to Mercier groundwater (at 1.17, 2.74 and 5.40 km) on the cell cycle of leucocytes in Rainbow Trout.....	84
Figure 5. Ratio of apoptosis-induced versus apoptosis-not-induced in Rainbow Trout exposed for 14 days to Mercier groundwater.....	85
Figure 6. Results for factorial (A) and discriminant function analyses (B).....	85
3.3. Étude des biomarqueurs chez la truite exposée aux eaux souterraines contaminées....	88
Figure 1. Map with sampling points around Mercier city in campaign may 2010.....	92
Figure 2. EROD activity in trout liver after 4 and 14 days exposure to groundwater at 1.2 km, 2.7 km and 5.4 km.....	93
Figure 3. GST activity in trout liver after 4 and 14 days exposure to groundwater at 1.2 km, 2.7 km and 5.4 km.....	93
Figure 4. Lipid peroxidation in trout liver after 4 and 14 days exposure to groundwater at 1.2 km, 2.7 km and 5.4 km.....	94
Figure 5. DNA strand break in trout liver after 4 and 14 days exposure to groundwater at 1.2 km, 2.7 km and 5.4 km.....	94
Figure 6. Results for discriminant function analyses for 14 days exposure to Mercier groundwater at 1.2 km, 2.7 km and 5.4 km.	94
CHAPITRE 4: IMMUNOTOXICOLOGIE DES EAUX DE L'UTES CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL.....	97
4.1. Étude in vivo des effets immunotoxiques d'une exposition aiguë de la truite aux eaux de l'UTES traitées et non traitées.....	98

Figure 1.UTES process and sampling location (prior and postiori treatment) **119**

Figure 2. Proliferation responses of head-kidney lymphocytes stimulated with PHA (T lymphocytes) and LPS (B lymphocytes) in leucocytes exposed to UTES effluent..... **121**

Figure 3. NK cytotoxic activity against cancerous cells YAC-1 in Rainbow Trout exposed to various concentrations of UTES effluent..... **122**

Figure 4. Measurement of cellular leukocyte concentrations in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) after 96 hours of exposure to a treated and untreated effluent. **123**

Figure 5. Phagocytosis of Rainbow Trout exposed to various concentrations of UTES effluent **124**

Figure 6. Proliferation responses of head-kidney lymphocytes stimulated with PHA (T lymphocytes) and LPS (B lymphocytes) in Rainbow Trout exposed for 96 hours to UTES effluent **125**

Figure 7. NK cytotoxic activity against cancerous cells YAC-1 in Rainbow Trout exposed to various concentrations of UTES effluent..... **126**

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE1: REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
TABLEAU 1.1. BIOMARQUEURS D'EXPOSITION ET/OU D'EFFET	19
TABLEAU 1.2. TABLEAU RÉCAPITULATIF SUR LES DIFFÉRENTS BIOMARQUEURS MESURÉS CHEZ DIFFÉRENTES ESPÈCES EXPOSÉES AUX CONTAMINANTS ORGANIQUES.....	20
Chapitre 3: Altérations immunologiques et biochimiques induites chez la truite après une exposition aux eaux souterraines de Mercier.....	44
3.1. Étude <i>in vitro</i> des effets immunotoxiques des eaux souterraines de Mercier sur les cellules immunitaires des truites arc-en-ciel.....	45
TABLEAU 1: SUMMARY OF ANALYTICAL RESULTS OF GROUNDWATER SITES SAMPLED FOR 61 ORGANIC CONTAMINANTS (SAMPLING CAMPAIGN 2009).	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
3.2. Effets immunotoxiques d'un site d'incinération de déchets industriels sur la truite (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) exposée aux eaux souterraines.....	76
Tableau 1. Chemical composition of Mercier groundwater	81
Tableau 2. Measurement of leukocyte concentration (cellularity), weights and lengths in Rainbow Trout (<i>O. mykiss</i>) after 14 days of exposure to different concentrations of Mercier groundwater (3.1%, 12.5%, 25% and 50%) and controls.....	82
Tableau 3. Apoptosis in lymphocytes and macrophages of Rainbow Trout exposed for 14 days to Mercier groundwater.....	83

Tableau 4. Correlation between biomarkers in Rainbow Trout exposed for 14 days to Mercier groundwater (at 1.17, 2.47 and 5.40 km).....	83
Tableau 5. Summary table to characterize the different aspects of the immunotoxic risk of contaminants.....	84
3.3. Étude des biomarqueurs chez la truite exposée aux eaux souterraines contaminées.....	88
Tableau 1. Samples of water collected in campaign 2010 from 15 wells in order to study the quality of Mercier groundwater.	91
Tableau 2. Characteristics of water samples.....	91
Tableau 3. Morphometric data of trout exposed to groundwater at 1.2 km, 2.7 km and 5.4 km..	93
Tableau 4. Biomarkers correlation in rainbow trout exposed for 4 and 14 days to Mercier groundwater at 1.2, 2.7 and 5.4 km.....	93
CHAPITRE 4: IMMUNOTOXICOLOGIE DES EAUX DE L'UTES CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL.....	97
4.1. Étude in vivo des effets immunotoxiques d'une exposition aiguë de la truite aux eaux de l'UTES traitées et non traitées	98
TABLEAU 1. ORGANIC COMPOUNDS DETECTED IN UTES TREATED EFFLUENT. .	120
CHAPITRE 5: DISCUSSIONS ET CONCLUSION GENERALE	
Tableau 1. Tableau récapitulatif des biomarqueurs de toxicité mesurés et leurs effets.....	137

LISTE DES ABRÉVIATIONS

COV: Composés organiques volatiles

DCE: Dichloroéthane

HAP: hydrocarbures aromatiques polycycliques

PCB: Biphényles polychlorés

TBT: Tributylétain

UTES: Unité de traitement des eaux souterraines

CMA: Concentration maximale acceptable

LDM: Limite de détection de la méthode

CL50: Concentration létale

TEQ: « Toxic Equivalent Quantity »

DJT: Dose journalière tolérable

DEX: Dexaméthasone

NK: « Natural Killer »

GST: Glutathion *S*-transférase

EROD: 7-éthyl résorufine-*o*-dééthylase

LPO: Peroxydation lipidique

ERO: Espèces réactives de l'oxygène

MDA: Malonydialdéhyde

MTs: Métallothionéines

K562: Cellules tumorales humaines

YAC-1: Cellules tumorales animales

LDPNA: Liquides denses en phase non aqueuse

PHA: Phytohémagglutinine

LPS: Lipopolysaccharide

µg: microgramme

µL: microlitre

µM: micromolaire

mM: millimolaire

mL: millilitre

INTRODUCTION

Les contaminants présents dans une nappe phréatique posent de sérieux problèmes pour l'être humain et son écosystème, par leur caractéristiques chimiques et leur toxicité. La pollution de ces eaux est généralement due à un mélange complexe de produits chimiques dont les interactions peuvent modifier la toxicité des substances isolées par synergie ou par antagonisme. En conséquence, la caractérisation chimiques des mélanges n'aboutit pas toujours à une évaluation appropriée de leurs effets biologiques (Liorente et al., 2012). L'utilisation de bio-essais pour évaluer les risques écotoxicologiques liés aux polluants chimiques, peut être prédictive des dommages dans le milieu naturel (Gagné et al., 1997).

Les poissons comme bioindicateurs, en particulier les téléostéens ont suscité un intérêt considérable dans les études écotoxicologiques (Vander Oost, 2003). La truite arc-en-ciel a été choisie en tant que modèle biologique du fait de sa sensibilité et de sa position dans les écosystèmes aquatiques. Plusieurs auteurs dans le cadre des recherches sur la pollution aquatique ont utilisé la truite comme bioindicateur (Yang et al., 1997; Hanson et al., 2005; Hoeger et al., 2005; Orrego et al., 2006; Cheng et al., 2007; Salo et al., 2007; Wang et al., 2007; Zurita et al., 2007; Gioacchini et al., 2008; Hébert et al., 2008; Sturve et al., 2008; Muller et al., 2009; Shelley et al., 2009; Gagné et al., 2011; Altinauk et al., 2012).

Dans ce contexte, notre étude écotoxicologique vise une analyse des marqueurs biologiques susceptibles de fournir une alerte précoce de toxicité, indiquant l'exposition de l'organisme à au moins un composé chimique à caractère toxique. Une approche multi-biomarqueurs a été utilisée dans l'étude. Ainsi, nous nous sommes attachés à suivre des marqueurs qui constituent les premiers signaux de perturbations suite à une interaction des xénobiotiques avec les organes cibles. En premier temps, nous nous sommes intéressés aux effets des substances chimiques sur le système immunitaire des poissons. L'immunocompétence était évaluée par la mesure de l'activité phagocytaire, l'activité cytotoxique des NK et la prolifération des lymphocytes. Des marqueurs enzymatiques (les enzymes de biotransformation) et non enzymatiques (stress oxydatif) ont été également mesurés, ainsi que l'intégrité de l'ADN (dommage à l'ADN).

Nous avons recherché également les effets de l'exposition aux contaminants sur le cycle cellulaire et l'apoptose des leucocytes de la truite. Au travers de cette approche nous avons tenté d'obtenir une image globale des conséquences biologiques d'une exposition aux eaux contaminées.

Afin de présenter l'étude réalisée dans ce sens, le présent manuscrit s'articule en deux parties: l'une bibliographique, l'autre concerne les articles. Dans la première partie bibliographique, un bilan de l'état de connaissances est dressé et constitue le premier chapitre. Ce chapitre résume ce que sont les contaminants qui pullulent dans les eaux souterraines ainsi que leur toxicité. Une présentation des outils d'évaluation de la qualité des milieux aquatiques est abordée et sont présentés parmi eux, en particulier, les biomarqueurs choisis pour notre étude. Pour cerner la problématique de la contamination, un deuxième chapitre inclue le contexte de l'étude, l'historique de la contamination, les objectifs de recherche et les hypothèses.

Les chapitres 3 et 4 constituent la partie «articles». Il s'agit d'étudier dans un premier temps (chapitre 3), les altérations immunologiques et biochimiques induites chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) après une exposition aux eaux souterraines de Mercier. Dans le deuxième temps (chapitre 4), nous avons étudié l'effet immunotoxique des eaux de l'unité de traitement des eaux souterraines (UTES) chez la truite. Enfin, dans le chapitre «discussion générale et conclusion» (chapitre 5), sont présentés les discussions. Elles sont synthétisées de façon à ne pas reprendre les informations fournies dans les articles. Le chapitre se termine par une conclusion et perspectives sur lesquelles ces travaux seraient susceptibles de déboucher.

CHAPITRE1: REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Eaux souterraines et contaminations

Au Canada, près de 8,9 millions de personnes soient 30,3% de la population sont tributaires de l'eau souterraine pour leur besoin domestique (figure 1.1). La contamination de ces eaux est l'un des problèmes environnementaux qui peut engendrer des effets indésirables sur la santé des êtres vivants et sur l'environnement (Zhang et al., 2009). De plus, son traitement peut s'avérer très long et coûteux. Plusieurs incidents ont contribué à sensibiliser la population sur l'importance et sur la vulnérabilité de cette ressource essentielle et vitale. Parmi ces incidents, nous citerons par exemple deux sources ponctuelles de contamination des eaux souterraines; l'infiltration chimique causée par l'incendie des pneus à Hagersville qui a menacé de polluer les eaux souterraines dans la province de l'Ontario (<http://www.ec.gc.ca/eau-water/default.asp?lang=Fr&n=6A7FB7B2-1>); et la contamination des eaux souterraines qui a rendu inutilisable les réservoirs d'eau de milliers d'habitants de la ville de Mercier au Québec, à cause des déversements de liquides organiques industriels denses dans les lagunes situées dans une ancienne carrière de gravier (Ministère de l'environnement et de la faune, 1997).

Les substances nuisibles dans les eaux souterraines ne sont pas toutes d'origine anthropique. On y trouve souvent des contaminants de source naturelle. C'est en fonction du contexte minéralogique que les eaux souterraines en se déplaçant participent à de nombreux processus géochimiques (altération, dissolution et précipitation). C'est ainsi qu'elles peuvent être contaminées par du fer, du manganèse, du carbonate de calcium, du plomb et par d'autres métaux. Deux cas connus de contamination naturelle : l'arsenic dans les Appalaches (<http://www.bape.gouv.qc.ca/sections/archives/eau/docdeposes/lesdocumdeposes/gene108-1.pdf>) et les résidus de fer dans les eaux souterraines de Mercier à Québec (Prime et Fournier, 2008).

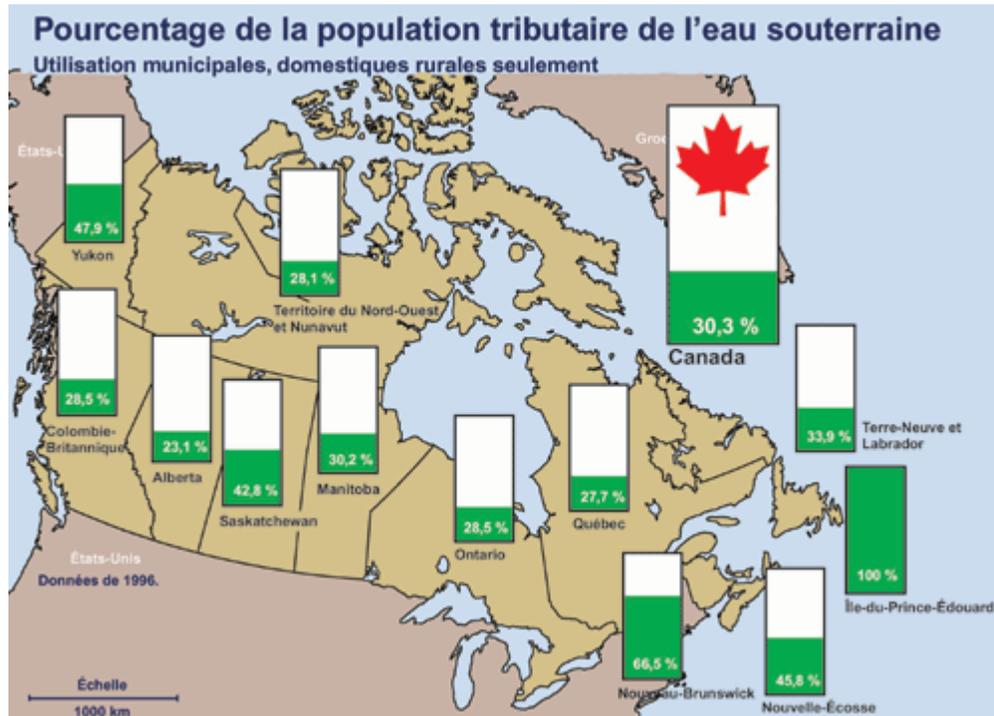


Figure 1.1. Statistique Canada, Estimations trimestrielles de la population du Canada, des provinces et des territoires, produit n° 91-001 au catalogue de Statistique Canada, Ottawa, vol 11, 1996 (<http://www.ec.gc.ca/eau-water/default.asp?lang=Fr&n=6A7FB7B2-1>).

Par ailleurs, plusieurs études sur la qualité des eaux souterraines et la migration des contaminants ont montré que la pollution ne s'arrête pas avec la perte de réserve d'eau. La contamination se déplace jusqu'aux eaux de surface (lacs et cours d'eau voisin). En effet, les eaux de surface présentent une interconnexion vitale avec les ressources en eaux souterraines (Han et al., 2012). Les conditions hydrogéologiques jouent un grand rôle dans le contrôle de la distribution des contaminants organiques dans les eaux souterraines. Leur vitesse de migration est contrôlée par des phénomènes de retentions selon la substance et le milieu d'écoulement (Poulain et al., 1985).

1.2 Les contaminants organiques dans les eaux souterraines et toxicité

Les polluants présents dans les eaux souterraines peuvent être mixtes et complexes, ils regroupent les métaux et les molécules organiques à des concentrations susceptibles d'induire des effets toxiques. Le sous-ensemble des polluants organiques est composé de plusieurs familles de molécules parmi lesquelles on retrouve principalement les composés organiques volatiles (COV), les polychlorobiphényles (PCB), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les pesticides organochlorés et les dioxines. Ces composés organiques présentent des caractéristiques chimiques communes (hydrophobie, solubilité, persistance) et sont bien connus pour leur toxicité. Par ailleurs, la toxicité d'un contaminant est une évaluation de sa capacité à nuire à un être vivant. Elle dépend entre autres de sa concentration, du type d'organisme et de la durée d'exposition. Le seuil de toxicité quant à lui est la concentration minimale qui posent le risque de causer des dommages à la santé humaine ou à l'environnement.

1.2.1 Les composés organiques volatiles (COV)

les COV représentent les principaux contaminants détectés dans les eaux souterraines (Golfinopoulos et al., 2001). La présence des COVs dans l'environnement est liée en majeure partie à l'activité humaine. Ils sont souvent mesurés dans les sites de déchets industriels et à titre d'exemple ont été détectés dans 44% d'échantillons de puits d'approvisionnement en eaux potables (Pohl et al., 2012). La population est généralement exposée à un mélange de COVs, plutôt qu'à un seul produit. Plusieurs travaux entrepris par ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) ont permis de tracer les profils toxicologiques des composés volatiles dans le but d'interpréter la toxicité d'un seul produit et d'un mélange de produits. Ils sont considérés immunotoxiques à faible concentration suite à une exposition à long terme (Wong et al., 1992) et carcinogènes (Toussaint et al., 1999).

1.2.1.1 *Le benzène*

Le benzène est un homologue appartenant à la série des hydrocarbures aromatiques (Mackay et al., 1992). La présence de benzène dans l'eau est généralement causée par des

effluents industriels et par la pollution atmosphérique. Au Québec, parmi les 2 388 échantillons analysés d'eau potable traitée, entre 2001 et 2005, le benzène était détecté à des concentrations entre 0,03 à 3,6 µg/L dans 26 échantillons provenant de 21 endroits différents. Parmi tous ces échantillons, un seul avait une concentration de benzène supérieure à 1 µg/L (<http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/benzene/index-fra.php>). La valeur recommandée pour ne pas avoir effet est de 2.2µg/L (US EPA, 2006). Le benzène est classé comme étant cancérigène pour l'humain (ATSDR, 2007).

● Toxicité du benzène

Une corrélation significative a été trouvée entre la concentration du benzène dans le sang des personnes exposées et l'immunosuppression (Uzma et al., 2010). Une concentration de benzène aussi basse que 10 ppm (32 mg/m³) avait un effet immunotoxique chez le rat, l'effet est traduit par une réduction dans la réponse des lymphocytes B et T (Zabrodskii et al., 1997). Le benzène induit un léger dommage à l'ADN des cellules cibles, seulement si l'exposition était à une forte concentration (5mM). Cependant, une exposition à ses métabolites en particulier, dont le p-benzo-quinone et benzotriol implique des effets indésirables comme le dommage à l'ADN et l'apoptose, même à faible concentration (Morozzi et al., 1999). Il a été démontré dans l'article de Morozzi et al.(1999), que le benzène est capable d'activer la protéine kinase C, enzyme qui joue un rôle dans la transduction du signal qui va induire la mort cellulaire programmée, ou apoptose. Le benzène et ses métabolites sont capables d'induire l'apoptose des lymphocytes chez l'homme (Singh et al., 2011). Les métabolites du benzène, en particulier l'hydroquinone, inhibent l'activité des macrophages par suppression de la production des interleukines (IL) (Lee et al., 2007).

1.2.1.2 Le chlorure de vinyle

Le chlorure de vinyle (chloréthylène ou chloréthène) est un produit chimique synthétique, légèrement soluble dans l'eau (1,1 g/L à 28 °C), mais très soluble dans les graisses et les solvants organiques (ATSDR, 2006). Son déversement en milieu aquatique est généralement associé aux rejets industriels de produits chimiques et de latex (CIRC, 1979). Il peut aussi être formé dans les

eaux souterraines par la biodégradation du trichloroéthène, du trichloroéthane et du tétrachloroéthène (ATSDR, 2006).

Comme le chlorure de vinyle n'est pas adsorbé sur les particules de sol, cette particularité lui permet de migrer facilement vers les eaux souterraines, où il peut rester pendant des années (Parsons et coll., 1984). Au Québec, la teneur en chlorure de vinyle mesurée dans 4 824 échantillons prélevés entre 2001 et 2009 était inférieure à la limite de détection de la méthode (LDM) dans la majorité des échantillons (99,6 %) : la concentration se situait entre 0,02 et 0,6 µg/L. 17 échantillons contenaient du chlorure de vinyle à des concentrations entre 0,04 et 3,0 µg/L (<http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/consult/2012/vinyl/draft-ebauche-fra.php>). La valeur recommandée pour ne pas avoir d'effet est de 2,4 µg/L pour le chlorure de vinyle (US EPA,2006).

● Toxicité du chlorure de vinyle

Le chlorure de vinyle est classé comme étant cancérigène (du groupe 1) pour l'être humain et les animaux (ATSDR, 2006). Le chlorure de vinyle est métabolisé au niveau hépatique (cytochrome P450) en produits très réactifs (l'oxyde de chloréthylène et le chloroacétaldéhyde). Ces deux métabolites sont capables de réagir avec l'ADN pour y former des adduits et sont principalement métabolisés par conjugaison au glutathion via la glutathion-S transférase (Huang et al., 1997). Aziz et al. (2012), ont également montré qu'il existait une corrélation entre les dommages causés à l'ADN et la durée de l'exposition au chlorure de vinyle. Cependant, il apparaît que les dommages causés à l'ADN sont réversibles après arrêt ou diminution de l'exposition (Fucic et al., 1996).

1.2.1.3 1,2-Dichloroéthane

Le 1,2-dichloroéthane est un produit chimique synthétique, utilisé principalement comme intermédiaire dans la synthèse du chlorure de vinyle. C'est un composé très volatil qui a une solubilité dans l'eau de 8 690 mg/L (à 20 °C) (Konemann, 1981).

En Ontario, sous un dépôt de solvants organiques, les concentrations de 1,2-dichloroéthane dans les eaux souterraines variaient de 3,9 à 58 µg/L en 1988, même si le site était abandonné depuis

une dizaine d'années (Lesage et al., 1990). Dans la même année, dans les eaux souterraines, sous une décharge de déchets industriels à Mercier (Québec), une concentration de 41,8 g/L de 1,2-dichloroéthane a été enregistrée, bien que la décharge ne soit plus en service depuis 1972 (Pakdel et al., 1992). Pour le dichloroéthane, la concentration maximale admissible est de 55 µg/L (US EPA, 2006). Étant donné sa solubilité dans l'eau et sa mobilité élevée dans le sol, le 1,2-dichloroéthane risque d'atteindre les eaux souterraines par lixiviation de décharges de déchets dangereux (Lesage et al., 1990).

● Toxicité de 1,2-Dichloroéthane

Les résultats d'études de la toxicité à court terme ont montré une toxicité aiguë chez des poissons de mer (*Menidia beryllina*); une concentration létale (CL50 - 96 h nominale) de 480 mg/L dans un essai sans renouvellement a été signalée (CL50- concentrations jugées létales pour 50 % des organismes après une exposition de 96 heures) (Dawson et al., 1977). Par ailleurs, dans un essai à long terme et à renouvellement continu, la croissance des larves des menés têtes-de-boule (*Pimephales promelas*) exposées à une concentration de 59 mg/L a été réduite de façon significative de 62% (Benoit et al., 1982).

Le métabolisme du 1,2-dichloroéthane consiste en une oxydation microsomale faisant intervenir le cytochrome P450. Il se produit ainsi, du chloroacétaldéhyde et du 2-chloroéthanol et qui est suivie d'une conjugaison avec le glutathion (Sweeney et al., 2008). La stimulation du métabolisme du dichloroéthane (DCE) dans le foie conduit à la formation de composés réactifs plus toxiques que la molécule mère capable de réagir avec l'ADN et entraînant ainsi une mutation (Gwinn et al., 2011). Otitoloju et al.(2011) ont reporté dans leur étude sur le dichloroéthane, que ce dernier inhibe l'activité de l'enzyme de la phase I de biotransformation de CYP 2E1, un isoforme de CYP450 impliqué dans la bioactivation de plusieurs substances chimiques carcinogènes (Lilly et al., 1998). Une exposition à une concentration de 2000 ppm DCE peut causer une altération dans la morphologie du foie et des reins (Hotchkiss et al., 2010). L'agence de recherche sur le cancer (AIRC) a désigné le DCE comme étant potentiellement carcinogène pour l'humain (Gwinn et al., 2011). Les mêmes auteurs ont rapporté dans leur étude

sur DCE, qu'il est génotoxique, il induit la formation des adduits d'ADN ainsi que des mutations dans les gènes chez les rongeurs. L'activité des phagocytes se voit diminuer, suite à une exposition aiguë au DCE chez le rat (Zabrodskii et al., 1995). L'inhibition de la réponse humorale semble être due au dysfonctionnement des cellules immunocompétentes (Zabrodskii et al., 2004).

1.2.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les (HAP) sont des composés ubiquistes et des polluants de l'environnement en raison de leurs propriétés cancérigènes et mutagènes (Oliva et al., 2010). C'est une famille qui regroupe de nombreuses substances qui diffèrent entre elles par leur nombre de noyaux benzéniques. Les HAP sont des sous-produits de la combustion incomplète de la matière organique. Les activités anthropiques sont donc la principale cause de la pollution aux HAP. Ils sont présents dans l'environnement sous forme de mélanges complexes difficiles à caractériser (Olivier, 2009). Les HAP quand ils sont accompagnés de solvants organiques mobiles peuvent atteindre les eaux souterraines ainsi que les eaux superficielles par lixiviation à travers le sol, ainsi que par le ruissellement de surface (Wakeham et al., 1980; Sloof et al., 1989). La plus forte concentration de HAP enregistrée dans le fleuve Saint-Laurent était celle du phénanthrène, avec une concentration maximale de 119 ng/L. Dans les provinces de l'Atlantique, les concentrations de fluoranthène atteignaient jusqu'à 113 ng/L dans les eaux marines, alors que les concentrations de BaP étaient au dessous de la limite de détection (de 0,8 à 1 ng/L) et 16 ng/L (http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/ps11-lsp1/hydrocarb_aromat_polycycl/hydrocarb_aromat_polycycl_4-fra.php). Cependant, peu de données sont disponibles sur la présence de HAP dans les eaux souterraines du Canada.

Le caractère lipophile des HAP, favorise leur accumulation dans les tissus lipidiques des organismes (Bado-Nilles et al., 2011). Leur biotransformation se fait généralement selon deux phases réactionnelles. La phase I dite de fonctionnalisation augmente le caractère polaire des molécules par des réactions d'oxydation (formation d'époxyde et de diols) (Hawkins et al., 2002). Le produit issu de cette première phase peut être plus toxique que le composé initial.

Toutefois, la phase II, dite de conjugaison, fait intervenir plusieurs enzymes, comme la glutathion-S-transférase (GST). L'activité de l'enzyme GST est liée à la défense antioxydante due à la conjugaison des xénobiotiques électrophiles (Palanikuma et al., 2011). Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), quelques HAP induisent les enzymes du cytochrome P450 à travers la voie du Récepteur Aryl (AhR) (Hahn et Stegeman, 1994). La biotransformation des hydrocarbures polycycliques aromatiques les rend hydrophiles et facile à éliminer. Les métabolites polaires de certains HAP, tel que le benzo[a]pyrène (BaP), peuvent interagir avec l'ADN. Il se forme alors des adduits sur l'ADN, ce qui peut aboutir à des mutations et, à long terme, au développement de cancers (Binelli et al., 2008).

● Toxicité des HAP

Les HAP sont connus pour induire des effets défavorables sur la croissance (Jifa et al., 2006) et la reproduction (White et al., 1999) des espèces. Vu leur caractère lipophile, ils peuvent pénétrer facilement les membranes biologiques et s'accumuler dans les organismes (Oliva et al., 2010). Leurs métabolites peuvent se lier de manière covalente à l'ADN provoquant des mutations et causant des altérations dans le matériel génétique (Oliva et al 2010). Plusieurs études ont démontré que certains HAP sont potentiellement immunosuppresseurs (Chen et white, 2004; Lenka Allan et al., 2010). En effet, chez la limande, les fortes doses en hydrocarbures sont responsables de la réduction du nombre de cellules immunitaires (Tahir et al., 1993); alors que chez la truite arc-en-ciel ce sont les faibles doses qui l'induisent (Hoeger *et al.*, 2004). Une injection par voie intrapéritonéale de benzo[a]pyrène chez le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) génère une réduction des lymphocytes réduisant ainsi la prolifération cellulaire et activant l'apoptose (Holladay *et al.*, 1998). Une réduction des phagocytes suggère une diminution de l'activité phagocytaire observée chez les vertébrés suite à une exposition au benzo[a]pyrène (Carlson *et al.*, 2002). Cependant, ce résultat ne semble pas être constant. En effet, chez le tilapia du Nil, une injection par voie intrapéritonéale de benzo[a]pyrène n'a aucun effet sur la phagocytose des leucocytes du pronéphros (Holladay *et al.*, 1998). Les HAP induisent l'apoptose par la voie mitochondriale dépendante du P53 (Franco et al., 2009). L'exposition aux HAP se produit par un mélange de toxiques, rarement par les composés pris

individuellement. L'effet additif du mélange d'HAP, génère la formation d'adduit, l'apoptose et le blocage du cycle cellulaire dans la phase S (Staal et al., 2007). Les HAP sont connus comme polluants à effets multiples causant les mutations à l'ADN, interférant avec les hormones endocriniennes et stimulant le métabolisme (Couillard et al., 2005). Une inhibition de l'activité CYP 1A chez les poissons exposés à une forte concentration de HAP est probablement liée à une variété de mécanismes, incluant l'hépatotoxicité comme il a été indiqué dans l'étude de Couillard et al. (2005).

1.2.3 Les pesticides

La disponibilité et l'utilisation de pesticides peuvent engendrer des risques sur la santé et sur l'environnement. Par conséquent, les pesticides sont des produits très réglementés au Canada par l'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA), qui relève de Santé Canada. En 2003, dans le Saint-Laurent et dans les rivières Nicolet, Yamaska et Saint-François, l'atrazine et le métolachlore, ainsi que le déséthylatrazine étaient détectés dans 50% des échantillons prélevés. L'atrazine et le métolachlore sont des herbicides utilisés surtout pour la culture de maïs et du soja au Québec (Environnement Canada, 2011)

● Toxicité des pesticides

Les pesticides semblent affecter la réponse immunitaire innée (activité phagocytaire) de l'espèce *Oncorhynchus mykiss* exposée au pentachlorophenol (1 µg/L et 2 µg/L) (Shelley et al., 2009). Une augmentation dans la production des ERO dans les cellules du pronéphros a été observée chez la truite exposée au lindane à faible concentration (Bettoule et al., 2000).

1.2.4 Les polychlorobiphényles (PCB)

Les Polychlorobiphényles constituent une famille de composés organiques synthétiques qui fait partie des douze premiers polluants organiques persistants (POP) couverts par la Convention de

Stockholm (Bernes, 1998). Leur présence dans l'environnement est principalement due à des déversements accidentels, à des rejets illicites et à l'épandage des boues d'épuration.

Généralement ce sont les PCB « dioxin-like » ou PCB-DL qui sont dosés simultanément dans l'environnement avec 17 dioxines et furanes, étant donné qu'ils ont le même mécanisme de toxicité. Par leur caractère hydrophobe, les PCB sont préférentiellement adsorbés sur les sédiments et sur les particules en suspension dans l'eau. En revanche, ils sont très solubles dans les graisses et s'accumulent dans les graisses des organismes aquatiques tout au long de la chaîne alimentaire.

● Toxicité des PCB

En 2001, l'OMS a fixé une dose journalière tolérable de 2,3 pg TEQOMS/kg pc/jour pour l'homme pour les dioxines, furanes et PCB-DL. En 2003, l'OMS a proposé une dose journalière tolérable (DJT) de 20 ng/kg pc/j pour l'ensemble des 209 congénères de PCB. Toutefois, les connaissances concernant la toxicité des PCB restent incomplètes. Les PCB sont classés comme probablement cancérigènes pour l'humain (classification groupe 2A par le AIRC agence internationale pour la recherche sur le cancer) (ATSDR, 2000a). Par ailleurs, les différents effets toxiques des PCB identifiés chez les espèces exposées sont généralement des effets hépatiques, immunitaires (Ferrante et al., 2011), endocriniens (Schumacher et al., 1993) et des effets sur la reproduction (De Guise et al., 1995).

Les PCB réduisent significativement la prolifération des splénocytes chez le beluga exposé à un mélange de plusieurs congénères (138,153 et 180) (DeGuise et al., 1998). Une réduction de la prolifération des lymphocytes T stimulés aux mitogènes a été observée chez le phoque (*Phoca vitulina*) exposé aux PCB (Mos et al., 2006). Une exposition des hémocytes de *Crassostrea gigas* aux PCB a engendré une diminution de l'activité phagocytaire (Levin et al., 2005; Gagnaire et al., 2006), alors que chez l'étoile de mer *Asteria rubens* une augmentation dans l'activité a été observée (Coteur et al., 2005). Un traitement des crapets arlequins (*Lepomis macrochirus*) avec du PCB 153 a causé une suppression dans la prolifération des lymphocytes B et T après 3 et 7 jours d'exposition, alors qu'une altération dans la prolifération des lymphocytes

B seulement a été obtenue après une journée d'exposition au PCB 126 (Duffy et al., 2006). Une induction dans l'apoptose a été impliquée dans l'augmentation de l'activité des caspase-3 des macrophages J774A.1 suite à une exposition à ces congénères (Ferrante et al., 2011).

1.3 Toxicité liée à un mélange de contaminants

Dans les sites contaminés, il apparaît que le polluant n'intervient jamais seul, il se forme généralement un mélange de polluants. Les effets combinés des mélanges de substances sont peu pris en compte dans l'évaluation et la gestion environnementale. Il n'existe pas encore d'approches ou de protocoles bien définis pour étudier la toxicité des mélanges de composés chimiques complexes, encore moins dans les eaux souterraines contaminées par plusieurs familles de xénobiotiques. Nous savons peu de choses sur les effets de ces mélanges et sur leurs interactions. Néanmoins, il est connu que dans un mélange, les substances agissent sur un ou plusieurs sites d'action pour produire un ou plusieurs effets (Boillot et al., 2008). Warne et Hawker (1995) ont rapporté que plus le nombre de substances chimiques est important dans un mélange, plus la probabilité d'une interaction capable d'induire des effets toxiques par additivité ou synergie augmente. L'inhibition du métabolisme dépendant du CYP450 1A1 par le TBT et en conséquence la réduction de la bioactivation du BaP, serait un exemple type d'antagonisme entre mélange de deux substances toxiques. Ainsi, le TBT pourrait avoir un effet protecteur contre le cancer envers le BaP et d'autres hydrocarbures. Otiloju et al. (2002), ont démontré des effets combinés de type antagoniste pour des mélanges binaires de métaux vis-à-vis un gastéropode (*Tympanotonus fuscatus*). Alors que, Lewis et al. (1992), ont démontré une synergie dans des effets combinés de mélanges surfactants/huiles. Les composés organiques volatiles sont souvent associés à l'activité humaine. Ils sont largement rencontrés dans notre environnement à des concentrations faibles. Cependant, l'être humain est généralement exposé à un mélange complexe de COV, plus qu'à un seul composé (Pohl et al., 2011). En effet, des interactions entre COV ont été discutées dans certains travaux (Lilly et al., 1998; Pohl et al., 2011). La majorité des effets observés dans un mélange de COV sont probablement le résultat de leur biotransformation par le CYP2E1 en métabolites qui réagissent avec des tissus cibles et causent

leur toxicité (Pohl et al., 2011). Toutefois, il est extrêmement impossible d'expliquer les mécanismes des interactions additives, synergiques ou antagonistes qui agissent sur les organismes

1.4 Biodisponibilité des contaminants dans les eaux souterraines

Plusieurs facteurs exogènes et endogènes à l'espèce influencent la réponse de l'organisme à l'exposition aux contaminants. Les facteurs exogènes correspondent aux caractéristiques liées aux produits chimiques (solubilité du composé, origine de la contamination, etc.), au milieu et aux conditions environnementales. Quant aux facteurs endogènes, ils se rapportent aux caractéristiques liées à l'espèce étudiée (mode de vie, alimentation, état physiologique, etc.) (Baumard et al., 1998; Bado-Nilles et al., 2008). Par ailleurs, les polluants peuvent être des composés inertes non toxiques, pouvant devenir toxiques après avoir subis une phase de biotransformation au sein des organismes et/ou par communauté bactérienne du milieu. Ces polluants peuvent alors être biodisponibles et exercer leur effet toxique en fonction de l'espèce et de son état physiologique (Bado-Nilles et al., 2008).

Par définition, la biodisponibilité d'une substance chimique désigne sa capacité à interagir avec les organismes cibles. Elle présente donc le paramètre essentiel pour la toxicité des substances chimiques. C'est la concentration de la fraction biodisponible dans les sites puis dans l'organisme qui est capable d'induire des effets toxiques dans l'organisme (Figure 1.2) (Fent, 2003 ; Garric et al., 2010).

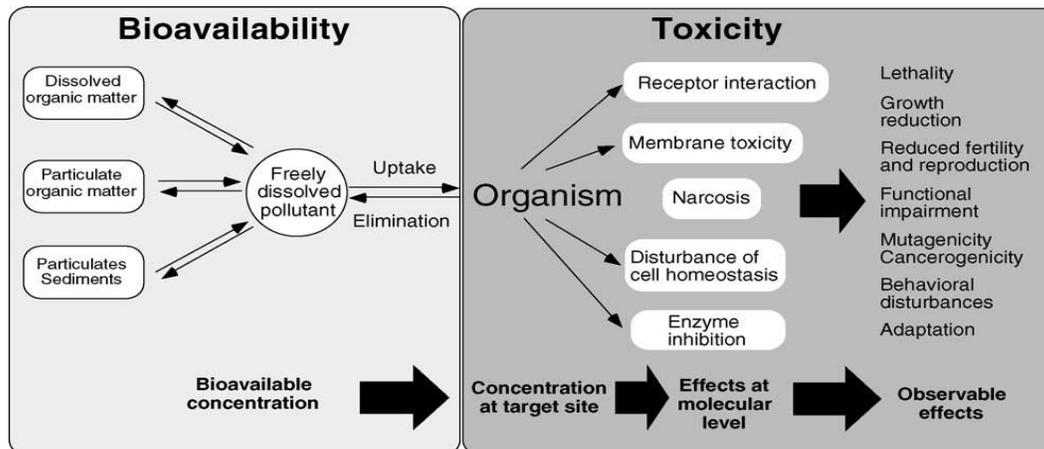


Figure 1.2. Fraction biodisponible et toxicité (Fent, 2003)

1.5 Outils d'évaluation de la qualité d'un milieu aquatique

Des approches chimiques, biologiques et ou biochimiques dans l'évaluation de la contamination et ses effets potentiels sont proposées pour estimer la biodisponibilité des substances qui dépend à la fois des caractéristiques physico-chimiques du milieu et de la physiologie des organismes exposés (Bucheli et Fent, 1996).

1.5.1 Approche chimique

La pollution chimique couvre un large spectre de produits chimiques qui sont introduits dans l'environnement par l'homme. Des concentrations de contaminants assez faibles peuvent générer des effets qui ne sont pas souvent prévisibles. Ces faibles concentrations sont souvent sous le seuil de limite de détection des méthodes d'analyse chimique (Garric et al., 2010). Afin d'évaluer le potentiel toxique de ces substances, il était nécessaire de mettre en œuvre de nouveaux procédés qui aillent au-delà des procédés chimiques classiques. En outre, les analyses chimiques ne peuvent pas à elles seules prédire les effets biologiques des contaminants sur les organismes. Elles sont généralement spécifiques à un seul contaminant, et ne peuvent pas

prendre en charge la multiplicité des molécules présentes dans les milieux naturels (Narbonne, 1998).

1.5.2 Approche biologique

Des méthodes basées sur des observations qualitatives et/ou quantitatives des espèces vivantes dans leur milieu ont été mise en place afin de pallier les insuffisances des méthodes d'analyses chimiques (Amiard et al., 1998). L'approche biologique nous renseigne sur la qualité du milieu et suggère une recherche sur la présence, l'absence et/ou l'abondance de certaines espèces comme par exemple les diatomées, les benthos et les communautés de poisson (Amiard et al., 1998).

1.5.3 Approche biochimique

Des mesures de variables biologiques complémentaires aux analyses chimiques ont été développées ces deux dernières décennies, pour une détection précoce de la réponse des organismes à des polluants, tels que des mesures biochimiques, physiologiques ou histologiques (Flammarion, 2000; Monferran et al., 2011). Ces mesures communément connues sous le nom de biomarqueurs, Lagadic et al (1997) les définissaient comme suit: « *Un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant* ».

Les biomarqueurs traduisent donc la réponse des contaminants sur les composantes vivantes de l'écosystème (Contardo-Jora, 2009). En plus, ils ont la capacité de montrer l'impact aigu et chronique des polluants dont la concentration varie dans le temps et dans l'espace (Maggioni et al., 2012). Par ailleurs, de bons biomarqueurs sont des indices sensibles à la fois de la biodisponibilité des polluants et des réponses biologiques précoces et sont utilisés comme outil d'alerte et de surveillance (Vander Oost, 2003).

Dans une situation de stress suite à une exposition à un polluant, l'organisme peut être perturbé et essaie de s'adapter. Ainsi, une cascade de réactions biologiques se déclenchent dont chacune peut servir de biomarqueurs (Mc Carthy, 1991).

Dans la littérature, les biomarqueurs sont subdivisés en biomarqueurs d'exposition et d'effet (Vander Oost, 2003; Garric et al., 2010). Le Tableau 1.1 montre quelques exemples de biomarqueurs d'exposition et/ou d'effet développés en écotoxicologie (Garric et al 2010).

- i. Biomarqueurs d'exposition: « *Ils signent l'activation de mécanismes de régulation intrinsèque au métabolisme de l'organisme (qui jouent un rôle de système d'adaptation)*» (Garric et al., 2010).
- ii. Biomarqueurs d'effet: « *Qui diagnostiquent un dépassement éventuellement transitoire des capacités de régulation de l'organisme avec des conséquences sur la viabilité (cellule, tissu, individu)*» (Garric et al., 2010).

Tableau 1.1. Biomarqueurs d'exposition et/ou d'effet avec petites modifications (Vasseur and Cossu-Leguille 2003 dans Garric et al., 2010)

	Biomarqueurs	Commentaires	Effets	Substances chimiques
Biomarqueurs d'exposition	CYP 1A1, expression et activité EROD, BaP hydroxylase, Glutathion-s-transférase	Les activités monooxygénases impliquant diverses isoformes de cytochromes P450 (EROD).	Induction	HAPs, BaP, PCBs, dioxines, Pesticides organochlorés, non spécifiques
	Protéines multi, xénobiotique, résistance (MXR)	Les protéines de transport membranaire (système MXR/MDR) peuvent être induites ou inhibées par plusieurs substances organiques.	Induction/inhibition	HAPs, PCBs et métabolites
	Acétyl cholinestérase	Activité enzymatique du métabolisme de neurotransmetteurs.	Inhibition	Pesticides (organo-phosphorés, carbamates)
	Vitellogénine	Protéines de réserve des œufs synthétisées dans le foie.	Induction	Perturbateurs endocriniens
	Métallothionéine/ phytochélatines, protéines de stress	Mts et PCs sont exprimées dans les tissus et impliquées dans l'homéostasie des métaux, mais aussi des composés aromatiques inducteurs de stress oxydatif cellulaire.	Induction	Métaux et autres
	Dommage ADN, adduits ADN	Les polluants peuvent altérer l'intégrité de la structure de l'ADN (cassure simple et double brin), soit directement, soit via leurs métabolites.	Occurrence	Mutagènes génotoxiques
Biomarqueurs d'effet	Dommage ADN		Occurrence	Mutagènes génotoxiques
	Acétyl cholinestérase		Inhibition	Pesticides (organo-phosphorés, carbamates)
	Peroxydation lipidique	Des polluants peuvent augmenter les niveaux cellulaires de molécules oxygénées réactives (ROS), par une induction de synthèse ou une inhibition des mécanismes de défense.	Induction	Non spécifiques
	Intégrité lysosomale	La stabilité de la membrane des lysosomes est un indicateur de l'état de la cellule.	Diminution	Non spécifiques

1.5.4 Exemples de biomarqueurs mesurés sur différentes espèces

Plusieurs modèles biologiques ont été utilisés pour mesurer certains biomarqueurs et/ ou processus afin d'évaluer l'effet toxique de certains composés organiques tels que les COV, les PCBs et les HAPs (voir tableau ci-dessous).

Tableau 1.2. Tableau récapitulatif sur les différents biomarqueurs mesurés chez différentes espèces exposées aux contaminants organiques.

Substances	Biomarqueurs testés	Modèles biologiques	Références
Composés organiques volatiles (COV)	Immunotoxicité Expression des gènes Apoptose Protéine kinase C Domage à l'ADN Prolifération des lymphocytes	Oryzias latipes Lymphocytes humaines Rat	Griffin et al., 2000 Mahendra et al., 2011 Mattes et al., 2010 Mc conkey et al., 1994 Morozzi et al., 1999 Poirier et al., 2002
Chlorobenzène	Activité enzymatique caspase3 Glutathion réductase Catalase Glutathion S -tarnsférase(GST) Hsp70 protéine de stress Apoptose Prolifération lymphoblastique Cellules immunitaires	Jenuynsia multidentata Salmo trutta Carrassius auratus Gammarus pulex Rats	Depledge et al., 2001 Ewens et al., 1999 Galloway et al., Monferran et al., 2008 Triebkorn et al., 2002 Zhang et al., 2008
Polychlorobiphenyles (PCB)	Test micronucleus Stress oxydatif Test des comètes Viabilité cellulaire Apoptose 17β-Estradiol Cycle cellulaire Altération mitochondriale Activité EROD Vitellogénine Prolifération des lymphocytes	Lignées cellulaires RTG-2 (truite arc-en-ciel) MCF-7 HepG2 (carcinome hépatocellulaire humain) Macrophage J774A.1 Carssius auratus Limanda limanda Salmo salar Hepatocytes truite Beluga Rats	Al Anati et al., 2010 DeGuise et al., 1998 Ferrante et al., 2011 Kandaswamy et al., 2012 Marabini et al., 2011 Peterson et al., 2012 Ptak et al., 2010 Rance et al., 2012 Shen et al., 2010 Wang et al., 2011 Zhang et al., 2009
Hydrocarbures aromatiques polycycliques(HAP)	Génotoxicité Immunotoxicité Activité EROD GST Index lipidique Catalase Expression des gènes Apoptose Acétylcholinestérase Recepteur Aryl Stress oxydatif Phagocytose Complément C3 TNFα LPO	Sea bass Dicentrarchus labrax Clupea harengus Anguilla-anguilla Turbot Mytilus edulis Paralichthys olivaceus Chanos chanos Oncorhynchus mykiss Liza aurata Golden grey	Bravo et al., 2011 Frenzilli et al., 2008 Hogan et al., 2010 Kerambrun et al., 2012 Lawrence et al., 2011 Milinkovitch et al., 2010 Natacha et al., 2010 Oliveira et al., 2008 Palanikumar et al., 2011 Reynaud et Deschaux, 2006 Song et al., 2012

1.5.5 Exemples de biomarqueurs mesurés chez le poisson

Plusieurs polluants environnementaux sont potentiellement immunotoxiques. Leurs effets englobent des effets aux niveaux des cellules et des organes du système immunitaire (Fournier et al., 2002). Par ailleurs, une variété de biomarqueurs utilisés chez les poissons ont servi d'outils dans les processus d'évaluation des risques liés à une exposition aux substances chimiques et dans le suivi de la qualité environnementale des écosystèmes aquatiques (McCarthy et Shugart, 1990).

1.5.5.1 Biomarqueurs immunologiques

Les biomarqueurs immunologiques ont un rôle clé dans le suivi de la santé des organismes avant l'apparition des dommages irréversibles. Une altération dans la réponse immunitaire des poissons peut être interprétée comme un signal d'alerte sur le risque potentiel associé à la présence des contaminants sur l'environnement (Vander Oost, 2003). Une grande susceptibilité à des maladies pourrait être engendrée suite à une exposition aux toxiques (Fournier et al 2000).

Parmi les biomarqueurs immunologiques utilisés chez les poissons, il y a notamment l'activité phagocytaires des macrophages mesurée pour des substances immunotoxiques (Haugland et al., 2012; Danion et al., 2011; Gagné et al., 2010; Ménard et al., 2010). Plusieurs auteurs ont montré que l'activité peut être inhibée ou stimulée en fonction du contaminant testé, de sa concentration et de la durée de l'exposition (Kakuta et al., 1997; Hoeger et al., 2004; Salo et al., 2007; Hébert et al., 2008).

La mesure de la prolifération des lymphocytes B et T, stimulée par des mitogènes, a été aussi utilisée comme biomarqueur dans plusieurs travaux (Shelley et al., 2013; Shelley et al., 2012; Siwicki et al., 2011; Müller et al., 2009; Hébert et al., 2008). Des réponses de stimulation ou d'inhibition ont été également observées selon l'espèce étudiée, la concentration de la substance et la durée de l'exposition. Duffy et al (2006) ont observé une immunosuppression de la prolifération des lymphocytes B et T chez des poissons exposés au PCB 153 à forte dose après 3 jours et 7 jours d'exposition. Alors qu'une stimulation de la prolifération des lymphocytes B et T

a été observée chez la truite après 28 jours d'exposition aux effluents de Montréal (Hébert et al., 2008).

L'activité des cellules tueuses naturelles (NK) qui lysent des cellules tumorales (e.g. cellules tumorales humaines K562 ou animales YAC-1) (Moretta et al., 2002) a été utilisée comme biomarqueur non spécifique chez les vertébrés exposés à des substances immunotoxiques dans plusieurs travaux (Holladay et al., 2010). Faisal et al, (1991) ont montré une immunosuppression de l'activité des NK chez *Fundulus heteroclitus* exposés aux HAP présents dans la rivière d'Elizabeth en Virginie. Cependant, Rice et al, (1996) dans leur étude sur l'effet des substances immunotoxiques (PBC et métaux lourds) sur l'activité des NK chez *Lepomis auritus*, ont démontré une stimulation. Une semaine d'exposition à 1% d'effluent des eaux usées de Montréal a provoqué également une augmentation de l'activité des NK chez *O.mykiss* (Salo et al., 2007).

Par ailleurs, d'autres paramètres immunitaires non spécifiques ont aussi été utilisés régulièrement comme biomarqueurs tels: le compte des leucocytes (lymphocytes et granulocytes) (Mac Donald et al., 2013; Bado-Nilles et al., 2011), ainsi que l'activité lysosomale (Jolly et al., 2012; Salo et al., 2007; Hoeger et al., 2004). En effet, Sanchez-Dardon et al, (1999) ont démontré une stimulation dans l'activité lysosomale chez des truites exposées à des concentrations de CdCl₂ (1-5µg/L) et de ZnCl₂ (10-50µg/L). La flambée oxydative est également étudiée chez les macrophages de poisson-chat, une augmentation a été induite suite à une exposition aux effluents toxiques (Fournier et al., 2000).

1.5.5.2. Biomarqueurs biochimiques

Nous présenterons quelques exemples de biomarqueurs biochimiques étudiés chez les poissons qui viennent en complément aux marqueurs immunologiques. Ces biomarqueurs traduisent l'exposition des organismes à certaines classes de contaminants organiques et inorganiques. Ces contaminants peuvent exercer des effets combinés (induction et inhibition) et peuvent entraîner toutes sortes d'interférence (synergie, additivité et antagonisme) sur les réponses (Gagné et al.,

1996). Le système de biotransformation (phase I et II) des xénobiotiques qui se fait principalement dans le foie, est un processus de détoxication qui a pour objectif la conversion des molécules toxiques hydrophobes en molécules moins toxiques hydrophiles, ce qui facilite leur élimination (Figure 1.3). La phase I, qui met en jeu le cytochrome P450, aboutit à la formation de groupements polaires plus hydrophiles. La phase II implique une réaction de conjugaison catalysée par des glutathion *S*-transférases et le glutathion comme co-facteur (Hoeger et al., 2005)

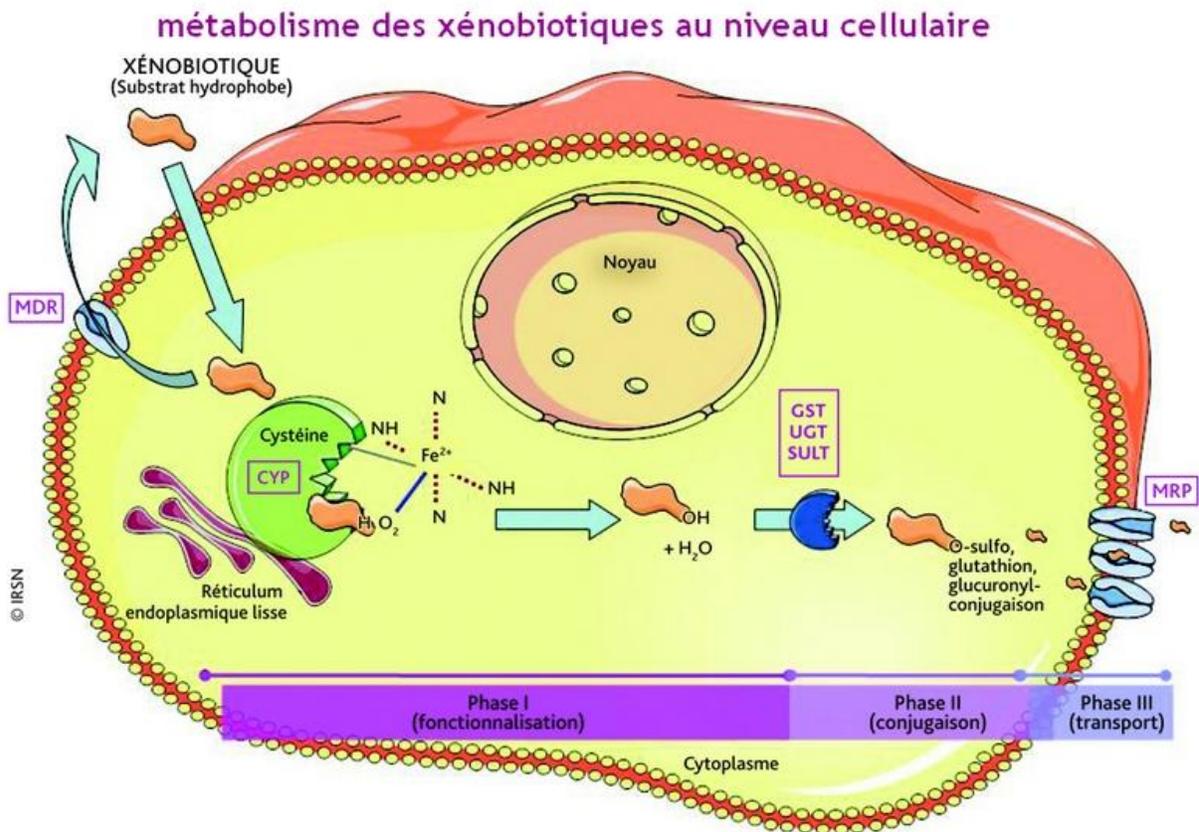


Figure 1.3. Schéma du métabolisme et de la détoxication des xénobiotiques (d'après Guegen et al., 2006). Les enzymes de la phase I (EROD), dites de fonctionnalisation, catalysent essentiellement les réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse. Les enzymes de la phase II (GST), dites de conjugaison, catalysent les réactions de conjugaison. Après détoxication, les transporteurs (P-glycoprotéine ou Pgp, multidrug resistance proteins ou MRP) transportent au travers des membranes les produits biotransformés, en vue de leur élimination de la cellule.

L'induction de l'activité enzymatique ethoxy-resorufine-*O*-dééthylase (EROD) est un des marqueurs d'exposition aux contaminants organiques le plus étudié chez le poisson (Flammarion et al., 2000). Elle renseigne sur l'exposition aux (HAP), aux (PCB) coplanaires et aux dioxines. Une induction de l'EROD a été observée chez *Golden pompano* et *Mangrove jack* collectés d'une aquaculture au sud de la Chine, principalement pollués par des HAP (He et al., 2012). Mu et al, 2012 ont montré que le benzo(a)pyrène induit significativement l'activité EROD *in vivo* à des doses d'exposition de 2, 4, 10 et 20 ug/L chez le médeka (*Oryzias melastigma*) et à une dose de 3µg/L chez la truite (Curtis et al., 2011). Toutefois l'activité est induite dans le foie plus que dans les branchies, reflétant l'importance du tissu hépatique chez le poisson dans le métabolisme de détoxification (Nahrgang et al., 2010). Cependant, l'activité se trouve inhibée chez les poissons exposés aux métaux (He et al., 2012). Une faible induction a été enregistrée dans l'activité glutathion S-transférase (GST), enzyme de la phase II de biotransformation, chez la dorade royale (*Gilthead seabream*) après une exposition au pyrène (0,25 µM), suggérant ainsi la réduction de la capacité des poissons à détoxifier les xénobiotiques (Pilarczyk et Correia, 2009). Toutefois, une augmentation de la GST, a été aussi observée chez le loup de mer (*Dicentrarchus labrax*) après 96h d'exposition à du pétrole brut (Kerambum et al., 2012). Certaines substances peuvent devenir génotoxiques lors de leurs activations métaboliques par les enzymes de biotransformation. La biotransformation ne se termine pas en une détoxification mais contribue ainsi à une bioactivation des xénobiotiques. Le produit ainsi biotransformé devient plus réactif et peut agir sur différentes cibles tel que l'ADN (Gagné et al., 2011). Ceci est vrai pour le chlorure de vinyle, le benzène et le benzo(a) pyrène. Ainsi, un biomarqueur de génotoxicité a été mis au point afin d'évaluer l'effet des contaminants sur l'intégrité structurale de l'ADN. L'effet génotoxique passe par l'effet des métabolites des xénobiotiques sur l'ADN notamment leur capacité à entraîner des cassures des brins de l'ADN (figure 1.4). En effet, en raison de la variétés de modes d'action des substances génotoxiques, il existe un grand nombre de dommage à l'ADN (Cachot et al.,2006).

Theodorakis et al, (2012) dans leur étude menée dans une zone humide au Guatemala (lagunes devant des installations pétrolières) ont démontré une corrélation significative entre les dommages à l'ADN et la concentration d'HAP dans les sédiments et dans l'eau chez des Cichlides. Une génotoxicité des HAP chez des poissons plats (*Scophthalmus maximus*) a également été étudiée après 4 jours d'exposition, temps nécessaire pour la production des métabolites génotoxiques requis pour causer une réponse positive dans le test de génotoxicité (Le Dû-Lacoste et al., 2012).

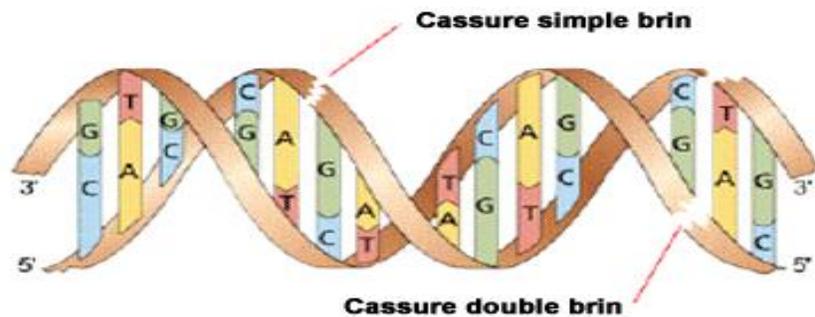


Figure 1.4. Cassure de brin d'ADN. Une cassure simple brin se produit quand un des fragments sucre-phosphate est rompu. Cette cassure se répare à partir du brin opposé qui sert de gabarit (Hall et Guiciac, 2006). Tandis que, les cassures double brin sont des lésions à dommages irréversibles (Stephen, 2002). Elles sont cytotoxiques et elles sont à l'origine de mutations et de la mort cellulaire (Kum Kum et Stephen, 2001).

Par ailleurs, les dommages induits au niveau cellulaire après exposition aux polluants chimiques pourraient inhiber la progression dans les phases du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est un processus de division et de croissance cellulaire des eucaryotes incluant des phases distinctes : G₀/G₁ (phase du cycle cellulaire plus longue et plus variable pendant laquelle la cellule croit en

taille et intensifie son métabolisme), S (partie de l'interphase ou phase de synthèse où la cellule réplique son ADN) et G2/M (phase séparant la synthèse d'une copie de l'ADN de la séparation physique des deux cellules) (figure 1.5).

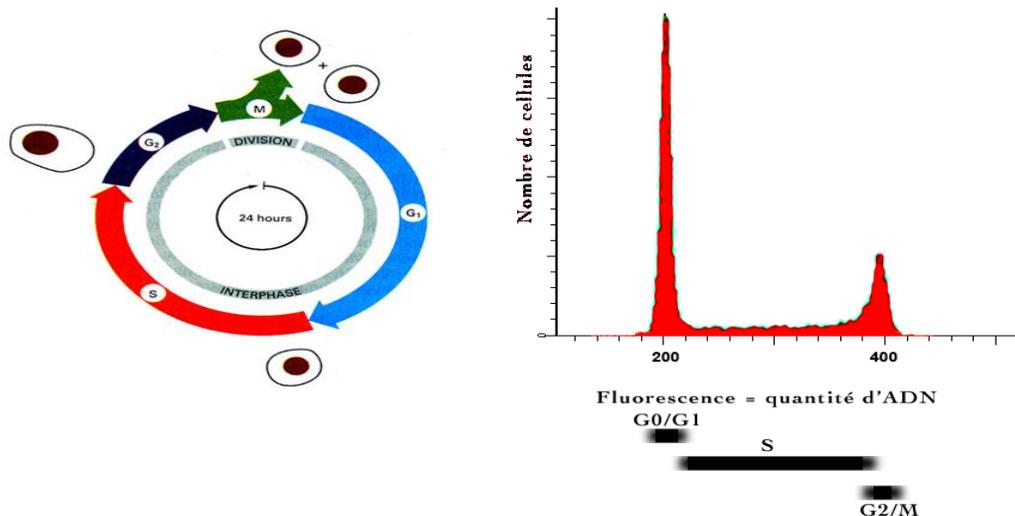


Figure 1.5. La distribution des cellules dans différentes phases du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est analysé par rapport à la quantité d'ADN par cellule qui varie au cours du cycle. L'ADN est capable de lier une sonde fluorescente qui permet de suivre le contenu en ADN de chaque cellule. Ainsi, la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle est rendue possible (Nunez, 2001). <http://cytometrie.crc.chus.qc.ca/>

Les cellules exposées aux xénobiotiques peuvent avoir des réponses différentes soient, l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire (Iliakis et al., 2003; Xiao et al., 2012). L'apoptose est considérée comme « une mort cellulaire programmée » (Duvall and Wyllie, 1986) (figure 1.6). Étant donné son importance dans l'élimination des cellules avec un ADN endommagé (Kiss et al., 2010), une défaillance des processus apoptotiques peut favoriser la survie des cellules

anormales et ainsi induire des processus de cancérogénèse (Follezou et al., 1999). Morozzi et al. (1999) ont démontré dans leur étude que l'apoptose pourrait être induite par les composés organiques volatiles et leurs métabolites (Peng et al., 2012). Le benzène serait capable d'activer la protéine kinase C, enzyme impliquée dans la mort cellulaire programmée (apoptose) (Mc conkey et al., 1994). Les HAP peuvent aussi induire l'apoptose chez les poissons (Nigro et al., 2002; Frenzilli et al., 2004). Ces résultats montrent bien que ce processus pourrait être utilisé comme un biomarqueur d'effet sensible dans l'évaluation des effets biologiques des contaminants dans l'environnement.

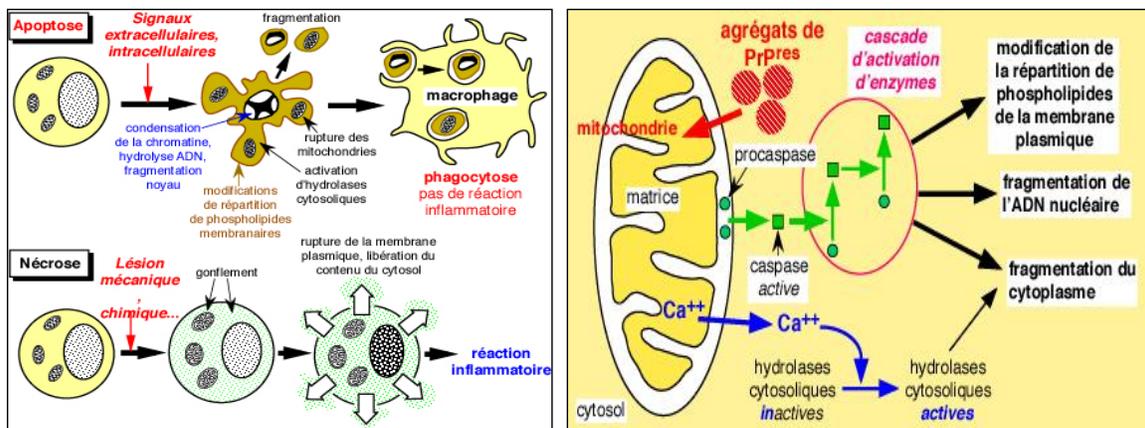


Figure 1.6. Le phénomène de l'apoptose avec les étapes en cascades (http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours/biocell/biopath_cell/prion/apoptose.html). Le point morphologique le plus caractéristique de l'apoptose est la condensation du noyau et du cytoplasme, ce qui engendre une diminution significative du volume de la cellule. La mitochondrie de la cellule apoptotique va larguer du cytochrome C dans le cytoplasme (Yang et al., 1997). La membrane plasmique va bourgeonner et former les corps apoptotiques. Pour faciliter la fonction des macrophages, la cellule signale son état apoptotique grâce aux molécules de phosphatidylsérines qui passent d'une orientation cytoplasmiques vers une orientation extracellulaire.

Dans l'évaluation des métallothionéines (MTs), protéines de faibles poids moléculaire et se caractérisent par leur affinité pour les ions métalliques, ont été utilisé comme biomarqueur d'effets de la contamination métallique. Une corrélation positive a été trouvée entre le taux de cuivre (Cu) et le taux de métallothionéines (MTs) ($r= 0.98$; $p<0.01$) dans le foie de poisson (Sea

bass) provenant du sud du Portugal et du nord de l'Espagne (Fernandes et al., 2008). Une augmentation dans le taux de MTs, a également été enregistrée chez (*Engraulis encrasicolus*) en période de reproduction dans le Golfe de Catane (La Sicile, Italie), ceci est sûrement lié à leur fonction principale de transporter les ions essentiels (Zn, Cu) qui contribuent au développement des ovocytes (Copat et al., 2012).

Une augmentation du taux de malonyl-dialdéhyde (MDA) a été enregistrée chez l'anguille (*Anguilla anguilla*.L) exposée à 1µM de cuivre (Gravato et al., 2006). La MDA est connue comme indice de la peroxydation lipidique des membranes biologiques et du dommage aux tissus (figure 1.7). Elle se forme lors de l'attaque des lipides poly insaturés par les espèces réactives de l'oxygènes produites par des contaminants organiques et inorganiques (Narbonne et al., 1991).

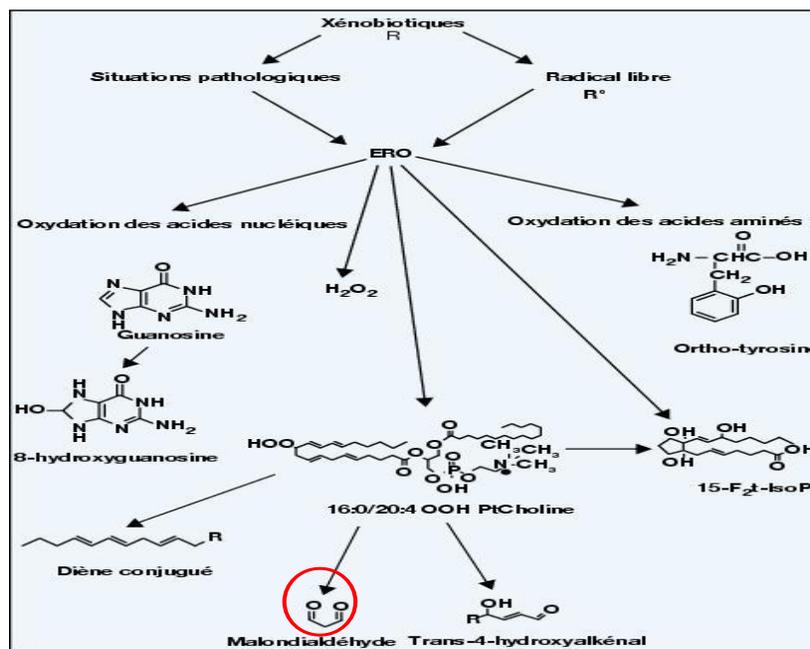


Figure 1.7. Schéma général de l'oxydation des acides aminés, des lipides et des acides nucléiques au cours du stress oxydant (d'après Zmart et al., 1999). La peroxydation lipidique est une conséquence de l'attaque des ERO sur les acides gras polyinsaturés de la membrane biologique. Il se forme ainsi, un hydroperoxyde instable. Il s'en suit la décomposition des hydroperoxydes formés par clivage de leur chaîne carbonée en aldéhydes (e.g. malondialdéhyde (MDA)) et alcanes (Dotan et al., 2004). L'excès de MDA produit dans un tissu peut se combiner aux groupements aminés libres des protéines, conduisant à la formation de produits susceptibles d'altérer leurs propriétés biologiques (Michel et al., 2008).

1.6 Modèle biologique: *Oncorhynchus mykiss*

1.6.1 Biologie de la truite

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum, 1792) appartient à la classe des actinoptérygiens, l'ordre des salmoniformes et la famille des salmonidés. La truite est originaire de la côte-ouest de l'Amérique du Nord et de la Russie (Quinn 2005). Sa répartition actuelle (Figure 1.8) est le résultat de son introduction dans toutes les eaux des continents. La plasticité de la truite arc-en-ciel et sa capacité d'adaptation aux conditions abiotiques très variées ont facilité sa distribution dans le monde actuelle (Crawford et Muir, 2008).

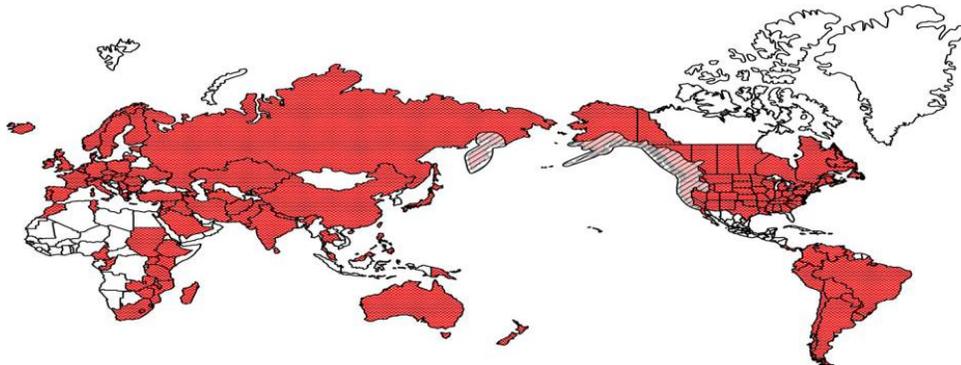


Figure 1.8. Répartition d'*Oncorhynchus mykiss* dans le monde. (Crawford, S.S. et Muir, A.M. ,2008). La zone rayée- les populations d'origine. La zone pleine - les populations introduites et naturalisées.

Selon Scott et Crossman (1974), la truite arc-en-ciel tolère des températures du milieu entre 13 et 21 °C. Par ailleurs, selon Raleigh et al. (1984), la température préférentielle se situe entre 0 °C et plus de 25 °C. Néanmoins, les salmonidés ont besoin d'une concentration en oxygène dissous de plus de 7,0 mg/l (Arrignon, 1998). Une concentration plus faible peut générer des effets négatifs sur leur croissance et leur reproduction (Raleigh et al., 1984). Ainsi, la truite est mieux armée pour faire face à la dégradation du milieu avec une meilleure résistance aux conditions

défavorables de son biotope (Crawford et Muir ,2008). La forme migrante de la truite arc-en-ciel (anadrome), qui évolue une partie de sa vie en mer, essentiellement dans le Pacifique, est appelée truite argentée et appartient à la même espèce. La truite arc-en-ciel passe toute sa vie dans les rivières alors que la truite argentée passe sa première année en mer avant de revenir en rivière pour acquérir sa maturité sexuelle et se reproduire.

1.6.2 Morphologie générale et anatomie

La truite arc-en-ciel a une morphologie caractéristique des salmonidés (Figure 1. 9). Son corps est allongé, elle possède une forte musculature et une nageoire caudale puissante taillée pour la nage rapide. L'équilibre lors de la nage est assuré par les nageoires pectorales, abdominales et la nageoire dorsale. Elle possède aussi une nageoire annale et une nageoire caudale.

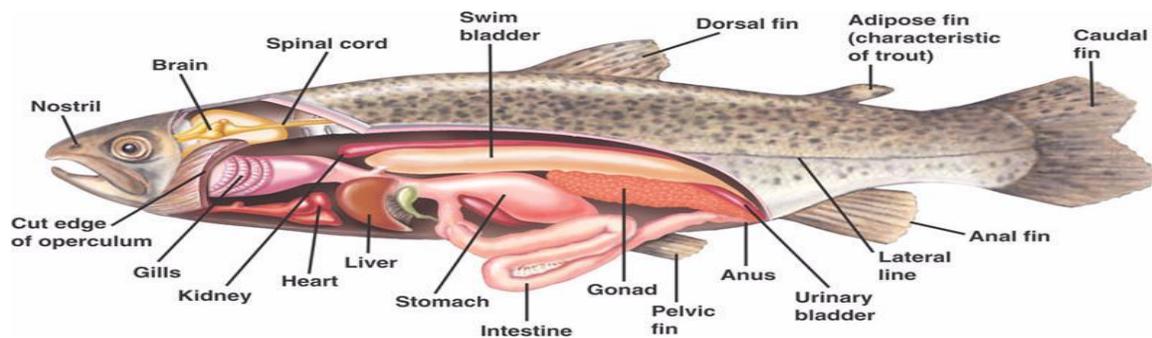


Figure 1.9. Anatomie de la truite arc-en-ciel.

http://bio1151b.nicerweb.net/Locked/media/ch34/34_16TroutAnatomy_L.jpg

1.6.3 Système immunitaire

L'immunité innée et acquise étaient présentes depuis l'existence des agnathes et des gnathostomes (Li et al., 2012). Le système immunitaire des poissons est non seulement conditionné par la particularité du milieu mais aussi par leur nature ectotherme (Rauta et al., 2012). Cependant, l'immunité innée est plus dépendante que l'immunité adaptative. Ainsi, ces

poikilothermes dans leur milieu aquatique sont capables de se protéger contre les infections grâce au mécanisme de défense inné (Ellis, 2001; Swain et Nayaka, 2009).

Le thymus, le rein antérieur (pronéphros) et la rate représentent les organes lymphoïdes des téléostéens. Chez la truite, le rein antérieur (pronéphros) remplace la moelle osseuse (Zapata et al., 1996). Il joue aussi un rôle dans l'excrétion et la fonction hématopoïétique et produit des hormones (Ellis et al., 1989; Zapata et Cooper, 1990). Cet organe très développé avant l'éclosion (Li et al., 2012) est important dans la réponse immunitaire spécifique et non spécifique. Il comprend des macrophages, des granulocytes et des lymphocytes B et T (Zelikoff et al., 1994). Il est le principal organe immunitaire responsable de la phagocytose (Danneving et al., 1994), de l'altération de l'antigène (Brattgjerd et al., 1996) et de la production d'anticorps (Whyte, 2007). En outre, la rate d'origine mésodermique, est suspendue dans la cavité péritonéale, elle joue généralement un rôle secondaire par rapport au rein antérieur dans la réponse immunitaire non spécifique et spécifique (Zapata et Cooper, 1990). Elle a un rôle essentiel dans la production hématopoïétique, la dégradation de l'antigène et la production d'anticorps (Manning et al. 1996). Sa taille est largement utilisée comme paramètre immunitaire mesurable avec un rôle potentiel dans la réponse immunitaire contre l'infection aux parasites (Lefebvre et al., 2004). Le thymus abondamment vascularisé contient des thymocytes (lymphocytes T du thymus) et des macrophages. Il semble être l'organe principal dans la différenciation des lymphocytes T (Genten et al., 2011). Le foie, organe cartilagineux est riche en alkylglycérols, substances lipidiques à propriétés anticancéreuses et anti-inflammatoires (Genten et al., 2011). Il intervient également dans la détoxification des substances chimiques par le biais des enzymes de biotransformation. Le foie peut être le siège d'anomalie, il peut augmenter de volume en stockant des mauvais lipides.

Le poisson possède trois types de cellules impliquées dans la phagocytose: les monocytes (ou macrophages), les granulocytes (neutrophiles,) et des cellules cytotoxiques non spécifiques ou "Natural Killers" (Froystad et al., 1998; Evans et al., 2001). Cependant, ce sont les macrophages qui sont porteurs du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH-II) et font partie des Cellules présentatrices d'antigène. Les cellules cytotoxiques (NK) comparées à celles des mammifères

sont identiques et sont retrouvées principalement dans le rein antérieur, la rate et le sang périphérique (Faisal et al., 1989). Elles sont capables de détruire des cellules cancéreuses ou des cellules affectées par un virus. Des cellules dendritiques formées à l'intérieur du rein antérieur et la rate sont aussi des acteurs impliqués dans la réponse immunitaire adaptative (Lovy et al., 2008).

Par ailleurs, le système immunitaire acquis se compose de deux types de cellules: les lymphocytes B se différenciant en cellules B mémoires et en plasmocytes pour produire des immunoglobulines. Les anticorps produits peuvent être retrouvés dans le sérum, la bile et le mucus de la peau (Zelikoff, 1994). Cependant, un seul type d'anticorps circulent chez le poisson qui est analogue aux IgM des mammifères, il s'agit des IgM-like. Les IgT sont un nouveau type d'anticorps signalé chez la truite (Hansen et al., 2005).

La muqueuse des branchies, de la peau et des intestins constituent des barrières mécaniques qui secrètent sous forme de mucus des lysozymes, des lectines et des molécules du système du complément contre l'invasion des microbes (Ruangsri et al., 2010; Jovanovic et al., 2012). Les lysozymes sont des enzymes mucolytiques d'origine leucocytaire qui peuvent agir comme une opsonine, et qui activent également le système du complément et les phagocytes (Whyte, 2007). Le niveau des lysozymes a été utilisé comme biomarqueur dans plusieurs études écotoxicologiques chez les poissons (Whyte, 2007). Les lectines sont considérées comme d'importants récepteurs de reconnaissance de l'immunité innée par leur capacité à se lier aux sucres terminaux sur les glycoprotéines et les glycolipides (Bianchet et al., 2002) Leur hétérogénéité a été démontrée chez plusieurs espèces de poissons téléostéens (Whytes et al., 2007). En effet, une large gamme de lectines actives ayant une spécificité variable pour différentes cibles oligosaccharidiques fournissent un long répertoire de récepteurs de surface des pathogènes (Yo X-Q et al., 2003). En plus des lysozymes et des lectines, le système du complément joue un rôle dans l'immunité innée et acquise (Li et al 2012). Son activation améliore la prolifération des cellules B (Morgan et al., 2005). L'activation protéolytique du C3 engendre une augmentation de l'activité phagocytaire par opsonisation, la promotion de la réponse inflammatoire et la stimulation de la prolifération des cellules B. Toutefois, des

cytokines telles que, l'interleukine 1- β produite par les macrophages (IL1- β), l'interleukine 6 (IL6) le "tumor necrosis factor" produit dans le rein (TNF- α) jouent un rôle de modulateur du système immunitaire chez les poissons (Whytes et al.,2007).

D'autres facteurs solubles sont présents dans le sérum du poisson, les protéines C-réactives (CRP) qui augmentent chez la truite suite à une infection bactérienne (Fournier et al., 2000). La CRP joue un rôle clé dans l'immunité non spécifique, favorisant ainsi la phagocytose par ses propriétés d'opsonisation, d'activation du complément et de liaison aux récepteurs des immunoglobulines. Par cette liaison, les monocytes activés augmentent la production de cytokines (Dupuy et al., 2003).

La phagocytose est une fonction immune non spécifique par laquelle les macrophages internalisent et digèrent les organismes envahisseurs ainsi que les particules étrangères. Les macrophages et les granulocytes de différentes espèces de poissons forment un réseau de défense immunitaire capable de neutraliser une variété de pathogènes envahisseurs sans activation préalable (Secombes et Fletcher, 1992). L'inhibition de la phagocytose perturbe l'élimination des bactéries et la sécrétion de cytokines et par la suite l'activation des lymphocytes impliqués dans la réponse immunitaire spécifique (figure 1.10) (Kollner al et., 2002).

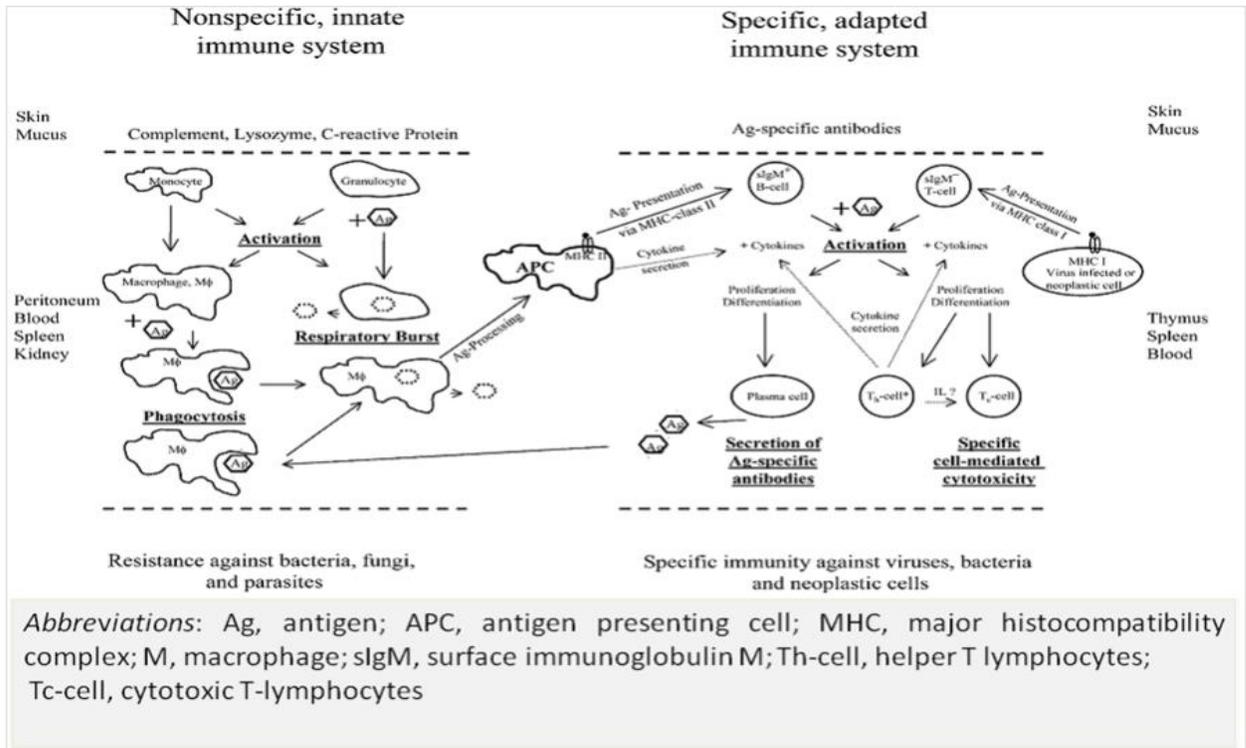


Figure 1.10. Aperçu schématique sur les différentes fonctions immunitaires chez les poissons osseux (Kollner et al., 2002).

Le système immunitaire des poissons est crucial pour leur survie. Néanmoins, plusieurs maladies ont été associées à une grande variété de polluants (Mc Neill 2012) et les conséquences des toxiques sur le système immunitaire prennent plusieurs aspects: l'immunodépression et baisse de résistance vis-à-vis des infections bactériennes et augmentation de l'incidence de certains cancers (Fournier et al., 2000). Les effets immunotoxiques des substances chimiques considérées comme des substances immunotoxiques comprennent des effets au niveau cellulaire et des organes du système immunitaire (Fournier et al 1999; Wong et al 1992).

CHAPITRE 2: CONTEXTE DE L'ÉTUDE

2.1. Problématique de Mercier

Mercier. Cette localité à vocation agricole située à moins de 25 km au sud ouest de Montréal est victime d'une catastrophe écologique. En effet, plusieurs milliers de composés organiques toxiques, COV, BPC, pesticides, HAP (naphtalène...), dibenzofuranes polychlorés (PCDF), dibenzo-p-dioxines (PCDD), existent à des niveaux qui représentent une menace pour la santé de l'humain et de toutes les composantes de l'environnement, notamment les eaux de surface, les sols et les eaux souterraines. Historiquement, le déversement de déchets liquides remonte à 1968 dans une gravière de la région. Selon différentes études 40 000 m³ à 170 000 m³ de composés chimiques organiques ont été déversés par la compagnie *Lasalle Oil Carrier Inc.* (Bape, 1994). Les lagunes ainsi formées contenaient des déchets dangereux provenant des industries, soient principalement des huiles et des solvants usés ainsi que des résidus de distillation du pétrole (Poulin et al., 1985). Dans un autre rapport publié par le Bape (1994), le phénomène de la migration de la contamination, à cause de la nature du sous sol des lagunes de Mercier, fut mis en évidence. En effet, le sous-sol (figure 2.1) est composé de trois formations géologiques distinctes dont 1) une couche de sable et 2) de gravier perméable, pouvant atteindre 30 mètres d'épaisseur qui se trouve en surface et repose 3) sur le roc, où circule une nappe d'eau profonde. Toujours dans ce même rapport, il est signalé que des huiles légères ont pu se déplacer horizontalement dans le sable des parois des lagunes. Il est également décrit que des huiles lourdes et des «liquides denses en phase non aqueuse» (LDPNA) se sont infiltrées en profondeur dans le sol. Elles se sont accumulées dans les dépôts de sable et de gravier et dans des dépressions naturelles du till peu perméable. Ces huiles ont aussi pu pénétrer dans les fissures du roc (figure 2.2).

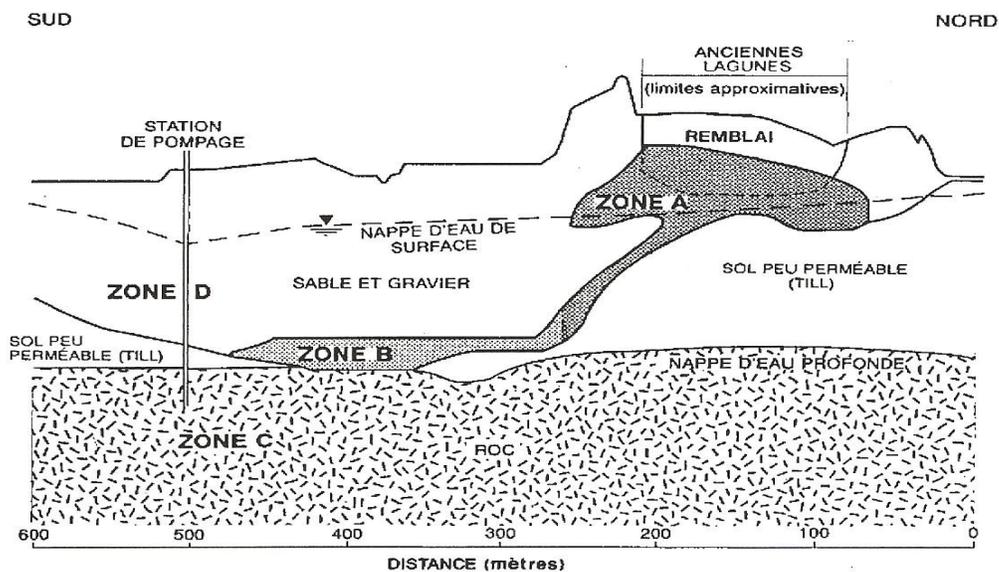


Figure 2.1. Les différentes zones A,B,C sources de contamination du site de Mercier.(Bape1994)

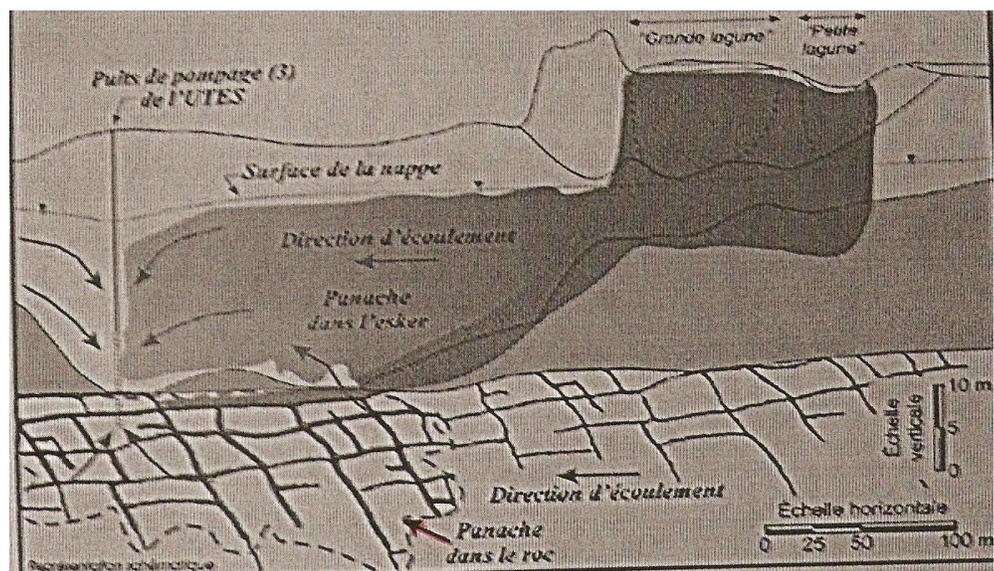


Figure2.2. Déplacement de la contamination dans le roc.(Bape 1994)

Les trois zones contaminées par des résidus huileux (zones A, B et C) constituent des sources de contamination des eaux souterraines. En effet, lorsque les eaux entrent en contact avec les déchets présents dans le sous-sol, certains composés chimiques peuvent s'échapper, se dissoudre et être entraînés dans les aquifères. Dans une étude entreprise en 1985, Poulin et ses collaborateurs parlent de l'étendue de l'enclave de contamination des eaux souterraines qui est délimitée par quatre zones. Les 2 premières zones qui s'étendent sur une superficie de 2 km² ont été identifiées comme des zones fortement polluées par des composés organiques (plus de 80 composés ont été mesurés dans la première zone). Deux autres zones où la contamination est plus faible s'étendent sur une superficie de 30 km² (Poulin et al., 1985). Dès 1971, des puits voisins furent contaminés et par la suite abandonnés (Prime et Fournier, 2008).

Comme solution au problème, un incinérateur fut construit à proximité des lagunes afin de détruire par oxydation thermique les déchets organiques déversés par la compagnie *Lasalle Oil Carriers.Inc* (Bape, 1994). Toutefois, d'autres déchets dont l'origine reste inconnue sont destinés à cet incinérateur, dont des déchets organochlorés, des hydrocarbures, des solvants, des polymères (Bape, 1994; Garreau et al., 2005). Les émanations de l'incinérateur ont ajouté à la contamination de l'atmosphère des dioxines, des furanes, des hydrocarbures et des composés volatils (Bape, 1994, Garreau et al., 2005). Une étude écotoxicologique de certains sols en périphérie de l'incinérateur de déchets dangereux de Mercier, a mis en évidence dans les sols se trouvant sous le panache de l'incinérateur, une diminution significative de la survie des vers de terre ainsi qu'une perte de poids et d'autre part une modulation de la réponse phagocytaire et une perturbation du cycle cellulaire des coelomocytes (Belmeskine et al., 2011).

Afin de limiter l'étendue de la contamination qui a atteint les eaux souterraines de Mercier en direction des eaux de surface (rivière Esturgeon et Châteauguay), en 1984, il a été décidé d'agir et de construire une station de pompage afin de créer un « piège hydraulique » qui retiendrait les panaches de l'eau souterraine contaminée de l'esker. Ainsi une station de traitement des eaux connue sous le nom « Unité de Traitement des Eaux Souterraines (UTES) » fut installée pour mieux filtrer et traiter les eaux afin de limiter les risques potentiels pour la santé humaine et celle de l'écosystème (Prime et Fournier 2008, Bape, 1994). D'après le rapport du Bureau d'audiences publiques sur l'environnement (BAPE, 1994), l'UTES réduit le pourcentage des contaminants que d'environ 50% pour mieux les remettre en circulation dans la rivière Esturgeon et dans l'air.

Pour leur part, les boues sont acheminées au lieu enfouissement sanitaire de Lachenaie. (<http://www.bape.gouv.qc.ca/sections/rapports/publications/bape085.pdf>).

Des composés organiques volatils ont été identifiés dans certains puits d'accès à la nappe phréatique échantillonnés aux environs de Mercier. Parmi eux, plusieurs composés organiques tels des HAP, des BPC et des métaux lourds ont été identifiés (Poulin et al., 1985; BAPE, 1994; Prime et Fournier, 2008). Ces composés sont reconnus immunotoxiques (immunosuppression et immunostimulation) (Zabrodskii et al., 1997; Sharma et al., 1980; Veraldi et al., 2006; Hogan et al., 2010; Gesto et al., 2009; Triggiani et al., 2011; White et al., 1994; Faisal et Huggett, 1993; Carlson et al., 2004 a,b; Reynaud and Deschaux, 2006; Zabrodskii et al., 2006; Poirier et al., 2002; Griffin et al., 2000), génotoxiques (Gwinn et al., 2011; Mattes et al., 2010; Ajit Kumar et al., 2011; Pohl et al., 2011) et cancérogènes (Morozzi et al., 1999; Gros et al., 2007; Singh et al., 2011; Aziz et al., 2012) chez l'être vivant. Ces effets toxiques observés peuvent être liés aussi bien à une seule des substances décrites qu'au mélange de celles-ci.

2.2. Objectifs de recherche

Face à cette problématique et parce que nous ne disposons pas de données écotoxicologiques sur le site, ce projet de recherche a été proposé par le Centre interinstitutionnel de recherche en écotoxicologie (CIRÉ). L'objectif principal de la thèse est d'obtenir un portrait représentatif du potentiel toxique des eaux souterraines de Mercier. Deux approches expérimentales ont été visées; l'approche *in vitro* et l'approche *in vivo* basées toutes deux sur l'utilisation d'une gamme de biomarqueurs comme outils d'évaluation de la toxicité.

La stratégie globale pour la réalisation de ce projet de thèse est donc structurée de manière à répondre à deux objectifs principaux:

Objectif 1: évaluer la toxicité des eaux souterraines de Mercier dans le panache de diffusion de la contamination.

Volet 1:, étudier *in vitro* le potentiel immunotoxique des substances chimiques biodisponibles sur les cellules immunitaires de la truite arc-en-ciel (13 puits ont été échantillonnés aux environs de Mercier). L'immunocompétence des différentes populations de cellules est évaluée par: l'activité phagocytaire, l'activité des cellules NK et la prolifération des lymphocytes stimulées par des mitogènes.

L'approche *in vitro* permet un meilleur contrôle des conditions expérimentales (e .g. les éléments nutritifs, le pH, la température) contribuant à réduire la variabilité des réponses toxiques. Cette approche expérimentale permet l'acquisition de données préliminaires tout en fournissant une première indication quant à l'action directe des contaminants.

Les résultats de ce volet sont décrits dans le chapitre n° 3 . L'article 1 intitulé: " Immunotoxic effects of *in vitro* exposure to Mercier groundwater on rainbow trout leucocytes" soumis au Journal Ecotoxicology and Environmental Safety(2014).

Volet 2: étudier l'effet d'une exposition aiguë et chronique *in vivo* de la truite aux contaminants organiques des eaux souterraines sur la réponse innée (Phagocytose), la réponse adaptative (transformation lymphocytaire), le cycle cellulaire et l'apoptose. Après le choix des puits d'intérêt (trois puits), cette seconde partie du travail vise à évaluer l'impact de l'exposition des truites à des échantillons représentatifs de la contamination réelle de la nappe. Les bioessais sont conduits dans des conditions expérimentales biotiques (espèce, âge) et abiotiques (température, photopériode, durée d'exposition) contrôlées standardisées afin de maîtriser les facteurs confondants. L'approche *in vivo conforme aux exigences réglementaires de la protection des animaux de laboratoire* a été entreprise au Centre Saint Laurent (Environnement Canada).

Les résultats obtenus sont présentés dans l'article 2 intitulé: "Immunotoxic effects of an industrial waste incineration site on groundwater in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) ". Cet article a été publié dans Journal of Environmental Sciences (2013).

Volet 3: étudier la réponse biochimique suite à l'exposition aux eaux souterraines de Mercier chez la truite. Les biomarqueurs biochimiques mesurés; l'activité EROD, l'activité glutathion S-transférase (GST), la peroxydation lipidique (LPO) et la génotoxicité (dommage à l'ADN).

Les résultats sont décrits dans le chapitre n° 3 et l'article 3 intitulé: " Biomarkers study of in rainbow trout exposed to industrially contaminated groundwater". Cet article a été publié dans Journal of Xenobiotics (2014).

Objectif 2: Il concerne l'étude des effets immunotoxiques des eaux d'UTES chez la truite *Oncorhynchus mykiss*.

Volet 1: Étudier l'impact d'une exposition aiguë aux eaux d'UTES traitées et non traitées sur les réponses immunitaires spécifiques (la transformation lymphoblastique) et non spécifiques (l'activité phagocytaire, la cytotoxicité des NK). Des truites sont soumises à des expositions contrôlées aux eaux d'UTES en laboratoire. Les biomarqueurs abordés sont la cellularité, l'activité phagocytaire, la transformation lymphoblastique stimulée aux mitogènes et la cytotoxicité des NK. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de l'article (4) dans le chapitre n° 4 intitulé: " The effects of treated groundwater effluent on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". Soumis au Journal Environmental Pollution(2014).

2.3. Hypothèses

La nappe phréatique, située sous les lagunes de Mercier, est contaminée, ceci est dû à la migration des polluants à travers les couches du sous sol. On se retrouve avec un mélange de substances toxiques qui représente un risque potentiel pour les organismes exposés.

Ces contaminants présents dans les eaux souterraines de Mercier peuvent avoir un effet à court et à long terme sur l'environnement et en conséquence sur l'homme. Toutefois, ils peuvent entraîner un effet léthal sur l'organisme exposé qui se traduit le plus souvent par une mortalité ou des modifications comportementales qui modifieront la capacité de la truite à s'alimenter et à se reproduire. Il peut y avoir aussi un effet sublétal en cas de survie de l'individu.

Quant aux biomarqueurs d'exposition et d'effet, la présence de polluants entraînera chez la truite une réponse au stress par une altération de la réponse immunitaire, une inhibition de la prolifération des lymphocytes T et B, un blocage du cycle cellulaire, une induction de l'activité EROD et une augmentation dans l'activité du glutathion-S-transférase.

Par ailleurs, la contamination peut se déplacer par le biais des rejets d'UTES après traitement vers les cours d'eau (rivière Esturgeon). Ces substances toxiques diluées parcourraient les chaînes et les réseaux alimentaires qui caractérisent les écosystèmes et s'accumuleraient dans les tissus des organismes aquatiques. On assisterait donc, à une toxicité se manifestant non pas de façon aiguë, mais plutôt de façon différée car elle résulte du mécanisme de bioaccumulation et/ou de biomagnification. Les organismes y vivants, se verront leur système immunitaire déficient, ce qui rend les poissons plus vulnérables aux parasites, d'où une répercussion sur la croissance, la reproduction et la physiologie. En conséquence, on observera une diminution de la population des poissons.

**CHAPITRE 3: ALTERATIONS IMMUNOLOGIQUES ET
BIOCHIMIQUES INDUITES CHEZ LA TRUITE APRÈS UNE
EXPOSITION AUX EAUX SOUTERRAINES DE MERCIER**

3.1. Étude *in vitro* des effets immunotoxiques des eaux souterraines de Mercier sur les cellules immunitaires des truites arc-en-ciel

Article 1: Immunotoxic effects of industrial waste contaminated groundwater on rainbow trout leucocytes

Auteurs

Nadjet Benchalgo, Francois Gagné, Michel Fournier

Soumis au journal

Ecotoxicology and Environmental Safety (en révision)

Contribution personnelle

Mon rôle a consisté à faire l'échantillonnage, à planifier les expériences, à faire les analyses et l'interprétation des résultats et à rédiger l'article à titre d'auteur principal.

Contribution des coauteurs

Dr Michel Fournier, mon directeur de recherche et Dr François Gagné co-directeur ont participé à la planification des expériences, à l'analyse des résultats ainsi qu'à la correction du manuscrit.

RÉSUMÉ

La présence de polluants organiques dans les eaux souterraines peut compromettre le système immunitaire des organismes aquatiques. La présente étude examine l'effet *in vitro* de l'exposition aux eaux souterraines échantillonnées de 13 puits situés dans le panache de l'incinérateur des lagunes contaminées à Mercier. Les cellules immunitaires ont été isolées du pronéphros et exposées à l'eau de puits à des concentrations croissantes (0%, 3,12%, 25% et 100%). L'immunocompétence des leucocytes a été déterminée par la viabilité, l'activité des phagocytes, l'activité des cellules NK et la prolifération des lymphocytes stimulés par des mitogènes PHA et LPS. Les résultats ont révélé que la viabilité et l'activité des NK n'ont pas été affectées par l'exposition. Toutefois, la capacité des macrophages à phagocyter une bille et plus a diminué de manière significative dans 4/13 des échantillons, et dans 6/13 des échantillons en ce qui concerne l'efficacité des macrophages à phagocyter trois billes et plus. Par ailleurs, la prolifération des lymphocytes B a été augmentée dans 8/13 des échantillons. La prolifération des lymphocytes T était significativement diminuée dans 5/13 des échantillons, alors qu'elle a augmenté dans 2/13 des échantillons. À la base des résultats *in vitro*, nous suggérons que les composés chimiques présents dans les eaux de puits sont capables de moduler la réponse immunitaire. Les eaux souterraines dans le panache des lagunes et de l'incinérateur à Mercier pourraient constituer une menace pour la fonction immunitaire chez les poissons exposés.

Texte en révision

Immunotoxic effects of industrial waste contaminated groundwater on rainbow trout leucocytes

N. Benchalgo¹, F. Gagné², M. Fournier¹

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, 531 des prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

² Emerging Methods, Aquatic Contaminant Research Division, Environment Canada,

105 Mc Gill St., Montréal, Quebec, Canada H2Y 2E7

Abstract

The presence of organic pollutants in groundwater from industrial waste may pose a risk to nearby aquifers. The purpose of this study investigates the toxicity of groundwater samples near an industrial waste area (Mercier, Québec, Canada) from 13 wells located on fish immune responses. Immune cells (leucocytes) from rainbow trout were exposed to increasing concentration (0%, 3.12%, 25% and 100%) of water samples. Immunocompetence was determined by following leucocytes viability, phagocytosis, natural cytotoxic cells (NCC) and lymphocyte proliferation under mitogen stimulation. The results revealed that cell viability and a tumor-killing capacity of natural cytotoxic cells were not affected following groundwater samples exposure. Overall, phagocytic capacity was significantly decreased and B-lymphocyte proliferation was significantly increased in 8/13 wells samples. while it was decreased in one well sample. Moreover, T-lymphocyte proliferation was significantly suppressed in 5/13 samples while it was increased in 2/13 samples. We suggest that organic compounds in well water modulate two critical immune response such as phagocytosis and lymphocyte proliferation. It is concluded that Mercier groundwater collected in the vicinity of an incinerator and contaminated lagoon could pose serious threat to the immune function in fish.

Keywords: Groundwater; immunotoxicity; viability; lymphocyte proliferation; natural cytotoxic cells; phagocytosis; rainbow trout

1. Introduction

In the late 1660s, the petrochemical industry, grouped into an important pole in the East of Montreal, got rid of liquid industrial wastes in an abandoned gravel pit (City of Mercier, Quebec, Canada). These liquid wastes are composed of miscellaneous industrial compounds such as used oils, solvents and volatile organic compounds (VOCs) (Gouvernement du Québec, 2007). Among the eighty organic substances detected in Mercier groundwater, the main ones were chloroform, dichloroethylene, dichloroethane, trichloroethane, phenol, chlorobenzene, toluene, ethylbenzene, naphthalene and polychlorinated biphenyl (Poulin et al., 1985). Over the years, the contaminants have reached the aquifers thereby compromising the source of drinking water to local residents. VOCs are often found at hazardous wastes sites and probably represent the most disturbing class of contaminants presents in groundwater (Ellis and Rivett, 2007). Indeed, 6 of the first 10 most frequently detected chemicals were VOCs in groundwater (Pohl and Scinicariello, 2011). They are able to infiltrate deep below the water table and persists over decades (Ellis and Rivett, 2007). The overall effect of groundwater on animals exposed will depend on the fate of contaminants in the dispersion plume (Gagné et al., 2002). However, when VOCs are mixed with other pollutants, mixture interactions (i.e., additive, synergistic or antagonistic) may arise (Wang et al., 2013).

Groundwater contamination of VOCs may impose a risk to human health event at very low concentration (Liu and Zhou, 2011). Several VOCs are known to have carcinogenic or mutagenic properties (Yao and Tsai, 2013; Aziz et al., 2012; Gwinn et al., 2011; Baudoin et al., 2002; Golfinopoulos et al., 2001).

Their toxicity is associated to their ability to pass through biological membranes and accumulate in the fatty tissues (Chary and Fernandez-Alba, 2012). However, VOCs present difficulties in the interpretation of aquatic toxicity tests due to their physico-chemical characteristics such as volatility, limited solubility in water and bioaccumulation potential (Avramov et al., 2013). The immune system represents critical protective functions to organism by deactivation and defense against infection by pathogens (Shelley et al., 2012; Collet, 2013). The impairment of the immune system is associated with increased mortality due to infectious diseases (Bols et al., 2001 in Shelley et al., 2012). Fish have both innate and specific immune systems (Watts et al., 2001). Innate immunity is mediated principally by macrophages/granulocytes and involves the production of natural cytotoxic cells (Canesi et al., 2007; Watts et al., 2001 in Gagné et al., 2013). Macrophages/granulocytes are responsible for the internalization and destruction of foreign bodies (Hebert et al., 2008; Müller et al., 2009). Natural Killer cells (NK) are important contributors in immune system defense against viral infection and against the formation of primary tumors (Lotzova, 1993). They are able to destroy appropriate target cells through a granzyme-mediated osmotic lysis (Wilson et al., 2004; Collet, 2013). Specific immunity is performed by B and T lymphocytes which are involved in humoral production (antibodies) (Hebert et al., 2008). Therefore, phagocytosis, NK activity and the mitogen-stimulated lymphoproliferation assays have been often used in immunotoxicity testing protocols as sensitive biomarkers of xenobiotics effects (Rice et al., 1996; Fournier et al., 2000; Bols et al., 2001; Harford et al., 2007; Salo et al., 2007; Gagné et al., 2008; Hebert et al., 2008; Heloise et al., 2008; Bado-Nilles et al., 2009; Danion et al., 2011; Gagné et al., 2013).

The purpose of this study was to evaluate the immunotoxicity of industrially-contaminated groundwater (City of Mercier, Quebec) head kidney leucocytes exposed in vitro. Immunocompetence was determined by following leucocytes viability, phagocytosis, NK activity and lymphocyte proliferation under mitogen stimulation.

2. Methods

2.1. Wells samples preparation

A volume of 1000 mL of water samples were collected from 13 wells (denoted W1...W13) (**Fig.1**) in the vicinity of the incinerator and contaminated lagoons in October 2009. Samples were placed immediately on ice packs in portable coolers and they were stored at 4°C in the dark until exposure. Before exposure, each sample was filtered with a 0.22 µm cellulosic membrane to remove microorganisms. A volume of 40 mL was used for chemical analysis performed by CEAEQ (Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Quebec, Qc, Canada). Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) was used as a detection method.

2.2. Isolation of pronephros leucocytes and in vitro exposure

Fish were humanly anaesthetized with tricaine methanesulfonate (MS222) at 0.1 % concentration according to the recommendations of animal care committee (n=8). The anterior kidney was removed under sterile conditions and crushed with a 2-mL glass grinder (Wheaton Scientific, New Jersey, USA) containing 1mL of sterile RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, ON, Canada) supplemented with heparin(10U/mL; Organon Tecknika, Ontario, Canada), HEPES-NaOH (10mM), pH 7.4,

penicillin /streptomycin (100U/mL and 100mg/mL respectively), and 10% Fetal Bovine Serum (FBS). The cell suspension was adjusted to 5 mL with the RPMI 1640 and was overlaid on 5 mL of lympholyte-M (Cederlane laboratories, Ontario, Canada) to remove red blood cells and cellular debris and cell suspension was then centrifuged for 30 min at 275 xg at 15°C. The thin white layer containing leukocytes was collected at the interface of the gradient and the cell suspension was centrifuged at 485xg for 10 min and washed twice in RPMI media without heparin. The ratio of live/dead cells was assessed microscopically with hemacytometer (Bright-line, PA, USA) using trypan blue exclusion (0.4 %) and the suspension was adjusted to 1×10^6 live cells/mL. Cells were exposed to increasing concentrations of the 13 wells samples (3.12%, 25% and 100%) for 21h hours at 15°C in humidified 5% CO₂ atmosphere.

2.3. Leucocyte viability assessment

At the end of exposure period, viability of macrophages and lymphocytes was evaluated by flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson, San José, USA) as described by,using propidium iodide (PI)(100 µg/ml) which is actively excreted by living cells (Brousseau et al.1998). The fluorescence of 5000 events was read in FL3 where fluorescent cells where gated from the viable and non-fluorescent cells. Data are expressed as percent of viable cells.

2.4. Phagocytosis assay

Phagocytosis was measured using fluorescently-labeled latex beads as described by [Brousseau et al.\(1998\)](#) . A volume of 500 µl of cell suspension was mixed with fluorescent latex beads (diameter of 1.71 µm: Polysciences, PA, USA) at a 100:1 bead-to-cell ratio. After the incubation period, the cell suspensions were layered over 4mL of RPMI supplemented with 3% of bovine serum albumin and centrifuged at 150xg at 4°C for 8 min to remove the free beads adsorbed at

the surface of cell membranes. The cells were then analyzed using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, CA, USA) and 5000 events were recorded. Two endpoints determine the percentage of macrophages that engulfed one bead or more (phagocytic capacity: M1) or three beads or more (phagocytic efficiency: M2). The results were expressed as the percentage of cells with one or three beads or more fluorescent beads .

2.5. Natural Killer cell assay

Pronephros Natural Cytotoxic Cells mediated lysis of murine lymphoma cells (YAC-1) was determined by flow cytometry according to [Brousseau et al. \(1998\)](#) method. An aliquot of 1 ml containing 1×10^7 target cells (YAC-1) was stained with 10 μ l of (3,3-dioctadecyloxycarbocyanine dye (DIO); Sigma-Aldrich) and incubated at 37°C with 5% of CO₂ for 20 min. DIO was used to label the membrane of (YAC-1). After incubation, stained target cells were washed twice in RPMI and adjusted to 1×10^6 cells/mL. Effector (pronephros leucocytes) and target (YAC-1 tumor cell line) cells was pipette at ration of 40:1, 20:1 and 0:1. A total of 30,000 targets cells and effectors were adjusted to yield a total volume of 330 μ L. The cell mixtures were centrifuged at 350xg for 1 min to bring cells and effectors onto contact. The cells were incubated at 15°C for 18h in the dark. At 30 min prior flow cytometry analysis, 15 μ L of propidium iodide (1mg/mL; PI) was added to each tube when (YAC-1) membranes are disrupted by effectors. Data were acquired by FACScalibur (Becton Dickinson) flow cytometer with a threshold set at FL1 (DIO+ cells) plots and 3000 events were recorded and analyzed for viability. Data are expressed as the percentage of target cells mortality.

2.6. Lymphocyte proliferation assays

Cells were plate at 5×10^5 cells/well in round-bottom microplates and incubated with 20 ug/mL of phytohemagglutinin (PHA), a mitogen activator of lymphocyte T, and with 250 ug/mL of lipopolysaccharide (LPS), a mitogen activator of lymphocyte B. After 72 h of incubation, 0.5 μ Ci/well of [³H]-methyl thymidine (6.7 Ci mmol⁻¹ ;(MP Biomedical, OH, USA) was added and plates incubated for a further 18h at 15°C. Cells were harvested with a semi-automatic cell harvester (Skatron Instruments As, Lier, and Norway) on fibreglass filter (Skatron Instruments As). Radioactivity was measured with a microbeta Trilux scintillation counter (Perkin Elmer, Toronto, Canada).The raw data were expressed as counts per minute (CPM).

2.7. Statistical analyses

Data are presented as the mean \pm SE. Data were analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc test ($p \leq 0.05$). The analysis was performed using Statistica for Windows (Version 7.0, StatSoft Inc., 1995).

3. Results

In the well samples, 13 of the 61 target volatile organic compounds were detected; concentrations varied between non detectable and 92 μ g/L. The concentrations of VOCs in groundwater samples were highly variable across wells (**Table 1**). The most frequently detected compounds include vinyl chloride (38.5%); chlorobenzene (30.7%); benzene (23.1%); 1, 2-dichloroethane (23.1%); ethylbenzene (23.1%); trichloroethene (15.3%) (**Fig.2**). Measured of vinyl chloride (92 μ g/L); 1,

2 dichloroethane (36 µg/L); 1, 1 dichloroethene (8.5 µg/L); trichloroethene (7.8 µg/L) exceeded the relating drinking standards (**Table 1**). The W2 at (0.23 km) contained the highest vinyl chloride concentration.

Neither cell viability, nor NK function were observed to be affected by exposure of trout leucocytes to groundwater (data not shown). At the highest concentration (1%) significant inhibition of immunocapacity (M1, the proportion of cells that engulfed of at least one bead) and immunoefficiency (M2, the proportion of cells that engulfed of at least three beads) occurred in 4/13 wells at (1.19, 1.15, 2.75 and 5.13 km) and (1.19, 1.15, 1.54 and 4.68 km) respectively (**Figs.3 and 4**). However, in (0.03 and 0.25%), both M1 and M2 were significantly inhibited by the exposure of immune cells to groundwater samples only at 4.31 km.

Exposure to well water from 9/13 (70%) samples increased lymphocytes proliferation when stimulated with LPS (lymphocytes B). while only 15 % of the well water samples stimulated lymphocyte T proliferation when stimulated with PHA. However, at the lowest exposure concentration lymphocyte T proliferation was significantly decreased at low concentrations for 5/13 (38%) of wells (**Figs.5 and 6**). However, T lymphocyte proliferation (1.7 and 1.9-fold with respect to controls) at 1.54 and 5.13 km respectively was rather less pronounced than B lymphocyte proliferation (2.3 and 2.5-fold relative to the controls) at 0.23 and 2.75 km respectively, suggesting that cell-mediated immunity was less affected than humoral mediated-immunity.

4. Discussion

In this study, we evaluated the contamination and the immunotoxic effects induced by Mercier groundwater on the immune system. Presence of VOCs in Mercier groundwater is indicative of subsurface contamination. The concentrations of VOCs were highly variable across wells (**Table 1**). In some samples, the parent compound although not detected, could have degraded into others compounds that were not analyzed. This suggests that many VOCs might degrade as they are transported through the water table as a result of natural attenuation process (Bi et al., 2011). Therefore, the absence of detectable concentration of VOCs may be due to degradation levels under analytical detection capabilities (Barnes et al., 2008).

The VOCs identified in certain groundwater samples are known to exert combined effects (induction and/or inhibition) on the immune system using mammalian model (Hsieh et al., 1990; Zabrodskii et al., 1997; Zabrodskii et al., 2006). However, their effects on aquatic organism are less reported. In this study, we tried to make a link between immunotoxic effects observed in cells exposed to groundwater samples and the presence of various contaminants detected in effluent. However, due to the complex mixture of toxic substances involved, it is difficult to distinctly find the cause-effect relationship. In our study, the results show that pronephric macrophages exposed *in vitro* to groundwater have significantly lower activity even if the samples were taken at farther distances than the lagoons effects independent of distance. Moreover, neither cell viability nor NK activity was affected after exposure to water samples. Furthermore, the chemicals in groundwater samples which have suppressed phagocytosis increase the risk of infectious diseases (Frouin et al., 2008). The results revealed that a low

number of samples (4/13) reduced phagocytosis activity of cells compared to unexposed cells, which would suggest immunosuppressive effects. The immunosuppressive effects could indicate compromised immunocompetence in trout. [Kakuta, 1997](#), moreover observed a decrease of phagocytotic activity in blood cells of goldfish exposed to treated sewage and phagocytotic activity was suppressed after one week exposure of trout to municipal effluent ([Salo et al., 2007](#)). *In vitro* exposure using primary cultures of trout leucocytes appears to respond similarly to fish exposed to effluent with respect to immune activity ([Gagné et al., 2013](#)).

Despite the presence of chemicals in the 0.23 km samples, it seems that exposure had no effect on immune cells except on the proliferation response of lymphocyte B which was increased at the highest concentration (1%). Immune enhancement may result in the loss of regulation within the immune system and can lead to adverse effects ([Frouin et al., 2008](#)). It appears that the observed immune response in this study, may reflect the combined effects of several chemicals. Thus, exposure to complex mixtures can lead to different responses that may differ from the response caused by exposure to a single chemical. However, competitive inhibition may occur as one of the possible interactions between the chemicals such as (trichloroethylene and vinyl chloride) ([Pohl and Scinicariello, 2011](#)).

The chemicals present in groundwater samples appear to have biphasic impact of the proliferative response of fish lymphocytes induced by PHA- and LPS with stimulation at higher concentration (1 %) and inhibition at lower concentration (0.03 and 0.25%). In previous study, mice exposed to a mixture of benzene and toluene in drinking water for 28 days completely inhibited immunotoxic effects (Increased T- and B cell mitogenesis) ([Hsieh et al., 1990](#)). In [Hoeger et al. \(2004\)](#), proliferation of conA and LPS-stimulated lymphocytes was likewise increased after exposure to sewage effluent.

5. Conclusions

In conclusion, this study provides some insights to the immunotoxic effect of groundwater contaminated by industrial wastes activities to rainbow trout leucocytes. The data suggests that chemicals were able to account for the observed effects. A stimulation of lymphocytes proliferation and an inhibition of phagocytosis occurred in (5/13) of samples at (0.23, 1.15, 1.19, 1.54, and 2.74 km). However, due to the complex mixture of toxic substances involved, it is difficult to find the cause-effect relationship.

Acknowledgments

This study was supported by the Canada Research Chair in Environmental immunotoxicology (Dr M. Fournier). The authors are thankful to Mr Julien Paquette and Michel Paquin from Ministry of Sustainable Development, Environment and Parks (Quebec) for their precious help in water sampling. The authors thank Marlene Fortier for her technical assistance.

REFERENCES

L. Allan, D. Sherr

Disruption of human plasma cell differentiation by an environmental polycyclic aromatic hydrocarbon: a mechanistic immunotoxicological study

Environmental Health 9(1) (2010), pp.15

M. Avramov, SI .Schmidt, C. Griebler

A new bioassay for the ecotoxicological testing of VOCs on groundwater invertebrates and the effects of toluene on *Niphargus inopinatus*

Aquatic Toxicology (1-3) (0) (2013), pp.130-131

K .Aziz, S. Nowsheen, G. Pantelias, G. Iliakis, VG. Gorgoulis, AG. Georgakilas

Targeting DNA damage and repair: Embracing the pharmacological era for successful cancer therapy

Pharmacology & Therapeutics 133(3)(2012), pp.334-350

A. Bado-Nilles, C. Quentel, H. Thomas-Guyon, S .Le Floch

Effects of two oils and 16 pure polycyclic aromatic hydrocarbons on plasmatic immune parameters in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linné)

Toxicology in Vitro 23(2) (2009), pp.235-241

KK. Barnes, D.W. Kolpin, E.T. Furlong, S.D.Zaugg, M.T.Meyer, LB . Barber

A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - I) groundwater

Science of The Total Environment International 402(2-3) (2008), pp.192-200

C. Baudoin, M. Charveron, R. Tarroux, Y. Gall

Environmental pollutants and skin cancer

Cell Biology and Toxicology 18(5) (2002), pp. 341-348

E. Bi, Y. Liu, J. He, Z. Wang, F. Liu

Screening of Emerging Volatile Organic Contaminants in Shallow Groundwater in East China

Ground Water Monitoring & Remediation 32(1) (2012), pp. 53-58

NC. Bols, JL. Brubacher, RC. Ganassin, LEJ. Lee

Ecotoxicology and innate immunity in fish

Developmental and Comparative Immunology 25(8-9) (2001), pp.853-873

P. Brousseau, Y. Payette, B. Blakley, H. Boermans, D. Flipo, H. Tryphonas, M. Fournier

Manual of Immunological Methods

Boston, USA, CRC Press: (1998), pp.141

CAEQ

Centre d'Expertise en Analyse Environnementale. Certificat d'analyse: Eaux souterraines de la région de Mercier. Projet 1818. Montréal (in french)

Centre d'Expertise en Analyse Environnementale (2009), pp.60

L. Canesi, LC. Lorusso, C. Ciacci, M. Betti, F. Regoli, G. Poiana, G. Gallo, A. Marcomini

Effects of blood lipid lowering pharmaceuticals (bezafibrate and gemfibrozil) on immune and digestive gland functions of the bivalve mollusc, *Mytilus galloprovincialis*

Chemosphere 69(6) (2007), pp.994-1002

NS. Chary, AR. Fernandez-Alba

Determination of volatile organic compounds in drinking and environmental waters

TrAC - Trends in Analytical Chemistry 32 (2012), pp. 60-75

B. Collet

Innate immune responses of salmonid fish to viral infections

Developmental & Comparative Immunology(0) (2013)

M. Danion, S. Le Floch, R. Kanan, F. Lamour, C .Quentel

Effects of in vivo chronic hydrocarbons pollution on sanitary status and immune system in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L)

Aquatic Toxicology 105(3-4) (2011), pp.300-311

PA .Ellis, MO. Rivett

Assessing the impact of VOC-contaminated groundwater on surface water at the city scale

Journal of Contaminant Hydrology 91(1-2) (2007), pp. 107-127

M. Fournier, V. Dougas, T. Colborn, FO. Omara, F .Denizeau, EF. Potworowski, P. Brousseau

Immunosuppression in mice fed on diets containing beluga whale blubber from the St Lawrence Estuary and the Arctic populations

Toxicology Letters 112-113 (2000), pp. 311-317

H. Frouin, M. Lebeuf, R. Saint-Louis, M. Hammill, É. Pelletier, M. Fournier

Toxic effects of tributyltin and its metabolites on harbour seal (*Phoca vitulina*) immune cells in vitro

Aquatic Toxicology 90(3) (2008), pp. 243-251

F. Gagné, J. Auclair, P. Turcotte, M. Fournier, C. Gagnon, S. Sauvé, C. Blaise

Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity

Aquatic Toxicology 86(3) (2008), pp.333-340

F. Gagné, C. Blaise, I. Aoyama, R. Luo, C. Gagnon, Y. Couillard, P. Campbell, M. Salazar

Biomarker study of a municipal effluent dispersion plume in two species of freshwater mussels

Environmental Toxicology 17(3) (2002), pp. 149-159

F. Gagné, M. Fortier, M. Fournier, S.A. Smyth

In vitro immunotoxicity of untreated and treated urban wastewaters using various treatment processes to rainbow trout leucocytes

Journal of Environmental Sciences (China) 25(7) (2013), pp. 1400-1407

SK. Golfinopoulos, TD. Lekkas, AD. Nikolau

Comparison of methods for determination of volatile organic compounds in drinking water

Chemosphere(45) (2001), pp. 275-284

Gouvernement du Québec, parcs Mdddee

Site des Anciennes Lagunes de Mercier

Document D'information: Gouvernement du Québec, Ministère des Communications (2007)

MR. Gwinn, DO. Johns, TF. Bateson, KZ. Guyton

A review of the genotoxicity of 1,2-dichloroethane (EDC)

Mutation Research/Reviews in Mutation Research 727(1-2) (2011), pp.42-53

AJ. Harford, K. O'Halloran, PFA. Wright

Effect of in vitro and in vivo organotin exposures on the immune functions of murray cod (Maccullochella peelii peelii)

Environmental Toxicology and Chemistry 26(8) (2007), pp. 1649-1656

N. Hébert, F. Gagné, P. Cejka, D. Cyr, DJ. Marcogliese, C. Blaise, J. Pellerin, M. Fournier

The effects of a primary-treated municipal effluent on the immune system of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Exposure duration and contribution of suspended particles

Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 148(3) (2008), pp.258-264

B. Hoeger, MR. Van Den Heuvel, BC. Hitzfeld, DR. Dietrich

Effects of treated sewage effluent on immune function in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)

Aquatic Toxicology 70(4) (2004), pp.345-355

G Hsieh, R. Sharma, RR. Parker

Subclinical effects of groundwater contaminants. IV. Effects of repeated oral exposure to combinations of benzene and toluene on regional brain monoamine metabolism in mice

Archives of Toxicology 64(8) (1990), pp.669-676

LR. Iwanowicz, DT. Lerner, VS. Blazer, SD. McCormick

Aqueous exposure to Aroclor 1254 modulates the mitogenic response of Atlantic salmon anterior kidney T-cells: Indications of short- and long-term immunomodulation

Aquatic Toxicology 72(4) (2005), pp.305-314

I. Kakuta

Effect of sewage on blood parameters and the resistance against bacterial infection of goldfish, *Carassius auratus*

Environmental Toxicology and Water Quality 12(1) (1997), pp. 43-51

L. Liu, H. Zhou

Investigation and assessment of volatile organic compounds in water sources in China

Environmental Monitoring and Assessment 173(1-4) (2011), pp.825-836

E. Lotzova

Definition and function of natural killer cells

Nat. Immunol 12(1993), pp.169-176

C. Müller, S. Ruby, P. Brousseau, D. Cyr, M. Fournier, F. Gagné

Immunotoxicological effects of an activated-sludge-treated effluent on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 150(3) (2009), pp.390-394

HR. Pohl, F. Scinicariello

The impact of CYP2E1 genetic variability on risk assessment of VOC mixtures Regulatory Toxicology and Pharmacology 59(3) (2011), pp.364-374

M. Poulin, G. Simard, M. Sylvestre

(Groundwater pollution by organic compounds at Mercier, Quebec). Pollution des eaux souterraines par les composés organiques à Mercier, Québec. (in french) Hydrogeology. 2(1985), pp.125-131

S. Reynaud, P. Deschaux

The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review

Aquatic Toxicology 77(2)(2006), pp. 229-238

CD. Rice, DH. Kergosien, SM. Adams

Innate Immune Function as a Bioindicator of Pollution Stress in Fish

Ecotoxicology and Environmental Safety 33(2) (1996), pp.186-192

HM. Salo, N .Hébert, C .Dautremepuits, P .Cejka, DG. Cyr, M .Fournier

Effects of Montreal municipal sewage effluents on immune responses of juvenile female rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)

Aquatic Toxicology 84(4) (2007), pp.406-414

LK. Shelley, PS. Ross, CJ. Kennedy

Immunotoxic and cytotoxic effects of atrazine, permethrin and piperonyl butoxide to rainbow trout following in a vitro exposure

Fish & Shellfish Immunology 33(2) (2012), pp.455-458

USEPA

USEPA of the Drinking Water Standards and Health Advisories (EPA 822-R-06-013)

Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC (2006)

S .Wang, H .Zhang, W. Zheng, X. Wang, ME. Andersen, J. Pi, G. He, W. Qu

Organic Extract Contaminants from Drinking Water Activate Nrf2-Mediated Antioxidant Response in a Human Cell Line

Environmental Science & Technology 47(9) (2013), pp. 4768-4777

M. Watts, BL. Munday, CM. Burke

Immune responses of teleost fish

Australian Veterinary Journal 79(8) (2001), pp. 570-574

WHO

Guidelines for Drinking-water Quality Recommendations. 3rd ed.

World Health Organization. Vol. 1(2006)

S. Wilson, L. Dzon, A. Reed, M. Pruitt, MM. Whalen

Effects of in vitro exposure to low levels of organotin and carbamate pesticides on human natural killer cell cytotoxic function

Environmental Toxicology 19(6) (2004), pp. 554-563

Y-C. Yao, J-H. Tsai

Effects of gasoline aromatic content on emissions of volatile organic compounds and aldehydes from a four-stroke motorcycle

Environmental Technology: (2013), pp. 1-9

PF. Zabrodskii, VF. Kirichuk, AV. Gryzunov

Changes in the nonspecific and immunological resistance during acute dichlorethane poisoning. *Izmenenie nespetsificheskoi i immunologicheskoi rezistentnosti organizma pri ostrom otravlenii dikhloretanom.* 123(1) (1997), pp. 51-53

PF. Zabrodskii, VG. Mandych, VG. Germanchuk

Inhibition of cytochrome P-450 with 2-diethylaminoethyl-2,2-diphenylpropylacetate (SKF-525A) reduces immunotoxicity of chlorinated carbohydrates

Bulletin of Experimental Biology and Medicine 142(3) (2006), pp. 324-326

FIGURES AND TABLES

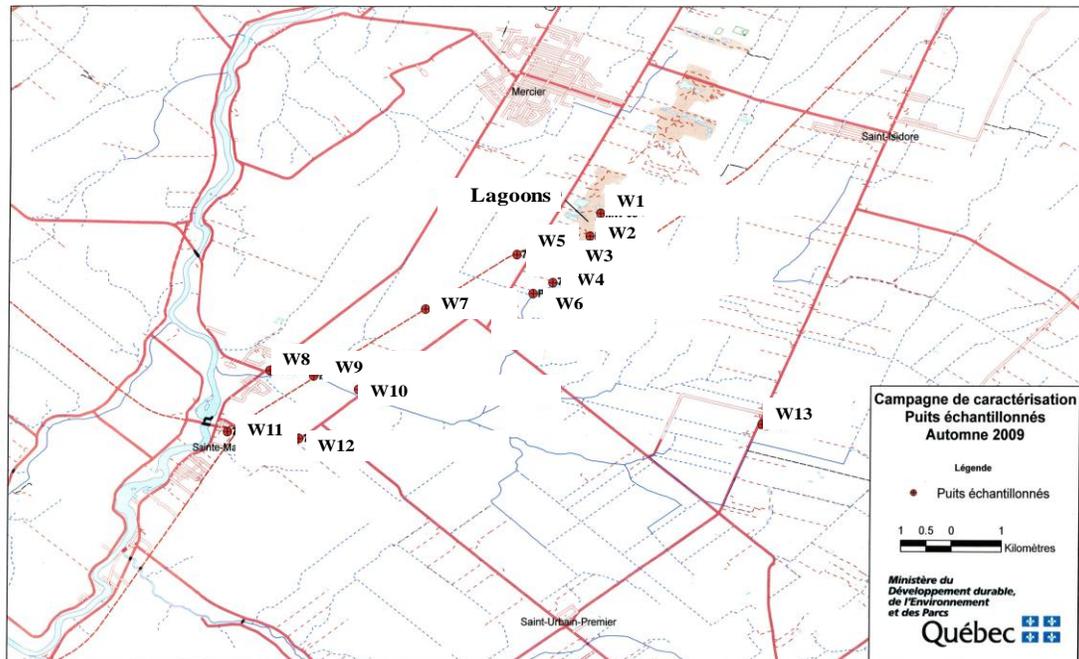


Fig.1. Sampling Wells at different distances around Mercier lagoons in campaign October 2009 (Modified map provided by the Ministry of Sustainable Development, Environment and Parks of Quebec, 2009). W1: 0.22 km; W2: 0.23 km; W3: 0.85 km; W4: 1.19 km; W5: 1.15 km; W6: 1.54km; W7: 2.75 km; W8: 5.13 km; W9: 4.68 km; W10: 4.39 km; W11: 6.26 km; W12: 5.39 km; W13: 4.31 km.

Table 1: Summary of analytical results of Groundwater sites sampled for 61 organic contaminants (Carpiqat 2009). Results were provided by the Centre d'expertise en analyse environnementale of the province of Quebec (CAEQ, 2009). Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) was used as a detection limit method.

Compounds (ug/L)	Wells code		W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	W13	Detection limit	Drinking water Standards (ug) (U.S.P.A., 2016)
	Distance (Km)		0.22	0.33	0.85	1.19	1.15	1.54	2.75	5.31	4.68	4.39	6.26	4.39	4.31		
VinylChloride			<0.2	92	1.2	0.3	<0.2	0.44	4.1	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	0.2	20
Trans-1,2-Dichloroethene			<0.09	0.29	<0.09	<0.09	<0.09	<0.09	0.38	<0.09	<0.09	<0.09	<0.09	<0.09	<0.09	0.09	100
1,1-Dichloroethane			<0.07	2.1	<0.07	<0.07	<0.07	<0.07	<0.07	<0.07	<0.07	<0.07	<0.07	<0.07	<0.07	0.07	-
Cis-1,2-Dichloroethene			<0.07	0	<0.07	<0.07	<0.07	<0.07	0.41	<0.07	<0.07	<0.07	<0.07	<0.07	<0.07	0.07	70
Benzene			<0.03	2.4	0.1	<0.03	<0.03	<0.03	0.52	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	0.03	5.0
1,2-Dichloroethane			<0.09	36	0.71	<0.09	<0.09	<0.09	0.17	<0.09	<0.09	<0.09	<0.09	<0.09	<0.09	0.09	5.0
1,1-Dichloroethane			<0.22	8.5	<0.33	<0.33	<0.22	<0.22	<0.22	<0.22	<0.22	<0.22	<0.22	<0.22	<0.22	0.22	7.0
1,3-Dichloropropane			<0.02	0.6	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	0.02	-
Chlorobenzene			<0.03	0.7	0.06	<0.03	0.09	<0.03	0.5	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	0.03	-
Ethylbenzene			<0.03	0.12	<0.02	<0.02	0.04	<0.02	0.05	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	0.02	700
Trichloroethene			<0.03	7.8	0.1	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	0.03	5.0

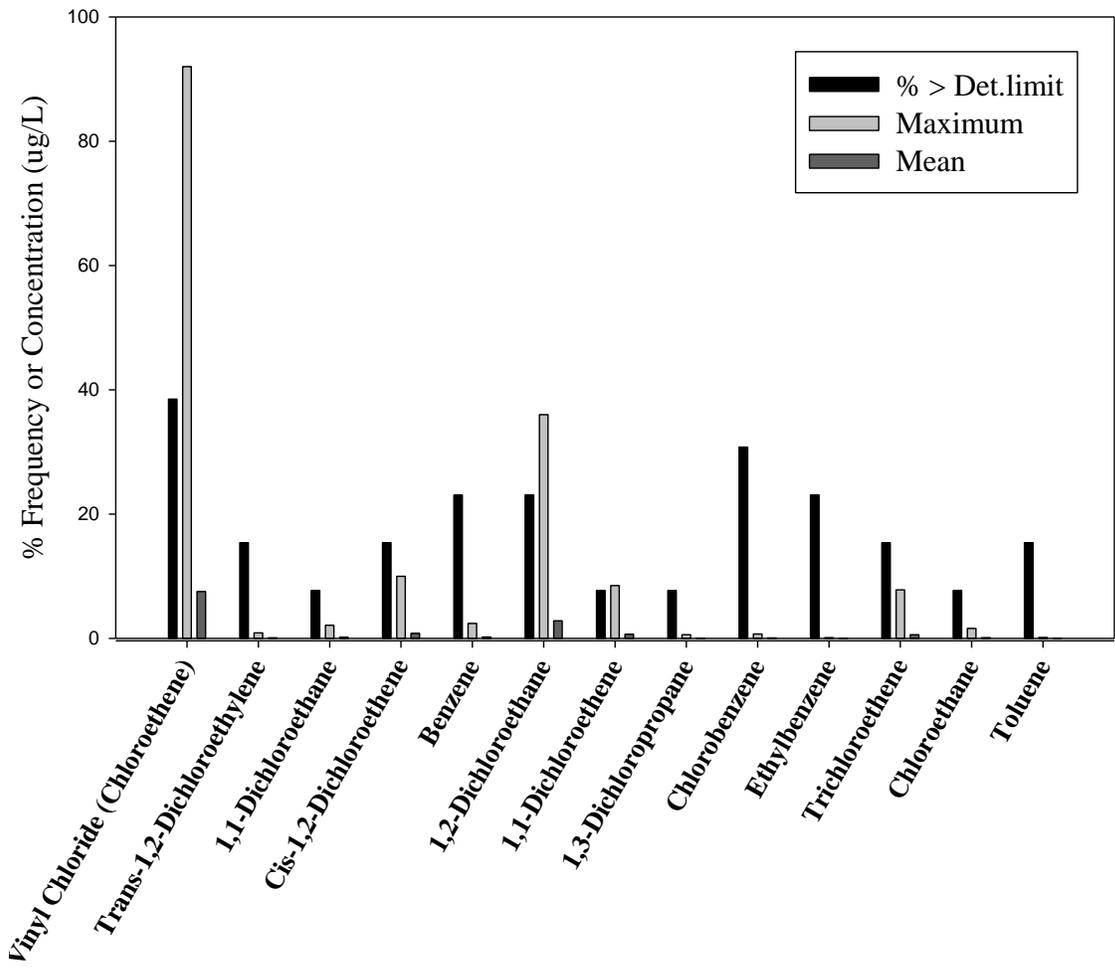


Fig.2. Frequency of occurrence, mean and maximum of concentration for VOCs detected in Mercier groundwater in campaign October 2009 (no replication in the measurement).

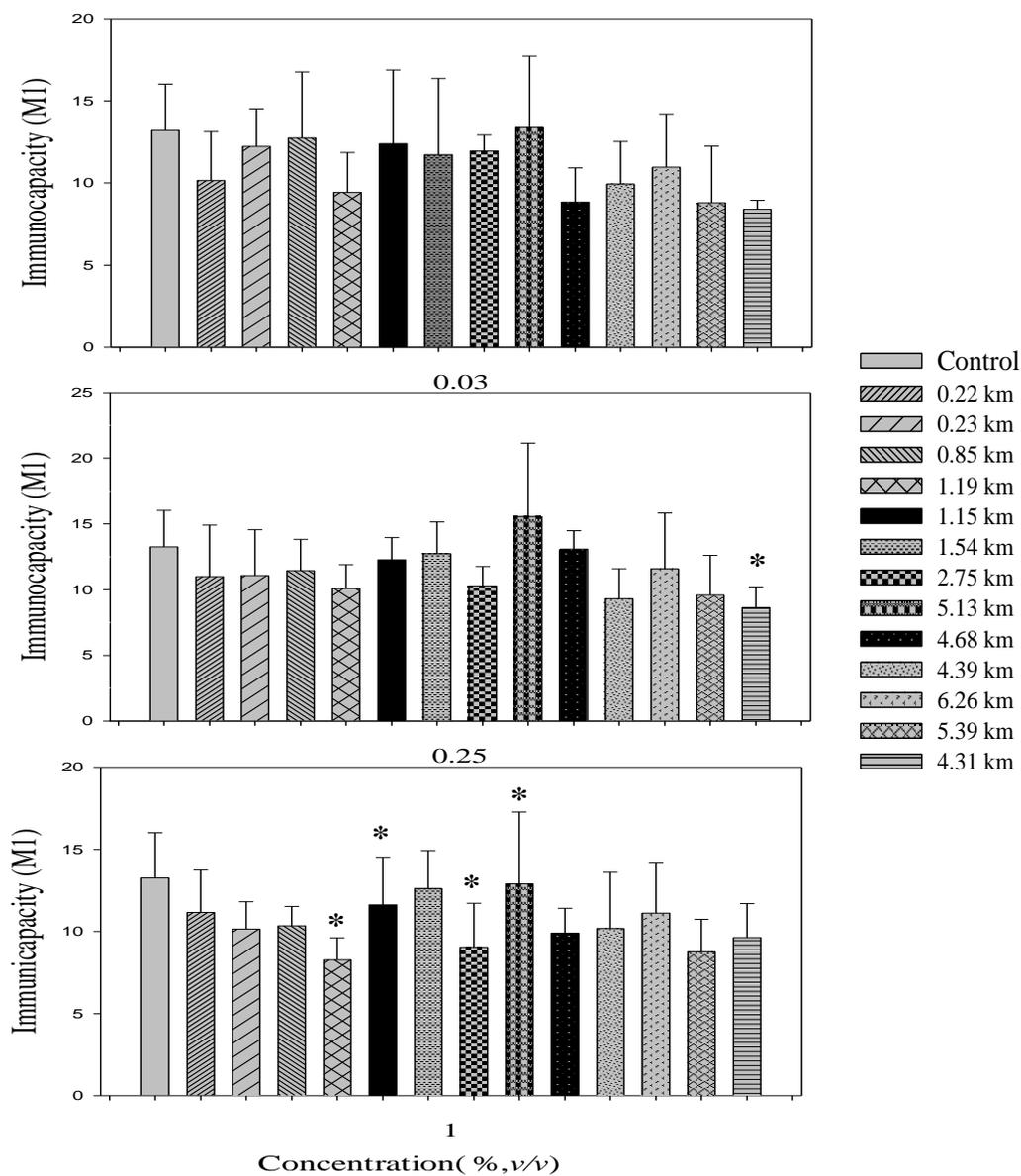


Fig.3. Phagocytic response of trout macrophages following 3 hours of pre-incubation with Mercier groundwater and 18 hours with beads (M1 : cells engulfed one bead and more). Data are represented as mean \pm SD (n=8) and asterisks indicates significant difference ($p < 0.05$) from control.

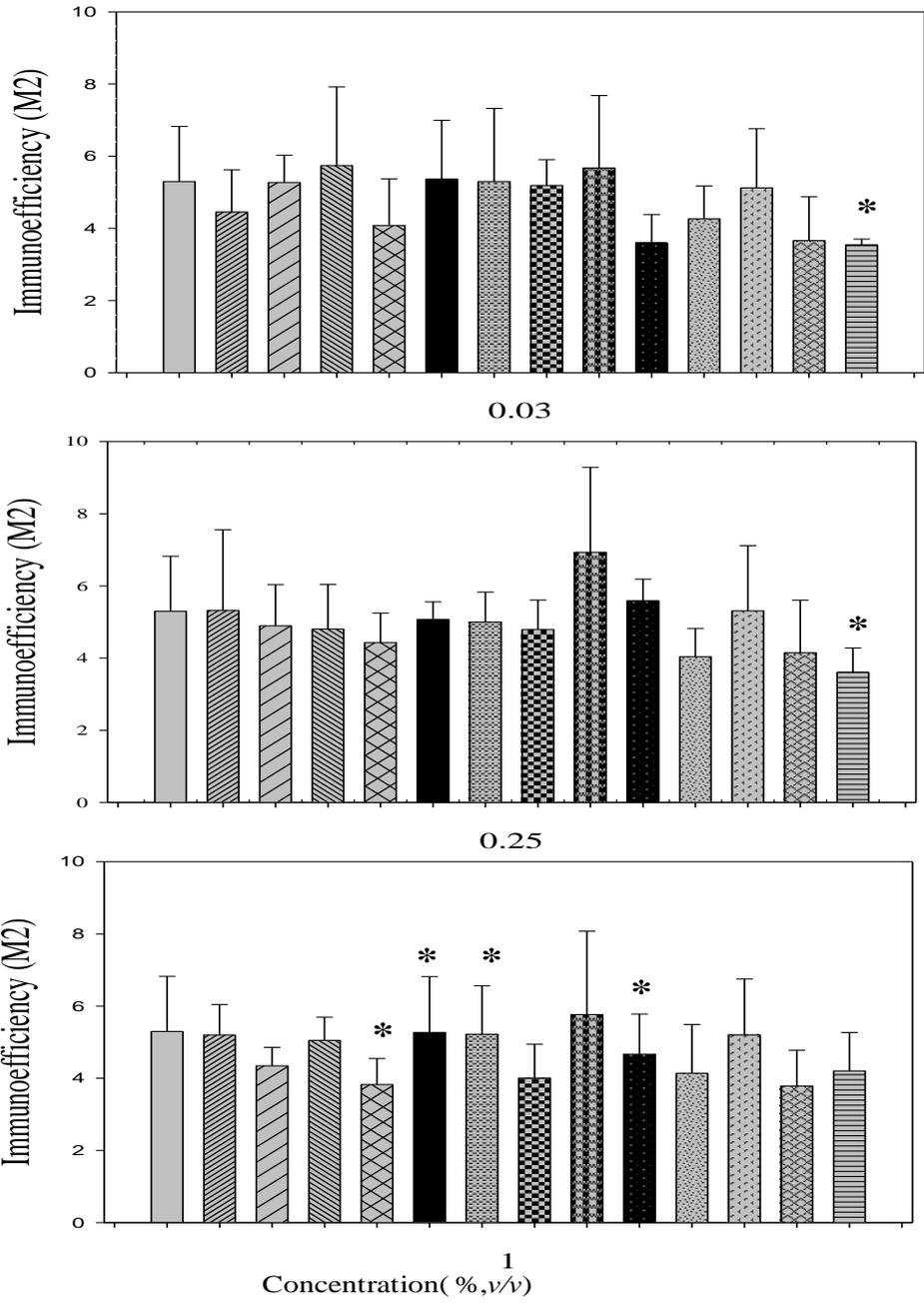


Fig.4. Immunoeficiency of trout macrophages following 3 hours of pre-incubation with Mercier groundwater and 18 hours with beads (M2 : cells engulfed three beads and more). Data are represented as mean ±SD (n=8) and asterisks indicates significant difference (p<0.05) from control.

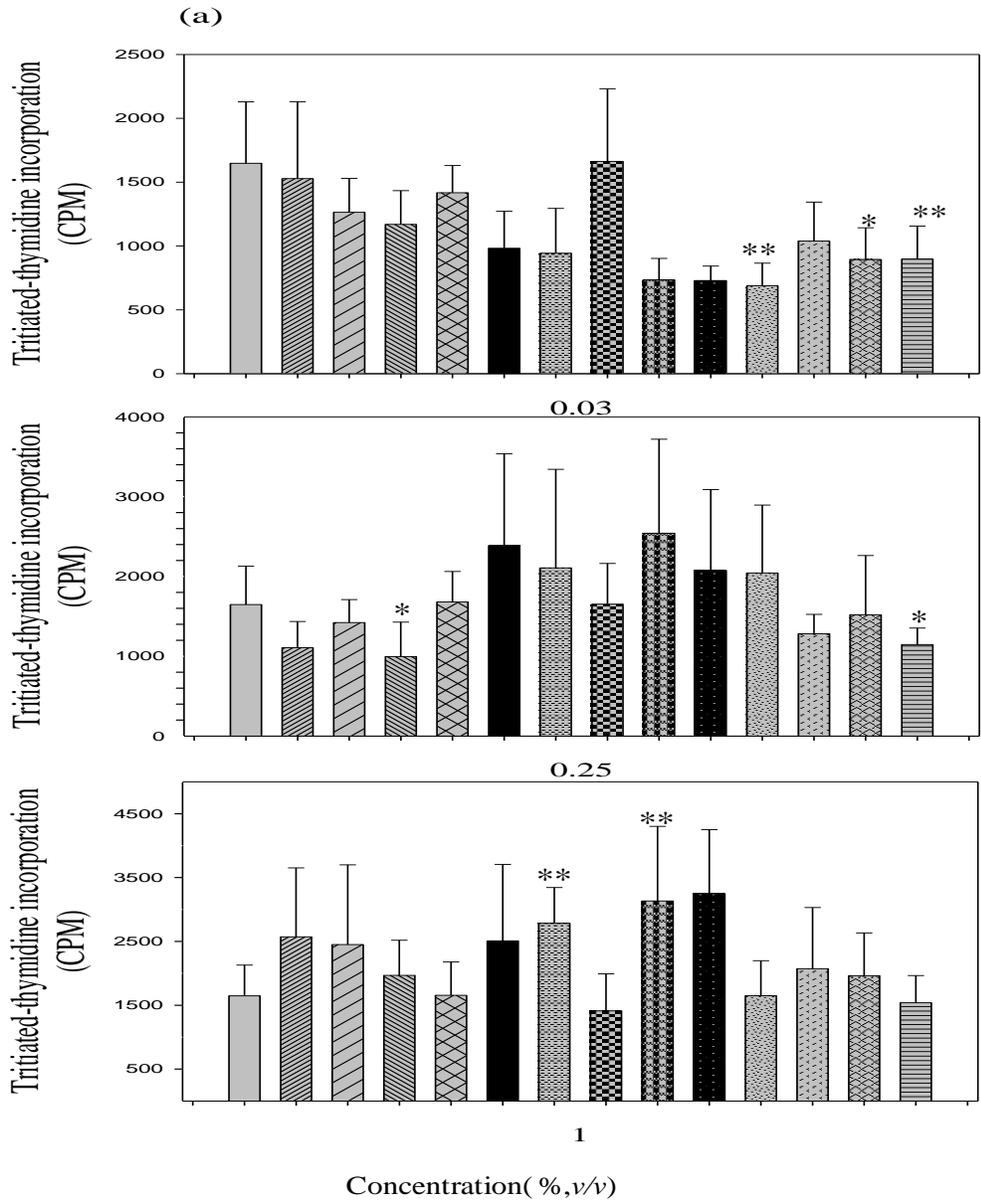


Fig.5. Effects of various concentrations of Mercier groundwater on trout leucocytes proliferation, stimulated with (a) PHA. The data represent the mean with standard error. Asterisks (*), (*) indicate a significant difference from control ($p < 0.05$, $p < 0.01$) respectively.**

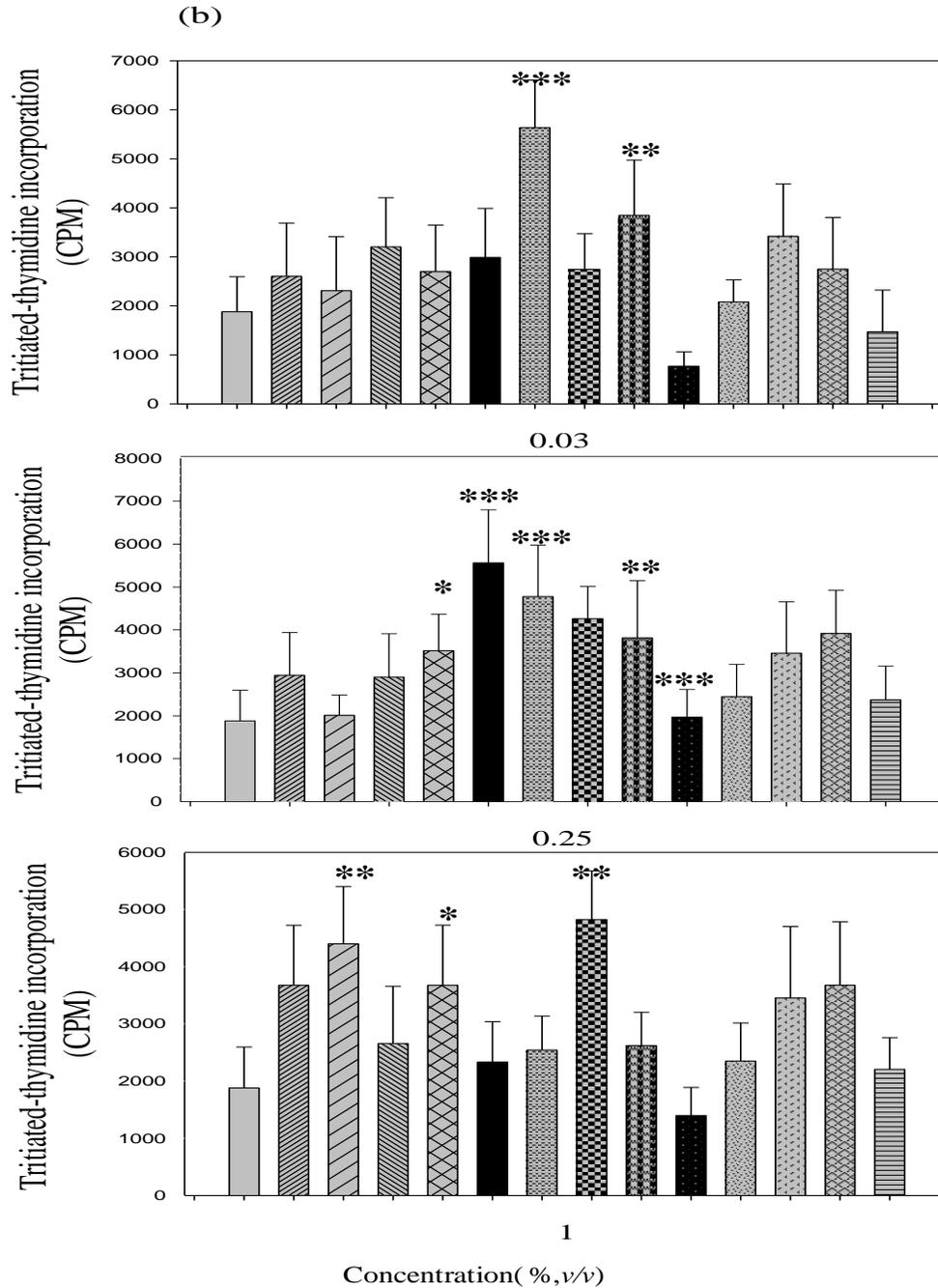


Fig.6. Effects of various concentrations of groundwater samples at different distances from Mercier lagoons on trout leucocytes proliferation, stimulated with (b) LPS. The data represent the mean with standard error. Asterisks (*), (), (***) indicate a significant difference from control ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) respectively.**

3.2. Effets immunotoxiques d'un site d'incinération de déchets industriels sur la truite (*Oncorhynchus mykiss*) exposée aux eaux souterraines

Article 2: Immunotoxic effects of an industrial waste incineration site on groundwater in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Auteurs

Nadjet Benchalgo, François Gagné, Michel Fournier

Publié dans Journal of Environmental Sciences.

Contribution personnelle

Mon rôle a consisté à faire l'échantillonnage, à planifier les expériences, à faire les analyses et l'interprétation des résultats et à rédiger l'article à titre d'auteur principal.

Contribution des coauteurs

Dr Michel Fournier, mon directeur de recherche et Dr François Gagné co-directeur ont participé à la planification des expériences, à l'analyse des résultats ainsi qu'à la correction du manuscrit.

RÉSUMÉ

Le rejet des déchets organiques issus de l'industrie pétrochimique dans les lagunes de l'arrondissement de Mercier a provoqué une grave contamination des eaux souterraines. L'objectif de cette étude était de déterminer le potentiel immunotoxique de trois puits à des distances croissantes du site de l'incinérateur (1,17; 2,74 et 5,40 km). Les truites arc-en-ciel ont été exposées à des concentrations croissantes pendant 14 jours. L'immunocompétence a été caractérisée par la phagocytose, la prolifération des lymphocytes, l'analyse du cycle cellulaire et l'apoptose. Une augmentation significative de la réponse innée (phagocytose) et de la réponse immunitaire spécifique (prolifération des lymphocytes B) ont été observées chez les truites exposées à l'eau échantillonnée du puits à 2,74 km. De plus, l'activité phagocytaire a été supprimée chez les groupes à 1,17 et 5,40 km. La proportion de lymphocytes en phase S a été significativement augmentée par l'eau des puits à 2,74 et 5,40 km, tandis que les lymphocytes en phase G0/G1 ont diminué chez les poissons exposés aux eaux des trois puits. En outre, l'apoptose des lymphocytes induite par la dexaméthasone (DEX) était significativement réduite chez les groupes à 2,74 km. Le ratio apoptose induite / apoptose était plus faible chez les groupes à 2,74 et 5,40 km. En résumé, nos expériences ont montré que l'exposition au mélange de composés organiques présents dans les eaux souterraines de Mercier module la phagocytose et la prolifération cellulaire, perturbe le cycle cellulaire et réduit le ratio apoptose induite / apoptose. Pour conclure, les eaux souterraines échantillonnées au voisinage de l'incinérateur pourraient avoir un impact sur l'immunocompétence chez les poissons exposés.



Available online at www.sciencedirect.com

Journal of Environmental Sciences

www.jesc.ac.cn



Immunotoxic effects of an industrial waste incineration site on groundwater in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Nadjet Benchalgo^{1,*}, François Gagné², Michel Fournier¹

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, 531 des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada

² Emerging Methods, Aquatic Contaminants Research Division, Environment Canada, 105 Mc Gill St., Monreal, Québec H2Y 2E7, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2013

revised 29 September 2013

accepted 29 October 2013

Keywords:

groundwater

phagocytosis

lymphocyte proliferation

cell cycle

apoptosis

rainbow trout

DOI: 10.1016/S1001-0742(13)60539-2

ABSTRACT

The discharge of organic waste from the petrochemical industry into the Mercier lagoons caused major groundwater contamination. The objective of this study was to determine the immunotoxic potential of these groundwater wells at increasing distance from the incinerator dumping site (1.17, 2.74 and 5.40 km). Rainbow Trout were exposed to increasing concentrations of water from three groundwater wells for 14 days. Immunocompetence was characterized by phagocytosis, mitogen-stimulated proliferation of lymphocytes, cell cycle analysis and apoptosis. A significant increase in innate (phagocytosis) and specific immune response (B lymphocyte proliferation) was observed in trout exposed to water collected from the well at 2.74 km. However, phagocytosis activity was suppressed in groups at 1.17 and 5.40 km. The proportion of lymphocytes in S phase was significantly increased in groups at 2.74 and 5.40 km, while lymphocytes in G0/G1 phase were decreased in all three exposure groups. Additionally, dexamethasone (DEX)-induced apoptosis of lymphocytes was significantly reduced in the group at 2.74 km, which suggests decreased lymphocyte turnover. Furthermore, the ratio of DEX-induced apoptosis/apoptosis was lower in the groups at 2.74 and 5.40 km. In summary, our experiments have shown that exposure to the mixture of organic compounds present in Mercier groundwater modulates phagocytosis and cell proliferation, disrupts the cell cycle and reduces the ratio of DEX-induced apoptosis/apoptosis. It is concluded that groundwater collected in the vicinity of an incinerator containment field could impact immunocompetence in fish.

Introduction

An estimated 40,000 m³ of industrial incineration wastes were dumped in an abandoned gravel pit (City of Mercier, Québec, Canada). The industrial waste consisted of used oil and liquid wastes from chemical and petrochemical industries (Poulin et al., 1985). Over the years, the contaminants permeated through the soil and contaminated aquifers, posing a risk to local habitats. In an attempt to alleviate this contamination problem, a groundwater treatment station plant was constructed near the incinerator area to remove and clean up the groundwater in the vicinity

of the dumping sites. Poulin et al. (1985) revealed that the extent of the groundwater contamination is delimited by four zones, and the characterization of groundwater concluded the existence of a highly polluted area in the first two areas (1 and 2) (Fig. 1), which occupy an area of 2 km². Two other zones (3 and 4) extend over an area of some thirty km², where the water contains various contaminants at low concentrations.

Preliminary analyses of groundwater samples have detected volatile organic compounds (VOCs) which are the most common groundwater contaminant (Poulin et al., 1985; Goulinopoulos et al., 2001). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), heavy metals and polychlorinated biphenyls (PCBs) were also found (Poulin et al., 1985; BAPE, 1994). Some volatile organohalogenes (e.g., vinyl

* Corresponding author. E-mail: benchalgo0211@yahoo.fr

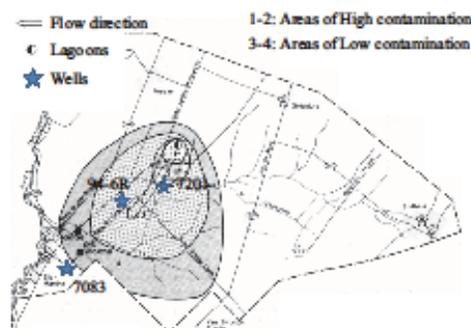


Fig. 1 Map with sampling points around the city of Mercier city during the 2010 sampling campaign. Map modified from Poulin et al. 1985. Wells 7201, 94-6R and 7083 are located at distances of 1.17, 2.74 and 5.40 km, respectively from the lagoons. Chloroform, dichloroethylene, trichloroethylene, dichloroethane, trichloroethane, chlorobenzene and phenol (data not shown) were the main chemicals measured to define the four zones (1, 2) and (3, 4), high versus low contamination (Poulin et al., 1985).

chloride) identified at the site are known to be carcinogenic to human and animals (Aziz et al., 2012). There is a paucity of certain types of studies on the effects of a mixture of various toxic components, including VOCs on the fish immune system given that the groundwater is geologically linked with the Chateauguay River.

Many studies have shown that chemical contaminants and mixtures could alter the immune function of fish (Zee-man and Brindley, 1981; Arkoosh et al., 1998; Fournier et al., 2000; Zelikoff et al., 2002). Indeed, contaminated aquatic environments have been associated with increased incidence of infectious diseases and tumors in fish populations (Song et al., 2011). The immune system is the common target of several organic compounds such as 1,1-dichloroethane, chloroform, trichloroethylene and vinyl chloride, which are known for their carcinogenicity and genotoxicity (Giri, 1995; Wong et al., 1998; Roldan-Arjona et al., 1991; Mundt et al., 2000; Naga Anusha, 2011; Pohl and Scinicariello, 2011). Numerous studies have demonstrated that a variety of PAHs are carcinogenic and immunotoxic in mammals and fish (Skupinska et al., 2004; Reynaud and Deschaux, 2006). PCBs have the potential to modulate immune responses and induce CYP1A and can disrupt the endocrine system in fish (Rice et al., 1996).

Innate response has been the focus of various studies assessing the immunotoxicity of contaminants (Canesi et al., 2007; Hannam et al., 2009). Such response is mediated principally by macrophages. Adaptive and specific immune responses are performed by B and T cells; the modulation of lymphocyte proliferation suggests the possibility of increased susceptibility to diseases (Mori et al., 2006). In addition to lymphocyte proliferation, cell cycle

and apoptosis were also analyzed and were determined to provide a better mechanistic insight. Examining cell cycle alteration provides an opportunity to assess the early signals of cytotoxicity, while apoptosis provides early warning signals of environmental disturbance (Osman et al., 2012). The signals arising within the cells following cytotoxicity are able to trigger apoptosis. Otherwise, disturbances in apoptosis may lead to abnormal development and diseases (Follezou et al., 1999; Igney and Kramm, 2002).

The objectives of this study was to investigate the effects of exposure to groundwater, at 1.17, 2.74 and 5.4 km from the contaminated lagoon area, on the immune system in juvenile Rainbow Trout following 14 days of exposure time. For this purpose, immune function was examined by following changes in phagocytosis and stimulated lymphoblastic proliferation. In addition, cell cycle analysis and the proportion of cells undergoing apoptosis were examined.

1 Materials and methods

1.1 Fish collection and maintenance

Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) ($n = 108$), weighing (23.1 ± 9.3) g, were obtained from a local fish farm "Les Arpents Verts" located at Sainte-Edwidge-de-Clifton, Quebec, Canada. They were kept for a minimum of 2 weeks in 300 L tanks at 15°C under a photoperiod of 12 hr light/12 hr dark and constant aeration. They were fed daily at a rate of 2% body weight with food pellets.

1.2 Water sampling

The location of the sampling station is shown in Fig. 1. The groundwater samples were collected in the plume of contamination from three wells during May 2010. The wells are located at distances of 1.17, 2.74 and 5.40 km from the lagoons.

A composite or grab volume of 100 L of groundwater samples were collected at the sites and the samples were stored at 4°C until exposure. The physico-chemical parameters of pH, conductivity and temperature were determined according to standard methods of Quebec's Centre d'expertise en analyse environnementale (ISO/CEI 17025). VOC parameters were vinyl chloride, trans-1,2-dichloroethylene, 1,1-dichloroethane, 1,2-dichloroethane, cis-1,2-dichloroethane, benzene and chlorobenzene (gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)) was used as a detection method.

1.3 Exposure experiments

Six plastic vessels (31 cm diameter \times 44 cm height, 20 L capacity) were filled with 15 L of water sample using polyethylene plastic bags. Six groups of 12 juvenile rain-

bow trout were distributed to each tank and were exposed to increasing concentrations of groundwater (3.1%, 12.5%, 25% and 50%) for 14 days at 15°C. The water was changed twice a week. The control group and the dilution water consisted of UV- and charcoaltreated tap water from the City of Montréal (Quebec, Canada). The exposure experiments were repeated twice. The fish were fed 3 times weekly with commercial fish pellets and the extra food was removed after 10 min. The feeding was stopped 24 hr before the end of the exposure. During the experiment, parameters such as temperature, dissolved oxygen content, pH and conductivity were measured daily. Data on nitrite, nitrate and ammonia concentrations were analyzed according to standard methods of (CAEQ, ISO/CEI 17025).

All chemicals were obtained from the Sigma chemical company (Ontario, Canada) unless specifically identified. Fish ($n = 6$) were humanely anaesthetized with tricaine methanesulfonate (MS222) at 0.1% concentration after 14 days in accordance with the recommendations of the animal care committee. The head-fork length and body weight were measured. The anterior kidney was removed under sterile conditions and crushed with a 2-mL glass grinder (Wheaton Scientific, New Jersey, USA) containing 1 mL of sterile RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Ontario, Canada) supplemented with heparin (10 U/mL; Organon Technika, Ontario, Canada), HEPES (10 mmol/L), penicillin/streptomycin (100 U/mL and 100 mg/mL respectively), and 10% fetal bovine serum (FBS). The cell suspension of head-kidney was centrifuged at 485 $\times g$ for 30 min and washed twice in RPMI media without heparin. The ratio of live/dead cells was assessed microscopically with a hemacytometer (Bright-line, Pennsylvania, USA) using trypan blue exclusion (0.4%) and the suspension was adjusted to 1×10^6 live cells/mL.

1.4 Phagocytosis

Phagocytic activity was assessed using fluorescently labelled beads in accordance with the protocol of Brousseau et al. (1998). A volume of 500 μL of each cell leukocyte suspension was incubated for 18 hr at 15°C with fluorescent latex beads (diameter of 1.71 μm ; Polysciences, Pennsylvania, USA) at a 100:1 bead-to-cell ratio. After the incubation period, the cell suspensions were layered over 4 mL of RPMI supplemented with 3% bovine serum albumin and centrifuged at 150 $\times g$ at 4°C for 8 min to remove the free beads adsorbed at the surface of cell membranes. The cell pellets were resuspended and fixed in 0.5% formaldehyde and 0.2% sodium azide in phosphate-buffered saline (PBS). Cells were then analyzed using a flow cytometry (Becton Dickinson, California, USA) and 5000 events were recorded. Two endpoints determined the percentage of macrophages that engulfed one bead or more (M1: phagocytic activity) or three beads or more (M2: phagocytic efficiency). The data were expressed as the percentage of cells that engulfed one bead or more and

three beads or more.

1.5 Lymphocyte proliferation

Cells were plated at 5×10^5 cells/well in round-bottom microplates and incubated with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of phytohemagglutinin (PHA), a mitogen activator of lymphocyte T, and with 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of lipopolysaccharide (LPS), a mitogen activator of lymphocyte B. After 72 hr of incubation, 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ of [^3H]-methyl thymidine (MP Biomedical, Ohio, USA) was added, and plates were incubated for a further 18 hr at 15°C. Cells were harvested with a semi-automatic cell harvester (Skatron Instruments As, Lier, Norway) on a fibreglass filter (Skatron Instruments As, Norway). Radioactivity was measured with a microbeta Trilux scintillation counter (Perkin Elmer, Toronto, Canada). The raw data were expressed as counts per min (CPM), and the results were presented as stimulation index (SI) calculated as follows:

$$SI = \frac{\text{CPM stimulated cells (PHA or LPS)}}{\text{CPM unstimulated cells}} \times 100 \quad (1)$$

1.6 Cell cycle

Cell cycle analysis was determined by flow cytometry. Briefly, a volume of (5×10^5) cells was centrifuged for 10 min at 450 $\times g$ with the brake on low. The supernatant was removed and 500 μL of ice-cold 70% ethanol was added and cells were centrifuged for 5 min at 450 $\times g$. Cells were then washed twice in PBS and resuspended in 0.5 mL of PBS containing PI (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and RNase (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cells were incubated at room temperature for 30 min. The DNA histogram results showed the percentage of cells in G0/G1, S and G2/M phases under total percentage, using Cell Quest Pro software (Becton Dickinson). At least 5000 events were acquired for each sample. Human tumor cells (K562) were used as a positive control for the cell cycle assay.

1.7 Apoptosis

To determine *in vitro* apoptosis, a commercial kit was used (Vybrant Apoptosis Assay Kit #4 from Molecular Probes, USA). It contains YO-PRO-1 and propidium iodide nucleic acid stains. The principle of this kit is to detect apoptosis as compared to cell membrane permeability; the green fluorescent YO-PRO-1 dye can enter apoptotic cells, but not propidium iodide. We added 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ of YO-PRO-1 and 0.1 mg/mL of propidium iodide to 0.5×10^6 cells/mL. After the incubation period of 30 min at 4°C in the dark, stained cells were analyzed by flow cytometry using green fluorescence emission for YO-PRO-1 (488 ± 30 nm emission) and red fluorescence for propidium iodide (610 ± 20 nm band pass). For each sample the fluorescence of 10,000 events was recorded. Dexamethasone was used as an inducer of apoptosis at 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$.

1.8 Statistical analyses

The data were expressed as a mean with standard error. In each experiment, differences between the control and groups of fish exposed to Mercier groundwater were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc test ($p < 0.05$). Analysis was performed using Statistica for Windows (Version 7.0, StatSoft Inc., 1995). Correlation was performed using Pearson-moment procedure, and factorial analyses were determined using principal component and discriminant function methods. Significance was set at $p < 0.05$.

2 Results

The results reveal that Mercier groundwater at 2.74 km from the lagoons has a higher degree of contamination than water at 1.17 and 5.40 km (Table 1). This suggests that groundwater treatment was effective at 1.17 km but the contamination persists at 2.74 km distance). Discriminant analysis confirmed that the site at 2.74 km from the lagoons was more contaminated and was different from the other sites. The biomarkers that discriminated the 2.74 km site were phagocytosis activity, LPS- and PHA-

stimulation lymphocyte proliferation, and the cell cycle (more explanation in paragraph 2.4).

2.1 Phagocytosis

Trout weights, lengths and leukocyte concentrations were not significantly changed by the incinerator groundwater effluent after 14 days of exposure time (Table 2). Exposure to Mercier groundwater showed two different immune responses: immune suppression for wells at 1.17 and 5.40 km and immune stimulation for well at 2.74 km. In fish exposed to groundwater at 1.17 km, a significant reduction in both immunoactivity (> 1 bead) and immunoefficiency (> 3 beads) was found at concentrations of 3.1% and 25%, respectively. In fish exposed to groundwater at 2.74 km, a significant increase in immunoactivity and efficiency was observed at 12.5% concentration. In fish exposed to the groundwater at 5.40 km (Fig. 2), phagocytosis was suppressed at concentrations of 12.5% and 25%

2.2 Lymphocyte proliferation

There was no apparent response in lymphocyte proliferation of total lymphocytes in fish exposed to well water at 1.17 km. However, exposure to the water at 2.74 km led to a significant reduction in proliferation of PHA-stimulated lymphocytes at 12.5% concentration. Both lymphocyte B

Table 1 Chemical composition of Mercier

Compound	Distance wells			Detection limit	Criteria groundwater ($\mu\text{g/L}$)
	1.2 km	27 km	5.4 km		
Vinyl chloride ($\mu\text{g/L}$)	< 0.10	4.00	< 0.10	0.10	2.40 (US EPA, 2006)
Trans-1,2-Dichloroethylene ($\mu\text{g/L}$)	< 0.08	2.00	< 0.08	0.08	50 (WHO, 2008)
1,1-Dichloroethane ($\mu\text{g/L}$)	< 0.10	0.40	< 0.10	0.10	1500 (MDEQ, 2008)
Cis-1,2-Dichloroethene ($\mu\text{g/L}$)	< 0.05	0.37	< 0.05	0.05	50 (WHO, 2008)
1,2-Dichloroethane ($\mu\text{g/L}$)	< 0.10	2.00	< 0.10	0.10	55 (WHO, 2008)
Benzene ($\mu\text{g/L}$)	< 0.05	0.29	< 0.05	0.05	2.20 (US EPA, 2006)

Values of measurements during sampling in may 2010.

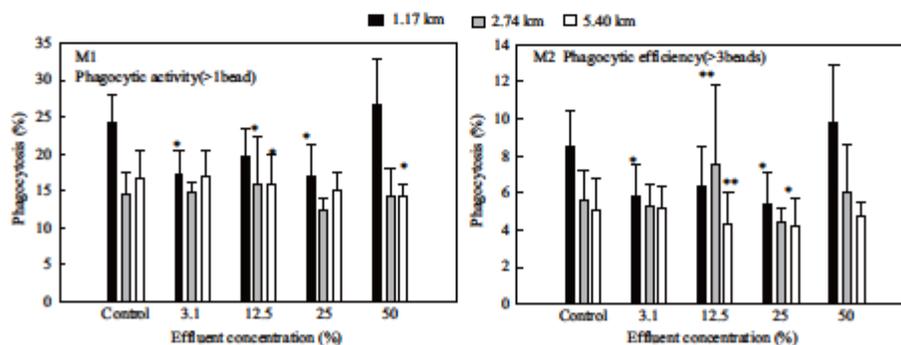


Fig. 2 Phagocytosis results for Rainbow Trout exposed to different concentrations of Mercier groundwater (at 1.17, 2.74 and 5.40 km) for 14 days (M1: phagocytic activity, M2: phagocytic efficiency). Asterisks indicate significant difference from controls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

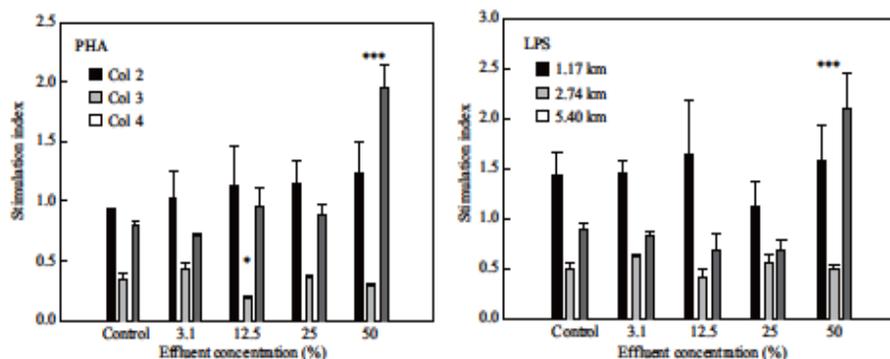


Fig. 3 Lymphocyte proliferation stimulated with PHA (T lymphocytes) and with LPS (B lymphocytes) in Rainbow Trout exposed for 14 days to Mercier groundwater (at 1.17, 2.74 and 5.40 km). Asterisks indicate significant difference from controls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Table 2 Measurement of leukocyte concentration (cellularity), weights and lengths in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) after 14 days of exposure to different concentrations of Mercier groundwater (3.1%, 12.5%, 25% and 50%) and controls

Distance*	Measures	Control	3.10%	12.50%	25%	50%
1.17 km	Leukocytes conc. ($\times 10^6$ cells/mL)	17 \pm 4	18 \pm 4	25 \pm 9	17 \pm 3	12 \pm 6
	Weight (g)	31 \pm 8	33 \pm 4	33 \pm 6	37 \pm 7	31 \pm 6
	Length (g)	13 \pm 1	14 \pm 1	13 \pm 1	14 \pm 1	13 \pm 1
2.74 km	Leukocytes conc. ($\times 10^6$ cells/mL)	25 \pm 7	24 \pm 5	26 \pm 5	24 \pm 6	21 \pm 4
	Weight (g)	32 \pm 9	31 \pm 6	32 \pm 7	34 \pm 5	33 \pm 8
	Length (g)	14 \pm 1	13 \pm 1	13 \pm 1	13 \pm 1	13 \pm 1
5.40 km	Leukocytes conc. ($\times 10^6$ cells/mL)	16 \pm 7	11 \pm 3	12 \pm 3	14 \pm 3	12 \pm 4
	Weight (g)	38 \pm 7	33 \pm 3	41 \pm 8	32 \pm 4	34 \pm 6
	Length (g)	14 \pm 1	14 \pm 0	15 \pm 1	13 \pm 1	14 \pm 1

Values presented as mean \pm standard error.

* Distance between the wells and the contaminated site.

and T proliferation were significantly enhanced at 50% water concentration after 14 days of exposure at 5.40 km (Fig. 3).

2.3 Cell cycle

Fish exposed to Mercier groundwater at 1.17, 2.74 and 5.40 km displayed significant disturbance in cell cycle compared to controls (Fig. 4). Indeed, a significant decrease in the number of cells in the G0/G1 phase was observed at 1.17, 2.74 and 5.40 km. This was accompanied by a significant increase in the proportion of cells undergoing DNA synthesis (S-phase) at 50% concentration of effluent at 2.74 km and at 3.1%, 25% and 50% concentration of effluent at 5.40 km.

2.4 Apoptosis

The proportion of apoptotic leucocytes was also determined in fish exposed to the groundwater samples (Table 3). After 14 days, there was no significant effect in groups at 1.17 and 5.40 km. However, the percentage of apoptotic lymphocytes significantly dropped at 3.1%

concentration for groundwater at 2.74 km. In the attempt to determine the susceptibility of lymphocytes to undergo apoptosis, we treated lymphocytes to a known inducer of apoptosis (dexamethasone or DEX). The level of the response to DEX induction appears higher in lymphocytes than in macrophages. The correlation analysis revealed that apoptosis was correlated with cell cycle, phagocytosis and lymphocyte proliferation (Table 4). Negative correlation between apoptosis and phagocytosis ($r = -0.83$, $p < 0.05$) was observed. On other hand, the correlation between proportion of apoptotic macrophages and the proportion of cell cycle in phase G2/M in groups at 1.17 km was significantly positive ($r = 0.90$, $p < 0.05$) indicating that the correlation between the proportion of apoptotic lymphocytes and the proportion of cell cycle in phase G2/M in groups at 2.74 km was significantly negative ($r = -0.92$, $p < 0.05$). Moreover, a negative correlation was found between apoptosis of lymphocytes and both T and B lymphocyte-induced proliferation in groups at 5.40 km ($r = -0.92$, $p < 0.05$ and $r = -0.94$, $p < 0.05$) respectively.

To describe the overall effects of exposure to contaminated groundwater on the immune system, cell cycle and

Table 3 Apoptosis in lymphocytes and macrophages of Rainbow Trout exposed for 14 days to Mercier groundwater

Distance	Parameters (%)	Control	3.10%	12.50%	25%	50%
1.17 km	Lymphocytes apoptosis	2.6 ± 0.3	3.0 ± 0.5	2.2 ± 0.2	2.1 ± 0.6	2.3 ± 0.8
	Macrophages apoptosis	1.5 ± 0.1	2.4 ± 1.1	1.8 ± 1.2	1.4 ± 0.5	0.8 ± 0.5
	Induced apoptosis of lymphocytes	8.0 ± 2.6	17.7 ± 4.0***	13.3 ± 3.6	8.9 ± 3.3	9.9 ± 1.4
	Induced apoptosis of macrophages	3.0 ± 1.9	5.4 ± 2.2**	3.5 ± 1.3	3.3 ± 1.5	2.1 ± 1.3
2.74 km	Lymphocytes apoptosis	3.0 ± 0.7	1.6 ± 0.7**	1.5 ± 0.4**	2.7 ± 1.0	1.9 ± 0.8**
	Macrophages apoptosis	2.5 ± 0.9	3.4 ± 3.2	11.6 ± 3.4*	15.5 ± 7.3	7.8 ± 5.9
	Induced apoptosis of lymphocytes	11.3 ± 3.2	13.9 ± 2.3	11.6 ± 3.7	20.1 ± 7.4**	10.8 ± 4.8
	Induced apoptosis of macrophages	1.9 ± 1.0	3.4 ± 2.1	2.7 ± 1.1	2.6 ± 1.1	1.7 ± 0.7
5.40 km	Lymphocytes apoptosis	6.4 ± 2.7	6.4 ± 2.2	6.2 ± 0.7	6.9 ± 4.3	4.9 ± 0.4
	Macrophages apoptosis	8.0 ± 5.8	5.9 ± 1.4	5.0 ± 1.5	6.0 ± 2.5	4.2 ± 1.2
	Induced apoptosis of lymphocytes	6.4 ± 1.6	9.1 ± 4.0***	7.8 ± 1.4	7.4 ± 2.0	4.8 ± 1.0
	Induced apoptosis of macrophages	2.8 ± 1.4	2.4 ± 0.5	2.0 ± 0.4	2.5 ± 0.7	1.9 ± 0.6

Data are expressed as the percentage of apoptotic cells. Asterisks indicate significant difference from controls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Table 4 Correlation between biomarkers in Rainbow Trout exposed for 14 days to Mercier groundwater

	Weight	Length	M1	M2	PHA	LPS	Apoptosis	G0/G1	S	G2/M
Weight			(-)0.94 A	(-)0.93 A				(-)0.95 A	0.94 A	
Length								(-)0.94 A	0.95 A	
M1							(-)0.83 A			
M2										
PHA							(-)0.92 C			
LPS							(-)0.94 C			
Apoptosis								0.89 B		0.90 A
										(-)0.92 B

A (1.17 km); B(2.74 km); C (5.40 km).

Only significant correlations are shown (* $p < 0.05$).

apoptosis in Rainbow Trout, factorial and discriminant function analyses were performed (Fig. 6). The factorial analysis revealed that 78% of the total variance was explained by the following parameters, which exhibited high factorial weights (> 0.7): apoptosis, lymphocyte proliferation and cell cycle (Fig. 6a). LPS-induced proliferation, G2/M and apoptosis were clustered together, suggesting that these biomarkers were closely associated (Fig. 6a). A discriminant function analysis of the immune responses, cell cycle and apoptosis revealed that all three wells and the controls were correctly classified, at 78%, 92%, 73% and 100% correctness, respectively (Fig. 6b). The well at 2.74 km differed most from the control and the other wells. The sites at 1.17 km and 5.40 km were closer in behavior to the control, and hence less toxic. Phagocytic activity (P1), phagocytic efficiency (P2), and PHA and LPS-induced proliferation were the main biomarkers that discriminated the sites. Table 5 shows the fold change values of various biomarkers measured in the study and summarizes the characteristics of different aspects of the contaminants present in Mercier groundwater with respect to their immunotoxic and neoplasia risks

3 Discussion

In this study, we investigated the immunotoxic effects of groundwater at increasing distance from an industrial dumping site (Mercier incinerator) in rainbow trout. A discriminant function analysis used to classify and determine the similarities or differences between study sites revealed that the sites farthest away from (5.40 km) and closest to (1.17 km) the lagoons were closer in behavior to the controls. This suggests that these water samples were less immunotoxic towards fish, and this is corroborated by the contaminant levels in groundwater (Table 1). Measured concentrations of volatile organic compounds (e.g., benzene, dichloroethane and vinyl chloride) were above the detection limit in groundwater at 2.74 km (Table 1). However, their effects on aquatic organisms are less reported. Based on the chemical contamination data, it appears then that the culprit contaminants are other than those measured in this study or that they perhaps act in a cumulative manner as a mixture.

Various chemicals from the environment can disrupt immune system function through multiple mechanisms

Table 5 Summary table to characterize the different aspects of the immunotoxic risk of contaminants

Distance	Phagocytosis M1 M2	Lymphocyte T	Lymphocyte B	G0/G1 S Arrest Yes or no	Apoptosis Normal DEX-induced	Immunotoxic Risk
1.17 km	(-) 0.71 (-) 0.68	–	–	(-) 0.87	– 2.2	Non specific immunosuppression
2.74 km	1.13 1.33	(-) 0.54	–	(-) 0.91 2.42 yes	(-) 0.63 1.76	Non specific immunosuppression Specific immunosuppression Neoplasia risk
5.40 km	(-) 0.94	2.45	2.35	(-) 0.85	–	Non specific immunosuppression

Values indicated fold change calculated by dividing the data from the experimental group by the data from the control group. "–" indicates no significant response.

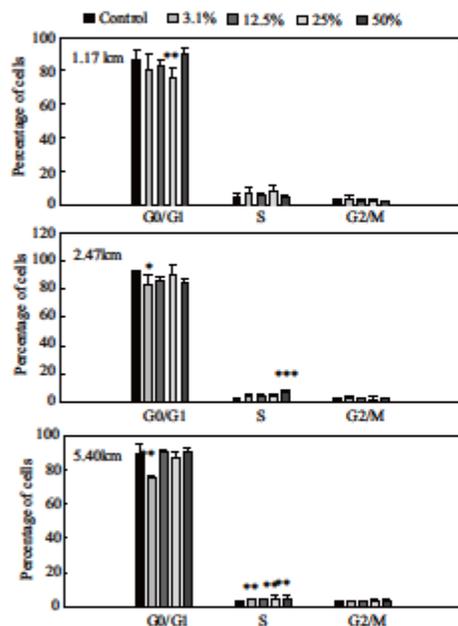


Fig. 4 Effects of the exposure to Mercier groundwater (at 1.17, 2.74 and 5.40 km) on the cell cycle of leucocytes in Rainbow Trout (14 days). Asterisks indicate significant difference from controls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

(Ren et al., 2013). Groundwater samples at 2.74 km caused an induction in macrophage phagocytosis activity. Conversely, a decrease in phagocytosis activity and efficiency was observed at 1.17 and 5.40 km. According to the literature, phagocytosis activity can be enhanced or depressed under chemical exposure. The stimulation in phagocytosis observed may result in the loss of regulation in the immune system and can lead to adverse outcomes including cancer, while chemical-induced immune suppression can lead to

increased susceptibility to infectious diseases (Descotes et al., 2004). A previous analysis of groundwater has also shown the presence of not only VOCs but also PAHs and PCBs as well (BAPE, 1994). Those compounds can generate various types of immunotoxic effects (i.e., immunosuppression and stimulation) depending on the dose (Lacroix et al., 2001; Veraldi et al., 2006; Bado-Nilles et al., 2011; Danion et al., 2011).

Our results demonstrate a different proliferative response in trout after exposure to Mercier groundwater. Data showed that the proliferative responses of T lymphocytes, but not of B lymphocytes, were significantly reduced at 2.74 km. This suggests that T cells (PHA-induced) were more sensitive to humoral response than B cells (LPS-induced), and hence antibody production would be more affected. Proliferation responses of both T and B lymphocytes at 5.40 km were increased by 2.45 times relative to the control. This may be related to compensatory proliferation induced in response to cell loss observed in apoptosis which was induced in that event.

It is known that alterations in the cell cycle provide an early warning signal of cytotoxicity (Peng et al., 2012). Contaminants can suppress the proliferation of cells as a consequence of arresting cell cycle division. In this study, the results indicated disruption of the normal cell cycle of lymphocytes upon exposure to groundwater near the Mercier incinerator at all three distances 1.17, 2.74 and 5.40 km. In fact, the distribution of exposed cells between G0/G1 and S phase was significantly altered compared to the control; the percentage of cells in G0/G1 significantly decreased in all groups as compared to the controls, indicating a decreased proportion of cells entering division. However, we found S-phase arrest induced by high concentration (50%) in the group at 2.74 km. The cells could be arrested in S phase to repair DNA damage before mitosis occurs (Binkova et al., 2000). The data on the cell cycle supports the hypothesis that it is probably a disturbance in the various signals that regulate cell cycle transition, such as transcription of many genes involved in DNA replication that is responsible for the

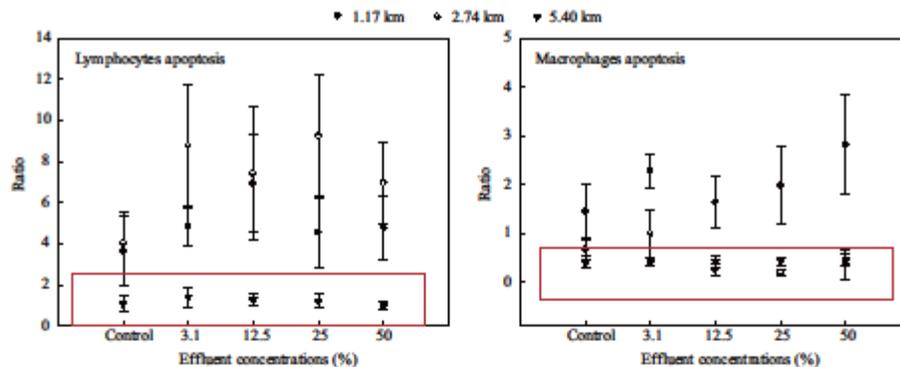


Fig. 5 Ratio of apoptosis-induced versus apoptosis-not-induced in rainbow trout exposed to Mercier groundwater (14 days).

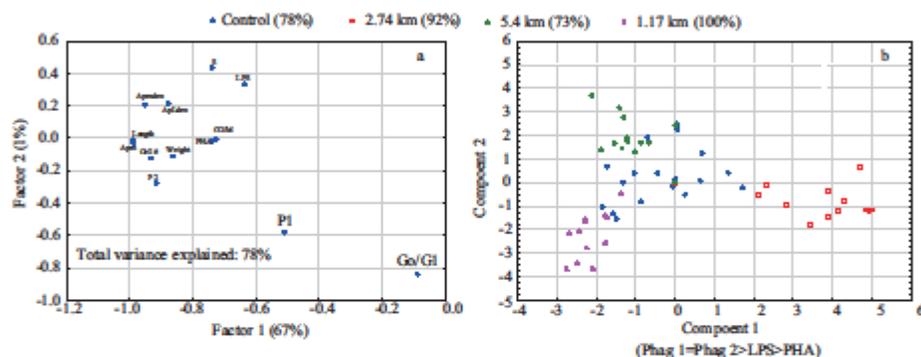


Fig. 6 Results for factorial (a) and discriminant function analyses (b). Weight, length, phagocytic activity (Phag 1), phagocytic efficiency (Phag 2), PHA-induced proliferation (PHA), LPS-induced proliferation (LPS), cellularity (Cell), cell cycle phases (G0/G1, S, G2/M), apoptosis induced of macrophages and lymphocytes (Apm, Apl) and apoptosis no induction of macrophages and lymphocytes (Apm, Apl).

effects observed.

Programmed cell death, or apoptosis, is a controlled process used to eliminate damaged cells in vertebrates and invertebrates (Kiss, 2010; Franco et al., 2009). Nevertheless, immunosuppressive pollutants can disrupt the natural balance of leucocytes (Rajaram et al., 1995; McConkey et al., 1988); conversely, the inhibition of apoptosis can lead to several diseases (Banerjee et al., 2012). In this study, apoptosis was decreased at the 2.74 km site with a concomitant decrease in lymphocyte proliferation. This suggests that damaged cells are removed from the system by apoptosis less often and that acquired and humoral aspects of the immune system in fish are compromised. In contrast, apoptosis was not inhibited in macrophages at 2.74 km, indicating that the turnover of cells responsible for phagocytosis was unchanged. Reduced apoptosis has been largely linked to the occurrence of cancer, where an excessive proliferation or failure of cell death was a hallmark of cancer (Manna et al., 2011) and apoptosis fol-

lows when DNA damage is too important for cell survival (Osman et al., 2012; Armstrong et al., 2011; Marabini et al., 2011; Nigro et al., 2002). Moreover, the low ratio of DEX-induced apoptosis/apoptosis observed in (Fig. 5) suggests that some chemicals could increase the resistance of lymphocytes or macrophages to apoptosis. Constant proliferation with less apoptosis could contribute to cancer development. These observations indicate that apoptosis may be used as a sensitive and promising biomarker for the detection of sublethal effects of chemicals in the aquatic environment.

4 Conclusions

This study provides some insight into the immunotoxic effect on rainbow trout of groundwater contaminated by incineration waste from industrial activities. The data sug-

gest that chemicals were able to account for the observed effects. A number of effects were observed, including a modulation of phagocytic activity and an alteration of lymphocyte proliferation. Additionally, this study suggests that these contaminants affect the cellular cycle of leukocytes and apoptosis of macrophages and lymphocytes.

4.1 Acknowledgments

This work was supported by the Canada Research Chair in Environmental Immunotoxicology (Dr. M. Fournier). The authors wish to acknowledge Julien Paquette and Michel Paquin of Quebec's Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs for their invaluable help in water sampling. The authors thank Marlene Fortier for her technical assistance. Many thanks to Hayet Belmeskine, Meriem Birane and Audrey Bruneau from INRS-IAF and to Chantale André of Environment Canada for their assistance in fish dissection and cell counts. Gratitude is also extended to Dr. Sylvie Roberge of the Quebec Laboratory for Environmental Testing for the nitrate and nitrite measurements. We also thank Keltie Purcell for editing the English manuscript, Environment Canada.

REFERENCES

- Arkoosh, M.R., Cassilas, E., Clemons E., Kagley, A.N., Olson, R., Reno, P. et al., 1998. Effect of pollution on fish disease: potential impacts on Salmonid populations. *J. Aquat. Anim. Health* 10(2), 182–190.
- Armstrong, C.M., Allred K.F., Allred C.D., 2011. Dietary fish oil reduces DNA adduct formation while estradiol upregulates apoptosis in response to DNA damage in the rat colon. *Dig. Dis. Sci.*, 56(9), 2585–2594.
- Aziz, K., Nowshheen, S., Pantelias, G., Iliakis, G., Gorgoulis, V.G., Georgakilas, A.G., 2012. Targeting DNA damage and repair: Embracing the pharmacological era for successful cancer therapy. *Pharmacol. Therapeut.* 133(3), 334–350.
- Bado-Nilles, A., Quentel, C., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J.L., Auffret, M., Thomas-Guyon H., 2011. In vivo effects of the soluble fraction of light cycle oil on immune functions in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linn). *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 74(7), 1896–1904.
- Banerjee, C., Goswami, R., Verma, G., Datta, M., Mazumder, S., 2012. *Aeromonas hydrophila* induced head kidney macrophage apoptosis in *Clarias farrachius* involves the activation of calpain and is caspase-3 mediated. *Develop. Comparat. Immunol.* 37(3–4), 323–333.
- BAPE, 1994. Office of public hearings on the environment of Quebec (BAPE). Restoration of contaminated Mercier site. Montreal. pp 222.
- Binkova, B., Giguère, Y., Rissner, J., Dostál, M., Srám, R.J., 2000. The effect of dibenzo[a,h]pyrene and benzo[a]pyrene on human diploid lung fibroblasts: The induction of DNA adducts, expression of p53 and p21(WAF1) proteins and cell cycle distribution. *Mutat. Res.-Genetic Toxicol. Environ. Mutag.* 471(1–2), 57–70.
- Brousseau, P., Puyette, Y., Blakley, B., Boermans, H., Flipo, D., Tryphonas, H. et al., 1998. *Manual of Immunological Methods*. CRC Press, Boston.
- Canesi, L., Lorusso, L.C., Ciacci, C., Betti, M., Regoli, E., Poiana, G., et al., 2007. Effects of blood lipid lowering pharmaceuticals (bezafibrate and gemfibrozil) on immune and digestive gland functions of the bivalve mollusc, *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* 69(6), 994–1002.
- Danion, M., Le Floch, S., Kanan, R., Lamour, F., Quentel, C., 2011. Effects of in vivo chronic hydrocarbons pollution on sanitary status and immune system in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquatic Toxicol.* 105(3–4), 300–311.
- Descotes, J., 2004. Chapter 13 Chemical immunotoxicology and developmental immunotoxicology. In: *Immunotoxicology of Drugs and Chemicals: an Experimental and Clinical Approach*. Elsevier. pp. 327–354.
- Follezou, J.Y., Emerit, J., Bricaire, F., 1999. Neuro-degenerative diseases: role of reactive oxygen species and of apoptosis. *Presse. Med.* 28(30), 1661–1666.
- Fournier, M., Dougas, V., Colborn, T., Omara, F.O., Denizeau, F., Potworowski, E.F. et al., 2000. Immunosuppression in mice fed on diets containing beluga whale blubber from the St Lawrence Estuary and the Arctic populations. *Toxicol. Lett.* 112–113, 311–317.
- Franco, R., Sanchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E.M., Panayiotidis, M.I., 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. *Mutation Res./Genetic Toxicol. Environ. Mutag.* 674(1–2), 3–22.
- Giri, A.K., 1995. Genetic toxicology of vinyl chloride—A review. *Mutat. Res.-Rev. Genetic Toxicol.* 339(1), 1–14.
- Goulinopoulos, S.K., Lekkas, T.D., Nikolau, A.D., 2001. Comparison of methods for determination of volatile organic compounds in drinking water. *Chemosphere* 45(3), 275–284.
- Hannam M.L., Bamber S.D., Sanch R.C., Galloway T.S., 2009. Immune modulation in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to North Sea produced water. *Environ. Poll.* 157(6), 1939–1944.
- Igney, F.H., Krammu, P.H., 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 2(4), 277–288.
- Kiss, T., 2010. Apoptosis and its functional significance in molluscs. *Apoptosis* 15(3), 313–321.
- Lacroix, A., Fournier, M., Lebeuf, M., Nagler, J.J., Cyr, D.G., 2001. Phagocytic response of macrophages from the pronephros of American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) exposed to contaminated sediments from Baie des Anglais, Quebec. *Chemosphere* 45(4–5), 599–607.
- Manna, S., Das, S., Chatterjee, M., Janarthan, M., 2011. Combined supplementation of vanadium and fish oil suppresses tumor growth, cell proliferation and induces apoptosis in DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. *J. Cell. Biochem.* 112(9), 2327–2339.
- Marabini, L., Calo, R., Fucile, S., 2011. Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153, 138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2). *Toxicol. Vitro* 25(5), 1045–1052.
- McConkey, D.J., Hartzell, P., Nicotera, P., Wyllie, A.H., Orrenius, S., 1988. Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicol. Lett.* 42(2), 123–130.
- Mori, C., Morsey, B., Levin, M., Nambiar, P.R., De guise, S., 2006. Immunomodulatory effects of in vitro exposure to organochlorines on T-cell proliferation in marine mammals and mice. *J. Toxicol. Environ. Health-Part A* 69(4), 283–302.

- Mundt, K.A., Dell, L.D., Austin, R.P., Luippold, R.S., Noess, R., Bigelow, C., 2000. Historical cohort study of 10 109 men in the North American vinyl chloride industry, 1942-72: Update of cancer mortality to 31 December 1995. *Occupat. Environ. Med.* 57(11), 774-781.
- Naga Amsha, P., 2011. Risk factors in hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Sci. Therapy* 3, S17-009.
- Nigro, M., Frenzilli, G., Scarzelli, V., Gorbi, S., Regoli, F., 2002. Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. *Mar. Environ. Res.* 54(3-5), 517-520.
- Osman, A.G.M., Abuel-Fadl, K.Y., Kloas, W., 2012. In situ evaluation of the genotoxic potential of the river Nile: II. Detection of DNA strand-breakage and apoptosis in *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Muta.Res.-Genetic Toxicol. Environ. Mutag.* 747(1), 14-21.
- Peng, D., Jiaxing, W., Chunhui, H., Weiyi, P., Xiaomin, W., 2012. Study on the cytogenetic changes induced by benzene and hydroquinone in human lymphocytes. *Human Exper. Toxicol.* 31(4), 322-335.
- Pohl, H.R., Scinicariello, F., 2011. The impact of CYP2E1 genetic variability on risk assessment of VOC mixtures. *Regulat. Toxicol. Pharmacol.* 59(3), 364-374.
- Poulin, M., Simard, G., Sylvestre, M., 1985. Groundwater pollution by organic compounds at Mercier, Quebec. *Hydrogeology* 2, 125-131.
- Ren, R., Sun, D.J., Yan, H., Wu, Y.P., Zhang, Y., 2013. Oral Exposure to the Herbicide Simazine Induces Mouse Spleen Immunotoxicity and Immune Cell Apoptosis. *Toxicol. Pathol.* 41(1), 63-72.
- Rice, C.D., Kergosien, D.H., Adams, S.M., 1996. Innate immune function as a bioindicator of pollution stress in fish. *Ecotox. Environ. Safe.* 33(2), 186-192.
- Roldan-Arjona, T., Garcia-Pedrajas, M.D., Luque-Romero, F.L., Hera, C., Pueyo, C., 1991. An association between mutagenicity of the Ara test of *Salmonella typhimurium* and carcinogenicity in rodents for 16 halogenated aliphatic hydrocarbons. *Mutagenesis* 6(3), 199-205.
- Song, J.Y., Nakayama, K., Murakami, Y., Kitamura, S.I., 2011. Heavy oil exposure induces high mortalities in virus carrier Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Mar. Poll. Bull.* 63(5-12), 362-365.
- US EPA, 2000. Vinyl chloride (CASRN 75-01-4). United States Environmental Protection Agency Integrated Risk Information System. US EPA. 1,2-Dichloroethane Carcinogenicity Assessment (CASRN 107-06-2), 11-1991.
- Veraldi, A., Costantini, A.S., Bolejack, V., Miligi, L., Vineis, P., Van Loveren, H., 2006. Immunotoxic effects of chemicals: A matrix for occupational and environmental epidemiological studies. *Amer. J. Indust. Med.* 49(12), 1046-1055.
- Wong, R.H., Wang, J.D., Hsieh, L.L., Du, C.L., Cheng, T.J., 1998. Effects on sister chromatid exchange frequency of aldehyde dehydrogenase 2 genotype and smoking in vinyl chloride workers. *Mutat. Res.* 420(1-3), 99-107.
- WHO IARC, 2008. Agents reviewed by the IARC monographs. World Health Organization International Agency for Research on Cancer.
- Zeeman, M.G., Brindley, W.A., 1981. Effects of toxic agents upon fish immune systems. In: Sharma, R.P., (Ed.), *Immunologic Considerations in Toxicology* 2. CRC Press, Boca Raton FL, pp. 1-60.
- Zelikoff, J.T., Carlson, E., Li, Y., Raymond, A., Duffy, J., 2002. Immunotoxicity biomarkers in fish: Development, validation and application for field studies and risk assessment. *Hum. Ecotoxicol. Risk Assess.* 8(2), 253-263.

3.3. Étude des biomarqueurs chez la truite exposée aux eaux souterraines contaminées

Article 3: Biomarkers study of in rainbow trout exposed to industrially contaminated groundwater

Auteurs

Nadjet Benchalgo, François Gagné, Michel Fournier

Publié dans Journal of Xenobiotics.

Contribution personnelle

Mon rôle a consisté à faire l'échantillonnage, à planifier les expériences, à faire les analyses et l'interprétation des résultats et à rédiger l'article à titre d'auteur principal.

Contribution des coauteurs

Dr Michel Fournier, mon directeur de recherche et Dr François Gagné co-directeur ont participé à la planification des expériences, à l'analyse des résultats ainsi qu'à la correction du manuscrit.

RÉSUMÉ

Le déversement de déchets liquides des industries chimiques et pétrochimiques dans les lagunes de Mercier situées à 20 km au sud de Montréal, au Québec, a provoqué une importante contamination des eaux souterraines par les polluants industriels. Le but de cette étude était d'étudier les effets toxiques d'une exposition de 4 et 14 jours aux eaux de trois puits situés à des distances croissantes 1,2; 2,7 et 5,4 km de la source de la contamination. Plusieurs biomarqueurs ont été mesurés chez Les truites tels que les biomarqueurs de la détoxification (éthoxyrésorufine *O*-dééthylase (EROD) et l'activité du glutathion *S*-transférase) et ceux des lésions tissulaires (peroxydation lipidique (LOP) et les cassures de brins d'ADN). Les résultats ont montré que l'activité ERO a été significativement induite dans le tissu hépatique à 1,2 et 5,4 km, tandis qu'elle était inhibée à 2,7 km. Par ailleurs, l'activité GST a été augmentée de façon significative chez les poissons exposés aux eaux de puits à 2,7 km (3.1%). Toutefois, la peroxydation lipidique n'a pas été affectée chez tous les groupes. Une induction significative du dommage à l'ADN a été observée chez les poissons exposés aux eaux des trois puits. En conclusion, les données suggèrent que la libération des contaminants des lagunes dans les eaux souterraines entraîne une augmentation dans la biotransformation des hydrocarbures aromatiques coplanaires et des dommages à l'ADN.

Biomarkers study in rainbow trout exposed to industrially contaminated groundwater

Nadjet Benchalgo,¹ François Gagné,² Michel Fournier¹

¹INRS-Institut Armand-Frappier, Laval;

²Emerging Methods, Aquatic Contaminant Research Division, Environment Canada, Montréal, Quebec, Canada

Abstract

The spill of liquid industrial waste from chemical and petrochemical industries in Mercier lagoons located 20 km south of Montreal, Quebec, caused a major groundwater contamination by industrial contaminants. The aim of this study was to investigate the toxic effects of Mercier groundwater, following 4 and 14 days of exposure to graded concentrations from three wells at increasing distances 1.2, 2.7 and 5.4 km from the source of contamination. Rainbow trout were examined for several biomarkers of defense [ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) and glutathione *S*-transferase (GST) activities] and those of tissue damage [lipid peroxidation (LPO) and DNA strand breaks]. The results showed that EROD activity was significantly enhanced in hepatic tissue at 1.2 and 5.4 km, whereas inhibition in activity was observed in group at 2.7 km. Therefore, GST activity was significantly increased at 3.19% concentration for the 2.7 km well. No change in LPO was observed. However, a significant induction of DNA strand breaks in liver was obtained at each distance. In conclusion, the data suggest that the release of these contaminants in groundwater leads to increased biotransformation for coplanar aromatic hydrocarbons and DNA damage in groundwater.

Introduction

The dumping of 40,000 to 170,000 m³ of industrial hydrocarbon waste in an abandoned gravel pit (Mercier, Quebec, Canada) caused severe water supply problems in the region.¹ The main industrial waste consisted of used oil from chemical and petrochemical industries.² In the gravel pit lagoon, the contaminants permeate through soil down to the groundwater. Among the organic compounds found, volatiles organic compounds (VOCs) (Table 1) such as vinyl chloride (chloroethene), trans 1,2-dichloroethylene, 1,1-dichloroethane, 1,2-dichloroethane, cis

1,2-dichloroethene, benzene, chlorobenzene, *m*-*p*-xylènes, chloroethane, 1,3-dichloropropane and phenol.^{1,3} Their physicochemical properties and hydrogeological conditions of the site are responsible of the complexity of contamination problem.⁴ Even if the lagoons are the main source of contamination, the industrial waste incinerator may be considered as well.

Organic industrial wastes containing VOCs, polyaromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and metals are usually found at hazardous waste sites.⁵ They are known to produce a variety of adverse effects in organism including, immunotoxicity,^{6,7} genotoxicity⁸⁻¹⁰ and carcinogenesis.^{11,12} Those contaminants are able to induce the biotransformation enzyme cytochrome P450 and glutathione *S*-transferase in fish^{13,14} and induce lipid peroxidation (LPO) and DNA strand breaks in exposed animals.^{3,17,18}

Although chemical analysis could find some of chemicals in these complex mixtures, it remains difficult to determine the cumulative effects in exposed organisms. The measurement of biomarkers represent a mean to determine the toxicological outcome of exposure to complex industrial contaminants mixture^{19,20} and give early warning signals about environmental threats of contaminants.²¹ Indeed, exposure to PAHs leads to the induction of cytochrome P4501A1 responsible for ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in fish liver and kidney.^{22,24} Gwinn *et al.*⁹ showed that certain volatile organic compounds (e.g. vinyl chloride, dichloroethane) are metabolized via oxidation mediated by CYP 450 system to form electrophilic metabolites which may be detoxified by glutathione *S*-transferase (GSTs).

Glutathione *S*-transferase is an important phase II enzyme that catalyses the conjugation of electrophilic compounds to GSH.²⁵ GST reacts with a wide spectrum of environmental pollutants.^{26,27} It has been reported that the enzyme GST react differently to a variety of compounds.¹⁴ These same authors, reported that GST was inhibited by benzene, whereas its activity was enhanced in animals exposed to 2,4-dichlorophenol.²⁸ Since this reaction consumes reduced glutathione, sustained or increased activity could lead to oxidative stress in cells.

The measurement of LPO levels in animal tissues has been recognized as biomarkers of oxidative damage towards unsaturated phospholipids.^{14,20} LPO is reported to cause loss of cell function under oxidative stress.²⁹ Genotoxicity was determined by evaluating DNA strand breaks and has been proposed as effective biomarkers in assessing the impact of contaminants released into the aquatic environment.²⁴ Sasaki *et al.*²⁴ showed hepatic DNA damage in rodents exposed to 1,2-

Correspondence: Nadjet Benchalgo, Institut National de la recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7.
Tel. +1.514.725.8394.
E-mail: benchalgo@ yahoo.fr

Key words: groundwater, ethoxyresorufin *O*-deethylase, glutathione *S*-transferase activity, lipid peroxidation, DNA strand breaks, rainbow trout.

Acknowledgments: this study was supported by the Canada Research Chair in Environmental Immunotoxicology (Dr M. Fournier) and Aquatic Contaminant Research Division, Environment Canada (Dr F. Gagné). The authors are thankful to Mr Julien Paquette and Michel Paquin from Ministry of Sustainable Development, Environment and Parks (Quebec) for their precious help in water sampling.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Received for publication: 28 October 2013.

Revision received: 13 December 2013.

Accepted for publication: 16 January 2014.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution NonCommercial 3.0 License (CC BY-NC 3.0).

©Copyright N. Benchalgo *et al.*, 2014
Licensee PAGEPress, Italy
Journal of Xenobiotics 2014; 4:1991
doi:10.4081/xeno.2014.1991

dichloroethane (EDC). Exposure to benzene leads to single strand breaks in erythrocytes in rodents.¹⁴ However, the toxicity of EDC has yet to be examined in fish. In this context, the present study was carried out to investigate biomarkers enzyme effects of Mercier groundwater exposure on rainbow trout. A set of biomarkers of defense and tissue damage were measured in the liver of trout exposed to groundwater at various distances from the landfill.

Materials and methods

Fish

Juvenile rainbow trout (*O. mykiss*) (total N=216), weighing 23.14±9.3 g, were obtained from a local fish farm *Les Arpents Verts* (Sainte-Edwidge-de-Clifton, Quebec, Canada). They were kept for a minimum of 2 weeks in 300-L tanks at 15°C under a photoperiod of 12 h light 12 h dark and constant aeration. They were fed daily at a rate of 2% body weight with food pellets.

Groundwater exposure experiments

The groundwater samples were collected in the summer of may 2010 from three wells at 1.2, 2.7 and 5.4 km from Mercier lagoons (Figure 1). These samples were then stored at 4°C in the dark until exposure. In six plastic vessels (31 cm diameter × 44 cm height, 20 L capacity) filled with 15 L of water sample using polyethylene plastic bags, six groups of 12 juvenile rainbow trout were exposed to increasing concentrations of groundwater (3.1% and 50%) for 4 days and 14 days at 15°C. The control group and the dilution water consisted of UV- and charcoal-treated tap water from the City of Montréal (Quebec, Canada). The exposure experiments were repeated twice and the water was changed twice a week. The fish were fed 3 times weekly with commercial fish pellets and the extra food was removed after 10 min. The feeding was stopped 24 h before the end of the exposure. Water chemistry (e.g., temperature, pH, oxygen, conductivity, nitrate-nitrite and ammonia) according to standard methods of the *Centre d'Expertise en Analyse Environnementale* of the province of Quebec² was within acceptable limits. The following

organic VOC parameters were determined: vinyl chloride, trans-1,2-dichloroethylene, 1,1-dichloroethane, 1,2-dichloroethane, cis-1,2-dichloroethane, benzene, and chlorobenzene (Table 2).^{32,34}

Biochemical analyses

Fish were humanely anaesthetized with tricaine methanesulfonate 0.1% (MS222) (Sigma-Aldrich, ON, Canada) after 4 days and 14 days (n=6), in accordance with the recommendations of the animal care committee and length and body weight measured. Condition factor (CF) for each fish was calculated according to the following equation (White and Fletcher, 1985):

$$CF = \text{body weight (g)} / \text{fork length}^3 \text{ (cm)} \times 100 \quad (1)$$

and the hepatosomatic index (HSI) was determined by the following:

$$\text{liver weight} / \text{body weight} \times 100 \quad (2)$$

Fish samples were conserved at -80°C until

biochemical analyses. Frozen livers were thawed and homogenized (20 s duration) using a Teflon pestle tissue grinder in an ice-cold homogenization buffer (10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4 containing 140 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol and 1 mg/mL aprotinin (a protease inhibitor). Aliquots of each homogenate were taken for LPO, DNA strand break determinations and protein concentrations. The remainder of the homogenate was centrifuged at 15,000 g for 20 min at 4°C. The supernatant (S15) was collected to measure 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity, GST activity and proteins. These biomarkers were normalized with both homogenate and S15 protein concentrations as determined by the method of Bradford³⁵ using standards of bovine serum albumin.

7-Ethoxyresorufin-O-deethylase

7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity was measured according to Gagné and Blaise³⁶ method. The reaction mixture contained 50 µL of S15 and 160 µL of 50 µM 7-ethoxyresorufin in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 and Tween 20. The reaction was started by the addition of 10 µL

Table 1. Samples of water collected in campaign 2010 from 15 wells in order to study the quality of Mercier groundwater. Analysis showed that approximately half of wells (7 wells) have concentrations of volatiles organic compounds higher than detection limit (the concentration values (µg/L)). Vinyl chloride concentrations within a well ranged up to 0.5 µg/L and a maximum concentration of 85 µg/L was recorded in one well. Analyses were provided by the *Centre d'Expertise en Analyse Environnementale* of the province of Quebec, and determined according to their standard methods (CAEQ, 2010)

Compounds	N° of Wells							DLM
	94-7R	7121	94-1S	94-5S	5M-81-B	94-6R	PW-09	
Chlorure de vinyl	85	-	85	0.7	0.5	4.0	0.5	0.1
Trans-1,2-Dichloroethylene	0.42	-	0.4	-	-	2.0	-	0.08
1,1-Dichloroethane	0.17	-	2.2	-	-	0.2	-	0.08
Cis-1,2-Dichloroethene	0.25	-	7.0	-	-	0.37	-	0.05
Benzene	0.15	-	-	-	0.08	0.29	-	0.05
1,2-Dichloroethane	0.1	-	-	-	0.5	0.41	-	0.1
m+p-Xylenes	-	0.21	-	-	-	-	-	0.14
Chloroethane	-	-	1.7	-	-	-	-	0.1
1,1-Dichloroethene	-	-	5.7	-	-	-	-	0.1
1,2-Dichloropropane	-	-	0.5	-	-	-	-	0.1
Chlorobenzene	-	-	0.56	-	-	-	-	0.05

Table 2. Summary of analytical results of groundwater sites at 1.2, 2.7 and 5.4 km sampled for 61 organic contaminants (data presented only compounds with concentration above limit detection).

Compounds (µg/L)	Distance wells (km)			Detection limit	Criteria groundwater (µg/L)
	1.2	2.7	5.4		
Vinyl chloride	-	4.00	-	0.10	2.40 ^m
Trans-1,2-Dichloroethylene	-	2.00	-	0.08	50 ^m
1,1-Dichloroethane	-	0.40	-	0.10	1500 ^m
Cis-1,2-Dichloroethene	-	0.37	-	0.05	50 ^m
1,2-Dichloroethane	-	2.00	-	0.10	55 ^m
Benzene	-	0.29	-	0.05	2.2 ^m

Values of measurements during sampling in may 2010. (-) No detected.

NADPH 1 mM. The mixture was incubated at room temperature for 30 and 60 min where fluorescence of resorufin was measured using 535 nm (excitation) and 635 nm (emission) filters. Calibration was achieved by comparing the rate of fluorescence change in the samples with fluorescence of resorufin standards. Enzyme activity (EROD) was expressed in nmol of resorufin/min/mg of proteins.

Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was measured according to the thiobarbituric acid method (Wills, 1987). A volume of 150 μ L of the homogenate were mixed with 300 μ L of 10% trichloroacetic acid solution containing 1 mM FeSO₄ and 150 μ L of 0.67% thiobarbituric acid. The mixture was allowed to stand in a water bath (70°C) for 10 min. Standards solutions were prepared with 0.001% of tetramethoxypropane for calibration. The thiobarbituric acid reactants (TBARS) were measured by fluorescence at 540 nm (excitation) and 590 nm (emission). Results were expressed in nmol of malonaldehyde equivalents per mg of proteins.

DNA strand breaks

DNA strand breaks were determined using the alkaline precipitation.²⁷ Briefly, 25 μ L of the homogenate was added to 200 μ L of SDS solution 2% containing 40 mM NaOH, 10 mM Tris base and 10 mM EDTA. An equal volume of 0.12 M KCl was added to the mixture which was allowed to stand in water bath 60°C for 10 min, and then cooled at 4°C for 30 min; to precipitate SDS associated nucleoproteins and genomic DNA. The mixture was then centrifuged at 8000 g for 5 min. DNA present in the supernatant were measured by mixing 50 μ L of the supernatant with 150 μ L of Hoechst dye at a concentration of 1 μ g/mL in 0.4M NaCl, 4 mM sodium cholate and 0.1 M tris-acetate pH 8.5. Fluorescence was then assessed using 360 nm (excitation) and 460 nm (emission) filters. DNA quantification was measured with standard solutions of Salmon sperm DNA. Results were expressed as μ g DNA/mg of proteins.

Glutathione S-transferase

Glutathione S-transferase activity was measured using 1-chloro-2-4-dinitrobenzene (CDNB) as the co-substrate. A volume of 50 μ L of S15 was mixed with 1 mM GSH and 1 mM CDNB substrate in 50 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, containing 100 mM NaCl. The mixture was incubated at 15°C for 0, 5, 15, 25 and 45 min. Activity was expressed by the increase in absorbance at 340 nm per min per milligram of protein.

Statistical analyses

The data were expressed as the mean with the standard error. In each experience, differences between control and groups of fish exposed to Mercier groundwater were evaluated

by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by *post-hoc* test ($P \leq 0.05$). The calculations were performed using Statistica for Windows (Version 7.0, StatSoft Inc., 1995). Correlation was performed using Pearson test. Discriminant function analysis was performed to determine the well distance characteristics. Significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

Chemical analysis

Among the 61 volatile organic compounds measured, vinyl chloride (4 μ g/L), trans-1,2-dichloroethylene (2 μ g/L), 1,1-dichloroethane (0.4 μ g/L), 1,2-dichloroethane (2 μ g/L), cis-1,2-dichloroethane (0.37 μ g/L) and benzene (0.29 μ g/L) were found at concentrations above the detection limit at 2.7 km (Table 2).

Morphological parameters

Neither trout weights, lengths nor CF and HSI showed any significant differences in sampling sites after 4 and 14 days of exposure time (Table 3). However, significant correlations were found between weights and CF ($r = 0.91$, $P \leq 0.05$), between lengths and CF ($r = 0.96$, $P \leq 0.05$) in groups at 5.4 km.

Biomarker responses

Phase I and II biotransformation activities

EROD activity was significantly increased in fish exposed to groundwater at 1.2 km (50%)

and 5.4 km (3.1%) following 4 and 14 days exposure respectively reaching 1.8-fold inductions. However, a significant inhibition in EROD activity was observed in fish exposed to groundwater at 2.7 km for all times of exposure at (3.1%) and (50%) concentrations (Figure 2). GST activity in the liver of fish exposed at 3.1% groundwater concentration from the site located at 2.7 km raised significantly after 4 days, reaching 2.1-fold relative to control (Figure 3). However, at (50%) groundwater concentration, GST activity returned to 1.3-fold with respect to control suggesting saturation. Indeed, measurement of GST activities following 14 days exposure to groundwater at (3.1%) and (50%) revealed no significant effects although the mean activity reached 1.2 and 1.6-fold respectively compared to control. The samples collected from groundwater at 1.2 km and 5.4 km did not trigger the increase in GST activity compared to control.

Biomarkers of tissue damage

Lipid peroxidation expressed by TBARS levels in liver of trout were no significantly different compared to control trout (Figure 4). This result was observed for all concentrations tested. Positive correlation was obtained between LPO and GST ($r = 0.88$, $P \leq 0.05$) in group at 5.4 km (Table 4). Exposure of trout to groundwater at 1.2 km caused a significant elevation of DNA strand breaks reaching 1.2-fold after 4 days exposure at (50%) concentration and (2-fold) after 14 days exposure at (3.1%) water concentration (Figure 5). At 5.4 km distance from the lagoons, a much

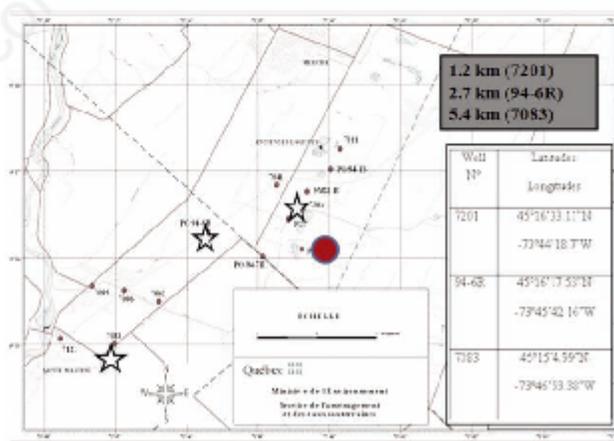


Figure 1. Map with sampling points around Mercier city in campaign may 2010. The wells exposure 7201, 94-6R and 7083 are located at distances (1.2, 2.7 and 5.4 km) from the lagoons. (Modified Map provided by the Ministry of Sustainable Development, Environment and parks of Quebec, 2009).

stronger induction (reaching 3.5 fold induction at 50%) compared to control was observed after 14 days. However, DNA Strand breaks were somewhat lower (1.0 and 1.3 fold) in liver of fish exposed to 3.1% and 50% groundwater respectively at 2.7 km for 4 days. A slight rise was observed after 14 days exposure (1.57 and 2.02 fold) compared to control. In addition, significant correlation was found in groups at 2.7 km between DNA strand breaks and LPO levels ($r=0.99$, $P 0.05$). However, negative correlation was between DNA strand breaks and EROD activity ($r=0.91$, $P 0.05$) (Table 4).

Discriminant function analysis

In the aim to describe the biochemical effects of chronic exposure (14 days) to contaminated groundwater on the liver of rainbow trout, discriminant function analyses were performed (Figure 6). The main biomarkers were identified on X and Y-axis. Discrimination function analysis of the biochemical responses revealed that all three wells at 2.7 km, 5.4 km and 1.2 km and the controls were correctly classified: 81%, 83%, 62% and 100% correctness respectively. EROD was the main biomarker that discriminated the sites.

Discussion

The aim of this study was to investigate the biochemical effects of exposure to groundwa-

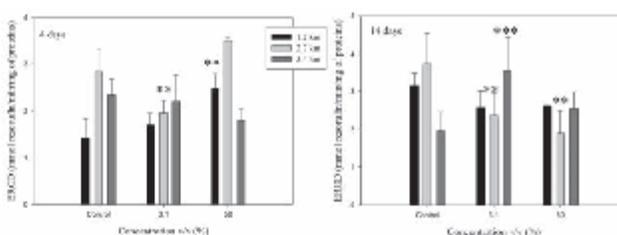


Figure 2. Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity in trout liver after 4 and 14 days exposure to groundwater at 1.2 km, 2.7 km and 5.4 km. Data are presented as mean±standard error. Asterisks indicate significant difference from controls (** $P<0.01$; *** $P<0.001$).

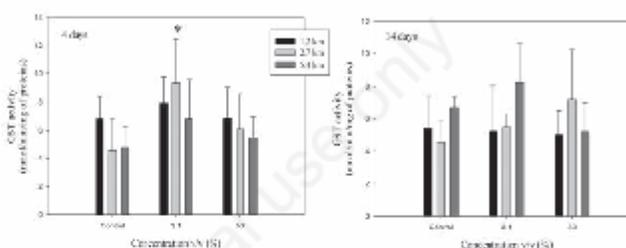


Figure 3. Glutathione S-transferase activity in trout liver after 4 and 14 days exposure to groundwater at 1.2 km, 2.7 km and 5.4 km. Data are presented as mean±standard error. Asterisks indicate significant difference from controls (* $P<0.01$).

Table 3. Morphometric data of trout exposed to groundwater at 1.2 km, 2.7 km and 5.4 km.

Well	Measures	4 days of exposure			14 days of exposure		
		Control	3.1%	50%	Control	3.1%	50%
1.2 km	Weight (g)	27±8	32±9	30±4	31±8	33±4	31±6
	Length (cm)	13±2	14±2	14±1	13±1	14±1	13±1
	Factor condition (FC)	1.3±0.2	1.0±0.1	1.1±0.1	1.4±0.2	1.3±0.1	1.5±0.2
	Hepatosomatic index (HIS)	1.1±0.3	1.2±0.8	0.8±0.3	1.2±0.6	1.2±0.4	1.1±0.3
2.7 km	Weight (g)	31±6	33±9	35±7	32±9	31±6	33±8
	Length (cm)	13±1	13±1	13±1	14±1	13±1	13±1
	Factor condition (FC)	1.3±0.1	1.3±0.2	1.4±0.2	1.4±0.1	1.4±0.0	1.4±0.1
	Hepatosomatic index (HIS)	1.0±0.3	1.1±0.6	1.2±0.4	1.1±0.6	1.0±0.3	1.3±0.6
5.4 km	Weight (g)	33±9	36±4	34±9	38±7	33±3	34±6
	Length (cm)	15±1	16±1	15±1	14±1	14±0	14±1
	condition (FC)	1.1±0.1	1.0±0.1	1.0±0.1	1.1±0.1	1.3±0.1	1.4±0.0
	Hepatosomatic index (HIS)	1.1±0.7	1.1±0.2	1.2±0.3	1.1±0.3	1.0±0.2	1.1±0.3

Values reported as mean±standard error.

Table 4. Biomarkers correlation in rainbow trout exposed for 4 and 14 days to Mercier groundwater at 1.2, 2.7 and 5.4 km.

	DNA damage	GST activity	Lipid peroxidation	EROD activity
DNA damage	-	-	0.99* (2.7/4d)	-
Lipid peroxidation	-	0.88* (5.4/14d)	-	-
EROD activity	-0.91* (2.7/14d)	-	-	-

GST, glutathione S-transferase; EROD, ethoxyresorufin O-deethylase. *Only significant correlations are shown ($P 0.05$).

ter at increasing distance from an industrial dumping site (Mercier lagoons) in rainbow trout and determine the behavior of the contamination plume in groundwater.

The concentrations of volatile organic compounds (e.g., benzene, dichloroethane and vinyl chloride) measured in samples at 2.74 km were 0.29 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively, which indicates that the plume is more concentrated at this distance (Table 2). The presence of VOCs in the groundwater could lead to serious health threats. The chronic exposure of organisms to low levels of VOCs can cause carcinogenesis,²⁸ i.e. vinyl chloride and benzene are widely recognized human carcinogens.²⁸ However, DNA damage was more important at the closest and farthest sampling distance (i.e. 1.2 and 5.4 km). Hence, the complexity of the fate and transport of chemical mixtures in groundwater makes it difficult to suggest causative chemicals responsible for the observed effects.

The CF and HSI of the trout were homogeneous in all exposure groups which removes size-related influences in the biomarker responses. It also suggests that the observed response were not immediately threatening at the fish morphological level. Fish from polluted environments generally show an increase in the HSI, exposition to PAHs or others substances which involved biotransformation leads normally to an elevation of this index.⁶ However, no significant increase in HSI was observed after 14 days of exposure time. May be the exposure period was not long enough to see HSI variations.

The data obtained in this study would suggest the presence of chemicals able to activate the Ah receptor. Indeed, EROD activity of groundwater exposure, were significantly enhanced over fish from the control at 1.2 km (50%) and 5.4 km (3.1%), but was reduced at 2.7 km for all times of exposure at (3.1%) and (50%) concentrations. The reduction of EROD activity in fish at site 2.7 km could be due to hepatotoxic damage which may inhibit the liver cells production of this enzyme or we hypothesized the presence of the blocker (antagonist) for AhR which reduce the enzyme activity mediated normally by AhR in trout. Whyte *et al.*⁴ suggested that toxicity caused by xenobiotics accumulation and their metabolites might inhibit enzyme production leading to an inhibition of EROD activity. Biotransformation of vinyl chloride, dichloroethane and benzene, the chemicals identified in groundwater samples at 2.7 km, are under cytochrome P450 2E1,⁶ as well as through glutathione conjugation.^{6,44} Trans and cis 1,2-dichloroethylene inhibit their own metabolism *in vivo* by inactivation of the metabolizing enzyme presumably the CYP 450 isoform CYP 2E1.¹⁴ The induction of GST activity as for CYP450 is regulated, in part by the Ah receptor.²⁸ Indeed, an increase

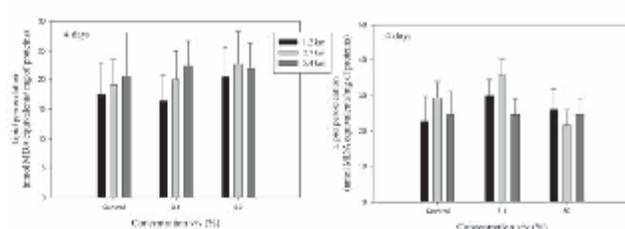


Figure 4. Lipid peroxidation in trout liver after 4 and 14 days exposure to groundwater at 1.2 km, 2.7 km and 5.4 km. Data are presented as mean±standard error. No significant difference was observed (ANOVA P>0.05).

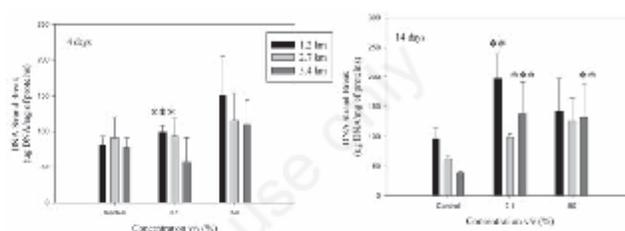


Figure 5. DNA strand break in trout liver after 4 and 14 days exposure to groundwater at 1.2 km, 2.7 km and 5.4 km. Data are presented as mean±standard error. Asterisks indicate significant difference from controls (**P<0.01; ***P<0.001).

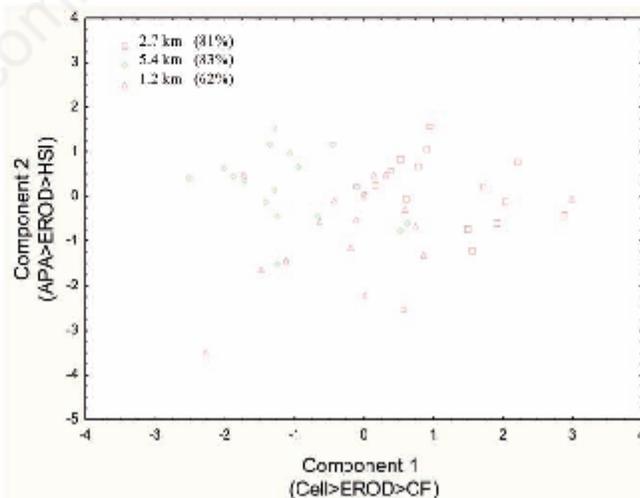


Figure 6. Results for discriminant function analyses for 14 days exposure to Mercier groundwater at 1.2 km, 2.7 km and 5.4 km. CF, condition factor; HSI, hepatosomatic index; Cell, cellularity; ethoxyresorufin-*O*-deethylase, APA and EROD activity.

in hepatic GST activity has been reported in several studies after fish exposure to PAHs, PCBs and certain VOCs.^{17,46} Various substrates involved in GST activity are recognized by the binding site of hydrophobic substrates.²⁷ Nevertheless, the enzyme GST has been reported to respond differently to different substances. For example, Otitoloju *et al.*¹⁸ reported that enzyme was inhibited by benzene, while Qian *et al.*⁴⁷ reported increased GST activity in liver of Crucian carp (*Carassius auratus*) injected with chlorobenzene. In our study, a significant increase displayed in the phase II biotransformation in trout exposed to 3.1% groundwater at 2.7 km after 4 days exposure. The GST response to groundwater after 4 days exposure in all groups shows a bell-shaped trend with an initial increase in activity, but significantly only at 2.7 km. Accordingly, the low enzyme activities after 14 days in fish from 1.2 km, 2.7 km and 5.4 km could be associated with deficiency to compensate for oxidative stress, possibly due to high levels of pollutant exposure.⁴⁸ Since LPO was not significantly affected and was not related to GST activity, we cannot support the argument that decreased GST activity was associated to oxidative stress.

Oxidative stress can be mediated by numerous organic contaminants, including, halogenated hydrocarbons, PAHs, and dioxins.³⁹ In the current study, LPO levels in trout exposed to groundwater at all distance increased slightly even if non-significantly. Although LPO was positively correlated to GST, the change in GST activity seemingly did not influence LPO under analysis of covariance.

DNA damage was measured by the levels of soluble strand breaks and can be used as tools to monitor genotoxicity in organisms.⁴⁹ At 4 days exposure, an initial increase in DNA strand breaks was observed in trout exposed to 50% groundwater at 1.2 km. Although, after 14 days of exposure to groundwater at 5.4 km, the amount of DNA were more elevated (reaching 3.4-fold) with respect to control. In fact, Devaux *et al.*²⁴ observed that the chub (*Leuciscus cephalus*) caught in Rhone River close to an industrial area presented DNA damage in erythrocytes. Genotoxic effect seems to be reflected by metabolites effects of chemicals on DNA, including their capabilities to lead to DNA strand. According to Gwinn *et al.*⁹ which reported that EDC, with its strong electrophilic affinity to DNA appears to induce DNA damage. Vinyl chloride oxidation produces an epoxide intermediate which reacts with a variety of cellular nucleophiles including DNA and glutathione (GSH).¹⁶ Mattes *et al.*⁸ reported likewise that DNA damage of vinyl chloride is due to the formation of the extremely reactive epoxide chlorooxirane during the oxidative metabolism of VC by CYP 450 in the liver. Unfortunately, we did not measure CYP2E1 activity in this study. However, DNA damage is

not correlated with EROD ($r = 0.91$, $P < 0.05$), this suggests that VOCs are associated with genotoxicity.

Conclusions

The data revealed that exposure to contaminated groundwater stimulated both phases I and II biotransformation activities as evidenced by EROD and GST activities. The water samples were also genotoxic which was seemingly not related to oxidative stress given the lack of LPO changes. This study provides some insights on the toxicity of groundwater contaminated by industrial waste to rainbow trout.

References

- Bureau d'Audiences Publiques sur l'Environnement du Québec (BAPE). Restauration du lieu contaminé de Mercier. Montréal: Bureau d'Audiences Publiques sur l'Environnement du Québec (BAPE); 1994. p 222.
- Poulin M, Simard G, Sylvestre M. Pollution des eaux souterraines par les composés organiques à Mercier, Québec. [Groundwater pollution by organic compounds at Mercier, Quebec]. *Hydrogéologie*. 1985;2: 125-31. [Article in French]
- Centre d'expertise en analyse environnementale (CAEQ). Certificat d'analyse: Eaux souterraines de la région de Mercier. Projet 5534. Montréal: Centre d'expertise en analyse environnementale (CAEQ); 2010.
- Prime J, Fournier M. Création d'un réseau de recherche interuniversitaire et multidisciplinaire sur les problématiques environnementales associées au site des lagunes de Mercier: Rapport préparé par le Centre interinstitutionnel de recherche en écotoxicologie (CIRE); 2008. p 224.
- Pohl HR, Scinicariello F. The impact of CYP2E1 genetic variability on risk assessment of VOC mixtures. *Regulat Toxicol Pharmacol* 2011;58:364-74.
- Poirier M, Fournier M, Brousseau P, Morin A. Effects of volatile aromatics, aldehydes, and phenols in tobacco smoke on viability and proliferation of mouse lymphocytes. *J Toxicol Environ Health - Part A* 2002; 65:1437-51.
- Zabrodskaia PE, Mandych VG, Germanchuk VG. Inhibition of cytochrome P-450 with 2-die thylaminoethyl-2,2-diphenylpropylacetate (SKF-525A) reduces immunotoxicity of chlorinated carbohydrates. *Bull Exper Biol Med* 2006;142:324-6.
- Mattes TE, Alexander AK, Coleman NV. Aerobic biodegradation of the chloroethenes: pathways, enzymes, ecology, and evolution. *FEMS Microbiol Rev* 2010;34: 445-75.
- Gwinn MR, Johns DO, Bateson TF, Guyton KZ. A review of the genotoxicity of 1,2-dichloroethane (EDC). *Mutat Res Rev Mutat Res* 2011;727:42-53.
- Kumar A, Sushama A, Rohil V, Manral S, Gangopadhyay S, Prasad A, et al. Prevention of benzene-induced genotoxicity in bone marrow and lung cells: superiority of polyphenolic acetates to polyphenols. *Archiv Toxicol* 2011;35:1141-50.
- Morozi G, De Bartolomeo A, Fabiani R, Rosignoli P, Lepore L. Induction of DNA-damage and apoptosis by volatile organic compounds and by benzene metabolites. *Igiene Moderna* 1999;112:1503-13.
- Gros M, Petrovic M, Barcelo D. Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the ebro river basin (northeast Spain). *Environ Toxicol Chem* 2007;26: 1553-62.
- Singh MP, Mishra M, Sharma A, Shulda AK, Mudiyan MKR, Patel DK, et al. Genotoxicity and apoptosis in *Drosophila melanogaster* exposed to benzene, toluene and xylene: attenuation by quercetin and curcumin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 253:14-30.
- Couillard CM, Lee K, Légaré B, King TL. Effect of dispersant on the composition of the water-accommodated fraction of crude oil and its toxicity to larval marine fish. *Environ Toxicol Chem* 2005;24: 1496-504.
- Palanikumar L, Kumaraguru AK, Ramakrishnan CM, Anand M. Biochemical response of anthracene and benzo [a] pyrene in milkfish *Chanos chanos*. *Ecotoxicol Environ Safety* 2012;75:187-97.
- Lilly PD, Thornton-Manning JR, Gargas ML, Clewell HJ, Andersen ME, Manning JRT. Kinetic characterization of CYP2E1 inhibition in vivo and in vitro by the chloroethylenes. *Archiv Toxicol* 1998;72: 609-21.
- Oliva M, Gonzalez de Canales ML, Gravato C, Guilhermino L, Perales JA. Biochemical effects and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in senegal sole (*Solea senegalensis*) from a Huelva estuary (SW Spain). *Ecotoxicol Environ Safety* 2010;73:1842-51.
- Otitoloju A, Olagoke O. Lipid peroxidation and antioxidant defense enzymes in *Clarias gariepinus* as useful biomarkers for monitoring exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Monit Assess* 2011;182:205-13.
- Martinez-Gomez C, Vethaak AD, Hylland K, Burgeot T, Kohler A, Lyons BP, et al. A guide to toxicity assessment and monitoring effects at lower levels of biological

- organization following marine oil spills in European waters. *ICES J Marine Sci* 2010;67:1105-18.
20. Esegbe F, Doherty V, Sogbanmu T, Otiololu A. Histopathology alterations and lipid peroxidation as biomarkers of hydrocarbon-induced stress in earthworm, *Eudrilus eugeniae*. *Environ Monit Assess* 2013;185:2189-96.
 21. Hanson N, Larsson Å. Experiences from a biomarker study on farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) used for environmental monitoring in a Swedish river. *Environ Toxicol Chem* 2009;28:1536-45.
 22. Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol* 2000;30:347-570.
 23. Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LEJ. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Develop Comparat Immunol* 2001; 25:853-73.
 24. Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 2003;13:57-149.
 25. Gonzalez JE, Reimschuessel R, Shaikh B, Kane AS. Kinetics of hepatic phase I and II biotransformation reactions in eight fin-fish species. *Marine Environ Res* 2009;67:183-8.
 26. Cazénave J, Bistoni MDL, Pesce SE, Wunderlin DA. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquatic Toxicol* 2006;76:1-12.
 27. Monferran MV, Galanti LN, Bonansea RI, Amé MV, Wunderlin DA. Integrated survey of water pollution in the Suquia River basin (Cordoba, Argentina). *J Environ Monit* 2011;13:398-409.
 28. Zhang JF, Liu H, Sun YY, Wang XR, Wu JC, Xue YQ. Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol. *Environ Toxicol Pharmacol* 2005;19:185-90.
 29. Li ZH, Zlabek V, Velisek J, Grabic R, Machova J, Kolarova J, et al. Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicol Environ Safety* 2011;74:319-27.
 30. Nigro M, Frenzilli G, Scarcelli V, Gorbi S, Regoli F. Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. *Marine Environ Res* 2002;54:517-20.
 31. Sasaki YF, Saga A, Akasaka M, Ishibashi S, Yoshida K, Su YQ, et al. Detection of in vivo genotoxicity of haloalkanes and haloalkenes carcinogenic to rodents by the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay in multiple mouse organs. *Mutat Res* 1998;419:13-20.
 32. Benchalgo N, Gagné F, Fournier M. Immunotoxic effects of an industrial waste incineration site on groundwater in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Environ Sci* 2014. [In press].
 33. US Environmental Protection Agency. 2006 Edition of the drinking water standards and health advisories (EPA 823-R-06-013). Washington, DC: Office of Water, US Environmental Protection Agency; 2006. Available from: http://water.epa.gov/action/advisories/drinking/upload2009_04_27_criteria_drinking_dwstandards.pdf
 34. WHO. Guidelines for drinking-water quality recommendations. Vol. 1: Recommendations. 3rd ed. Geneva: World Health Organization; 2006. Available from: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/gdwq3rev/en/
 35. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analyt Biochem* 1976;72:248-54.
 36. Gagne F, Blaise C. Hepatic metallothionein level and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and paper mill effluents. *Water Res* 1993;27:1669-82.
 37. Gagné F, Trotier S, Blaise C, Sproull J, Ernst B. Genotoxicity of sediment extracts obtained in the vicinity of a creosote-treated wharf to rainbow trout hepatocytes. *Toxicol Lett* 1995;78:175-82.
 38. Roose P, Brinkman UAT. Volatile organic compounds in various marine organisms from the Southern North Sea. *Marine Pollut Bull* 2000;40:1167-77.
 39. Hiraku Y, Karwanishi S. Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites. *Cancer Res* 1996;56:5173-8.
 40. Kopecka-Pilarczyk J, Correia AD. Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to pyrene and fluorene. *J Exper Marine Biol Ecol* 2009;372:49-57.
 41. Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol* 2000;30:347-570.
 42. Huang C-Y, Huang K-L, Cheng T-J, Wang J-D, Hsieh L-L. The GST T1 and CYP2E1 genotypes are possible factors causing vinyl chloride induced abnormal liver function. *Archiv Toxicol* 1997;71:482-8.
 43. Nakajima T, Wang RS, Elovaara E, Park SS, Gelboin HV, Hietanen E, et al. Monoclonal antibody-directed characterization of cytochrome P450 isozymes responsible for toluene metabolism in rat liver. *Biochem Pharmacol* 1991;41:395-404.
 44. Filser JG, Bolt HM. Pharmacokinetics of halogenated ethylenes in rats. *Archiv Toxicol* 1978;42:123-36.
 45. Maria VL, Correia AC, Santos MA. Genotoxic and biochemical responses in caged eel (*Anguilla anguilla* L.) after short-term exposure to harbour waters. *Environ Int* 2004;29:923-9.
 46. Yang F, Zhang Q, Guo H, Zhang S. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and teratogenicity of marine sediments from Qingdao coastal areas using in vitro fish cell assay, comet assay and zebrafish embryo test. *Toxicol Vitro* 2010;24:2003-11.
 47. Qian Y, Yin D, Li Y, Wang J, Zhang M, Hu S. Effects of four chlorobenzenes on serum sex steroids and hepatic microsome enzyme activities in crucian carp, *Carassius auratus*. *Chemosphere* 2004;57: 127-33.
 48. Correia AD, Gongalves R, Scholze M, Ferreira M, Henriques MA-R. Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *J Exper Marine Biol Ecol* 2007;347: 109-22.
 49. Costa PM, Neuparth TS, Casiro S, Lobo J, Martins M, Ferreira AM, et al. Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: Laboratory versus in situ studies. *Environ Res* 2011;111:25-36.
 50. Devaux A, Flammarion P, Bernardon V, Garric J, Monod G. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in Chub (*Leuciscus cephalus*). *Marine Environ Res* 1988;46:257-62.

CHAPITRE 4: IMMUNOTOXICOLOGIE DES EAUX DE L'UTES CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL

4.1. Étude in vivo des effets immunotoxiques d'une exposition aiguë de la truite aux eaux de l'UTES traitées et non traitées

Article 4: The effects of treated groundwater effluent on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Auteurs

Nadjet Benchalgo, Francois Gagné, Michel Fournier

Soumis au journal

Environmental Pollution

Contribution personnelle

Mon rôle a consisté à faire l'échantillonnage, à planifier les expériences, à faire les analyses et l'interprétation des résultats et à rédiger l'article à titre d'auteur principal.

Contribution des coauteurs

Dr Michel Fournier, mon directeur de recherche et Dr François Gagné co-directeur ont participé à la planification des expériences, à l'analyse des résultats ainsi qu'à la correction du manuscrit.

RÉSUMÉ

Le but de cette étude était d'évaluer l'immunotoxicité de l'eau souterraine de Mercier au niveau de l'UTES chez des truitelles femelles (*O. mykiss*) par deux approches *in vitro* et *in vivo*. Les poissons ont été exposés pendant 96 heures à des concentrations croissantes (0%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50% et 100%) de l'effluent avant traitement et après traitement. *In vitro*, les leucocytes ont été exposés aux mêmes concentrations de l'effluent traité et non traité. L'immunocompétence a été évaluée par l'activité et l'efficacité de la phagocytose, la réponse de la prolifération des lymphocytes stimulée par des mitogènes et l'activité des cellules NK-like. Les résultats de *l'in vitro et in vivo* ont révélé que la cytotoxicité des NK a été affectée significativement dans un rapport cellules cibles/cellules effectrices de 20 :1 et 40 :1. Cependant, la viabilité et l'activité phagocytaire des macrophages n'ont pas été affecté par l'exposition. *In vivo*, les résultats indiquent que la phagocytose a été significativement réduite chez les truites exposées aux deux types d'effluent. La prolifération des lymphocytes T et B a été stimulée dans les deux études *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats suggèrent que les eaux souterraines de Mercier même traitées, augmentent l'activité cytotoxique, la prolifération des lymphocytes impliqués dans la production des anticorps, avec une inhibition concomitante de la phagocytose. Par conséquent, les eaux de l'UTES rejetées après traitement dans les eaux de surface pourraient constituer une menace sérieuse pour les organismes qui y vivent.

Article tel que soumis

**The effects of treated groundwater effluent on the immune system of rainbow
trout (*Oncorhynchus mykiss*)**

N. Benchalgo¹, F. Gagné², M. Fournier¹

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, 531 des prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

² Emerging Methods, Aquatic Contaminant Research Division, Environment Canada,

105 Mc Gill St., Montréal, Quebec, Canada H2Y 2E7

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the immunotoxicity of treated Mercier groundwater on juvenile female Rainbow Trout (*O.mykiss*). In this work we investigated these effects both for *in vitro* and *in vivo* exposure. Immunocompetence was assessed by the activity and the efficiency of phagocytosis, the proliferation response of lymphocytes under mitogen stimulation and the activity of Natural killer cells (NK-like). For *in vitro* exposure, leucocytes were exposed to increasing concentrations (0%, 6.25%, 12.5%, 25%, 50% and 100% v/v) of effluent before and after UTES treatment (Unit groundwater treatment). For *in vivo* exposure, fish were exposed for 96 hours to the treated and no treated effluent at increasing concentrations. Both *in vitro* and *in vivo* exposure revealed that NK-like activity was significantly affected by the treated effluent at 12.5% and 25% than the no treated one at an effector/target cell ratio of 20:1 and 40:1. The results indicate that phagocytosis was significantly reduced *in vivo* in both treated and no treated effluent. T and B lymphocyte proliferation in fish from both groups was stimulated in both *in vitro* and *in vivo* exposure . However, the results suggest that UTES treated groundwater effluent, increase cytotoxic activity and lymphocytes involved in antibody production, with a concomitant decrease in phagocytosis activity. Consequently, the waters of the UTES discharged after treatment in surface waters could pose a serious threat to the organisms living there.

Keywords: UTES, Rainbow Trout, Phagocytosis, NK-like cells, lymphocytes proliferation.

Introduction

Most domestic and some industrial wastewaters are processed by municipal wastewater treatment plants. The Mercier's Esker is facing a major problem of soil contamination and pollution of groundwater in response to oil spills in the old Mercier lagoons. A mixture of liquid chemicals present in the site was moved along the groundwater flow into the aquifer threatening the health of ecosystems. This situation has required UTES installation (Unit groundwater treatment) at a distance of 275m from the source area of contamination to counteract the possible contamination of groundwater.¹ UTES installation consists of three pumps at the unit level that create a hydraulic trap to prevent contaminated water to spread into the aquifer. Indeed, the pumped water is supposed to be treated and then discharged into Esturgeon River. Moreover, the additions of a treatment which consist of removing residual iron by the addition of hydrogen peroxide, chlorine, coagulant (iron) and polymer to remove bacteria, hydrocarbons and heavy metals. Thereafter, the water obtained is decanted and filtered through a sand filter. At the end of the process, the treated effluent will be routed into the river (Figure 1). These are important steps to contain the contamination from spreading, since an initial analysis of water samples after treatment of UTES has detected polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs), volatile organic compounds (VOCs) and heavy metals.² However those contaminants are found in mixtures so that synergetic effect can take place. Several studies have shown the potential for volatiles organic compounds to affect immune system.³ Exposure of fish to heavy metals contributes to various disorders, including immunotoxicity⁴, and can lead to immunosuppression.^{5, 6} PAHs are known for their immunomodulatory potential. The immune system of fish is very sensitive to this group of compounds as these can affect both non specific and specific immunity.⁷

It has been demonstrated that immunosuppression caused by many chemical exposures has been positively correlated with decrease resistance to infections in fish populations.^{6,8,9}

Previously, both innate and specific immune responses have been used as sensitive biomarker of xenobiotics effects.^{6,10,11,12,13,14,15} Innate immunity is mediated principally by, granulocytes, monocytes/macrophages and Natural Killer-like cells. The macrophages and granulocytes are responsible for the internalization and destruction of foreign microorganisms.^{8,13} Phagocytosis activity has been described as an attractive biomarkers of hydrocarbon pollution in fish.⁷ NK-like cells consist of spontaneous cytotoxic action against several different targets: cancerous cell lines.¹⁶ Several xenobiotics have been examined for their ability to modulate NK-like cells activity.¹¹ The specific immune responses is performed principally by B and T cells, which are involved in the production of humoral factors (antibodies) and cytotoxic cells (cytokines) to support the destruction of infected cells.

In vitro studies have several advantages compared to *in vivo* studies. These tests eliminate interaction that occur within the body (endocrine vs immune system). Otherwise, an *in vivo* study takes into account modes of pollutants actions and physiological response of organism. *In vivo* studies are generally used to confirm the effects observed *in vitro*.

On the other hand, once water is treated with UTES to removed contaminants will they still target the immune system of aquatic organisms. The objective of this study was to assess the immunotoxic potential of Mercier groundwater prior and after UTES treatments on juvenile female trout. The immune competence was assessed by measuring phagocytosis, the activity of natural cytotoxic cells and lymphoblastic proliferation capacity in the presence of mitogens on kidney immune cells of rainbow trout.

Materials and methods

Fish collection and maintenance

Juvenile Rainbow Trout (*O. mykiss*) weighing 21.3 ± 6.2 g, were obtained from a local fish farm “*Alleghanys*” located at Saint Alexis des Monts, Quebec, Canada. They were kept for a minimum of 2 weeks in 300-L tanks at 15°C under a photoperiod of 12 h light / 12 h dark and constant aeration. They were fed daily at a rate of 2% body weight with food pellets.

Exposure to UTES effluent before and after treatment

1- *In vitro* exposure

For *in vitro* exposure, a volume of 1000 mL of water samples were collected from UTES. Samples were placed immediately on ice packs in portable cooler and they were stored at 4°C until exposure. Before exposure, each sample was filtered with a 0.22 µm cellulosic membrane to remove microorganisms.

2- *In vivo* exposure

a composite or grab volume of 100 L of water samples were collected at UTES (before and after treatment) during the morning hours in June and the samples were stored at 4°C until exposure. The physico-chemical parameters of pH, conductivity and temperature were determined according to standard methods of Quebec’s Centre d’expertise en analyse environnementale.¹⁷

Six plastic vessels (31 cm diameter x 44 cm height, 20 L capacity) were filled with 15 L of water sample using polyethylene plastic bags. 48 juvenile Rainbow Trout were distributed to each tank

and were exposed to increasing concentrations of UTES water (6.25%, 12.5%, 25%, 50% and 100%) for 96 hours at 15°C. The control group and the dilution water consisted of UV- and charcoal-treated tap water from the City of Montréal (Quebec, Canada). The treatment exposure groups and the control were performed in duplicate (n= 2x5). During the experiment parameters such as temperature, dissolved oxygen content, pH and conductivity were measured daily. All chemicals were obtained from the Sigma chemical company (Ontario, Canada) unless specifically identified. Fish (n = 8) were humanely anaesthetized with tricaine methanesulfonate (MS222) at 0.1% concentration after 96 hours in accordance with the recommendations of the animal care committee. The head-fork length and body weight were measured.

Isolation of pronephros leucocytes

The anterior kidney was removed under sterile conditions and crushed with a 2-mL glass grinder (Wheaton Scientific, New Jersey, USA) containing 1 mL of sterile RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Ontario, Canada) supplemented with heparin (10 U/mL; Organon Tecknika, Ontario, Canada), HEPES (10 mM), penicillin/streptomycin (100 U/mL and 100 mg/mL respectively), and 10% fetal bovine serum (FBS). The cell suspension of head-kidney was centrifuged at 485 x g for 30 min and washed twice in RPMI media without heparin. The ratio of live/dead cells was assessed microscopically with a hemacytometer (Bright-line, Pennsylvania, USA) using trypan blue exclusion (0.4%) and the suspension was adjusted to 1.10^6 live cells/mL.

Phagocytosis

Phagocytic activity was assessed using fluorescently labeled beads in accordance with the protocol of Brousseau et al.¹⁸ A volume of 500 μ L of each cell leukocyte suspension was incubated for 18 hours at 15°C with fluorescent latex beads (diameter of 1.71 μ m; Polysciences, Pennsylvania, USA) at a 100:1 bead-to-cell ratio. After the incubation period, the cell suspensions were layered over 4 mL of RPMI supplemented with 3% bovine serum albumin and centrifuged at 150 x *g* at 4°C for 8 minutes to remove the free beads adsorbed at the surface of cell membranes. The cell pellets were resuspended and fixed in 0.5% formaldehyde and 0.2% sodium azide in phosphate-buffered saline (PBS). Cells were then analyzed using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, California, USA) and 5000 events were recorded. Two endpoints determined the percentage of macrophages that engulfed one bead or more (M1: phagocytic activity) or three beads or more (M2: phagocytic efficiency). The data were expressed as the percentage of cells that engulfed one bead or more and three beads or more.

Lymphocyte proliferation

Cells were plated at 5×10^5 cells/well in round-bottom microplates and incubated with 20 μ g/mL of phytohemagglutinin (PHA), a mitogen activator of lymphocyte T, and with 250 μ g/mL of lipopolysaccharide (LPS), a mitogen activator of lymphocyte B. After 72 hours of incubation, 0.5 μ Ci/well of [³H]-methyl thymidine (6.7 Ci mmol^{-1} ; MP Biomedical, Ohio, USA) was added, and plates were incubated for a further 18 hours at 15°C. Cells were harvested with a semi-automatic cell harvester (Skatron Instruments As, Lier, Norway) on a fibreglass filter (Skatron Instruments As). Radioactivity was measured with a microbeta Trilux scintillation counter (Perkin Elmer,

Toronto, Canada). The raw data were expressed as counts per minute (CPM), and the results were presented as CPM stimulated cells (PHA or LPS).

NK-like activity

Pronephros NK-like cell mediated lysis of murine lymphoma cells (YAC-1) was determined by a flow cytometry according to Brousseau et al.¹⁸ method. An aliquot of 1 ml containing 1×10^7 Target cells (YAC-1) was stained with 10 μ l of (3,3-dioctadecyloxacarbocyanine dye (DIO); Sigma-Aldrich) and incubated at 37°C with 5% of CO₂ for 20 min. DIO was used to label the membrane of (YAC-1). After incubation, stained target cells were washed twice in RPMIc and adjusted to 1×10^6 cells/mL. Effector (pronephros leucocytes) and target (YAC-1 tumor cell line) cells was pipette at ration of 40:1, 20:1 and 0:1. A total of 30,000 targets cells and effectors were adjusted to yield a total volume of 330 μ L. The cell mixtures were centrifuged at 350xg for 1 min to bring cells and effectors onto contact. The cells were thus incubated at 15°C for 18h in the dark. At 30 min prior flow cytometry analysis, 15 μ L of propidium iodide (1mg/mL; PI) was added to each tube when (YAC-1) membranes are disrupted by effectors. Data were acquired by FACScalibur (Becton Dickinson) flow cytometer with a threshold set at FL1 (DIO+ cells) plots and 3000 events were recorded and analyzed for viability. Data are expressed as the percentage of target cells mortality.

Statistical analysis

Results are expressed as mean±S.E. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey HSD post-hoc for specific comparison of means ($p \leq 0.05$). Analysis was performed using Statistica for Windows (Version 7.0, StatSoft Inc., 1995).

Results

During the course of exposure experiments, the water temperature (14.8 ± 0.74), pH (7.86 ± 0.30), conductivity ($2.85 \mu\text{S} \pm 0.17$) and dissolved oxygen percentage (87.2 ± 3.11) were stable in all groups treatment.

Based on the previous chemical analysis of effluent after treatment ² (Prime and Fournier 2008, Mdedd) done by CEAEQ (Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Quebec, Qc, Canada), showed the presence of different classes of contaminants (Table 1); volatile organic compounds (VOCs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), pesticides, nonyl phenol ethoxylates (NPE), drug residues and heavy metals.

Firstly, the results of *in vitro* exposure revealed that phagocytosis and viability were no affected (data not showed). However, T and B lymphocyte proliferation in fish from both groups was stimulated (Figure 2). NK-like activity was significantly affected by the treated effluent at 12.5% and 25% compared to the no treated one at an effector/target cell ratio of 20:1 and 40:1 (Figure 3).

The condition factor (i.e. fish total weight/fork length) was not significantly affected by the exposure to UTES effluent in all groups (data no shown) and the leucocytes concentration in

group exposed to treated effluent showed a slight reduction in level compared with group exposed to untreated effluent, but the results remained not statically significant as well (Figure 4). In our study, no mortality and non external lesions were observed.

Phagocytosis activity (M1) was significantly decreased at 25% v/v of the effluent after treatment and at 50 % v/v of the effluent before treatment. The phagocytosis efficiency (M2) was also decreased in groups 12.5% and 25 % of effluent after treatment and at 50% of effluent before treatment (Figure 5).

Moreover, the *in vitro* functionality of lymphocytes measured by their proliferation in the presence of mitogens used was significantly affected in groups exposed to UTES effluent after and before treatment. The proliferation of both lymphocytes B and T was enhanced at 50% v/v before treatment. Lymphocytes proliferation was significantly enhanced in groups exposed to treated effluent at 25% v/v for lymphocytes T and 25% and 50% for lymphocytes B (Figure 6).

NK-like activity was examined in trout exposed to increasing concentrations of UTES effluent before and after treatment (Figure 7). The results indicated that NK-like activity was not significantly affected by the untreated effluent. However, at the effector/target cell ratio of 20:1, significant change in cytotoxicity towards YAC-1 tumor cells was observed at 25% v/v groups exposed to treated UTES effluent. At a ratio of 40:1, significant cytotoxicity was observed at 12.5% v/v.

Discussion

Based on previous results of chemical analysis of treated water of UTES, ² the analysis showed that UTES process does not completely eliminate pollutants as VOCs, HAPs and some heavy

metals were measured at concentration above the detection limit concentration in samples collected postiori UTES treatment. Among these compounds, we will quote; vinyl chloride (8.7µg/L), cis 1,2-dichloroethene (100µg/L), 1,1-dichloroethane (6.3 µg/L), benzene (5.1 µg/L), toluene (9.4 µg/L), chlorobenzene (9.3 µg/L), naphthalene (1.5 µg/L), phenol (2.7 µg/L), formaldehyde (42 µg/L) , nonyl phenol ethoxylates 1 (NP1EO 0.11 µg/L; NP11EO 0.06µg/L; NP12EO 0.06µg/L), bisphenol A (24 ng/L), clofibric acid (3400 ng/L), iron (17 µg/L) and manganese (190 µg/L). Certain substances concentrations were above the recommended norm (see table 1) (e.g., 1,2-dichloroethane, cis1,2-dichloroethene, ethylbenzen, 1,1,2 trichloroethane, bromide and arsenic, while others substances concentrations measured pose no risk of exposure. However, some synergistic and antagonistic effects between pollutants may be involved. Thus, the observed effects could not be attributed solely to one substance, but rather to a mixture of contaminants. This type of additive effect can also be suspected for others molecules detected in UTES effluents. A various *in vitro* and *in vivo* studies have shown the potential for those contaminants to adversely affect the immune system.³ Our result obtained in this study, it turns out that fish cells behave *in vivo* they behave *in vitro*. Furthermore, tests conducted *in vitro* have confirmed the results of *in vivo* but only for NK activity and lymphocytes proliferation.

The various classes of contaminants identified in UTES effluent may exert combined effects (induction and/or inhibition) on the immune system in trout. In this study, we tried to make a link between immunotoxic effects observed in trout exposed to UTES treated and untreated effluent and the presence of divers classes of contaminants in effluent. However, due to the complex mixture of toxic substances in the effluent involved, it is difficult to distinctly find the cause-effect relationship.

The immune system of trout exposed for 96 hours to treated and untreated UTES effluent, was affected in an acute manner at the phagocytosis activity and lymphocyte T and B proliferation levels. The NK-like activity was affected significantly only by treated effluent. Otherwise, the crude effluent is composed mainly of volatiles organic compounds according to the report of Boulet and Walsh.²⁰ It is therefore possible that VOC might have contributed to the immunosuppressive effect observed in trout.

In this experiment, 96 hours exposure to UTES effluent significantly suppressed phagocytosis at concentration ranging from 12.5 to 50 %. This is in line with experiment done with *Mytilus edulis* mussels, where immunosuppression was observed in exposure for 21 days to 12.5%, 25%, 50% and 100% to treated and untreated municipal wastewaters.²¹ It is assumed that the effluent even after the process applied to the water treatment unit, remains contain chemicals able to reduce the head kidney macrophages ingestion of latex beads. In the acute dichloroethane toxicity, phagocytosis activity remained significantly decrease in mice.²² Dichloroethane and trichloroethylene are immunosuppressive compounds.²³

The occurrence of heavy metals which abound in UTES effluents, this suggest that at least a part of the immunotoxic effects observed may be related to the presence of heavy metals in the effluent. Exposure to heavy metals altered phagocytic activity of aquatic organisms.²⁴ Manganese and iron are reported to generate immunosuppressive effects in humans and animals.²⁵ Thus, chemical-induced immunosuppression may results in increased susceptibility incidence of infection disease.²⁶

Hoeger et al.²⁷ observed in their study enhancement in proliferation responses of blood lymphocytes-LPS and ConA-stimulation after exposure rainbow trout for 27 days to municipal

effluent, while in the present study *in vitro* proliferation of lymphocytes B and T were enhanced after 96 hours suggesting difference in effluent composition, origin of lymphocytes and either time-dependant effects in fish. Another potential immunotoxic group of compounds in effluent are PAHs as these can affect both non specific and specific immunity.⁷ PAH are considered as immunosuppressive class of contaminants depending on concentration and type of contaminants and on the species studied. Indeed, PAH have suppressed both B and T cells proliferation in humoral response.²⁸ Conflicting responses are due to the dose and the compound tested in fish and mammals.²⁹

Levin et al.³⁰ reported that PCB might increase lymphocytes proliferation and suppress phagocytosis, but stimulation could reflect a response of the most immunocompetent cells.³¹ PHA-induced proliferation was increased in the 1 µg exposure of PCB in *Atlantic salmon*.³²

NK-like activity was significantly increased 3- and 3.36-fold at 12.5% and 25% v/v treated effluent concentration at the effector/target cell ratio of 40:1 and 20:1 respectively, suggesting that T cells involved in tumor recognition were activated by the treated effluent. Muller et al.⁸ reported in their study, that exposure to treated effluent increases NK activity in rainbow trout but after 30 days of exposure. Thus, immune stimulation may result in the loss of regulation within the immune system and can lead to adverse effects.²⁶

Some nonylphenol were shown to act as estrogenic disruptors and the immune system of fish is very sensitive to endocrine disruptors.³³ It is possible that nonylphenols might affect the immune system of aquatic organism indirectly by disruption of immune system and endocrine natural interaction.³⁴ *In vitro* exposure to *Carassius auratus* lymphocytes and macrophages to bisphenol A significantly induced lymphocyte proliferation.³⁵ The induction of lymphocytes proliferation

and NK activity in trout exposed to UTES effluent could have been the result in part at least of the presence of estrogenic disruptors (e.g., bisphenol A and nonylphenol).

Conclusion

In vivo, the exposure to UTES effluent revealed that phagocytosis was influenced by both effluents in decreasing order while lymphocytes proliferation and NK-like activity were enhanced. In conclusion our study consolidated the hypothesis of an immunomodulatory effects associated with exposure to UTES treated and untreated effluent. UTES effluent could induce acute immunotoxicity and weaken the immune system in exposed organism living in the receiving water and could have an important impact on the survival in the long term. From the results obtained in this study we could think that UTES cannot restore Mercier groundwater. In fact, the unit behaves rather like a hydraulic containment which limits the propagation of dissolved contaminants in the groundwater. An optimization of UTES is required by integrating an ozonation system. The present treatment is not at the forefront of technology. Peroxides have a slight effect on PAHs and VOCs whereas ozonation can oxidize VOCs and make them soluble preventing their release into the atmosphere. The treatment with chlorine could introduce an additional problem by forming carcinogenic chlorinated derivatives.

Acknowledgments

This study was supported by the Canada Research Chair in Environmental Immunotoxicology (Dr. M. Fournier). The authors wish to acknowledge Claude Bruneau of Quebec's Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs for their invaluable help in

water sampling. The authors thank Marlene Fortier for her technical assistance. Many thanks to the INRS and Environment Canada laboratories teams for their assistance in fish dissection and cell counts.

References

1. **BAPE**. Bureau d'Audiences Publiques sur l'Environnement du Québec (BAPE). Restauration du lieu contaminé de Mercier. Montréal. **1994**:222p.
2. **Prime J, Fournier M**. Création d'un réseau de recherche interuniversitaire et multidisciplinaire sur les problématiques environnementales associées au site des lagunes de Mercier: Rapport préparé par le Centre interinstitutionnel de recherche en écotoxicologie (CIRÉ). **2008**:224p.
3. **McDermott C, Heffron JJA**. Toxicity of Industrially Relevant Chlorinated Organic Solvents In Vitro. *International Journal of Toxicology*. 2013 March 1, **2013**;32(2):136-45.
4. **Jadhav SH, Sarkar SN, Ram GC, Tripathi HC**. Immunosuppressive Effect of Subchronic Exposure to a Mixture of Eight Heavy Metals, Found as Groundwater Contaminants in Different Areas of India, Through Drinking Water in Male Rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **2007**;53(3):450-8.
5. **Wong S, Fournier M, Coderre D, Banska W, Krzystyniak K**. Environmental Immunotoxicology, In *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*. Peakall Edit, Chapman and Hall London. **1992**:167-89.
6. **Fournier M, Dégas V, Colborn T, Omara FO, Denizeau F, Potworowski EF, et al**. Immunosuppression in mice fed on diets containing beluga whale blubber from the St Lawrence Estuary and the Arctic populations. *Toxicology Letters*. **2000**;112-113:311-7.
7. **Reynaud S, Deschaux P**. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquatic Toxicology*. **2006**;77(2):229-38.
8. **Müller C, Ruby S, Brousseau P, Cyr D, Fournier M, Gagné F**. Immunotoxicological effects of an activated-sludge-treated effluent on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. **2009**;150(3):390-4.
9. **Morley NJ**. Interactive effects of infectious diseases and pollution in aquatic molluscs. *Aquatic Toxicology*. **2010**;96(1):27-36.

10. **Rice CD, Schlenk D.** Immune function and cytochrome P4501A activity after acute exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health.* **1995**;7(3):195-204.
11. **Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LEJ.** Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology.* **2001**;25(8-9):853-73.
12. **Salo HM, Hébert N, Dautremepuits C, Cejka P, Cyr DG, Fournier M.** Effects of Montreal municipal sewage effluents on immune responses of juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology.* **2007**;84(4):406-14.
13. **Hébert N, Gagné F, Cejka P, Cyr D, Marcogliese DJ, Blaise C, et al.** The effects of a primary-treated municipal effluent on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Exposure duration and contribution of suspended particles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* **2008**;148(3):258-64.
14. **Bado-Nilles A, Quentel C, Auffret M, Le Floch S, Gagnaire B, Renault T, et al.** Immune effects of HFO on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **2009**;72(5):1446-54.
15. **Danion M, Le Floch S, Kanan R, Lamour F, Quentel C.** Effects of in vivo chronic hydrocarbons pollution on sanitary status and immune system in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquatic Toxicology.* **2011**;105(3-4):300-11.
16. **Faisal M, Marzouk MSM, Smith CL, Huggert RJ.** Mitogen Induced Proliferative Responses of Lymphocytes from Spot (*Leiostomus xanthurus*) Exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Contaminated Environments. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* **1991**;13(3):311-27.
17. **CAEQ.** Centre d'expertise en analyse environnementale. Certificat d'analyse: Eaux souterraines de la région de Mercier. Projet 5534. **2010.**
18. **Brousseau P, Payette Y, Blakley B, Boermans H, Flipo D, Tryphonas H, et al.** *Manual of Immunological Methods.* Boston, USA, CRC Press. **1998**:141 p.
19. **McDermott C, Heffron JJA.** Toxicity of Industrially Relevant Chlorinated Organic Solvents In Vitro. *International Journal of Toxicology.* **2013** March 1, 2013;32(2):136-45
20. **Boulet G, Walsh P.** Effets sur l'air ambiant des émissions de l'incinérateur Clean Harbors et de l'Unité de traitement des eaux souterraines (UTES) à Mercier: Évaluation par modélisation de la dispersion atmosphérique, Québec, ministère du Développement durable, de

l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'état de l'environnement, . ISBN :978-2-550-60117-3. **2010**:31 pages.

21. **Akaishi FM, St-Jean SD, Bishay F, Clarke J, das Rabitto I, de Oliveira Ribeiro CA.** Immunological responses, histopathological findings and disease resistance of blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquatic Toxicology*. **2007**;82:1-14.
22. **Zabrodskii PF, Kirichuk VF, Gryzunov AV.** Changes in the nonspecific and immunological resistance during acute dichlorethane poisoning. *Izmenenie nespecificheskoi i immunologicheskoi rezistentnosti organizma pri ostrom otravlenii dikhloretanom*. **1997**;123(1):51-3.
23. **Zabrodskii PF, Mandych VG, Germanchuk VG.** Inhibition of cytochrome P-450 with 2-diethylaminoethyl-2,2-diphenylpropylacetate (SKF-525A) reduces immunotoxicity of chlorinated carbohydrates. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. **2006**;142(3):324-6.
24. **Fournier M, Pellerin J, Lebeuf M, Brousseau P, Morin Y, Cyr D.** Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquatic Toxicology*. **2002**;59(1-2):83-92.
25. **Zelikoff JT, Carlson E, Li Y, Raymond A, Duffy J, Beaman JR, et al.** Immunotoxicity biomarkers in fish: Development, validation and application for field studies and risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment*. **2002**;8(2):253-63.
26. **Descotes J.** Chapter 13 Chemical immunotoxicology and developmental immunotoxicology. *Immunotoxicology of Drugs and Chemicals: an Experimental and Clinical Approach*: Elsevier; **2004**. p. 327-54.
27. **Hoeger B, van den Heuvel MR, Hitzfeld BC, Dietrich DR.** Effects of treated sewage effluent on immune function in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. **2004**;70(4):345-55.
28. **Allan L, Sherr D.** Disruption of human plasma cell differentiation by an environmental polycyclic aromatic hydrocarbon: a mechanistic immunotoxicological study. *Environmental Health*. **2010**;9(1):15.
29. **Davila DR, Davis DP, Campbell K, Cambier JC, Zigmund LA, Burchiel SW.** Role of alterations in Ca²⁺-associated signaling pathways in the immunotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. **1995**;45(2):101-26.

30. **Levin M, Morsey B, Mori C, Nambiar PR, De Guise S.** Non-coplanar PCB-mediated modulation of human leukocyte phagocytosis: A new mechanism for immunotoxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*. **2005**;68(22):1977-93.
31. **Mos L, Morsey B, Jeffries SJ, Yunker MB, Raverty S, De Guise S, et al.** Chemical and biological pollution contribute to the immunological profiles of free-ranging harbor seals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **2006**;25(12):3110-7.
32. **Iwanowicz LR, Lerner DT, Blazer VS, McCormick SD.** Aqueous exposure to Aroclor 1254 modulates the mitogenic response of Atlantic salmon anterior kidney T-cells: Indications of short- and long-term immunomodulation. *Aquatic Toxicology*. **2005**;72(4):305-14.
33. **Farcy E, Gagné F, Martel L, Fortier M, Trépanier S, Brousseau P, et al.** Short-term physiological effects of a xenobiotic mixture on the freshwater mussel *Elliptio complanata* exposed to municipal effluents. *Environmental Research*. **2011**;111(8):1096-106.
34. **Gagné F, Auclair J, Turcotte P, Fournier M, Gagnon C, Sauvé S, et al.** Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. *Aquatic Toxicology*. **2008**;86(3):333-40.
35. **Yin D-q, Hu S-q, Gu Y, Wei L, Liu S-s, Zhang A-q.** Immunotoxicity of bisphenol A to *Carassius auratus* lymphocytes and macrophages following in vitro exposure. *Journal of Environmental Sciences*. **2007**;19(2):232-7.
36. **USEPA** of the Drinking Water Standards and Health Advisories (EPA 822-R-06-013). Office of Water, US Environmental Protection Agency, Washington, DC. **2006**.
37. **USEPA.** National Recommended Water Quality Criteria- Office of Water, Office of Science and Technology. **2006a**.
38. **WHO.** World Health Organization: Chemical Hazards in drinking water-WHO, Water Sanitation and Health (WSH), Drinking Water Quality (DWQ). **2008**.
39. **CCME.** Conseil Canadien des ministères de l'environnement: Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement, Winnipeg- le conseil. **2002**.
40. **MDEQ.** Michigan Department of Environmental Quality: Rule 57 Water Quality Values-Surface Water Quality Assessment Section, MDEQ. **2008**:5p.
41. **SC. Santé Canada:** Recommandation pour la qualité de l'eau potable au Canada- Tableau Sommaire et Documents Techniques- Santé Canada, Santé de l'environnement et du milieu de travail. Rapports et publications, Qualité de l'eau. **2008**.

List of figures and tables

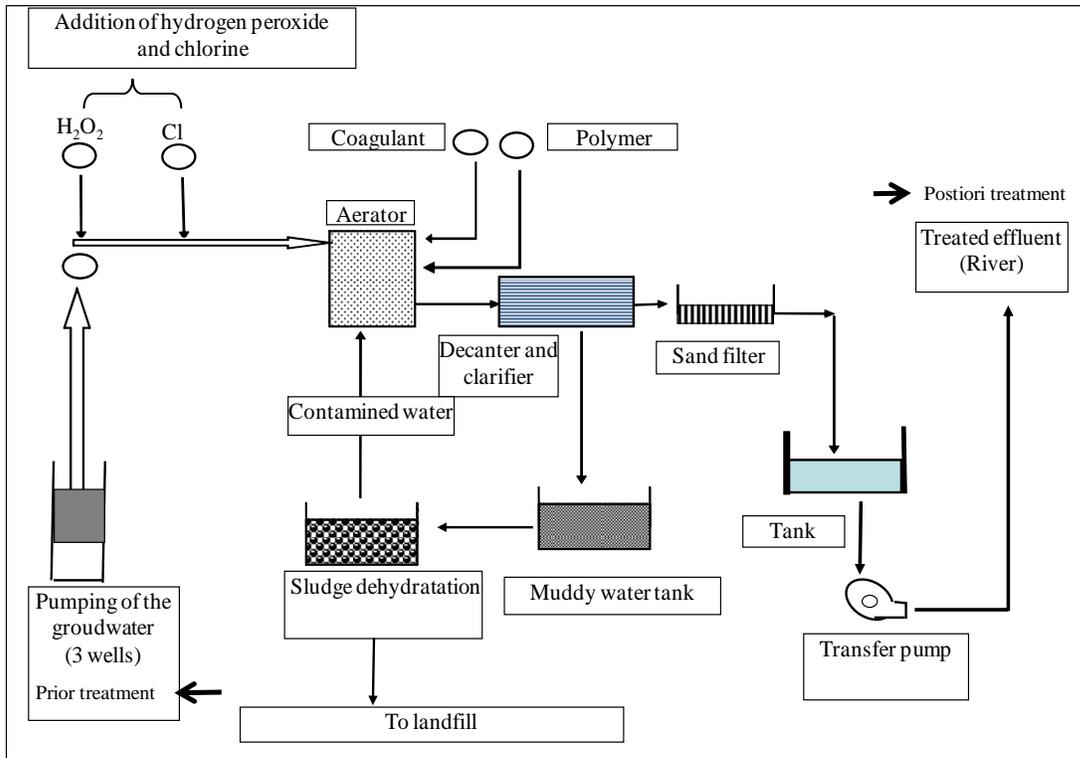


Fig.1.UTES process and sampling location (prior and postiori treatment)

Table1. Organic compounds detected in UTES treated effluent (Data presented only compounds with concentration above limit detection). Criteria groundwater concentration concern only compounds with concentrations above limit recommended (Prime and Fournier, 2008).

Chemical class	Measured Compounds	Conc.	Unit	Detection limit	Criteria groundwater
VOC	Vinyl chloride	8.7	µg/L	0.2	2.4 ³⁶
	1,1-dichloroethene	0.48	-	0.22	-
	Trans 1,2dichlorethylene	1.1	-	0.09	50 ³⁸
	1,1-dichloroethane	6.3	-	0.07	-
	Cis 1,2-dichloroethene	100	-	0.07	50 ³⁸
	Chloroforme	0.83	-	0.12	- ⁷
	Benzene	5.1	-	0.03	2.2 ³⁷
	1,2-dichlorethane	6.9	-	0.09	1.5 ³
	Trichloroethene	1.2	-	0.09	- ⁷
	Toluene	9.4	-	0.03	-
	1,1,2-trichlorethene	1.8	-	0.07	0.59 ³
	1,3-dichloropropane	6.9	-	0.02	-
	Chlorbenzene	9.3	-	0.03	-
	Ethylbenzene	6	-	0.02	2.4 ³⁹
	m,p-xylenes	6	-	0.05	-
	O-xylene	3.2	-	0.02	-
	1,2-dichlorobenzene	0.10	-	0.06	-
	Phenol	2.7	-	0.05	-
	Bis(2-chloroethyl ether)	12	-	0.1	-
	2-chlorophenol	0.11	-	0.05	-
	Benzylalcohol	1.2	-	0.1	-
	1,2-dichlorobenzene	0.29	-	0.1	-
	Formaldehyde	42	-	1.0	-
Acetaldehyde	1.5	-	1.0	-	
PAH	Naphthalene	1.5	µg/L	0.1	-
	Fluorene	0.23	-	0.1	-
NPE	NP1EO	0.11	µg/L	0.1	-
	NP11EO	0.06	-	0.03	-
	NP12EO	0.06	-	0.04	-
Pesticide aryloxyacide	Mecoprop	0.10	µg/L	0.01	-
Metals	Bromide	310	µg/L	0.5	2.4 ⁴⁰
	Iodide	13	-	0.5	-
	Lithium	6.8	-	0.06	-
	Phosphor	2.8	-	2	-
	Silicon	5.1	mg/L	0.003	-
	Arsenic	0.52	µg/L	0.03	0.3 ⁴¹
	Boron	55	-	0.3	-
	Copper	2.3	-	0.05	-
	Iron	17	-	0.5	-
	Manganese	190	-	0.004	50 ³⁹
	Nickel	0.63	-	0.02	-
	Lead	0.033	-	0.03	-
	Zinc	1.9	-	0.7	-
	Others	Ammonia	0.28	mg/L	0.02
Total nitrogen		0.48	-	0.02	-
Inorganic carbon		39	-	0.2	-
Total organic carbon		1.4	-	0.2	-
Calcium		160	-	0.02	-
Potassium		4.4	-	0.03	-
Magnesium		41	-	0.02	-
Sodium		36	-	0.02	-
Sulfate		220	mg/L	0.3	-
Bisphenol A		24	ng/L	0.5	-
Cholesterol		29	-	0.5	-
Clofibrac acid		3400	-	5	-

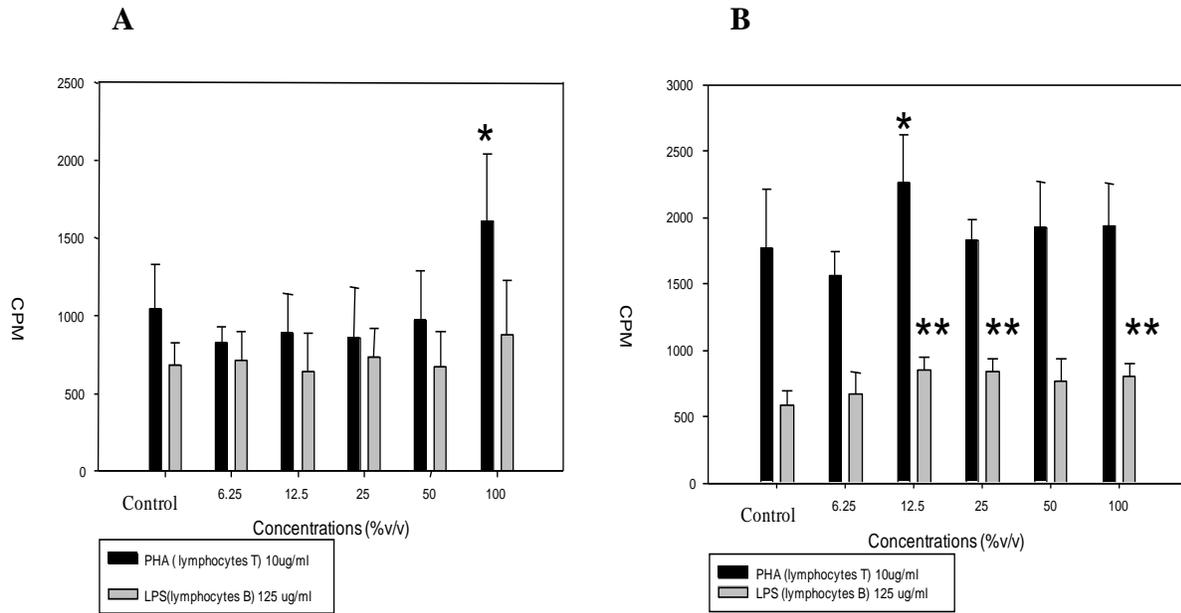


Fig.2. Proliferation responses of head-kidney lymphocytes stimulated with PHA (T lymphocytes) and LPS (B lymphocytes) in leucocytes exposed to UTES effluent (A: untreated; B: treated) *in vitro*. Asterisks indicate significant difference from controls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

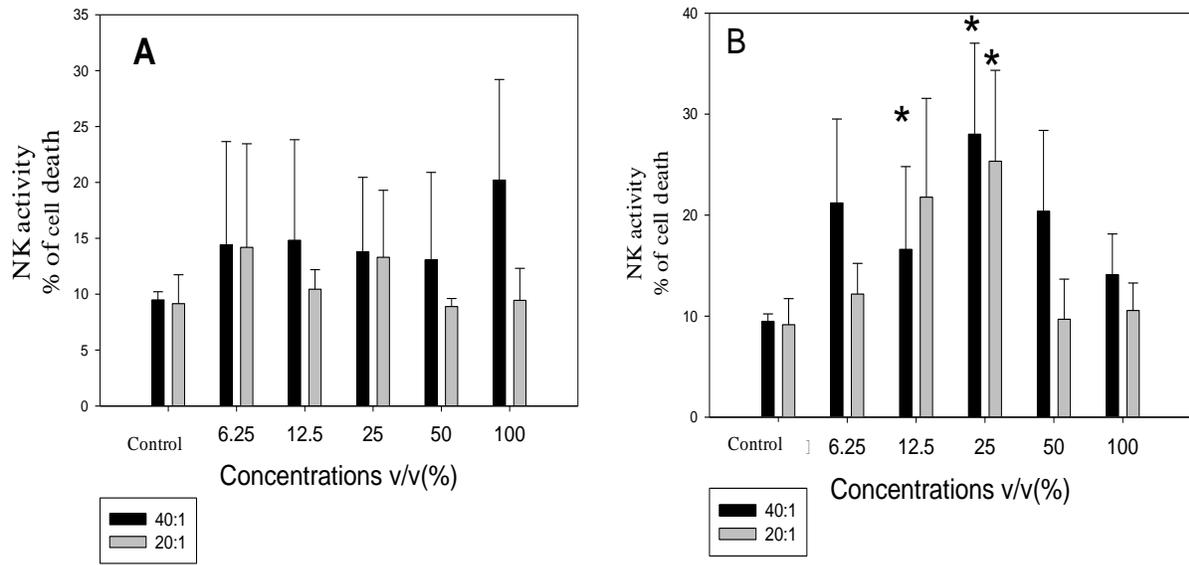


Fig.3. NK cytotoxic activity against cancerous cells YAC-1 in Rainbow Trout exposed to various concentrations of UTEs effluent (A: untreated; B: treated) following *in vitro* exposure. Asterisks indicate significant difference from controls (* $p \leq 0.05$).

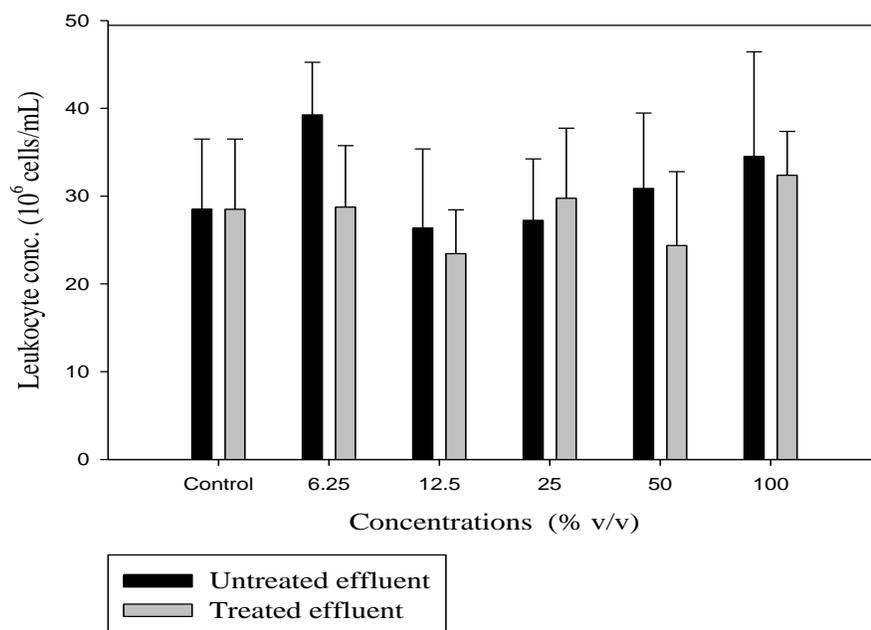


Fig.4. Measurement of cellular leukocyte concentrations in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) after 96 hours of exposure to a treated and untreated effluent (*in vivo*).

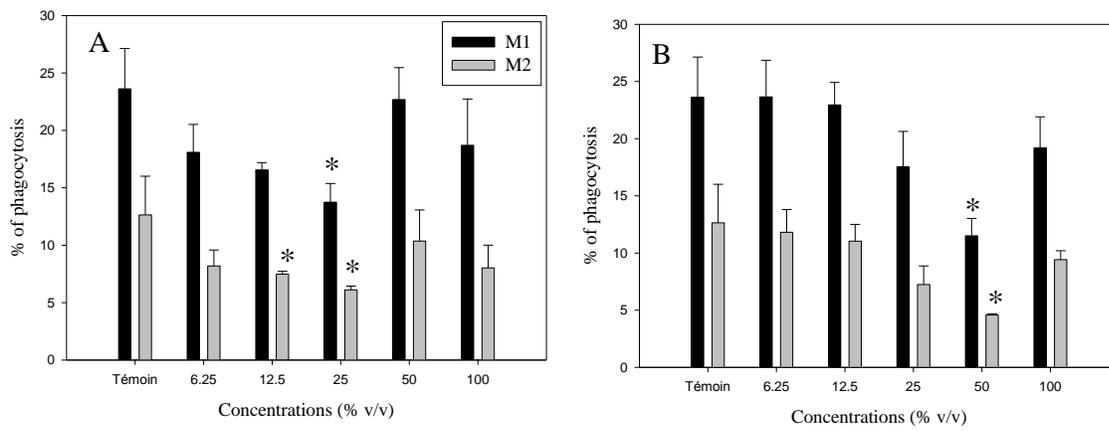


Fig.5. Phagocytosis of Rainbow Trout exposed to various concentrations of UTES effluent (A: untreated; B: treated) for 96 hours (*in vivo*). Data are expressed as the percentage of macrophages having engulfed latex beads, M1 (one bead or more) and M2 (three beads or more). * indicates significance from controls ($p < 0.05$).

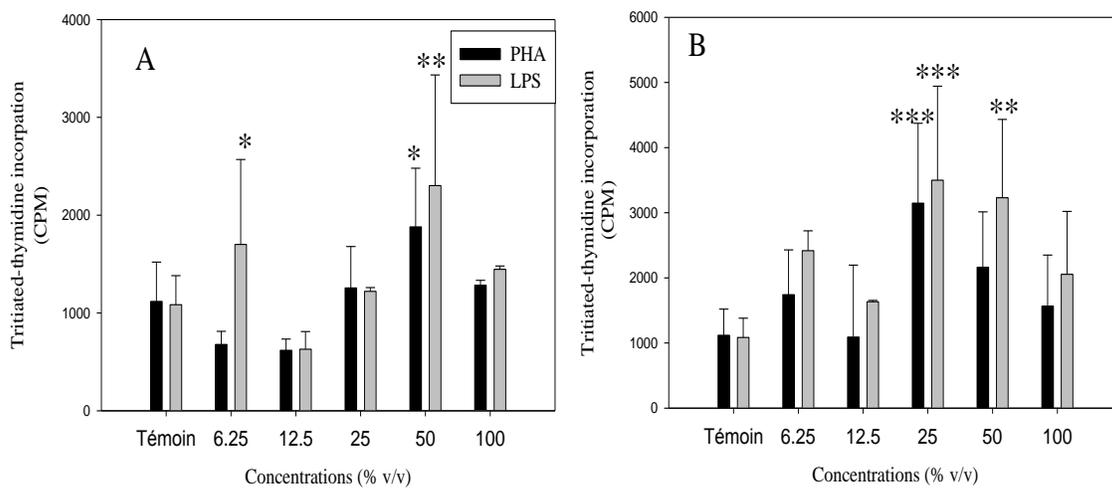


Fig.6. Proliferation responses of head-kidney lymphocytes stimulated with PHA (T lymphocytes) and LPS (B lymphocytes) in Rainbow Trout exposed for 96 hours to UTES effluent (A: untreated; B: treated) (*in vivo*). Asterisks indicate significant difference from controls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$).**

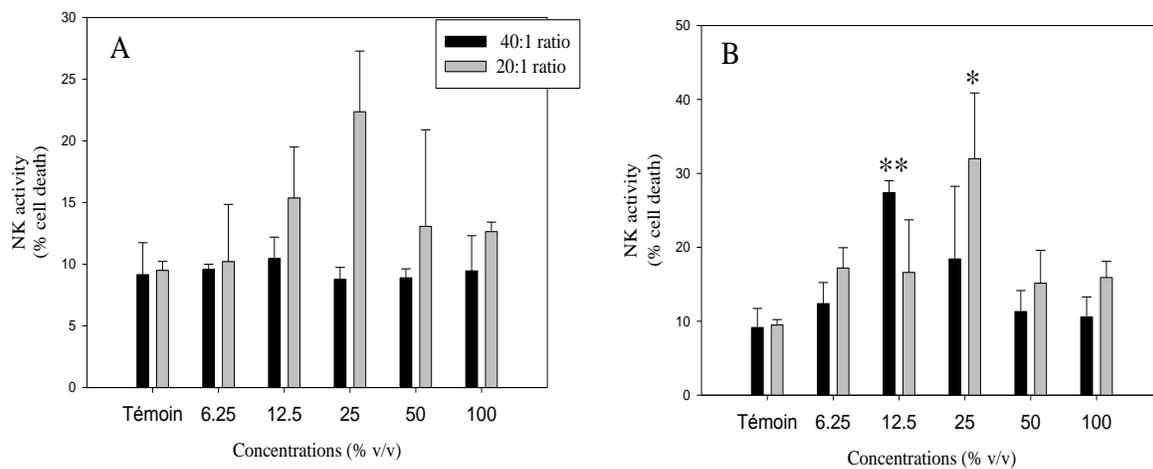


Fig.7. NK cytotoxic activity against cancerous cells YAC-1 in Rainbow Trout exposed to various concentrations of UTES effluent (A: untreated; B: treated) following 96 hours exposure period (*in vivo*). Asterisks indicate significant difference from controls (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

CHAPITRE 5: DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

L'évaluation du risque tient compte à la fois des études physico-chimiques pour définir le niveau de contamination du milieu (exposition) et l'évaluation de la toxicité aiguë ou chronique de cette contamination afin de prédire leurs effets dans l'environnement (danger). Elle intervient à des niveaux d'organisation biologiques entre autres, moléculaire, cellulaire et tissulaire.

Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte. Les objectifs spécifiques de ce travail visaient à 1) mettre au point et démontrer l'intérêt d'une approche multi-biomarqueurs dans l'évaluation d'un site contaminé, afin de mieux cerner les réponses biologiques à des contaminants chimiques suite à des expositions *in vitro* et *in vivo* et de prédire leurs effets sur l'activité biologique des poissons dans l'écosystème aquatique; 2) étudier la relation entre l'exposition à un mélange de toxique, la réponse immunitaire, la réponse biochimique, l'apoptose et le cycle cellulaire et enfin; 3) mettre en évidence l'action des contaminants non mesurés dans l'étude sur la réponse biologique.

Ce travail réalisé fait appel à deux classes de biomarqueurs; les biomarqueurs d'exposition et les biomarqueurs d'effet. Les biomarqueurs d'exposition sont impliqués dans les mécanismes de défense (phagocytose, NK) et de métabolisation de détoxification des xénobiotiques (EROD, GST). Ils rendent compte de la biodisponibilité des toxiques dans le milieu. Alors que les biomarqueurs d'effet (exemple; génotoxicité, stress oxydatif (LPO)) signifient que les mécanismes de défense n'ont pas été suffisamment efficaces pour contourner l'effet toxique. Ils correspondent entre autre à des cibles moléculaires (exemple ; dommage à l'ADN, perturbation du cycle cellulaire, stress oxydatif). Ainsi, les conséquences peuvent se répercuter au niveau de la santé du poisson.

Deux approches complémentaires ont été intégrées dans l'étude; l'approche *in vitro* et l'approche *in vivo*. Elles contribuent à une démarche générale d'évaluation des risques suite à une exposition aux eaux souterraines contaminées par des substances chimiques. Les études *in vitro* présentent plusieurs avantages d'évaluation et d'anticipation des effets comparativement aux études *in vivo*. Ces derniers tests permettent d'éliminer les interactions pouvant survenir à l'intérieur de l'organisme (système endocrinien vs système immunitaire). Cependant, cet avantage peut être considéré comme un inconvénient, étant donné que le test *in vitro* ne permet pas de savoir

comment réagit réellement l'organisme. En effet, une étude *in vivo* prend en compte les modes d'action des polluants et les réponses physiologiques des organismes. Elle permet de confirmer les effets observés dans les expositions *in vitro*. D'après nos résultats obtenus dans le chapitre 4, il se trouve que les cellules de poissons se comportent *in vivo* comme elles se comportent *in vitro*. Par ailleurs, les tests menés *in vivo* ont permis de confirmer les résultats de l'*in vitro*.

Un des points forts de notre démarche était de réaliser tous les essais mono-spécifiques dans des conditions expérimentales biotiques (espèce et âge) et abiotiques (température, photopériode et durée d'exposition) contrôlées. Cela a permis de maîtriser aux mieux les facteurs connus pour influencer la réponse des organismes. En revanche, les deux approches n'ont pas pu identifier le composé provoquant la réponse, mais elles nous ont informés sur l'activité globale de l'échantillon. Ainsi, le degré de la toxicité du mélange de contaminants de l'eau souterraine de Mercier a été indiqué par ces essais biologiques qui nous ont fournis des résultats rapides et un diagnostic efficace de la pollution. La caractérisation chimique de ces eaux a montré qu'elles contiennent une large gamme de COV dont les teneurs excèdent les normes recommandées pour la qualité des eaux potables; chlorure de vinyle (92 µg/L); 1, 2 dichloroéthane (36 µg/L); 1, 1 dichloroéthène (8.5 µg/L); trichloroéthène (7.8 µg/L) (Tableau1, article 1) (US.EPA, 2006). Certains composés ont été détectés à des proportions variées par rapport à l'ensemble des échantillons mesurés; vinyle chlorure (38.5%); chlorobenzène (30.7%); benzène (23.1%); 1, 2-dichloroéthane (23.1%); éthylbenzène (23.1%); trichloroéthène (15.3%) (Tableau 1 et Figure.2, article 1).

Le plus grand nombre de COV détectés lors de la campagne d'échantillonnage effectuée d'octobre 2002 à Mai 2004 était dans les puits à 0,23 km et à 2.74 km des lagunes. Ce scénario s'est répété en 2009 et 2010 avec une plus grande concentration du vinyle chlorure (92 µg/L) et (4 µg/L) qui était enregistrée respectivement dans les puits à 0,23 km et 2,74 km. Ces résultats convergent avec la caractérisation des eaux souterraines qui conclut à l'existence d'une zone fortement polluée de 2 km² (Poulain et al., 1985). Cependant, si on considère juste le composé chlorure de vinyle, nous remarquerons qu'il y a eu une dilution dans la concentration de ce produit dans le panache de la contamination source. D'après Buschek et Alcantar (1995), c'est peut être la dispersion du panache de pollution sous l'effet de l'hétérogénéité du milieu qui est à l'origine de l'étalement de la pollution et qui a contribué à diluer les concentrations. En plus de la

décomposition des contaminants, ces deux mécanismes ont peut être contribué au phénomène d'atténuation et ont influencé la configuration des panaches de composés dissous. Plusieurs COV pouvaient être transformés ou dégradés dans les eaux souterraines, probablement à la suite du procédé d'atténuation naturelle. L'absence de concentration détectable d'un composé volatil pourrait être due soit à son atténuation, soit au niveau ci-dessous des capacités de détections analytiques (Bi et al., 2011).

Les concentrations en COV dans l'eau souterraine témoignent donc de la mobilité de ces composés chimiques. Cependant la mise en évidence des effets de ces substances présentes dans les eaux sur la truite exposée s'est heurtée à la complexité chimique des mélanges en présence et celle des processus de biotransformation. En faisant le lien entre les effets immunotoxiques observés et la présence de certains contaminants (article 1), il a été difficile de parler de relation cause-effet. En ce qui concerne les échantillons où les teneurs n'excédaient pas les normes recommandées, ceci n'exclue pas leur effet toxique sachant que l'eau présente un mélange de composés chimiques (non mesurés dans l'étude tels que les HAP et les PCB) qui interagissent entre eux. Au meilleur de nos connaissances, les données disponibles sur la toxicité des COV sont limitées. Le profil de ces eaux vient corroborer les résultats de plusieurs études de monitoring sur la qualité des eaux souterraines où les COV sont les contaminants les plus communs des eaux souterraines (Golfinopoulos et al., 2001; Han et al., 2012). Il est important de rappeler que la région d'étude est une zone agricole, donc il est difficile de discriminer la contribution des engrais et des pesticides dans les réponses observées. En revanche, le mélange complexe des substances chimiques présentes dans les eaux souterraines ne permet pas d'attribuer le potentiel toxique à une classe de contaminants. C'est dans ce contexte où les tests de toxicité confèrent certains avantages à l'évaluation de la qualité des effluents, entre autres, ils tiennent compte de la toxicité des substances non analysées. Plusieurs substances même à dose infinitésimale peuvent entraîner une pollution toxique du milieu aquatique. Cependant, beaucoup de données manquent sur leur potentiel toxique qui tient en compte leur biodisponibilité, de la synergie et l'antagonisme entre plusieurs substances. En plus de la substance toxique présente dans les échantillons, l'organisme peut aussi être exposé à des métabolites plus polaires excrétés qui se trouvent dans le milieu d'essai. Ainsi, ils contribueront à l'ensemble de la toxicité évaluée. On comprend donc la nécessité d'une évaluation globale de la toxicité par les tests biologiques qui viennent compléter les méthodes des analyses chimiques (Van Coillie, 1989). Cependant, les

essais réalisés en laboratoire ne peuvent donner qu'une idée approximative de la toxicité du milieu, ils ne permettent pas de refléter les conditions du milieu naturel.

L'utilisation de l'approche multi-biomarqueurs dans nos travaux apparaît indispensable pour le diagnostic des effets des contaminants sur les organismes et sur les écosystèmes aquatiques. La présente étude a permis d'utiliser plusieurs biomarqueurs qui se sont avérés pertinents au cours des expériences réalisées. Cependant, ces biomarqueurs ne sont pas spécifiques à un polluant donné.

L'étude s'est focalisée sur des anomalies du système immunitaire recherchées sur l'immunité non spécifique (phagocytose, les cellules tueuses (NK)) et sur l'immunité spécifique (la réponse de la prolifération des lymphocytes stimulée aux mitogènes (LPS et PHA)). Ces paramètres sont considérés comme des outils pour évaluer le système immunitaire (Zelikoff et al., 2000; Bols et al., 2001; Shelley et al., 2009). Nos résultats indiquent une altération des fonctions immunitaires en une immunosuppression et/ou une immunostimulation. Ces deux profils distincts d'immunostimulation et d'immunosuppression traduisent les interférences (antagonismes, synergie et additivité) sur les niveaux de la réponse immunitaire que peuvent engendrer une exposition à des effluents qui sont des mélanges complexes de substances organiques et inorganiques. La diminution de la phagocytose suggère une exposition à des contaminants immunotoxiques (Lacroix et al., 2001). L'échantillon d'eau à 2,74 km a provoqué une induction de l'activité des phagocytes et inversement, une inhibition a été observée à 1,17 km et 5,40 km. L'exposition au chlorure de vinyle produit une stimulation de la phagocytose et son métabolisme est un facteur clé dans cet effet (Gwinn et al., 2011). Les données ont montré que la réponse de prolifération des lymphocytes T a été inhibée à 2,74 km alors qu'elle a été stimulée à 5,40 km. Le dichloroéthane inhibe la prolifération des lymphocytes T (Zabrodskii et al., 1997). Le benzène à des concentrations plus faibles que 10 ppm, était immunotoxique. Une inhibition de la réponse de prolifération des lymphocytes B et T était observées chez des animaux exposés. La stimulation de l'activité des cellules NK observée est aussi une manifestation immunotoxique. Les poissons possèdent donc une balance entre le système innée et humorale. Une diminution de l'activité immunitaire innée, augmente la réponse immunitaire humorale afin de compenser cette suppression. Par ailleurs, certains paramètres paraissent plus sensibles que d'autres entre autres la phagocytose et la prolifération lymphoblastique. De plus, les toxiques peuvent agir sur le système

immunitaire en perturbant les membranes biologiques et l'homéostasie du calcium (Rice et al., 1995), puisque l'activité immunitaire dépend essentiellement de l'homéostasie du calcium. D'autres paramètres non spécifiques mesurés tels que le facteur de condition, l'index hepato-somatique n'ont pas été affectés par l'exposition.

L'activation du récepteur AhR (non mesurée dans notre étude) a été reconnue comme mécanisme par lequel de nombreux contaminants suppriment la réponse immunitaire adaptative. Plusieurs études ont montré que les biphenyls et les hydrocarbures ont des effets immunotoxiques sur le système immunitaire avec une activité directement liée à l'affinité du produit pour se lier à AhR. La plupart, sinon la totalité des cellules immunitaires expriment les protéines d'AhR y compris les lymphocytes (T et B) et les NK. Ces multiples cellules cibles expliquent pourquoi plusieurs toxiques exercent leur effet immunosuppresseur (Kervliet et al., 2009). Enfin, plusieurs mécanismes peuvent supprimer le système immunitaire; l'interaction avec le récepteur AhR, la perturbation de la membrane, la modification de la production des interleukines (IL), la perturbation de la métabolisation du calcium intracellulaire et l'activation du métabolisme en métabolites réactifs (White et al., 1994; Fent et al., 2004; Kennedey et al., 2008).

D'autre part, la mesure de paramètres biochimiques du métabolisme des espèces exposées a souvent été utilisée pour déceler les effets écotoxicologiques précoces. Ce type d'approche se caractérise par une grande sensibilité qui peut permettre de détecter des effets toxiques liés à des molécules à faible toxicité aiguë. Parmi les tests biochimiques retenus dans l'étude, l'induction de l'activité enzymatique (EROD) qui est liée au cytochrome P450. L'avantage de l'activité EROD est de répondre à de faibles concentrations des polluants. Son intérêt est qu'elle soit impliquée dans l'activation métabolique des xénobiotiques, conduisant à leur biotransformation en produits réactifs capable de générer des perturbations génotoxiques chez les poissons contaminés. Ce système est généralement inductibles. Plusieurs auteurs estiment que l'activité EROD présente la plus forte réponse aux inductions par des composés organiques tels que les HAP, les PCB et les COV (Burgeot et al., 1994 ; Flammarion et al., 1997 ; Lilly et al., 1998; Couillard et al., 2005; Gros et al., 2007; Polanikumar et al., 2012). Il réagit avec un grand nombre de composés présentant un caractère lipophile (Bucheli et al., 1995; Flammarion et al., 1997; Vander Oost et al., 1997). Leur toxicité est généralement liée à leur interaction avec la membrane biologique en augmentant leur perméabilité d'où une perturbation de la fonction

enzymatique (Roche et al., 2002). En ce qui concerne les réponses biochimiques dans notre étude, l'activité EROD représentait le marqueur le plus performant. Ce paramètre était l'acteur clé dans la discrimination des sites contaminés étudiés (Article 2). Dans les travaux de Gagné et al. (2012) sur l'exposition des hépatocytes aux contaminants issus des sables bitumineux, il semble que l'activité EROD était aussi le marqueur le plus performant (62% de performance).

Le deuxième biomarqueur était l'induction de l'activité GST qui a été largement rapportée chez des poissons exposés aux mélanges de substances chimiques (Qian et al., 2004; Correia et al., 2007; Otitoloju et al., 2011; Monferran et al., 2011). Les GST, enzymes de métabolisation sont inductibles par les contaminants, ce qui leur donne la particularité d'être utilisé en tant que marqueur (Narbonne et al., 1991; Marinez-Lara et al., 1997; Singh et al., 1999). Une diminution de l'activité GST dépendante de la durée d'exposition (14 jours) a été observée chez les poissons exposés aux eaux souterraines échantillonnées à 1.17 km des lagunes. Par conséquent, d'après Almeida et al. (2012), ces résultats suggèrent que la GST peut être impliquée dans la détoxification selon deux voies opposées: 1) promotion de la conjugaison avec le glutathion dans les réactions de la phase II, dont les résultats montrent une induction de l'activité; 2) en se fixant aux substances chimiques et/ou métabolites, réduisant ainsi la concentration pouvant induire des effets indésirables, ce qui entraîne la diminution de l'activité.

Les biomarqueurs de la réponse chronique peuvent inclure préférentiellement la mesure du dommage à l'ADN et la peroxydation lipidique (Martinez-Gomez et al., 2010). Il est à noter que les dommages à l'ADN (génotoxicité) sont extrêmes après un temps d'exposition plus long (14 jours dans notre cas) et présentent les réponses les plus fortes dans différents échantillons.

La peroxydation lipidique peut engendrer une génotoxicité et une perturbation de plusieurs signaux et voies métaboliques (Oliva et al., 2010). Des interrelations entre les réponses biochimiques ont aussi été observées, nous citerons celle de LPO et génotoxicité ($r=0,90$; $p<0,05$) dans le puits à 2,74 km. D'après cette corrélation, il semble que la génotoxicité avait comme origine la production accrue des ERO (Espèces Réactives de l'Oxygène). Cependant, la quantité des ERO accumulés dans le foie semblait être insuffisante pour provoquer la peroxydation lipidique, LPO n'étant pas affectée. Mais, les résultats ont montré une corrélation entre GST et LPO ($r= 0,88$; $p<0,05$) dans le puits à 5,40 km. Le MDA peut réagir avec des

antioxydants entraînant une diminution de la défense cellulaire (Otitolaju et al., 2011). Toutefois, nous ne pouvons pas accepter l'argument que l'activité de la GST est associée au stress oxydatif.

Dans le site à 2,74 km, une induction de la génotoxicité avec une inhibition de l'activité EROD avec une corrélation significative ($r=-0,91$; $p<0,05$) ont été notées chez les truites exposées. Ces résultats suggèrent que le dommage à l'ADN a pu inhiber l'activité EROD, mais il est difficile d'expliquer par quel mécanisme ceci a pu se produire. Ceci suggère aussi que les contaminants présents dans les échantillons sont associés à la génotoxicité et le toxique impliqué dans la réponse de génotoxicité ne requière pas une activation métabolique. Cette action directe correspond généralement à un groupe de produits chimiques tels que les agents alkylants considérés comme des génotoxiques à action directe (par exemple le sulfate de diméthyle, composé non mesuré dans l'étude qui est un produit utilisé dans l'industrie chimique et dans la production des substances chimiques en agriculture (Environnement Canada, 2009 dans <http://www.ec.gc.ca/ese-ees/default.asp?lang=Fr&n=21F912D1-1>).

Les toxiques sont généralement électrophiles et donc susceptibles de se lier de manière covalente avec les sites nucléophiles de l'ADN, perturbant ainsi le fonctionnement cellulaire. Le stress génotoxique induit des mécanismes cellulaires, tels que le blocage dans le cycle cellulaire ou l'apoptose (Didelot, 2002). L'apoptose a pu être déclenchée par des signaux émis à la suite de la cytotoxicité. Une augmentation dans le taux de cellules apoptotiques est un signal cellulaire d'altération (Battaglia et al., 2010). La fragmentation de l'ADN a été suggérée être l'un des premiers événements irréversibles déclenchant l'apoptose des cellules immunitaires. Les composés organiques volatiles et les métabolites de benzène sont connus pour induire l'apoptose chez des animaux exposés (Morozzi et al., 1999). Inversement, l'inhibition de l'apoptose peut conduire à plusieurs maladies (Banerjee et al., 2012). Dans cette étude, l'apoptose a été diminuée chez les truites exposées au site à 2,74 km avec une diminution concomitante de la prolifération des lymphocytes T. Ceci suggère que les cellules endommagées sont retirées du système par apoptose et l'immunité humorale est compromise. Par ailleurs, les résultats ont indiqué une perturbation dans le cycle cellulaire des lymphocytes après exposition des poissons à l'eau souterraine de Mercier. En effet, le pourcentage de cellules en phase G0/G1 a été significativement réduit en le comparant aux témoins. Ceci explique une diminution de la proportion des cellules qui entament la division cellulaire.

Les résultats obtenus avec le marqueur EROD sont difficiles à interpréter. À cause de la complexité du mélange, aux phénomènes d'induction et d'inhibition de l'activité enzymatique observés chez les truites exposées aux eaux de puits contaminés. On peut penser que l'inhibition de l'activité EROD observée dans l'échantillon à 2.74 km des lagunes à très faible concentration 3% est due à d'autres composés présents dans le milieu non mesurés dans l'étude qui sont rentrés en compétition avec les composés inducteurs de l'activité EROD. Parmi ces composés, nous supposons que les métaux en particulier le fer, seraient impliqué dans la réponse d'inhibition (le fer a été identifié dans les eaux souterraines de Mercier dans le rapport de Bape (1994)). Le fer composé relativement soluble dans l'eau, ses concentrations peuvent servir d'indicateur de dégradation anaérobie des mélanges d'hydrocarbures (Buschek et Alcantar, 1995). Une étude similaire a montré une inhibition d'EROD par le fer chez le rouget, ce qui suppose que ce composé présent dans les échantillons avec les polluants inducteurs est susceptible de provoquer des interactions antagonistes ou synergiques qui se traduisent par une induction ou une inhibition de l'activité (Perez et al., 2000). Dans le même échantillon, une inhibition de la prolifération des lymphocytes T stimulées avec du mitogène a été observée. Il se trouve que l'exposition des lymphocytes T à des concentrations de fer a pu aussi inhiber la réponse de prolifération des lymphocytes stimulées avec du PHA (Bryan et Leech, 1983). En plus de la substance toxique présente dans les échantillons, l'organisme peut aussi être exposé à des métabolites plus polaires excrétés qui se trouvent dans le milieu d'essai. Ainsi, ils contribueront à l'ensemble de la toxicité évaluée.

À la lumière des résultats obtenus sur le traitement à l'UTES, on peut conclure que l'unité ne peut réhabiliter la nappe phréatique. Les différentes classes de contaminants présents dans les eaux de l'UTES après traitement ont exercé des effets combinés d'induction et d'inhibition sur le système immunitaire. Cependant, à cause de la complexité du mélange, il est aussi difficile d'expliquer la relation cause-effet. Par ailleurs, l'UTES se comporte plutôt comme un système de confinement hydraulique qui limite la propagation des contaminants dans les eaux souterraines. En effet, les résultats ont montré que l'effluent de l'UTES, même après traitement affaiblirait le système immunitaire chez la truite, ce qui pourrait avoir un impact important pour la survie de ces organismes à plus long terme.

La caractérisation de la biodisponibilité des contaminants, la connaissance de la forme chimique des polluants permettra de mieux évaluer leur traitabilité par des procédés de décontaminations. Cependant, les résultats du traitement appliqué à l'UTES ne sont pas conformes aux attentes recommandées. Le peroxyde utilisé dans le procédé de traitement a très peu d'action sur les hydrocarbures (Voir Schéma du procédé de traitement, article 4). Le chlore employé actuellement amène un problème supplémentaire aux eaux de surfaces en formant des dérivées chlorées cancérigènes. Des travaux de Canistro et al. (2012) ont démontré un effet génotoxique et une modulation du cytochrome P450 chez des poissons (*Cyprinus carpio*) exposés pendant 10 jours aux eaux de surfaces traitées avec du chlore.

Nous proposons une amélioration du traitement par l'intégration d'un système d'ozonation qui permet l'oxydation des COV, le traitement des hydrocarbures. Les molécules ainsi dégradées en acide et alcool seront facilement prises en charge par l'environnement. Nous proposons aussi des coagulants organiques en alternative aux coagulants minéraux. Cependant, l'utilisation des polymères cationiques comme flocculant pendant la coagulation dans le traitement peut induire une toxicité. Les risques de toxicité sont liés à la formation de sous-produits reconnus cancérigènes de type nitrosamine. Dans les travaux de Rowland et al. (2000) la toxicité des eaux usées industrielles a réduit la population des *Ceriodaphnia dubia* exposée à cet effluent. Sur ce, un suivi renforcé de taux de traitement s'impose.

Pour conclure, nous dirons qu'un risque environnemental est déterminé par ; la dangerosité des substances chimiques tels que les COV, HAP, PCB et les métaux lourds (toxicité) et par ; l'exposition des milieux naturels à ces substances. Toutefois, les biomarqueurs étudiés ont permis d'établir un diagnostic du risque environnemental par ; la toxicité du mélange de composés chimiques et par ; l'exposition des eaux souterraines à ce mélange. Par ailleurs, les deux approches *in vitro* et *in vivo* ont permis une évaluation de l'activité globale de l'échantillon. Le mélange complexe des substances chimiques présentes dans les eaux souterraines de Mercier n'a pas permis d'attribuer le potentiel toxique à une classe de contaminants. Il est impossible d'identifier le toxique impliqué dans l'effet observé. En plus des substances chimiques présentes dans les eaux, l'organisme pouvait être exposé à des métabolites (non mesurés) plus polaires. Ainsi, ils contribuent à l'ensemble de la toxicité évaluée.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse mettent en évidence la pertinence de l'approche multibiomarqueurs (tableau1). Mais, ils soulignent aussi les limites de leur utilisation et nos lacunes dans la compréhension et l'interprétation des mécanismes qui expliquent les effets observés.

Tableau 1 : récapitulatif des biomarqueurs de toxicité mesurés et leurs effets

Marqueurs mesurés		Méthodes	Organes	Effets observés
Système immunitaire	Phagocytose	Cytométrie à flux	Pronéphros	+ /-
	Cytotoxicité des NK			+
	Prolifération lymphocytes B et T			+/-
	Apoptose-DEX			Résistance à l'apoptose
Cycle cellulaire	Perturbation du cycle en G0/G1 et arrêt en phase S			
Détoxification	EROD	Spectrophotométrie à fluorescence	Foie	+/-
	GST			+
ADN	Dommage			+
Stress oxydatif	Peroxydation lipidique			

+ Induction; - Inhibition; 0 pas d'effet

D'après l'analyse factorielle et discriminante effectuées pour discriminer les différents sites étudiés, ils semblent que la phagocytose, l'activité des lymphocytes B /T et l'activité EROD sont les acteurs clés dans la discrimination. De ce fait; ils seront considérés comme les biomarqueurs les plus sensibles qui pourraient être sélectionnés dans des études ultérieures.

À l'issue de notre étude, on pourrait émettre quelques recommandations pour le suivi environnemental de la qualité des eaux souterraines. La mesure des biomarqueurs dans la détermination du risque de pollution est incontournable, étant donné que la réponse du biomarqueur est plus sensible qu'une mesure de la mortalité ou de la reproduction. Dans notre étude, les biomarqueurs ont permis de mettre en évidence l'exposition à, ou les effets, d'un mélange de contaminants. Toutefois, leurs réponses sont interprétées comme un signal d'alerte d'apparition ultérieure de perturbations du fonctionnement de l'organisme, voire de la population. L'approche multi-marqueur a permis la multiplication des informations qui ont contribué à confirmer le risque potentiel du site contaminé (anciennes lagunes de Mercier). L'utilisation d'un seul paramètre apparaît critiquable. Ainsi, pour des études futures sur l'impact des eaux souterraines sur la faune aquatique, une approche par mesure d'une batterie de biomarqueurs est recommandée car il n'existe pas de biomarqueur idéal, ni informatif sur toutes les molécules chimiques. Des biomarqueurs d'exposition (EROD et GST) et d'effets (LPO et dommage à l'ADN) peuvent être intégrés avec les réponses sur le système immunitaire (la phagocytose, la prolifération lymphoblastique) afin de dresser un bilan sur la santé de l'environnement au complet. Cependant, ces biomarqueurs présentent certaines limites qui se résument comme suit :

1/ pas de réponse spécifique à un contaminant et les réponses immunologiques et biochimiques peuvent varier.

2/ des effets d'induction/ stimulation ou inhibition/suppression peuvent être mesurés lors d'une exposition.

3/ les réponses sont souvent dépendantes des contaminants et des concentrations (dilutions) testées.

4/ les réponses peuvent aussi varier selon la durée d'exposition et le type d'exposition; cellules « in vitro » ou individu entier « in vivo ».

Dans un contexte d'évaluation de risque, il serait important de tracer des profils de concentrations des contaminants des eaux souterraines (COVs, HAP, PCB et métaux lourds), en fonction de la distance par rapport aux anciennes lagunes. L'absence de données chimiques limite l'interprétation des réponses des biomarqueurs mesurés. Une reconstitution des mélanges de substances organiques (PCB, HAP ET COV) pour dégager des effets de synergie ou d'antagonisme est à recommander.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aarab N, Champwau O, Mora P, Daubeze M, Guarrigues P, Narbonne JF. 2004. Scoring approach based on fish biomarkers applied to French river monitoring. *Biomarkers* 9:258-270.

Al-Anati L, Héberg J, Stenius U. 2010. Non-dioxin-like PCBs interact with benzo[a]pyrene-induced p53-responses and inhibit apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 249(2):166-177.

Allan L, Sherr D. 2010. Disruption of human plasma cell differentiation by an environmental polycyclic aromatic hydrocarbon: a mechanistic immunotoxicological study. *Environmental Health* 9(1):15.

Amiard JC, Caquet T, Lagadic L. 1998. Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In: Lagadic,L.,Caquet,T., Amiard,J.J., Ramade,F. (Eds.). *Utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. Lavoisier, Londres, Paris, New York: pp. XXI-XXXI.

Arrignon J. 1998. Aménagement piscicole des eaux douces. 5e éd. (Paris : Lavoisier, TEC & DOC).

ATSDR. 2006. Toxicological profile for vinyl chloride. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, Géorgie.

ATSDR. 2007. Toxicological profile for benzene. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA(www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp3.html).

Aziz K, Nowsheen S, Pantelias G, Iliakis G, Gorgoulis VG, Georgakilas AG. 2012. Targeting DNA damage and repair: Embracing the pharmacological era for successful cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 133(3):334-350.

Bado-Nilles A, Quentel C, Auffret M, Le Floch S, Gagnaire B, Renault T, Thomas-Guyon H. 2009. Immune effects of HFO on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(5):1446-1454.

Bado-Nilles A, Quentel C, Mazurais D, Zambonino-Infante JL, Auffret M, Thomas-Guyon H, Le Floch S. 2011. In vivo effects of the soluble fraction of light cycle oil on immune functions in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linné). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(7):1896-1904.

Banerjee C, Goswami R, Verma G, Datta M, Mazumder S. 2012. *Aeromonas hydrophila* induced head kidney macrophage apoptosis in *Clarias batrachus* involves the activation of calpain and is caspase-3 mediated. *Developmental & Comparative Immunology* 37:323-333.

BAPE. 1994. Bureau d'Audiences Publiques sur l'Environnement du Québec (BAPE). *Restauration du lieu contaminé de Mercier*. Montréal,.222p.

Barnett JB, Brundage KM, Charlene AM. Immunotoxicology of Pesticides and Chemotherapies. *Comprehensive Toxicology*. Oxford: Elsevier. p 467-487.

- Battaglia CLR, Gogal Jr RM, Zimmerman K, Misra HP. 2010.** Malathion, lindane, and piperonyl butoxide, individually or in combined mixtures, induce immunotoxicity via apoptosis in murine splenocytes in vitro. *International Journal of Toxicology* 29(2):209-220.
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Sorbe JC, Burgeot T, Bellocq J. 1998.** Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin* 36:951-960.
- Belmeskine H, Haddad S, Vandelac L, Sauvé S, Fournier M. 2012.** Étude écotoxicologique du site de Mercier soumis aux impacts de l'incinérateur de déchets dangereux. Thèse soutenue 2012. Université du Québec. INRS-Institut Armand Frappier. 208p.
- Benoit DA, Puglisi FA, Olson DL. 1982.** A Fathead Minnow Pimephales promelas Early Life Stage Toxicity Test Method Evaluation and Exposure to Four Organic Chemicals Environ. Pollut., Ser A 28:189 - 197.
- Bernes C. 1998.** Persistent organic pollutants. Monitor 16. Swedish Environmental Protection Agency. ISBN 91-620-1189-8.
- Bi E, Liu Y, He J, Wang Z, Liu F. 2012.** Screening of Emerging Volatile Organic Contaminants in Shallow Groundwater in East China. *Ground Water Monitoring & Remediation* 32(1):53-58.
- Bianchet M, Odom E, Vasta G, Amzel L. 2002.** Nature Structural Biology. A novel fucose recognition fold involved in innate immunity(9):628e34.
- Binelli A, Cogni D, Parolini M, Riva C, Provini A. 2009.** Cytotoxic and genotoxic effects of in vitro exposure to Triclosan and Trimethoprim on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*)
- Boillot C. 2008.** Evaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques : contribution à l'amélioration de la phase "caractérisation des effets". Thèse. Villeurbanne : Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.
- Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LEJ. 2001.** Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology* 25(8-9):853-873.
- Brattgjerd S, Evensen O. 1996.** A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* in the head kidney phagocytes of experimentally infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Vet Pathologie Biologie*(33):55-65.
- Bravo CF, Curtis LR, Myers MS, Meador JP, Johnson LL, Buzitis J, Collier TK, Morrow JD, Laetz CA, Loge FJ and others. 2011.** Biomarker responses and disease susceptibility in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fed a high molecular weight PAH mixture. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(3):704-714.
- Bryan C, Leech S. 1983.** The immunoregulatory nature of iron: lymphocyte proliferation. *Cellular immunology* 75:71-79.
- Bucheli TD, Fent K. 1995.** Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 25(3):201-268.
- Burgeot T, Bocquene G, Pingray G, Godefroy D, Legrand J, Dimeet J, Marco F, Vincent F, Henocque Y, Jeanneret HO. 1994.** Monitoring biological effects of contamination in marine

fish along French coasts by measurement of ethoxyresorufin- O-deethylase activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 29:131-147.

Buschek TE, Alcantar CM. 1995. Regression Techniques and Analytical Solutions to Demonstrate Intrinsic Bioremediation. Dans: R.E. Hinchee, J.T. Wilson et D.C. Downey (éd.). *Intrinsic Bioremediation*. Batelle Press, Columbia, Ohio:109-116.

Canistro D, Melega S, Ranieri D, Sapone A, Gustavino B, Monfrinotti M, Rizzoni M, Paolini M. 2012. Modulation of cytochrome P450 and induction of DNA damage in *Cyprinus carpio* exposed in situ to surface water treated with chlorine or alternative disinfectants in different seasons. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 729(1-2):81-89.

Carlson EA, Li Y, Zelikoff JT. 2002. Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. *Aquat. Toxicol*(56):289-301.

Carlson EA, Li Y, Zelikoff JT. 2004. Benzo[a]pyrene-induced immunotoxicity in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): relationship between lymphoid CYP1A activity and humoral immune suppression. *Toxicology and Applied Pharmacology* 201(1):40-52.

Chen G, White PA. 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 567(2 and 3):151-225.

Cherry A. Groundwater Occurrence and Contamination in Canada. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences*, préparé pour le ministère des Pêches et des Océans (1987), Ottawa, Canadian Aquatic Resources, M.C. Healey et R.R. Wallace (éd.) 215:p. 395.

CIRC. 1979. Vinyl chloride, polyvinyl chloride and vinyl chloride-vinyl acetate copolymers. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum* 19:377.

Copat C, Brundo MV, Arena G, Grasso A, Oliveri Conti G, Ledda C, Fallico R, Sciacca S, Ferrante M. 2012. Seasonal variation of bioaccumulation in *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) and related biomarkers of exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 86:31-37.

Correia AD, Gongalves R, Scholze M, Ferreira M, Henriques MA-R. 2007. Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 347(1-2):109-122.

Coteur G, Danis B, Wantier P, Pernet P, Dubois P. 2005. Increased phagocytic activity in contaminated seastars (*Asterias rubens*) collected in the Southern Bight of the North Sea. *Marine Pollution Bulletin* 50(11):1295-1302.

Couillard CM, Lee K, Légaré B, King TL. 2005. Effect of dispersant on the composition of the water-accommodated fraction of crude oil and its toxicity to larval marine fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(6):1496-1504.

Crawford SS, Muir AM. 2008. Global introductions of salmon and trout in the genus *Oncorhynchus*: 1870-2007. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 18(3):313-344.

Crawford SS, Muir AM. 2008. Global introductions of salmon and trout in the genus *Oncorhynchus*: 1870-2007. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 18(3):313-344.

- Curtis LR, Garzon CB, Arkoosh M, Collier T, Myers MS, Buzitis J, Hahn ME. 2011.** Reduced cytochrome P4501A activity and recovery from oxidative stress during subchronic benzo[a]pyrene and benzo[e]pyrene treatment of rainbow trout. *Toxicology and Applied Pharmacology* 254(1):1-7.
- Danion M, Le Floch S, Lamour F, Guyomarch J, Quentel C. 2011.** Bioconcentration and immunotoxicity of an experimental oil spill in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(8):2167-2174.
- Danneving B, Lauve A, Press C, Landsverk T. 1994.** Receptor-mediated endocytosis and phagocytosis by rainbow trout head kidney sinusoidal cells. *Fish Shellfish Immunol* (4):3-18
- Dawson GW, Jennings AL, Drozdowski D, Rider E. 1977.** The Acute Toxicity of 47 Industrial Chemicals to Fresh and Saltwater Fishes. *J. Hazard. Mat* 1(4):303 - 318.
- De Guise S, Flipo D, Boehm JR, Martineau D, Béland P, Fournier M. 1995.** Immune functions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*): Evaluation of phagocytosis and respiratory burst with peripheral blood leukocytes using flow cytometry. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 47(3-4):351-362.
- De Guise S, Flipo D, Boehm JR, Martineau D, Béland P, Fournier M. 1995.** Immune functions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*): Evaluation of phagocytosis and respiratory burst with peripheral blood leukocytes using flow cytometry. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 47(3-4):351-362.
- De Guise S, Martineau D, Béland P, Fournier M. 1998.** Effects of in vitro exposure of beluga whale leukocytes to selected organochlorines. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 55(7):479-493.
- Del Rio-Tsonis K TP, Zarkadis IK, Tsagas AG, Lambris JD. 1998.** Expression of the third component of complement, C3, in regenerating limb blastema cells of urodeles. *Journal of Immunology*(161):6819e24.
- Didelot C. 2002.** Arrêts du cycle cellulaire et induction d'apoptose pour les lignées de carcinome humain de la tête et du cou HPV-18 positives, après exposition au 5-fluorouracile et aux radiations ionisantes : implication de NF-kB dans la radiosensibilité et l'apoptose spontanée. Thèse. UHP - Université Henri Poincaré http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCD_T_2002_0...
[Consulté 3/11/2013](#)
- Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk D. 2004.** Lipid peroxidation cannot be used as universal criteria of oxidative stress. *Progress Research* 43:200-227.
- Duffy JE, Zelikoff JT. 2006.** The relationship between noncoplanar PCB-induced immunotoxicity and hepatic CYP1A induction in a fish model. *Journal of Immunotoxicology* 3(1):39-47
- Dupuy AM, Terrier N, Sénécal L, Morena M, Leray H, Canaud B, Cristol J-P. 2003.** La CRP est-elle plus qu'un marqueur de l'inflammation ?. *Néphrologie* 24(7):pp. 337-341.
- Duvall E, Wyllie AH. 1986.** Death and the cell. *Immunol. Today* 7:115-19.
- Ellis AE. 2001.** Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology* 25(8 et 9):827-839.

- Environnement, Canada. 2011.** Présence et concentrations des pesticides prioritaires dans certains écosystèmes aquatiques canadiens. Direction des sciences et de la technologie de l'eau.
- Evans DL, Leary JH, Jaso-Friedmann. 2001.** Nonspecific cytotoxic cells and innate immunity regulation by programmed cell death. *Dev. Comp. Immunol.* 25(8-9):791-805.
- Ewens S, Wulferink M, Goebel C, Gleichmann E. 1999.** T cell-dependent immune reactions to reactive benzene metabolites in mice. *Archives of Toxicology* 73(3):159-167.
- Faisal M, Huggett RJ, . 1993.** Effects of aromatic hydrocarbons on the lymphocyte mitogenic responses in spot (*Leiostomus xanthurus*). *Mar. Environ. Res* 35:121-124.
- Faisal M, Weeks BA, Vogelbein WK, Huggett RJ. 1991.** Evidence of aberration of the natural cytotoxic cell activity in *Fundulus heteroclitus* (Pisces: Cyprinodontidae) from the Elizabeth River, Virginia *Veterinary Immunology and Immunopathology* 29(3-4):pp. 339-351.
- Fent K. 2003.** Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters* 140-141(0):353-365.
- Fernandes D, Zanuy S, Bebianno MJo, Porte C. 2008.** Chemical and biochemical tools to assess pollution exposure in cultured fish. *Environmental Pollution* 152(1):138-146.
- Ferrante MC, Mattace Raso G, Esposito E, Bianco G, Iacono A, Clausi MT, Amero P, Santoro A, Simeoli R, Autore G and others. 2011.** Effects of non-dioxin-like polychlorinated biphenyl congeners (PCB 101, PCB 153 and PCB 180) alone or mixed on J774A.1 macrophage cell line: modification of apoptotic pathway. *Toxicology Letters* 202(1):61-68.
- Flammarion P, Brion F, Babut M, Garric J, Migeon B, Noury P, Thybaud E. 2000.** Induction of fish vitellogenin and alterations in testicular structure: Preliminary results of oestrogenic effects in Chub (*Leucinus cephalus*). *Ecotoxicology* 9:127-135.
- Flammarion P. 1997.** Mesure in situ de l'induction du cytochrome P450 chez les cyprinidés d'eau douce. Optimisation de l'interprétation. Université de Metz: pp.107+annexes.
- Follezou JY, Emerit J, Bricaire F. 1999.** Neuro-degenerative diseases: role of reactive oxygen species and of apoptosis. *Presse Med* 28(30): pp. 1661-1666
- Fournier M, Dégas V, Colborn T, Omara FO, Denizeau F, Potworowski EF, Brousseau P. 2000.** Immunosuppression in mice fed on diets containing beluga whale blubber from the St Lawrence Estuary and the Arctic populations. *Toxicology Letters* 112-113:311-317.
- Franco R, Sanchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI. 2009.** Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: MÃ©trois. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 674(1-2):3-22.
- Frenzilli G, Nigro M, Scarcelli V, Gorbi S, Regoli F. 2001.** DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon. *Aquatic Toxicology* 53(1):19-32.
- Froystad MK, Rode M, Berg T, joen G. 1998.** A role for scavenger receptors in phagocytosis of protein-coated particles in rainbow trout head kidney macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 22(5-6):533-49.

- Fucic A, Barkovic D, Garaj-Vrhovac V, Kubelka D, Ivanic B, Dabo T, Mijic A. 1996.** A nine-year follow up study of a population occupationally exposed to vinyl chloride monomer. *Mutat. Res* 361:49-53.
- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Burgeot T, Renault T. 2006.** Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology* 22(1):1-14.
- Gagné F, Andre C, Douville M, Talbot A, Parrott J, McMaster M, Hewitt M. 2011.** An examination of the toxic properties of water extracts in the vicinity of an oil sand extraction site. *Journal of Environmental Monitoring* 13(11):3075-3086.
- Gagné F, André C, Skirrow R, Galinas M, Auclair J, van Aggelen G, Turcotte P, Gagnon C. 2012.** Toxicity of silver nanoparticles to rainbow trout: A toxicogenomic approach. *Chemosphere* 89(5):615-622.
- Gagné F, Blaise C, Fournier M, Hansen PD. 2006.** Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 143(2):179-186.
- Gagné F, Fortier M, Yu L, Osachoff HL, Skirrow RC, Van Aggelen G, Gagnon C, Fournier M. 2010.** Immunocompetence and alterations in hepatic gene expression in rainbow trout exposed to CdS/CdTe quantum dots. *Journal of Environmental Monitoring* 12(8):1556-1565.
- Galloway TS, Depledge MH. 2001.** Immunotoxicity in Invertebrates: Measurement and Ecotoxicological Relevance. *Ecotoxicology* 10(1):5-23.
- Garric J, Morin S, Vincent-Hubert F. 2010.** L'évaluation du risque toxique dans les milieux aquatiques. Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage. *Revue SET*. n°01:12-19.
- Gesto M, Tintos A, Rodríguez-Illamola A, Soengas JL, Méguéz JM. 2009.** Effects of naphthalene, 1^β-naphthoflavone and benzo(a)pyrene on the diurnal and nocturnal indoleamine metabolism and melatonin content in the pineal organ of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology* 92(1):1-8.
- Golfinopoulos SK, Lekkas TD, Nikolau AD. 2001.** Comparison of methods for determination of volatile organic compounds in drinking water. *Chemosphere*(45):275-284.
- Gravato C, Teles M, Oliveira M, Santos MA. 2006.** Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla* L. and the influence of pre-exposure to 1^β-naphthoflavone. *Chemosphere* 65(10):1821-1830.
- Griffin JM, Gilbert KM, Pumford NR. 2000.** Inhibition of CYP2E1 reverses CD4⁺ T-cell alterations in trichloroethylene-treated MRL^{+/+} mice. *Toxicological Sciences* 54(2):384-389.
- Gros M, Petrovic M, Barcelo D. 2007.** Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the ebro river basin (northeast Spain). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(8):1553-1562.
- Gwinn MR, Johns DO, Bateson TF, Guyton KZ. 2011.** A review of the genotoxicity of 1,2-dichloroethane (EDC). *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 727(1-2):42-53.

- Hahn ME, Stegeman JJ. 1994.** Regulation of Cytochrome P4501A1 in Teleosts: Sustained Induction of CYP1A1 mRNA, Protein, and Catalytic Activity by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran in the Marine Fish *Stenotomus chrysops*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 127(2):187-198.
- Hall EJ, Giaccia AJ. 2006.** *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins: p. 16.
- Han DM, Tong XX, Jin MG, Hepburn E, Tong CS, Song XF. 2012.** Evaluation of organic contamination in urban groundwater surrounding a municipal landfill, Zhoukou, China. *Environmental Monitoring and Assessment*:1-32.
- Hansen JD, Landis ED, Phillips RB. 2005.** Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102(19):6919-24.
- Hanson N, Larsson Å. 2009.** Experiences from a biomarker study on farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) used for environmental monitoring in a Swedish river. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(7):1536-1545.
- Hawkins SA, Billiard SM, Tabash SP, Brown RS, Hodson PV. 2002.** Altering cytochrome P4501A activity affects polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol.Chem. Res. Toxicol.* 21:1845-1853.
- He X, Nie X, Yang Y, Liu X, Pan D, Cheng Z, Liang X. 2012.** Multi-biomarker responses in fishes from two typical marine aquaculture regions of South China. *Marine Pollution Bulletin* 64(11):2317-2324.
- Hébert N, Gagné F, Cejka P, Cyr D, Marcogliese DJ, Blaise C, Pellerin J, Fournier M. 2008.** The effects of a primary-treated municipal effluent on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Exposure duration and contribution of suspended particles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 148(3):258-264.
- hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 150(1):50-56.
- Hoeger B, Hitzfeld B, Köllner B, Dietrich DR, van den Heuvel MR. 2005.** Sex and low-level sampling stress modify the impacts of sewage effluent on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune system. *Aquatic Toxicology* 73(1):79-90.
- Hoeger B, van den Heuvel MR, Hitzfeld BC, Dietrich DR. 2004.** Effects of treated sewage effluent on immune function in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 70(4):345-355.
- Hogan NS, Lee KS, Köllner B, van den Heuvel MR. 2010.** The effects of the alkyl polycyclic aromatic hydrocarbon retene on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response. *Aquatic Toxicology* 100(3):246-254.
- Holladay SD, Smith BJ, Gogal Jr RM. 2010.** Exposure to formaldehyde at therapeutic levels decreases peripheral blood lymphocytes and hematopoietic progenitors in the pronephros of tilapia *Oreochromis*

Holladay SD, Smith BJ. 1995. Alterations in murine fetal thymus and liver hematopoietic cell populations following developmental exposure to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Environ Res* 68:106 - 113.

Holladay SD, Smith SA, Besteman EG, Deyab ASMI, Gogal RM, Hrubec T, Robertson JL, Ahmed SA. 1998. Benzo[a]pyrene-induced hypocellularity of the pronephros in tilapia (*Oreochromis niloticus*) is accompanied by alterations in stromal and parenchymal cells and by enhanced immune cell apoptosis. *Veterinary, Immunology and Immunopathology.* 64:69-82.

Hotchkiss JA, Andrus AK, Johnson KA, Krieger SM, Woolhiser MR, Maurissen JP. 2010. Acute toxicologic and neurotoxic effects of inhaled 1,2-dichloroethane in adult Fischer 344 rats. *Food and Chemical Toxicology* 48(2):470-481.

Huang C-Y, Huang K-L, Cheng T-J, Wang J-D, Hsieh L-L. 1997. The GST T1 and CYP2E1 genotypes are possible factors causing vinyl chloride induced abnormal liver function. *Archives of Toxicology* 71(8):482-488.

IARC. 1979. 1,2-Dichloroethane, in: Some Halogenated hydrocarbons (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.:pp. 429-448.

Iliakis G, Wang Y, Guan J, Wang H. 2003. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 22:5834-47.

Jifa W, Zhimin Y, Xiuxian S, You W. 2006. Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicus*) exposed to benzo (a) pyrene and sodium dodecyl-benzene sulfonate. *Ecotoxicol. Environ. Safe* 65:pp. 230-236.

Jolly S, Bado-Nilles A, Lamand F, Turies C, Chadili E, Porcher JM, Betouille S, Sanchez W. 2012. Multi-biomarker approach in wild European bullhead, *Cottus sp.*, exposed to agricultural and urban environmental pressures: Practical recommendations for experimental design. *Chemosphere* 87(7):675-683.

Jovanovic B, Palic D. 2012. Immunotoxicology of non-functionalized engineered nanoparticles in aquatic organisms with special emphasis on fish in Review of current knowledge, gap identification, and call for further research. *Aquatic Toxicology* 118-119(0):141-151.

Kakuta I. 1997. Effect of sewage on blood parameters and the resistance against bacterial infection of goldfish, *Carassius auratus*. *Environmental Toxicology and Water Quality* 12(1):43-51.

Kennedy CJ, Farrell AP. 2008. Immunological alterations in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasii*, exposed to aqueous hydrocarbons derived from crude oil. *Environmental Pollution* 153(3):638-648.

Kerambrun E, Henry F, Marechal A, Sanchez W, Minier C, Filipuci I, Amara R. 2012. A multibiomarker approach in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*

Kerkvliet NI, Shepherd DM, Baecher-Steppan L. 2002. T lymphocytes are direct, aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): AhR expression in both CD4+ and CD8+ T cells is necessary for full suppression of a cytotoxic T lymphocyte response by TCDD. *Toxicol Appl Pharmacol* 185:146 - 152.

- Kiss T. 2010.** Apoptosis and its functional significance in molluscs. *Apoptosis* 15(3):313-321.
- Kollner B, Kotterba G. 2002.** Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after intraperitoneal immunisation with *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.* 12(1):35-48.
- Konemann H. 1981.** Quantitative Structure-activity Relationships in Fish Toxicity Studies, Part 1: Relationship for 50 Industrial Pollutants. *Toxicology* 19:209 - 221.
- Kum Kum K, Stephen PJ. 2001.** DNA double-strand breaks: signalling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics* 27: p. 247-254.
- Kumar A, Sushama A, Rohil V, Manral S, Gangopadhyay S, Prasad A, Raj H, Parmar V. 2011.** Prevention of benzene-induced genotoxicity in bone marrow and lung cells: superiority of polyphenolic acetates to polyphenols. *Archives of Toxicology* 85(9):1141-1150.
- Lacroix A, Fournier M, Lebeuf M, Nagler JJ, Cyr DG. 2001.** Phagocytic response of macrophages from the pronephros of American plaice (*Hipoglossoides platessoides*) exposed to contaminated sediments from Baie des Anglais, Quebec. *Chemosphere* 45(4-5):599-607.
- Lagaric L, Caquet T, Ramade F, Amiard JC. 1998.** Biomarqueurs en écotoxicologie. Collection Écologie, Masson. Landis, W.G. & M-H. Yu, 1995.
- Le Du-Lacoste M, Akcha F, Dvier M-H, Morin B, Burgeot T, Budzinski H. 2012.** Comparative study of different exposure routes on the biotransformation and genotoxicity of PAHs in the flatfish species, *Scophthalmus maximus*. *Environmental Science and Pollution Research*:1-18.
- Lee JY, Kim JY, Lee YG, Shin WC, Chun T, Rhee MH, Cho JY. 2007.** Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, reduces macrophage-mediated immune responses. *Molecules and Cells* 23(2):198-206.
- Lefebvre F, Mounaix B, Poizat G, Crivelli A. 2004.** Impacts of the swim bladder nematode *Anguillicola crassus* on *Anguilla anguilla*: variations in liver and spleen masses. *J Fish Biol*(64):435-47.
- Lesage S, Jackson RE, Priddle MW, Riemann PG. 1990.** Occurrence and Fate of Organic Solvent Residues in Anoxic Groundwater at the Gloucester Landfill, Canada. *Environ. Sci. Technol* 24(4):559 – 566.
- Levin M, Morsey B, Mori C, Nambiar PR, De Guise S. 2005.** Non-coplanar PCB-mediated modulation of human leukocyte phagocytosis: A new mechanism for immunotoxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 68(22):1977-1993.
- Li ZH, Zlabek V, Li P, Grabic R, Velisek J, Machova J, Randak T. 2012.** Biochemical and physiological responses in liver and muscle of rainbow trout after long-term exposure to propiconazole. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(6):1391-1396.
- Lilly PD, Thornton-Manning JR, Gargas ML, Clewell HJ, Andersen ME, Manning JRT. 1998.** Kinetic characterization of CYP2E1 inhibition in vivo and in vitro by the chloroethylenes. *Archives of Toxicology* 72(10):609-621.

MacDonald GZ, Hogan NS, Kollner B, Thorpe KL, Phalen LJ, Wagner BD, van den Heuvel MR. 2013. Immunotoxic effects of oil sands-derived naphthenic acids to rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 126:95-103.

Mackay D, Shiu WY, Ma KC. 1992. Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Lewis Publishers, Boca Raton, FL Volume 1.

Madureira TV, Rocha MJ, Cruzeiro C, Rodrigues I, Monteiro RAF, Rocha E. 2012. The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal): Evaluation of impacts on fish liver, by histopathology, stereology, vitellogenin and CYP1A immunohistochemistry, after sub-acute exposures of the zebrafish model. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 34(1):34-45.

Maggioni T, Hued AC, Monferran MV, Bonansea RI, Galanti LN, Amé MV. 2012. Bioindicators and biomarkers of environmental pollution in the middle-lower basin of the suquaa river (cordoba, argentina). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 63(3):337-353.

Manning M, Nakanishi T. 1996. The specific immune system: cellular defenses. In: Iwama G, Nakanishi T, editors. *The fish immune system. Organism, pathogen and environment.* San Diego, CA: Academic Press:p. 103-205.

Marabini L, Calo R, Fucile S. 2011. Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153, 138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2). *Toxicology in Vitro* 25(5):1045-1052.

Martinez-Gomez C, Vethaak AD, Hylland K, Burgeot T, Kohler A, Lyons BP, Thain J, Gubbins MJ, Davies IM. 2010. A guide to toxicity assessment and monitoring effects at lower levels of biological organization following marine oil spills in European waters. *ICES Journal of Marine Science* 67(6):1105-1118.

Mattes TE, Alexander AK, Coleman NV. 2010. Aerobic biodegradation of the chloroethenes: pathways, enzymes, ecology, and evolution. *FEMS Microbiology Reviews* 34(4):445-475.

McCarthy JF, Shugart LR. 1990. Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers. Chelsea, Mich:457pp.

McNeill SA, Arens CJ, Hogan NS, Köllner B, van den Heuvel MR. 2012. Immunological impacts of oil sands-affected waters on rainbow trout evaluated using an in situ exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 84:254-261.

Ménard L, Escarné R, Marcogliese DJ, Cyr D, Fournier M, Gagné F. 2010. The impacts of urban pollution on the immune system of spottail shiners (*Notropis hudsonius*) in the St. Lawrence River. *Fresenius Environmental Bulletin* 19(7):1369-1374.

Michel F, Bonnefont-Rousselot D, Mas E, Draï J, Théron P. 2008. Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques revue générale. *Annales de Biologie Clinique* 66(Numéro 6):605-20.

Milinkovitch T, Godefroy J, Théron M, Thomas-Guyon H. 2010. Toxicity of dispersant application: Biomarkers responses in gills of juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*). *Environmental Pollution* 159(10):2921-2928.

- Monferran MV, Galanti LN, Bonansea RI, Amé MV, Wunderlin DA. 2011.** Integrated survey of water pollution in the Suqu a River basin (Córdoba, Argentina). *Journal of Environmental Monitoring* 13(2):398-409.
- Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. 2002.** What is a natural killer cell? *Nat Immunol* 3(1):1529-2908.
- Morozzi G, De Bartolomeo A, Fabiani R, Rosignoli P, Lepore L. 1999.** Induction of DNA-damage and apoptosis by volatile organic compounds and by benzene metabolites. *Igiene Moderna* 112(4):1503-1513.
- Mos L, Morsey B, Jeffries SJ, Yunker MB, Raverty S, De Guise S, Ross PS. 2006.** Chemical and biological pollution contribute to the immunological profiles of free-ranging harbor seals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(12):3110-3117.
- Mu J-l, Wang X-h, Jin F, Wang J-y, Hong H-s. 2012.** The role of cytochrome P4501A activity inhibition in three- to five-ringed polycyclic aromatic hydrocarbons embryotoxicity of marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Marine Pollution Bulletin* 64(7):1445-1451.
- M ller C, Ruby S, Brousseau P, Cyr D, Fournier M, Gagné F. 2009.** Immunotoxicological effects of an activated-sludge-treated effluent on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 150(3):390-394.
- Nahrgang J, Jonsson M, Camus L. 2010.** EROD activity in liver and gills of polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to waterborne and dietary crude oil. *Marine Environmental Research* 70(1):120-123.
- Narbonne J-F, Daubeze M, Baumard P, Budzinski H, Clerandeanu C, Akcha F, Mora P, Garrigues P. 2001.** Biochemicals markers in mussels, *Mytilus* sp. and pollution monitoring in European coasts: data analysis in *Biomarkers in Marine Organisms: a practical approach*. edited by P. B. Garrigues, H. Walker, H.C and Narbonne, J-F. Amsterdam:pp 216-238.
- NARBONNE JF, GARRIGUES P, RIBERA D, RAOUX C, MATHIEU A, LEMAIRE P, SALAUN JP, LAFAURIE M. 1991.** Mixed function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: Field studies on the French coast of the Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 100C:37-42.
- Nigro M, Frenzilli G, Scarcelli V, Gorbi S, Regoli F. 2002.** Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. *Marine Environmental Research* 54(3-5):517-520.
- Nunez R. 2001.** DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol* 3(3):67-70.
- Oliva M, Gonzalez de Canales ML, Gravato C, Guilhermino L, Perales JA. 2010.** Biochemical effects and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in senegal sole (*Solea*).
- Oliveira M, Pacheco M, Santos MA. 2008.** Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene. *Science of the Total Environment* 396(1):70-78.
- Otitoloju A, Olagoke O. 2011.** Lipid peroxidation and antioxidant defense enzymes in *Clarias gariepinus* as useful biomarkers for monitoring exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Monitoring and Assessment* 182(1-4):205-213.

Pakdel H, Couture G, Roy C, Masson A, Locat J, Gelinas P, Lesage S. 1992. Developing Methods for the Analysis of Toxic Chemicals in Soil and Groundwater: The Case of Ville Mercier, Quebec, Canada » (chap. 13), Groundwater Contamination and Analysis at Hazardous Waste Sites,. S. Lesage et R.E. Jackson (éd.), Marcel Dekker, Inc., New York, NY:p. 381.

Palanikumar L, Kumaraguru AK, Ramakritinan CM, Anand M. 2011. Biochemical response of anthracene and benzo [a] pyrene in milkfish *Chanos chanos*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 75(0):187-197.

Parsons F, Wood PR, DeMarco J. 1984. Transformations of tetrachloroethene and trichloroethene in microcosms and groundwater. *J. Am. Water Works Assoc* 26:56-59.

Peng D, Jiaying W, Chunhui H, Weiyi P, Xiaomin W. 2012. Study on the cytogenetic changes induced by benzene and hydroquinone in human lymphocytes. *Human and Experimental Toxicology* 31(4):322-335.

Pilarczyk JK, Correia AD. 2009. Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to pyrene and fluorene. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol* 372:pp. 49-57.

Pohl HR, Scinicariello F. 2012. The impact of CYP2E1 genetic variability on risk assessment of VOC mixtures. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 59(3):364-374.

Poirier M, Fournier M, Brousseau P, Morin A. 2002. Effects of volatile aromatics, aldehydes, and phenols in tobacco smoke on viability and proliferation of mouse lymphocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 65(19):1437-1451.

Poulin M, Simard G, Sylvestre M. 1985. (Groundwater pollution by organic compounds at Mercier, Quebec). *Pollution des eaux souterraines par les composés organiques à Mercier, Quebec.* 2:125-131.

Prime J, Fournier M. 2008. Création d'un réseau de recherche interuniversitaire et multidisciplinaire sur les problématiques environnementales associées au site des lagunes de Mercier: Rapport préparé par le Centre interinstitutionnel de recherche en écotoxicologie (CIRÉ).224p.

Qian Y, Yin D, Li Y, Wang J, Zhang M, Hu S. 2004. Effects of four chlorobenzenes on serum sex steroids and hepatic microsomal enzyme activities in crucian carp, *Carassius auratus*. *Chemosphere* 57(2):127-133.

QUÉBEC, MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT ET DE LA FAUNE. 1996. État de l'écosystème aquatique du bassin de la rivière Châteauguay, 1979-1994. Québec : le Ministère, Direction des écosystèmes aquatiques:13 p.

QUÉBEC, MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT ET DE LA FAUNE. 1997. Opérations régionales : Inventaire des dépôts de pneus hors d'usage sur le territoire de chacune des directions régionales de l'Environnement et de la Faune du Québec. Québec : le Ministère, Direction des opérations régionales:82 p.

Quinn B, Gagné F, Weber J-P, Blaise C. 2005. Ecotoxicological effects of a semi-submerged municipal dump (Castle harbour, Bermuda) on the Calico scallop *Argopecten gibbus*. *Marine Pollution Bulletin* 51(5-7):534-544.

Rauta PR, Nayak B, Das S. 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunology Letters* 148(1):23-33.

Reynaud S, Deschaux P. 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquatic Toxicology* 77(2):229-238

Roche H, Buet, A. and Ramade, F. 2002. Accumulation of Lipophilic Microcontaminants and Biochemical Responses in Eels from the Camargue Biosphère Reserve. *Ecotoxicology* 11:155-164.

Rowland CD, Burton GA, Morrison SM. 2000. Implication of polymer toxicity in a municipal wastewater effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(8):2136-2139.

Salo HM, Hébert N, Dautremepuits C, Cejka P, Cyr DG, Fournier M. 2007. Effects of Montreal municipal sewage effluents on immune responses of juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 84(4):406-414.

Sanchez-Dardon J, Voccia I, Hontela A, Chilmonczyk S, Dunier M, Boermans H, Blakley B, Fournier M. 1999. Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vivo. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(7):1492-1497.

Scott WB, Crossman EJ. 1974. Poisson d'eau douce du Canada, bulletin 184. (Ottawa : Office des recherches sur les pêcheries du Canada).

Secombes CJ, Fletcher TC, O'Flynn JA, Costello MJ, Stagg R, Houlihan DF. 1991. Immunocompetence as a measure of the biological effects of sewage sludge pollution in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 100(1-2):133-136.

Selvakumar K, Bavithra S, Suganthi M, Benson C, Elumalai P, Arunkumar R, Krishnamoorthy G, Venkataraman P, Arunakaran J. 2012. Protective Role of Quercetin on PCBs-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Hippocampus of Adult Rats. *Neurochemical Research* 37(4):708-721.

senegalensis) from a Huelva estuary (SW Spain). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(8):1842-1851.

Sharma RP, Yakel HO, Gehring PJ. 1980. Immunotoxicologic studies with vinyl chloride in rabbits and mice. *International Journal of Immunopharmacology* 2(4):295-299.

Shelley LK, Balfry SK, Ross PS, Kennedy CJ. 2009. Immunotoxicological effects of a sub-chronic exposure to selected current-use pesticides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 92(2):95-103.

Shelley LK, Osachoff HL, van Aggelen GC, Ross PS, Kennedy CJ. 2013. Alteration of immune function endpoints and differential expression of estrogen receptor isoforms in leukocytes from 17 β -estradiol exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 180:24-32.

Shelley LK, Ross PS, Kennedy CJ. 2012. Immunotoxic and cytotoxic effects of atrazine, permethrin and piperonyl butoxide to rainbow trout following in vitro exposure. *Fish and Shellfish Immunology* 33(2):455-458.

Shen K, Shen C, Yu J, Yu C, Chen L, Shi D, Chen Y. 2010. PCB congeners induced mitochondrial dysfunction in Vero cells. *Journal of Hazardous Materials* 185(1):24-28.

Singh MP, Mishra M, Sharma A, Shukla AK, Mudiam MKR, Patel DK, Ram KR, Chowdhuri DK. 2011. Genotoxicity and apoptosis in *Drosophila melanogaster* exposed to benzene, toluene and xylene: Attenuation by quercetin and curcumin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 253(1):14-30

Siwicki AK, Robak S. 2011. The innate immunity of European eel (*Anguilla anguilla*) growing in natural conditions and intensive system of rearing. *Central-European Journal of Immunology* 36(3):130-134.

Slooff W, Janus JA, Matthijsen AJCM, Montizaan GK, Ros JPM. 1989. Integrated Criteria Document PAHs. National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM), Buthoven, Netherlands, Report no. 758474011:199 p.

Song J-Y, Nakayama K, Kokushi E, Ito K, Uno S, Koyama J, Rahman MH, Murakami Y, Kitamura S-I. 2012. Effect of heavy oil exposure on antibacterial activity and expression of immune-related genes in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(4):828-835.

Staal YCM, Hebels DGAJ, van Herwijnen MHM, Gottschalk RWH, van Schooten FJ, van Delft JHM. 2007. Binary PAH mixtures cause additive or antagonistic effects on gene expression but synergistic effects on DNA adduct formation. *Carcinogenesis* 28(12):2632-2640.

Stephen PJ. 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*. Oxford University Press 23(5) :p. 687-696.

Sweeney MH, Saghir SA, Gargas ML. 2008. Physiologically based pharmacokinetic model development and simulations for ethylene dichloride (1,2-dichloroethane) in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol* 51:311-323.

Tahir A, Fletcher T, Houlihan D, Secombes C. 1993. Effect of short-term exposure to oil contaminated sediments on the immune response of dab, *Limanda limanda*. *Aquat Toxicol* 27:71-82.

Theodorakis C, Bickham J, Donnelly K, McDonald T, Willink P. 2012. DNA damage in cichlids from an oil production facility in Guatemala. *Ecotoxicology* 21(2):496-511.

Toussaint MW, Wolfe MJ, Burton DT, Hoffmann FJ, Shedd TR, Gardner Jr HS. 1999. Histopathology of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) chronically exposed to a complex environmental mixture. *Toxicologic Pathology* 27(6):652-663.

Triggiani M, Loffredo S, Granata F, I. Staiano R, Marone G. 2011. Modulation of Mast Cell and Basophil Functions by Benzene Metabolites. *Current Pharmaceutical Design* 17(34):3830-3835.

USEPA. 2006. of the Drinking Water Standards and Health Advisories (EPA 822-R-06-013). Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

- Uzma N, Kumar BS, Hazari MAH. 2010.** Exposure to benzene induces oxidative stress, alters the immune response and expression of p53 in gasoline filling workers. *American Journal of Industrial Medicine* 53(12):1264-1270.
- Van Coillie, R. 1989.** Problématique écotoxicologique du mercure dans les réservoirshydroélectriques nordiques du Québec pour le projet hydroélectrique de Grande Baleine. Environnement Canada, Direction de la protection de l'environnement, Montréal, 16 p.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13(2):57-149.
- Veraldi A, Costantini AS, Bolejack V, Miligi L, Vineis P, Van Loveren H. 2006.** Immunotoxic effects of chemicals: A matrix for occupational and environmental epidemiological studies. *American Journal of Industrial Medicine* 49(12):1046-1055.
- Wakeham SG, Schaffer C, Giger W. 1980.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Recent Lake Sediments - I. Compounds Having Anthropogenic Origins. *Geochim. Cosmochim. Acta* 44:403-413.
- WARNE M, HAWKER D. 1995.** The number of components in a mixture determines whether synergistic and antagonistic or additive toxicity predominate: The funnel hypothesis. *Ecotox Env Saf* 31:23-28.
- White KL, Holsapple MP. 1984.** Direct suppression of in vitro antibody production by mouse spleen cells by the carcinogen benzo(a)pyrene but not by the noncarcinogenic congener benzo(e)pyrene. *Cancer Res* 44:3388 - 3393.
- White PA, Robitaille S, Rasmussen JB. 1999.** Heritable reproductive effects of benzo(a)pyrene on the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 18: pp. 1843-1847.
- Whyte SK. 2007.** The innate immune response of finfish "A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology* 23(6):1127-1151.
- Wong S, Fournier M, Coderre D, Banska W, Krzystyniak K. 1992.** Environmental Immunotoxicology, In *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*. Peakall Edit., Chapman and Hall. London:167-189.
- Xiao F, Feng X, Zeng M, Guan L, Hu Q, Zhong C. 2012.** Hexavalent chromium induces energy metabolism disturbance and p53-dependent cell cycle arrest via reactive oxygen species in L-02 hepatocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 371(1-2):65-76.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. 1997.** Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked *Science of The Total Environment* 275:1129-32.
- Yu X-Q KM. 2003.** Developmental and Comparative Immunology *Manduca sexta* lipopolysaccharide-specific immunlectin-2 protects larvae from bacterial infection(27):189e96.
- Zabrodskii P, Troshkin N, Mandych V. 2004.** Stimulation of immunotoxicity of chemicals metabolizing in vivo into highly toxic compounds by the monooxygenase system inductors. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 138(4):369-371.

Zabrodskii PF, Kirichuk VF, Gryzunov AV. 1997. Changes in the nonspecific and immunological resistance during acute dichlorethane poisoning. 123(1):51-53.

Zabrodskii PF, Mandych VG, Germanchuk VG. 2006. Inhibition of cytochrome P-450 with 2-diethylaminoethyl-2,2-diphenylpropylacetate (SKF-525A) reduces immunotoxicity of chlorinated carbohydrates. Bulletin of Experimental Biology and Medicine 142(3):324-326.

Zapata AG CE. 1990. The immune system: comparative histophysiology. Chichester: John Wiley and Sons.

Zelikoff JT, Carlson E, Li Y, Raymond A, and Duffy J. 2002. Immunotoxicity biomarkers in fish: Development, validation and application for field studies and risk assessment. Hum. Ecotoxicol. Risk Assessment 8:253-263.

Zelikoff JT, Smialowicz R, Bigazzi PE, Goyer RA, Lawrence DA, Maibach HI, Gardner D. 1994. Immunomodulation by Metals. Fundamental and Applied Toxicology 22(1):1-7.

Zhang Y, Geißen S-U, Gal C. 2008. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. Chemosphere 73(8):1151-1161.

Zhang Z, Swain T, Bagwald J, Dalmo RA, Kumari J. 2009. Bath immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry induces enhancement of inflammatory cytokine transcripts, while repeated bath induce no changes. Fish and Shellfish Immunology 26(5):677-684.

Zwart L, Meerman J, Commandeur J. 1999. Biomarkers of free radical damage. Applications in experimental animals and in humans. Free Radic Biol Med 26:202-26.

SITES WEB CONSULTÉS

Anatomie poisson

http://bio1151b.nicerweb.net/Locked/media/ch34/34_16TroutAnatomy_L.jpg.

Consulté 01 /12/ 2012.

Apotose.

http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours/biocell/biopath_cell/prion/apoptose.html. Consulté le 12/11/2013.

<http://cytometrie.crc.chus.qc.ca/> .

Consulté 11/11/2013.

Consultation publique sur la gestion de l'eau au Québec.

(<http://www.bape.gouv.qc.ca/sections/rapports/publications/bape085.pdf>).

(<http://recherched.gouv.qc.ca/internet/cached.do?idx=0&id=259836&query=Mercier>).

<http://www.ec.gc.ca/ese-ees/default.asp?lang=Fr&n=21F912D1-1>).

Consulté le 08/11/2013.

Consultation publique sur la gestion de l'eau au Québec.

<http://www.bape.gouv.qc.ca/sections/archives/eau/docdeposes/lesdocumdeposes/gene108-1.pdf>).

Consulté 15/06/2013.

Cycle cellulaire.

<http://www.bing.com/images/search?q=cycle+cellulaire&FORM=HDRSC2#view=detail&id=3ADE8E515A8181D3DF7CF449227DF61E79BD5BB7&selectedIndex=17>

Consulté 22 /07/2013.

Environnement Canada.

<http://www.ec.gc.ca/eau-water/default.asp?lang=Fr&n=6A7FB7B2-1>).

Consulté le 15/06/2013.

Environnement Canada.

<http://www.ec.gc.ca/eau-water/default.asp?lang=Fr&n=6A7FB7B2-1>.

Consulté 02/12/ 2012.

Santé Canada.

<http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/benzene/index-fra.php>

Consulté 02/12/ 2012.

Santé Canada.

<http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/consult/ 2012/vinyl/draft-ebauche-fra.php>

Consulté 02/12/2012.

Santé Canada.

(http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/psl1-lsp1/hydrocarb_aromat_polycycl/hydrocarb_aromat_polycycl_4-fra.php).

Consulté le 18/06/2013.

ANNEXES

ANNEXE A: RÉSULTATS DE L'ÉTUDE PILOTE

Poissons fournis par la ferme aquacole (Les Arpents Verts)

Acclimatation 15 jours avant l'exposition pilote.

Conditions d'exposition:

✚ Poids moyen des poissons utilisés: $25,55 \text{ g} \pm 3,89$

✚ Taille moyenne: $133\text{mm} \pm 0,81$

**A-1 Suivi des paramètres physico-chimique de l'eau d'exposition (eau d'acclimatation)
(Tableau 1et2)**

Tableau A-1: suivi des paramètres physico-chimiques de l'eau des chaudières A et B.

Projet Mercier Étude pilote		Fiche n°2																		
N° Chaudière CHA-CHB-CHC-CHD																				
Mois mars-11		A+B 2X/S Renouvellement 2 fois par semaine																		
2		C+D 1X/S Renouvellement 1 fois par semaine																		
CHA	Temp	0 (%)	pH	Cond	NO2	NO3	NH3	REN 2X/S	REN 1X/S		CHB	Temp	0 (%)	pH	Cond	NO2	NO3	NH3	REN 2X/S	REN 1X/S
1	13,3	88,2	6,98	293		0,34	0,012	1	1		1	13,8	81,6	6,78	292		0,35	0,02	1	1
2	10,8	93,4		312						calibrer	2	11,3	83,6		308					
3	12,6	94,6		301						sonde	3	12,4	94,3		314					
4	12,3	92,2	7,21	312		0,36	3,52	2			4	12,4	94,3	7,88	312		0,35	3,64	2	
5											5									
6											6									
7	13,5	98,5		319				3	2		7	15,6	97,6		316				3	2
8											8									
9											9									
10								4			10								4	
11	12,3	93,4		363							11	12,5	96,4		375					
12											12									
13											13									
14	12,9	90	7,74	422		0,23	14,57	5	3		14	13,1	91,8	7,89	364		0,37	23,77	5	3
15											15									
16	12,2	97,8		377							16	12,5	95,7		367					
17	13,3	97,5		391				6			17	13,3	92,1		348				6	
18	12,1	93,7		349							18	12,4	92,2		359					
19											19									
20											20									
21	13,6	93,7		387				7	4		21	13,2	90,7		349				7	4
22											22									
23	12,5	98,5		351							23	12,4	94,7		364					
24	13,4	88,4		365							24	12,3	88,6		381				8	
25											25									
26											26									
27											27									
28	12,7	88,9	7,72	375		0,39	7,38				28	12,7	88,7	7,92	388		0,34	19,47		
29											29									
30											30									
31											31									

Tableau A-2 : suivi des paramètres physico-chimiques de l'eau des chaudières C et D.

CHC	Temp	O (%)	pH	Cond	NO2	NO3	NH3	REN 2XS	REN 1XS		CHD	Temp	O (%)	pH	Cond	NO2	NO3	NH3	REN 2XS	REN 1XS
1	13,3	80,5	6,93	295				1	1		1	13,8	80,5		294				1	1
2	11,2	94,5	6,87	314							2	11,2	93,4		315					
3	12,4	92,2		314							3	12,6	92,3		325					
4	12,4	92,3	7,73	314				2			4	12,6	92,4	7,73	315				2	
5											5									
6											6									
7	13,9	97,9		339				3	2		7	15,6	100		335				3	2
8											8									
9											9									
10								4			10								4	
11	12,8	92,8		431							11	13	95		451					
12											12									
13											13									
14	13,6	91		395				5	3		14	13,1	92,2		383				5	3
15											15									
16	12,6	93,3		412							16	13	95,1		422					
17	12,6	92,4		423				6			17	13	94,1		437				6	
18	12,9	91,8		432							18	12,9	94		445					
19											19									
20											20									
21	12,3	91,2		386				7	4		21	12,7	92,5		375				7	4
22											22									
23	12,4	92,4		405							23	12,9	90,9		391					
24	12,3	90,7		420				8			24	12,8	97,8		402				8	
25											25									
26											26									
27											27									
28	12,8	89,3	8,09	483							28	13,2	89,8	8,02	453					
29											29									
30											30									
31											31									

A-2 Les paramètres d'analyse au cytomètre

A-2-1-Viabilité

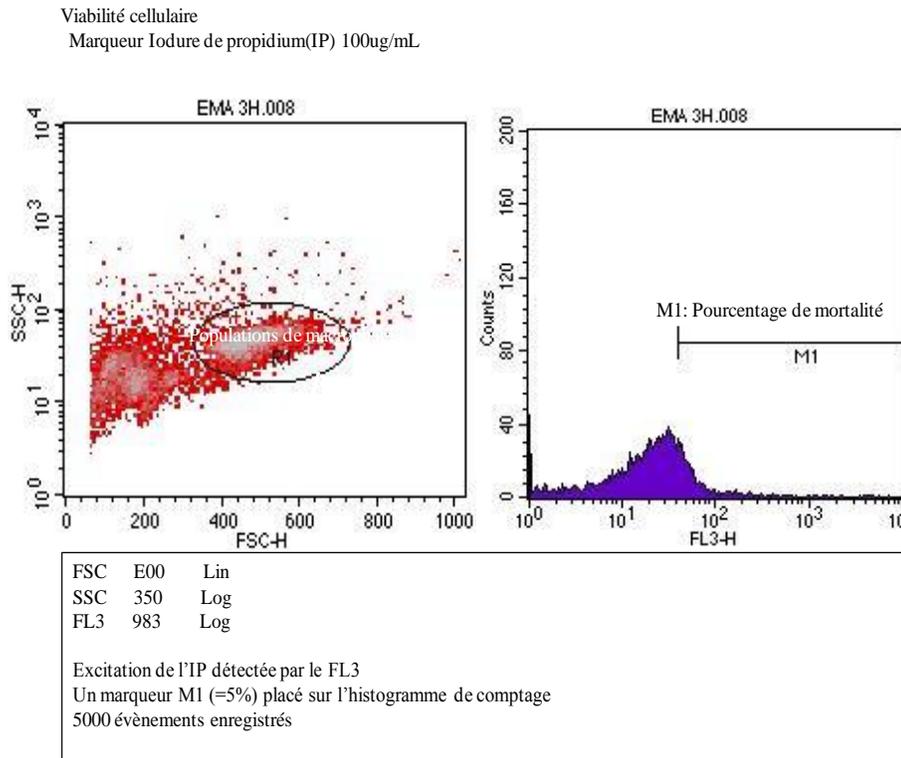


Figure A-1: Cytogramme de la viabilité

A-2-2- Phagocytose

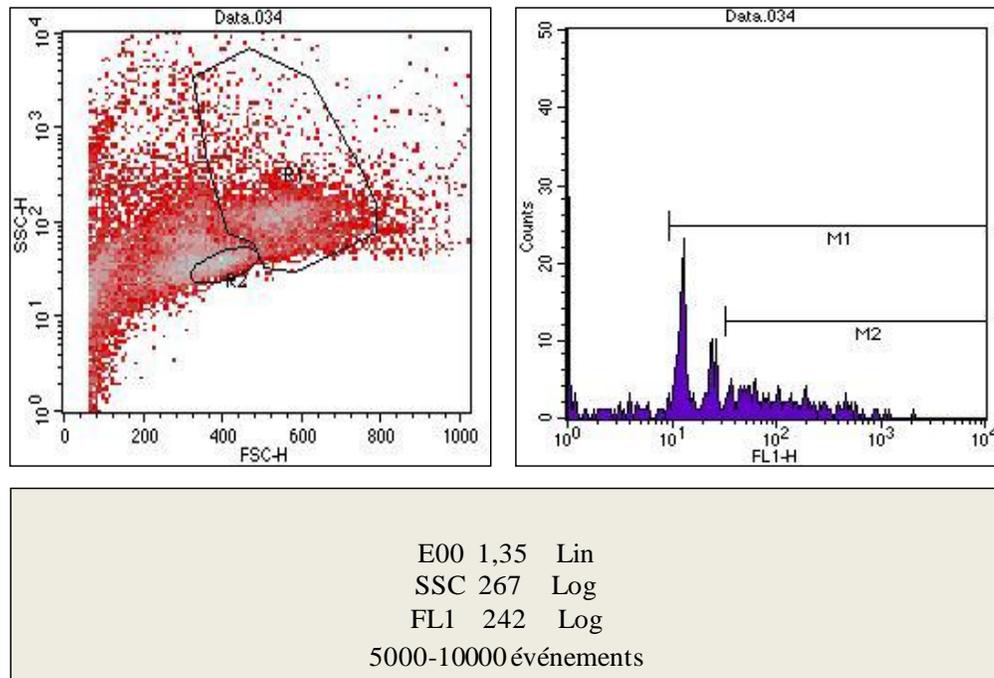


Figure A2: Cytogramme de la phagocytose

A-2-3-Apoptose

Apoptose des macrophages et des lymphocytes

- Marquage au Yo-PRO (0.1 mg/mL) et IP (0.1 mg/mL)
- Dexaméthasone (10 μ M)

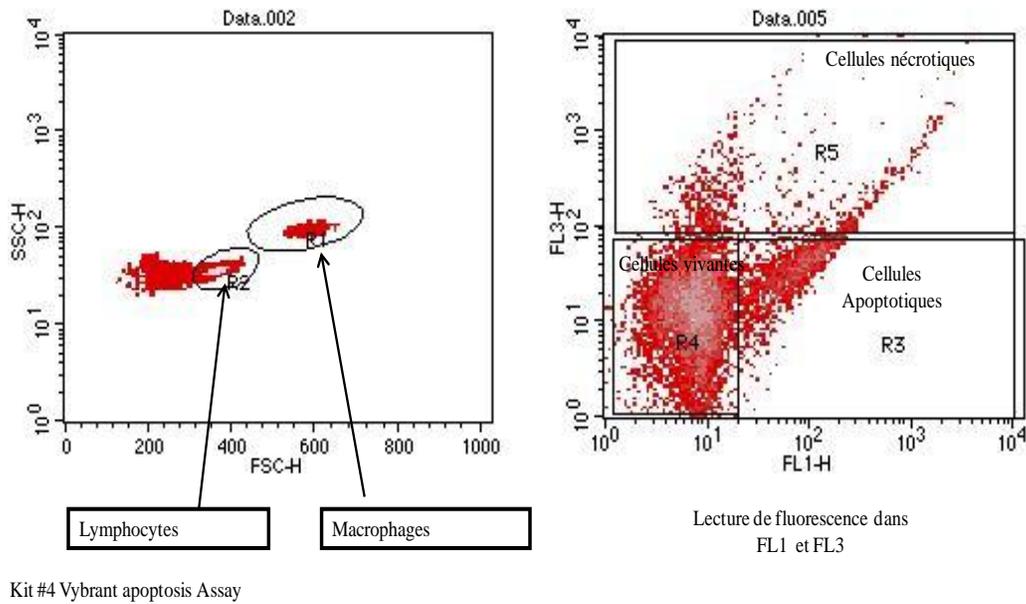


Figure A-3: Cytogramme de l'apoptose

A-3-Résultats des biomarqueurs testés dans l'étude Pilote

A-3-1-Viabilité

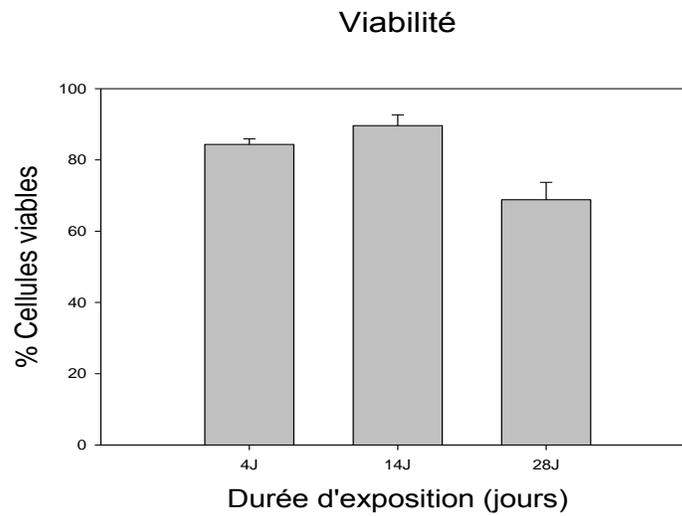


Figure A-4: Histogramme de la viabilité des macrophages

A-3-2- Phagocytose

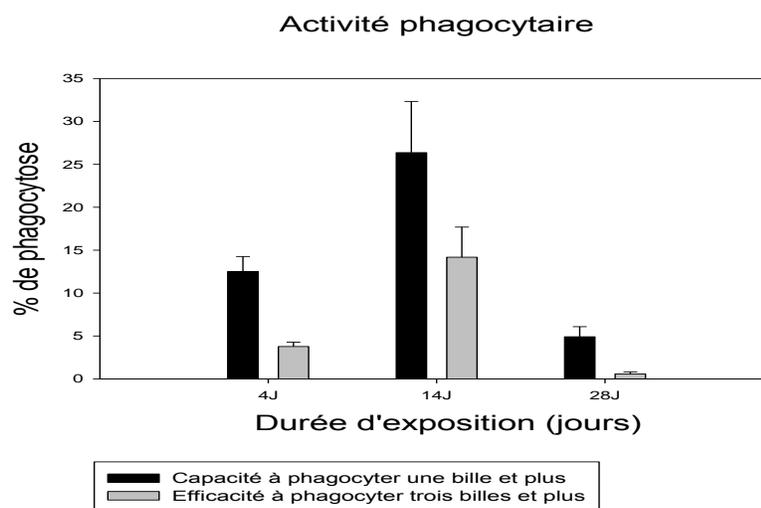


Figure A-5 : Histogramme de l'activité et de l'efficacité phagocytaires

A-3-3- Apoptose

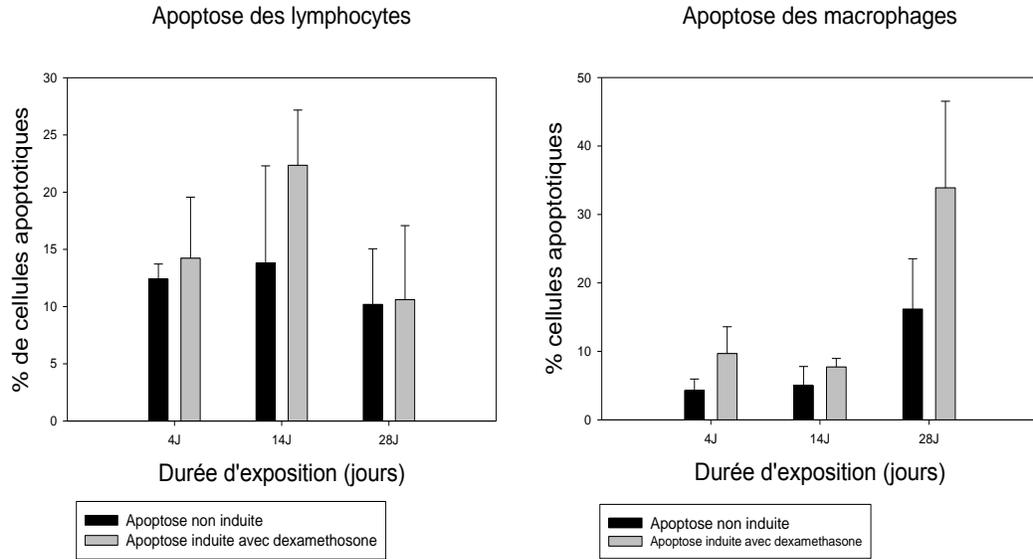


Figure A-6: Histogramme de l'apoptose des lymphocytes et des macrophages

A-3-4-Transformation lymphoblastique stimulée par du PHA et du LPS

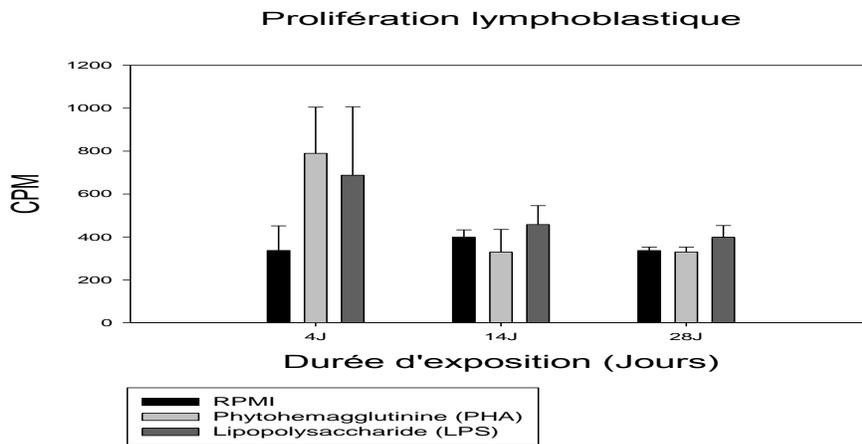


Figure A-7: Histogramme de la prolifération des lymphocytes stimulées aux mitogènes PHA et LPS.

ANNEXE B: LETTRES DES ÉDITEURS

From: <jesc@rcees.ac.cn>

To: <benchalgo0211@yahoo.fr>

Subject: Acceptance information from JES

Date: Tue, 29 Oct 2013 11:32:39 +0800

Dear Mr./Ms.Benchalgo,

We are pleased to inform you that your manuscript entitled "Immunotoxic effects of an industrial waste incineration site on groundwater in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)(201307219)" has been accepted for publication. It is scheduled to be published in Vol.26, No. 4 (April) 2013 in the Journal of Environmental Sciences.

DOI: 10.1016/S1001-0742(13)60516-1

The corresponding editor will contact with you if there are any concerns with your paper when checking it.

Thanks for your interest in publishing your work in Journal of Environmental Sciences.

Sincerely yours,

JES

Journal of Environmental Sciences

P. O. Box 2871, Beijing 100085, China

Tel.& Fax: 86(10) 62920553

E-mail: jesc@263.net

Website: www.jesc.ac.cn

October 29,2013

To: "Benchalgo Nadjat" benchalgo0211@yahoo.fr

Subject: [JXeno] Journal of Xenobiotics [paper #1991] -Editor Decision-Acceptance

Dear Dr. Benchalgo Nadjat,

We are pleased to inform you that your paper has been accepted for publication.

Please note that the figures definition is not very high and the final result in layout will not be perfect. Kindly let us have (via email) higher definition images (minimum 300 dpi - .jpg or .tiff format).

Also, please send Tables in editable format (word or excel), otherwise we cannot edit them for Layout. Thank you.

Please consider our Ahead-of-Print publication option right now: if you wish to accept kindly send us an authorization message, and our production office will prepare and publish soon a PDF of your manuscript without editing it (converting the Word .doc into a .pdf format); you'll receive the proofreading request AT THE END of the editing process for your approval on the final formatted version of your paper. Then we will replace the "early release" version with the final one. Based on your approval, your article will be thereafter submitted to all indexes/directories in which our journal is listed. PAGEPress offers a chargeable English language and scientific copy editing service. In the case you need it, a cost estimation will be forwarded to you. **KINDLY ADVISE WITHIN TWO WORKING DAYS IF YOU NEED IT.** Before publication we also need to get via fax (+39.0382.1750481) or email (preferred) your agreement to the License and the Disclosure Form attached. Both have to be filled in and signed, and sent back to us. In mind to allow PAGEPress to proceed with publication of your work, please note that the Disclosure Form **MUST** be filled in by EACH author of the paper; if you prefer, you can send only one form filled in by the corresponding author with a scanned copy of the fourth page, signed by your co-authors all together.

ONLY AFTER RECEIVING ALL THE REQUIRED DOCUMENTS, your paper will undergo the Copyediting and the Pagination phases. You will be given the possibility to approve the final paginated PDF before publication.

Thank you very much for choosing to submit your paper to our Journal.

Best regards,

Ms. Paola Granata

paola.granata@pagepress.org

Managing Editor

[EES \(ELS\)](#)

À benchalگو0211@yahoo.fr

Ms. No.: EES-14-40

Title: Immunotoxic effects of in vitro exposure to Mercier groundwater on rainbow trout leucocytes

Corresponding Author: Mrs. Benchalگو Nadjet

Authors: François Gagné, Professor; Michel Fournier, Professor

Dear Mrs. Nadjet,

Thank you for submitting your manuscript to Ecotoxicology and Environmental Safety. However, before we can proceed, the Editor would like you to consider some changes. The Editor encourages you to consider these comments and make an appropriate revision of your manuscript. The comments appear below.

Please submit your revision online within 60 days by logging onto the Elsevier Editorial System for Ecotoxicology and Environmental Safety:

<http://ees.elsevier.com/ees/>

Your username is: benchalگو0211@yahoo.fr

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/ees/automail_query.asp

The manuscript record can be found in the "Submissions Needing Revision" menu.

When submitting your revised paper, please include a separate document uploaded as "Response to Reviews" that carefully addresses the issues raised in the below comments, point by point. You should also include a suitable rebuttal to any specific request for change that has not been made.

Thank you, and we look forward to receiving your revised manuscript.

With kind regards,

Paul K Sibley, PhD

Associate Editor

Ecotoxicology and Environmental Safety

Email: ees2@elsevier.com

Environmental Pollution

À benchalgo0211@yahoo.fr

Environmental Pollution

Ref: ENVPOL-D-14-00077

Title: The effects of treated groundwater effluent on the immune system of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)

Authors: Benchalgo Nadjet; François Gagné, Professor; Michel Fournier, Professor

Article Type: Research Paper

Dear Mrs. Benchalgo Nadjet,

Your submission entitled "The effects of treated groundwater effluent on the immune system of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)" will be handled by Editor-in-Chief William J. Manning, Ph D.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/envpol/>.

Thank you for submitting your work to this journal. Please do not hesitate to contact me if you have any queries.

Kind regards,

Environmental Pollution

Paola Granata

À

moi

nov 7 à 9h15 AM

Dear Dr. Benchalgo,

thank you for your message. As you are the copyright holder of the paper you can reuse the article for non-commercial use only and provided that you cite the source.

No further permission is required.

Thank you again for your contribution to the journal,
best regards

Ms. Paola Granata
PAGEPress srl
Scientific Publications
via G. Belli 7
27100 Pavia, Italy
T. +39.0382.1751762
F. +39.0382.1750481
www.linkedin.com/company/3264205

GLOSSAIRE

Adduit : Un adduit à l'ADN résulte de la fixation d'une molécule à un site nucléophile de l'ADN par liaison covalente. Ces adduits peuvent modifier l'expression des gènes et participer à la carcinogénèse.

Agnathes : Le terme Agnathe (du grec, sans et gnathos, mâchoire), désigne l'ensemble des Crâniates dépourvus de mâchoire.

Carcinogène : Un cancérigène ou carcinogène est un facteur provoquant l'apparition d'un cancer.

Cytochrome P450 : Les cytochromes P 450 sont une famille d'enzymes qui absorbent la lumière à une longueur d'onde de 450 nanomètres. Elles sont connues principalement pour leur utilisation par un grand nombre de composés organiques pour catalyser l'oxydation. Leurs substrats sont des métabolites ou des composés chimiques provenant de l'environnement.

Ectotherme : Les organismes ectothermes sont des organismes dont la température corporelle est la même que celle du milieu extérieur.

ERO : Les espèces réactives de l'oxygène se forment dans les cellules suite à de nombreux processus, stress biotiques ou abiotiques, mort cellulaire programmée.....

Génotoxique : une substance est génotoxique quand elle peut compromettre l'intégrité physique ou fonctionnelle du génome. Des produits génotoxiques peuvent notamment être à l'origine de cancers.

Gnathostomes : Le caractère qui définit les Gnathostomes est la présence de mâchoires cartilagineuses.

Hepatotoxicité : L'hépatotoxicité est le pouvoir qu'a une substance de provoquer des dommages au foie.

Immunité non spécifique : Constitue l'immunité innée. Elle constitue la première ligne de défense face à une infection. Les cellules de l'immunité innée réalisent la phagocytose et détruisent les corps étrangers de manière non spécifique.

Immunité spécifique : Constitue l'immunité adaptative ou acquise. Elle fait intervenir des cellules spécialisées appelées les lymphocytes qui sont responsables de la production d'anticorps

Immunostimulation : Caractérisée par l'induction d'une réponse qualitativement anormale.

Immunosuppression : est caractérisée par une baisse de résistance vis-à-vis des infections microbiennes, virales et par l'augmentation de l'incidence de certains cancers.

Immunotoxique : Un xénobiotique qui inhibe la réponse immunitaire

Métallothionéine : Les métallothionéines (MTs) sont des protéines de faibles poids moléculaires (6-10 kDa) qui se caractérisent par leur structure et leur haute affinité pour les ions métalliques. Ces protéines jouent un rôle majeur en contrôlant la biodisponibilité des métaux.

Mucolytique : Un agent mucolytique est une substance (chimique, un médicament) qui fluidifie le mucus.

Mutagène : Un agent qui change le génome (l'ADN) d'un organisme et augmente ainsi le nombre de mutations génétiques. Les mutagènes sont en général des composés chimiques ou des radiations. C'est une étape nécessaire vers la cancérisation.

Mutation : Une mutation est une modification de l'information génétique dans la séquence de l'ADN ou dans l'ARN.

Opsinine : le terme d'opsonine désigne, toute substance qui se lie à des antigènes et provoque leur phagocytose par des macrophages ou des leucocytes neutrophiles.

Poïkilothermes : Les poïkilothermes (ou à sang froid) sont des animaux ayant une température corporelle qui varie avec celle de leur milieu.