

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	iii
REMERCIEMENTS.....	v
RÉSUMÉ.....	ix
TABLE DES MATIÈRES	xii
LISTE DES FIGURES.....	xv
LISTE DES TABLEAUX	xvii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xix

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1. Caractéristiques et origines chimiques des HAPs.....	1
1.2. Aperçu toxicologique des HAPs	2
1.3. Problématiques environnementales des HAPs.....	9
1.4. Cas du système Fjord du Saguenay – Estuaire du St-Laurent.....	13
1.5. Considérations toxicologiques et modélisation des processus d'exposition trophiques	15
1.6. Hypothèses et objectifs de recherche	18
1.7. Approche expérimentale	20

CHAPITRE 2

A FISH BIOASSAY TO EVALUATE THE TOXICITY ASSOCIATED WITH THE

INGESTION OF BENZO[*a*]PYRENE-CONTAMINATED BENTHIC PREY22

2.1. ABSTRACT23

2.2. INTRODUCTION.....25

2.3. MATERIALS AND METHODS29

2.3.1. Experimental design29

2.3.2. *Post mortem* contamination of *N. virens* with benzo[*a*]pyrene.....29

2.3.3. *In vivo* contamination of *N. virens* with benzo[*a*]pyrene30

2.3.4. Preparation of *N. virens*-based diets.....31

2.3.5. Benzo[*a*]pyrene and hydroxylated benzo[*a*]pyrene analysis32

2.3.6. Mummichog exposure.....33

2.3.7. Benzo[*a*]pyrene-7,8,9,10-tetrol analysis in the bile35

2.3.8. EROD activity in intestine and liver35

2.3.9. PCNA labeling in intestine and liver.....36

2.3.10. Histopathology37

2.3.11. Statistical analysis38

2.4. RESULTS.....39

2.4.1. Survival and morphometric parameters39

2.4.2. Benzo[*a*]pyrene-7,8,9,10-tetrol analysis in the bile39

2.4.3. EROD activity in intestine and liver41

2.4.4. PCNA labelling in intestine and liver41

2.4.5. Histopathology45

2.5.	DISCUSSION	48
2.5.1.	A successful trophic fish assay.....	48
2.5.2.	Trophic transfer and metabolism.....	49
2.5.3.	Toxicity assessment.....	52
2.6.	CONCLUSION	55
2.7.	ACKNOWLEDGEMENTS	56

CHAPITRE 3

CONCLUSION GÉNÉRALE	57
---------------------------	----

LISTE DES RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	64
--	-----------

ANNEXE – A

PRÉPARATION DES DIÈTES EXPÉRIMENTALES.....	77
--	----

ANNEXE – B

MONTAGE ET RESULTATS DE L'EXPÉRIENCE D'EXPOSITION DES <i>NEREIS</i>	78
---	----

ANNEXE – C

RÉSULTATS DES PARAMÈTRES MORPHOMÉTRIQUES POUR LES CHOQUEMORTS À LA FIN DE L'EXPÉRIENCE.....	80
--	----

ANNEXE – D

RÉSULTATS DEVOILÉS AVEC L'AIMABLE AUTORISATION DU Dr. M. FOURNIER ...	81
---	----

ANNEXE – E

RÉSULTATS DEVOILÉS AVEC L'AIMABLE AUTORISATION DU Dr. C. ROULEAU	83
--	----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1 : structure des 16 HAPs classés par la US-EPA comme principaux polluants à risque. ...4	
Figure 2 : exemple de métabolisme bioactivateur pour un HAP précancérigène ; cas du B[a]P chez l'humain (inspiré de Ramesh et al., 2004).7	
Figure 3 : mécanismes moléculaires à l'origine de la bioactivation du B[a]P par la CYP1A chez l'humain (tiré de Ramesh et al., 2004).8	
Figure 4 : schéma général de la circulation possible pour un HAP ingéré par voie orale 10 (Ramesh et al., 2004). 10	
Figure 5 : synthèse des biomarqueurs sélectionnés pour évaluer les effets toxiques d'une exposition à une diète contaminée aux HAPs. 12	
Figure 6 : description du réseau trophique modèle employé dans le cadre de cette étude.21	

CHAPITRE 2

Figure 1. Schematic overview of the experimental set-up.34	
Figure 2. Benzo[a]pyrene-7,8,9,10-tetrol concentrations in the bile in mummichogs exposed to diets prepared with <i>N. virens</i> contaminated <i>post mortem</i> (PM) or <i>in vivo</i> (IV) with B[a]P or to commercial fish diet (C1).40	
Figure 3. Ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylase activity levels in intestine (ERODI - white) and liver (ERODF - grey) in mummichogs exposed to diets prepared with <i>N. virens</i> contaminated <i>post mortem</i> (PM) or <i>in vivo</i> (IV) with B[a]P or to commercial fish diet (C1).42	

Figure 4. Proliferating cellular nuclear antigen (PCNA) labeling extent in enterocytes along intestinal villi (PLE) in mummichogs exposed to diets prepared with <i>N. virens</i> contaminated <i>post mortem</i> (PM) or <i>in vivo</i> (IV) with B[a]P or to commercial fish diet (C1).	43
Figure 5. Proliferating cellular nuclear antigen (PCNA) labeling index in liver hepatocytes (PLI) in mummichogs exposed to diets prepared with <i>N. virens</i> contaminated <i>post mortem</i> (PM) or <i>in vivo</i> (IV) with B[a]P or to commercial fish diet (C1).	44
Figure 6. A) and C) normal liver of mummichogs exposed to control diet (PM1) and B) and D) liver exposed to a diet contaminated with 20 µg/g dry weight concentration of B[a]P (PM5) and exhibiting hydropic vacuolation of the hepatocytes	46

ANNEXE – A

Préparation des diètes expérimentales.....	77
--	----

ANNEXE – B

Montage et résultats de l'expérience d'exposition des <i>N. virens</i>	78
--	----

ANNEXE – E

Distribution du ¹⁴ C-B[a]P chez un choquemort 7 jours après ingestion d'une diète de <i>N. virens</i> contaminée	83
---	----

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2

Table 1. B[a]P concentration (HPLC analysis) in the diets prepared from <i>N. virens</i> contaminated <i>post mortem</i> (PM).....	30
Table 2. Prevalence of hydropic vacuolation and density of pigmented macrophage aggregates in the liver of mummichogs exposed to diets prepared with <i>N. virens</i> contaminated <i>post mortem</i> (PM) or <i>in vivo</i> (IV) with B[a]P or to commercial fish diet (C1).	47

ANNEXE – B

Tableau récapitulatif, pour les <i>N. virens</i> dont les diètes IV des choquemorts furent issues, les moyennes du nombre total d'individus (n) et du poids total individuel humide (P) par bassin au début (J-0) et à la fin de l'exposition <i>in vivo</i> (J-27) ; du pourcentage de mortalité (M) ; de l'indice de gain de masse corporelle (GM) et la moyenne \pm écart-type des concentrations finales en B[a]P-parent (BP) obtenues pour les différents traitements (T).....	78
---	----

ANNEXE – C

Tableau récapitulatif pour chaque traitement le nombre total d'individus (n) et les moyennes \pm écart-types des paramètres morphométriques mesurés sur les choquemorts à la fin de l'expérience (J-21).....	80
--	----

ANNEXE – D

Tableau récapitulant les moyennes \pm écart-types des pourcentages de phagocytes (M1, macrophages contenant une bille et plus) et de l'activité phagocytaire (M3, pourcentage de macrophages contenant trois billes ou plus), indicateur de dysfonctionnement immunitaire, obtenues dans le rein antérieur droit des choquemorts à la fin de l'expérience (J-21)81

Rapport-Gratuit.com

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AhR	<i>aryl hydrocarbon receptor</i> – récepteur aryl-hydrocarbure
B[a]P	benzo[a]pyrène
BP-tétrol	benzo[a]pyrène-7,8,9,10-tétrol
BPDE	benzo[a]pyrène-diol époxyde
CAF	composés aromatiques fluorescents
CYP 1A	gène codant pour l'expression de la CYP1A
CYP	cytochrome P450
Diète IV	diète contaminée <i>in vivo</i>
Diète PM	diète contaminée <i>post mortem</i>
EROD	éthoxyrésorufine- <i>O</i> -dééthylase
FS-ESL /	système Fjord du Saguenay – Estuaire du St-Laurent /
SF-SLE	Saguenay Fjord – St. Lawrence Estuary system
HAPs	hydrocarbures aromatiques polycycliques
MFO/OFM	<i>mixed function oxygenase</i> – oxygénase à fonction mixte
CYP1A	isoenzyme P450 1A du CYP450
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i> – antigène nucléaire de prolifération cellulaire
PLE	<i>PCNA labelling extent</i> (étendue de la coloration de l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire le long des villosités intestinales)
PLI	<i>PCNA labelling index</i> (pourcentage de noyaux d'hépatocytes avec coloration de l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire)
US EPA	<i>United-States Environmental Protection Agency</i>

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. Caractéristiques et origines chimiques des HAPs

Largement répandus dans l'environnement, incluant l'air, l'eau et les sédiments, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) forment une classe de composés organiques à deux cycles benzéniques ou plus qui constituent un groupe d'un très grand nombre de molécules. Les HAPs pénètrent dans l'environnement par plusieurs sources aussi bien anthropiques que naturelles. D'origine anthropique, ces composés sont formés pour l'essentiel lors de la combustion incomplète de la matière organique et se retrouvent fréquemment sous différentes formes de mélanges complexes (Dreyer et al., 2005). Ils sont pour la plupart issus des émissions atmosphériques, des effluents industriels et domestiques et des produits pétroliers ou traités à la créosote. Il est généralement reconnu que certains mélanges de composés légers (3 cycles et moins) sont plus abondants dans les produits pétroliers tandis que les composés plus lourds sont majoritairement issus des processus de combustion lente (Cossa et al., 1998). Lorsque d'origine naturelle, ces composés sont notamment formés lors des feux de forêt, du volcanisme et par le jeu de basses températures et de hautes pressions que subit la matière organique lors de la formation du pétrole. Solides à température ambiante et faiblement hydrophobes, les HAPs en milieu aquatique se trouvent le plus souvent assemblés à la matière organique dissoute ou colloïdale (en particulier les substances humiques et fulviques) ou à la matière organique particulaire en suspension ou sédimentaire.

1.2. Aperçu toxicologique des HAPs

Les HAPs de faible poids moléculaire (composés de 2 ou 3 cycles benzéniques), plus solubles dans l'eau et moins persistants, sont connus pour leur toxicité aiguë et chronique chez les organismes aquatiques, imputable au composé parent. Ils peuvent ainsi nuire aux capacités de survie, de croissance, de reproduction et causent des développements anormaux (Eisler, 1987). À l'opposé, les HAPs de haut poids moléculaire (4 cycles benzéniques et plus), plus persistants, apparaissent d'une toxicité aiguë moins grande à des concentrations environnementales mais peuvent être mutagènes et cancérigènes chez les organismes supérieurs. Mis à part les effets cancérigènes, il a aussi été rapporté une variété importante d'autres effets toxiques sur différents organes chez l'humain et certains animaux de laboratoires. Des altérations du développement et des dysfonctions d'ordre cytotoxique, immunotoxique ou neurotoxique ont pu être constatées, de même que certains cas d'embryotoxicité et de perturbation du système endocrinien et reproducteur (Ramesh et al., 2004). Ces effets varient grandement selon la nature des composés impliqués, la durée et la voie d'exposition. La plupart des études écotoxicologiques sur les HAPs ont porté sur des organismes aquatiques plutôt que sur des organismes terrestres (CEPA, 1994). Des effets sur la survie, la croissance, la reproduction et le déclenchement de néoplasmes ont été observés après une exposition aux HAPs par plusieurs auteurs qui ont passé en revue les effets écotoxicologiques des HAPs sur différents organismes aquatiques (Germain et al., 1993; van der Oost et al., 2003). La gamme étendue des concentrations responsables d'effets reflète la diversité des paramètres et des protocoles expérimentaux. En laboratoire, des effets néoplasiques et génotoxiques liés à l'exposition à des HAPs ont été observés chez des organismes terrestres et aquatiques. Des données recueillies sur le terrain confirment souvent cette association (CEPA, 1994; US-EPA, 1987).

La Figure 1 présente la structure de certaines espèces chimiques classées à fort potentiel de risque par la United States Environmental Protection Agency (US-EPA) : l'acénaphthylène, l'acénaphène, l'anthracène, le benzo[*a*]anthracène, le benzo[*a*]pyrène, le benzo[*b*]fluoranthène, le benzo[*k*]fluoranthène, le benzo[*ghi*]perylène, le chrysène, le dibenzo[*ah*]anthracène, le fluoranthène, le fluorène, l'indeno[*1,2,3-cd*]pyrène, le naphthalène, le phénanthrène et le pyrène (US-EPA, 1987). Il faut par ailleurs souligner que de plus en plus d'études mettent en évidence la contribution toxique importante des formes alkylées des HAPs, maintenant incluses dans la liste des HAPs prioritaires de l'US-EPA (Rhodes et al., 2005).

D'un point de vue toxicologique, la métabolisation d'un xénobiotique par un organisme joue un rôle central dans son devenir biologique et détermine souvent ses effets toxiques. Dans le cas d'une exposition à certains polluants organiques tels que les HAPs, une cascade de réactions enzymatiques séquentielles conduit à différentes étapes de biotransformation qui précèdent l'excrétion finale ou en partie du xénobiotique (ex : HAP parent) et de ses produits dérivés (ex : métabolites du HAP parent). La phase de biotransformation a cours dans différents organes plus ou moins spécialisés à cette fin comme le foie, connu pour jouer un rôle clef chez les mammifères autant que chez les poissons (van der Oost et al., 2003). Deux types de réactions principales sont reconnues pour leur propension à modifier les propriétés physicochimiques du HAP parent : les réactions dites de Phase 1 (fonctionnalisation) et celles dites de Phase 2 (conjugaison). Dans la première, le xénobiotique parent subit des processus d'oxydo-réduction et d'hydrolyse en chaîne qui introduisent des groupes chimiques fonctionnels, polarisant ainsi sa molécule.

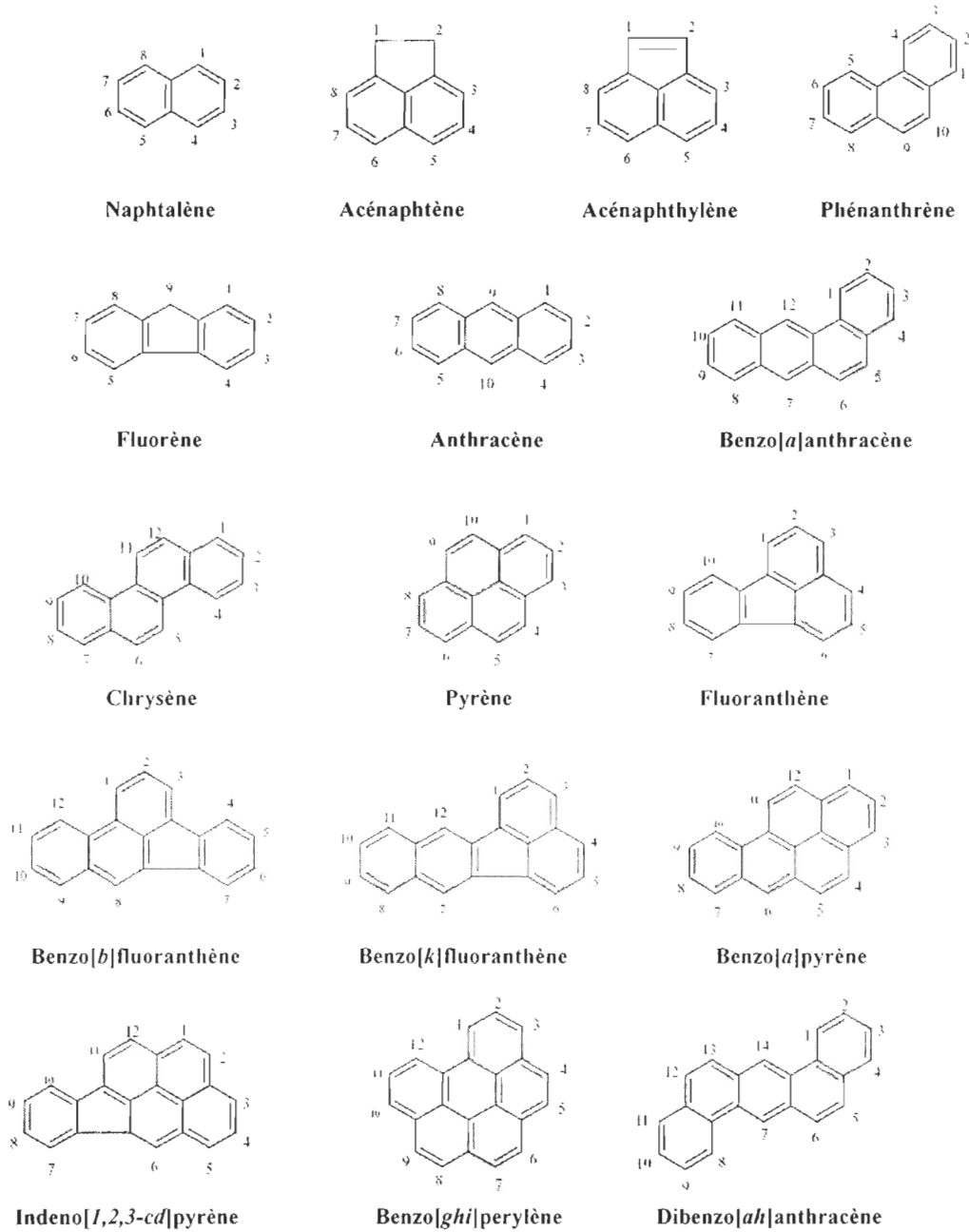


Figure 1 : structure des 16 HAPs classés par la US-EPA comme principaux polluants à risque.

Les réactions de Phase 2 synthétisent la combinaison du xénobiotique parent ou de ses métabolites de Phase 1 à d'autres complexes moléculaires polaires (glutathion, sulfates, etc.). La biotransformation contribue en général à détoxifier l'organisme en rendant le xénobiotique moins réactif, donc moins toxique, et hydrophile, donc plus facilement excrétable par la bile, l'urine ou les branchies. Cependant, il est possible qu'un xénobiotique peu métabolisable soit bioaccumulé par l'organisme. Dans d'autres cas, à l'image de certains HAPs précancérigènes, il arrive que le composé parent soit bioactivé au cours des processus de biotransformation, en produisant des métabolites très réactifs et de toxicité accrue, capables de former des liaisons covalentes avec des macromolécules endogènes telles que l'ADN (Figure 2). Tel que référencé par Reichert et al. (1998), Livingstone (1998), van der Oost (2003) et Ramesh et al. (2004), la métabolisation des HAPs chez les poissons, semble suivre des voies semblables aux mammifères.

Le métabolisme oxydatif des HAPs catalysé par les enzymes de Phase 1 du système OFM (*oxygénase à fonction mixte*), est à l'origine d'intermédiaires hydrophiles comme des phénols, dihydrodiols, quinones et époxydes, parfois très électrophiles. Ce dernier peut générer un stress oxydatif directement relié à la production d'espèces intermédiaires réactives de l'oxygène ($O_2^{\cdot-}$; H_2O_2 ; OH^{\cdot}) qui prendront la forme de radicaux libres aux effets potentiellement cytotoxiques : oxydation de macromolécules, inactivation enzymatique, peroxydation lipidique, dommages à l'ADN et ultimement, apoptose. Un des principaux mécanismes de toxicité consiste, dans le cas de certains congénères de haut poids moléculaire tel que le B[a]P, en une activation oxydative, catalysée par la P450 1A (CYP1A), une isoenzyme du cytochrome P450 (CYP), un complexe enzymatique de Phase 1 (Figure 3). Certains des métabolites produits, tels que le B[a]P-diol epoxide (BPDE), sont des espèces électrophiles cancérigènes car capables de s'adduire à certaines macromolécules comme les acides nucléiques (Xue and Warshawsky, 2005) et les

protéines (Padros and Pelletier, 2000). Les adduits à l'ADN (ex : BPDE-ADN, Figure 2) peuvent agir comme agent mutagène ou se substituer à une base azotée et interférer ainsi avec l'expression génétique normale de la cellule. S'en suit une cascade de réactions toxiques à l'échelle moléculaire, puis une succession de lésions cytologiques qui au niveau systémique, pourront perturber certaines fonctions immunitaires ou endocriniennes. Dans certains cas, à défaut de mécanismes de réparation de l'ADN adéquats, le cycle cellulaire peut s'en trouver tellement altéré qu'il en résultera une prolifération anarchique de cellules filles, facteur prépondérant à la genèse néoplasique menant à la formation de tumeurs cancéreuses.

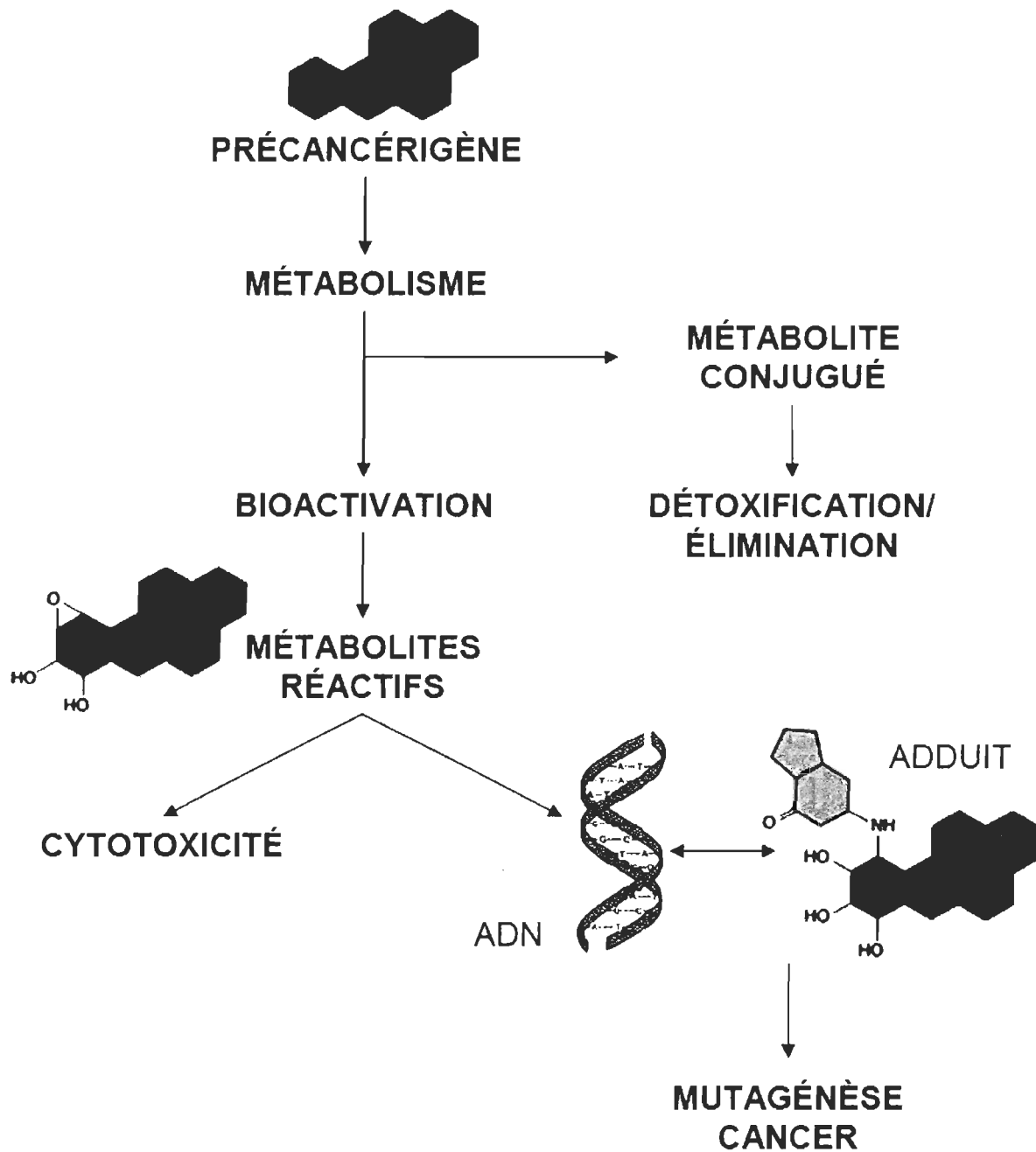


Figure 2 : exemple de métabolisme bioactivateur pour un HAP précancérigène ; cas du B[a]P chez l'humain (inspiré de Ramesh et al., 2004).

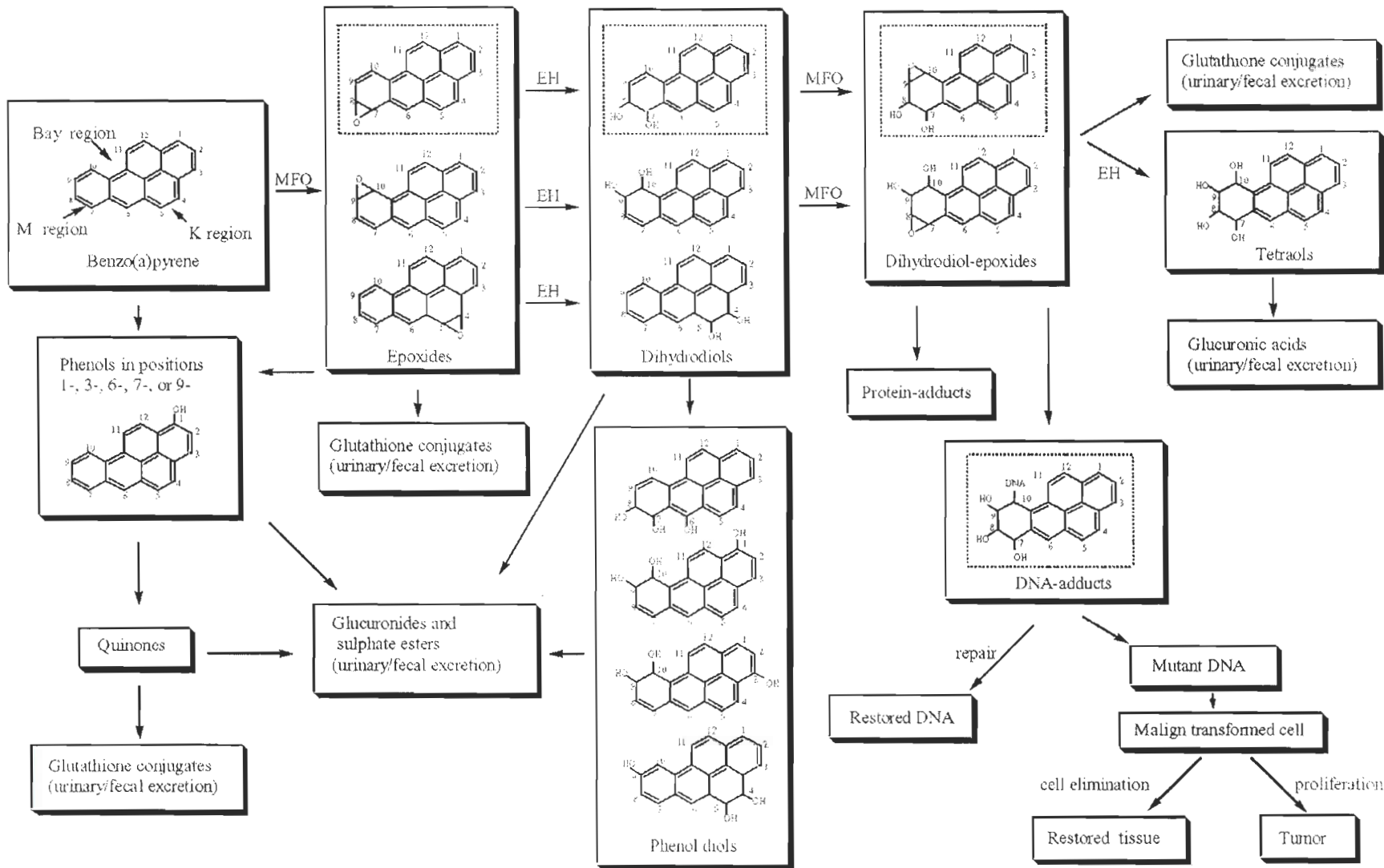


Figure 3 : mécanismes moléculaires à l'origine de la bioactivation du B[a]P par la CYP1A chez l'humain (tiré de Ramesh et al., 2004).

1.3. Problématiques environnementales des HAPs

Dans l'environnement marin côtier, les principales sources de HAPs prennent la forme de dépôts atmosphériques ainsi que de formes dissoutes ou particulaires transportées par les effluents municipaux ou industriels et sont ainsi particulièrement concentrées en périphérie urbaine (Pham and Proulx, 1997; White and Rasmussen, 1998). Par la suite, les HAPs peuvent se retrouver dans différents compartiments abiotiques (eau, particules, sédiments) ou biotiques (organismes vivants ou morts). Ces compartiments sont autant de sources d'exposition possibles pour la faune environnante, par le contact direct autant que par les voies orales (transfert trophique) et respiratoires (diffusion tégumentaire, branchies). Les espèces exposées oralement aux HAPs peuvent se retrouver à différents niveaux trophiques. Dans le cas des écosystèmes aquatiques, les HAPs peuvent s'accumuler dans différents réservoirs abiotiques et devenir biodisponibles pour les organismes benthiques ou pélagiques, particulièrement ceux évoluant à l'interface eau-sédiment (Stevenson, 2003; van der Oost et al., 2003). Aux différents niveaux trophiques, l'importance relative de la voie d'exposition orale repose sur le potentiel de risque toxique systémique que constitue la prise de nourriture contaminée par des HAPs (Figure 4). Une batterie de biomarqueurs propres à la chaîne d'évènements associés à la toxicité des HAPs a été utilisée avec succès dans des études en laboratoire et sur le terrain chez les poissons : induction d'enzymes de la CYP1A tel l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) dans le foie, concentration de métabolites de HAPs dans la bile, concentration hépatique d'adduits à l'ADN et prévalence de lésions pré-cancéreuses et cancéreuses au foie (Figure 5).

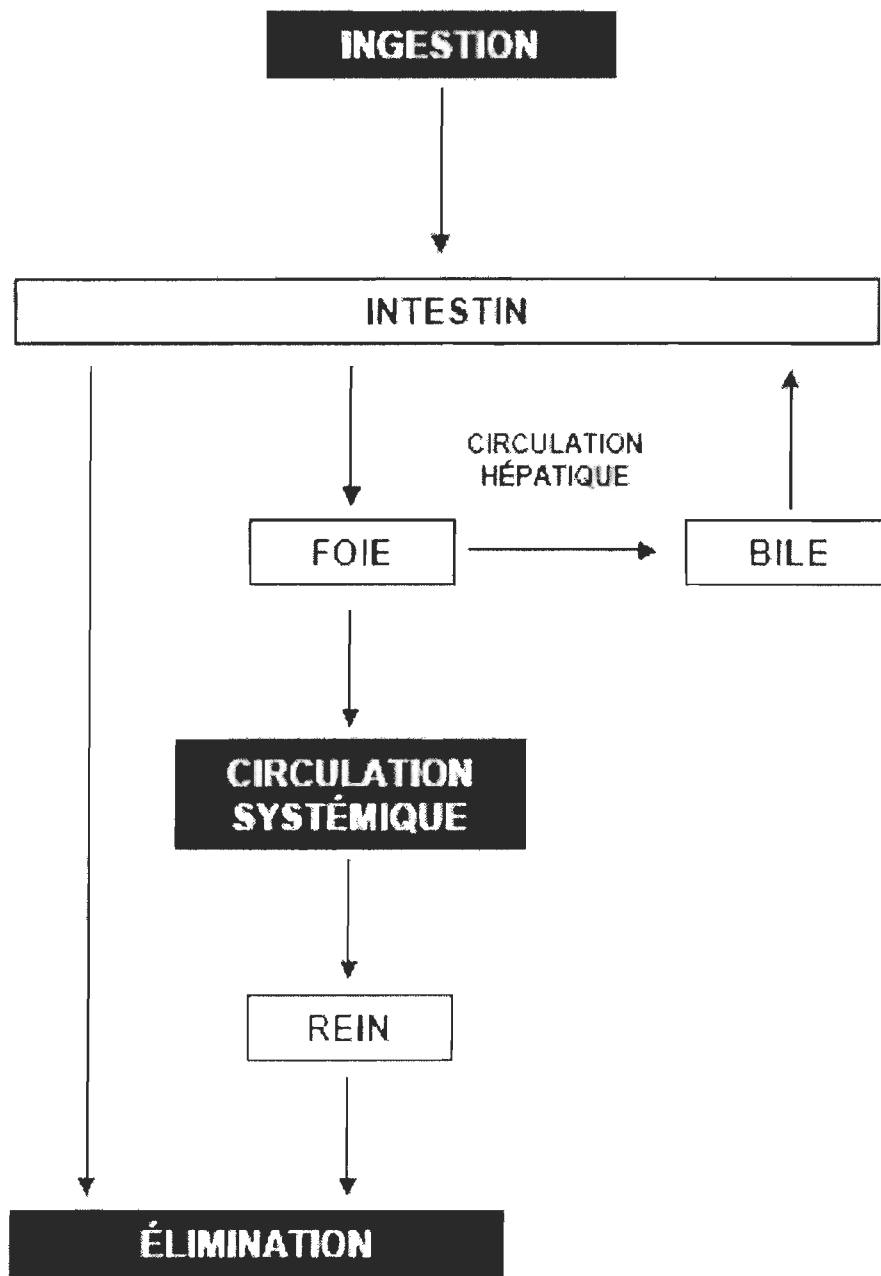


Figure 4 : schéma général de la circulation possible pour un HAP ingéré par voie orale (Ramesh et al., 2004).

La toxicité des HAPs chez les poissons se manifeste de manière très diversifiée en fonction des espèces, des voies d'exposition, de la durée et de l'intensité de l'exposition, de même que de la composition du mélange de HAPs, par des affections d'ordre biochimique, histopathologique (Myers et al., 2000), immunologique et génétique (van der Oost et al., 2003). Certains dommages sur la reproduction ou le développement sont également possibles (CEPA, 1994). Les investigations portant sur le lien entre les adduits à l'ADN et la formation de foyers néoplasiques dans le foie ont démontré qu'une grande quantité d'adduits à l'ADN chez certaines espèces de poissons vivant sur des sites contaminés était associée à une plus grande prévalence de lésions hépatiques. C'est ainsi que Reichert et al. (1998) ont démontré chez la plie anglaise (*Pleuronectes vetulus*) que des niveaux élevés d'adduits à l'ADN sont un facteur de risque significatif pour la formation de certaines lésions dégénératives et pré-néoplasiques se produisant tôt dans l'histogénèse des néoplasmes hépatiques. Cette corrélation est observée chez plusieurs autres espèces de poissons plats vivant en contact avec des sédiments contaminés aux HAPs tel que révélé par French et al. (1996), Anulacion et al. (1998) et Myers et al. (2000; 2003). Par ailleurs, la prévalence de tumeurs hépatiques a déjà été associée avec une réduction significative de l'espérance de vie des Poulamons (*Microgadus tomcod*) dans la rivière Hudson, NY, USA (Dey et al., 1993).

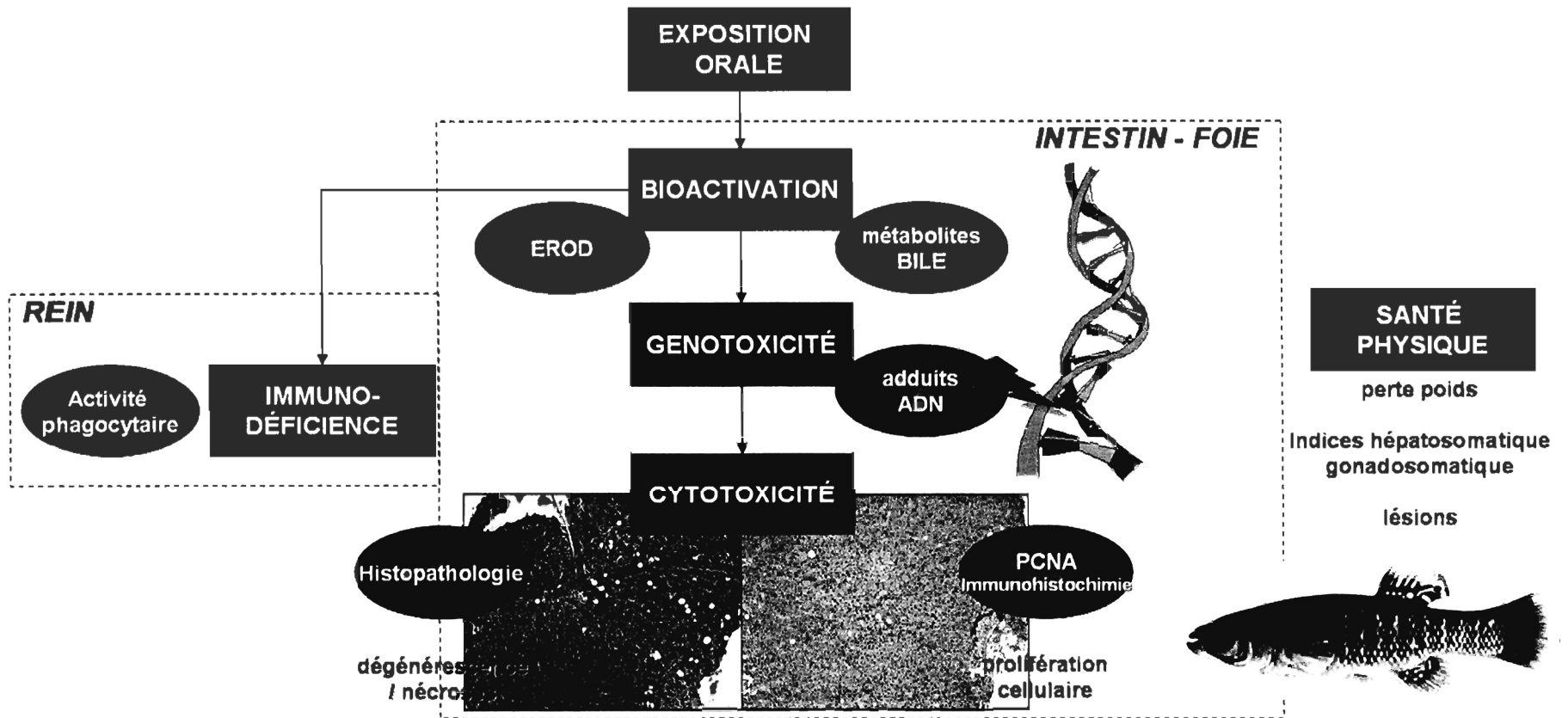


Figure 5 : synthèse des biomarqueurs sélectionnés pour évaluer les effets toxiques d'une exposition à une diète contaminée aux HAPs.

1.4. Cas du système Fjord du Saguenay – Estuaire du St-Laurent

Avec une forte urbanisation et une importante concentration en industries pétrochimiques, métallurgiques et papetières, l'estuaire du Saint-Laurent (ESL) de même que le fjord du Saguenay (FS) sont fortement exposés au HAPs. Une des principales sources historiques de pollution dans ce vaste bassin de drainage demeure les fumées et effluents issus des alumineries situées le long du Saguenay ou sur la côte nord de l'estuaire, particulièrement celles qui utilisaient la technologie Soderberg (CEPA, 1994). La présence de HAPs dans les sédiments du système Fjord du Saguenay – Estuaire du St-Laurent (FS-ESL) a ainsi été démontrée par plusieurs analyses chimiques dans les bassins hydrographiques du fjord du Saguenay (Martel et al., 1987), du fleuve Saint-Laurent (Arcaro et al., 1999; Stark et al., 2003), de son estuaire (Pelletier et al., 1991) et de son golfe (Gearing et al., 1991). Globalement, le patron de concentration en HAPs totaux dans les sédiments semble décrire un gradient décroissant de l'amont vers l'aval du fleuve St-Laurent (Cossa et al., 1998; Gagnon et al., 1998). Dans les sédiments du port de Montréal, les concentrations médianes et maximales ont déjà été proches de 5,7 et 66,0 µg/g pour le phénanthrène, ainsi que de 2,8 et 39,0 µg/g pour le pyrène. La concentration médiane de B[a]P a ainsi déjà été de 1,2 µg/g, avec une valeur maximale proche de 29,0 µg/g. La concentration médiane des HAPs totaux était alors de 14,2 µg/g et la valeur maximale, de 278 µg/g (Environnement Illimitée, 1990).

En revanche, la présence des HAPs dans les organismes du FS-ESL est nettement moins documentée et les espèces commerciales de poissons, mollusques et crustacés ne semblent pas présenter de signes de contamination évidente par des composés parents (Pelletier et al., 1999). Cependant, les travaux menés par White et al. (1997; 1998a; 1998b) ont clairement démontré une

évidence de contamination par des composés génotoxiques chez plusieurs espèces de poissons et de macroinvertébrés.

Relativement peu d'espèces aquatiques du FS-ESL ont fait l'objet d'investigations toxicologiques poussées sur les niveaux d'exposition et de nuisances des HAPs *in situ*. Wirgin et al. (1994), ont comparé plusieurs populations de poulamons atlantique (*Microgadus tomcod*) capturées dans six systèmes hydriques plus ou moins pollués par des mélanges complexes de HAPs de la côte est nord-américaine. Les individus issus des frayères de la rivière Batiscan dans le FS-ESL présentèrent un patron de réponses typique des régions fortement exposées telles que la rivière Hudson. Les quantités moyennes d'adduits à l'ADN dans le foie et de composés aromatiques fluorescents (CAF) dans la bile mesurées furent respectivement de 40 nmol par mol de bases et de 250 ng d'équivalents B[a]P par mg de protéines biliaires, soit 4 à 5 fois plus que pour la rivière Miramichi (200-600 ng de HAPs / g sédiments secs). Des traces de certains HAPs ont été trouvées dans le foie et les ovaires d'individus de morue (*Gadus morhua*) prélevés dans l'océan atlantique du nord-ouest : acenaphthène (18 ng/g sec), fluorene (28 ng/g sec) et chrysène (22 ng/g sec) dans le foie et fluorene (72 ng/g sec) dans les gonades (Hellou et al., 1994). Du côté des mammifères, l'hypothèse selon laquelle les HAPs seraient à l'origine de cancer gastro-intestinaux chez le béluga (*Delphinapterus leucas*) a été présentée à plusieurs reprises (Beland et al., 1993), hypothèse renforcée par la présence d'adduits du B[a]P (Martineau et al., 2002). Sa diète, composée d'une variété d'organismes possiblement contaminés, serait la source la plus tangible de contamination pour le béluga. Il semblerait donc que les HAPs ou leurs produits de dégradation, puissent exercer leurs effets toxiques sur des espèces dominant l'écosystème.

1.5. Considérations toxicologiques et modélisation des processus d'exposition trophiques

Les différents maillons en interaction à l'intérieur d'une chaîne alimentaire peuvent constituer un réseau à l'intérieur duquel les HAPs et leurs métabolites sont aussi théoriquement susceptibles de circuler, on parlera alors de biotransfert. Bien qu'abondants dans certaines régions contaminées, la biodisponibilité trophique des HAPs et son importance relative comme voie d'exposition restent toujours un sujet relativement controversé. Plusieurs auteurs admettent cependant que les HAPs pourraient être transférés aux réseaux trophiques supérieurs via certains vecteurs benthiques fouisseurs ou filtreurs (D'Adamo et al., 1997; Rust et al., 2004b). C'est pourquoi certains auteurs ont émis l'hypothèse que l'ingestion de proies benthiques contaminées avec des HAPs pourrait être à l'origine de cancers gastro-intestinaux chez les bélugas (Martineau et al., 2002). Néanmoins cette dernière hypothèse selon laquelle les HAPs pourraient exercer leurs effets génotoxiques en remontant les maillons trophiques est sujette à controverse, car elle repose sur bien peu de données disponibles concernant la biodisponibilité ainsi que la possibilité de transfert trophique des HAPs et de leurs métabolites. La raison principale en est qu'en général, les HAPs ont une forte propension à être facilement métabolisés aux différents niveaux trophiques diminuant ainsi les quantités disponibles pour les maillons trophiques supérieurs (van der Oost et al., 2003). Par ailleurs, même si certaines espèces benthiques ont une faculté de bioaccumulation, particulièrement chez les bivalves (White et al., 1997), le phénomène de biomagnification des HAPs parents ne semble pas exister dans la nature.

Bien que l'alimentation puisse être considérée comme une source importante d'absorption de HAPs chez les humains et mammifères (Ramesh et al., 2004), rares sont les études qui se sont effectivement penchées sur cette voie d'exposition pour les poissons (Van Veld et al., 1997 ; Wu

et al., 2003). Dans la plupart des études toxicologiques, les poissons sont exposés directement au xénobiotique par l'eau ou par injection intrapéritonéale. De plus, la plupart des expériences de modélisation du transfert trophique n'impliquent que des cas d'exposition orale mettant en jeu des diètes commerciales contaminées (Van Veld et al., 1997). Rares sont les travaux ayant cherché à modéliser une véritable interaction alimentaire dans des conditions réalistes pour éclairer le potentiel de transfert trophique et la toxicité des HAPs en milieu naturel. Rice et al. (2000) ont mis au point un modèle expérimental incorporant un processus écologique représentatif basé sur une interaction du type [prédateur non-contaminé] – [proie élevée sur des sédiments contaminés], mettant en relation la sole anglaise (*Pleuronectes vetulus*) et le polychète *Armandia brevis*. Après 28 jours d'exposition sur des sédiments contaminés *in vitro* (B[a]P) et *in situ* (Puget Sound, Washington, USA), les vers ont servi à nourrir les plies pendant 10 à 12 jours. À la fin de l'expérience, des ralentissements de croissance et des niveaux significativement plus élevés d'induction de la CYP1A et d'adduits à l'ADN ont été mesurés dans le foie de certains groupes par rapport aux poissons témoins, particulièrement dans le cas d'individus exposés au B[a]P. D'Adamo et al. (1997) ont reproduit une chaîne alimentaire à petite échelle se composant d'une microalgue, *Dunaliella tertiolecta*, de la moule méditerranéenne (*Mytilus galloprovincialis*) et du bar commun (*Dicentrarchus labrax*). Après 20 jours d'exposition au B[a]P et au 7,12-dimethyl benz[a]anthracene (B[a]A), ils ont réussi à mettre en évidence un patron de bioaccumulation très différent entre moules et poissons contaminés, patron imputable à la plus grande efficacité de la détoxification enzymatique dans le foie des poissons. Pour le B[a]A particulièrement, une bioaccumulation rapide et importante de HAPs parents dans la chair des moules fut ainsi observée, contrastant avec les faibles augmentations des concentrations des contaminants dans le muscle des poissons. D'autres tels que Baumard et al. (1998), Pruell et al. (2000) et Lemiere et al. (2005) ont aussi utilisé des espèces benthiques prélevées sur des sites

contaminés de façon chronique pour les utiliser comme vecteurs trophiques potentiels pour l'exposition de prédateurs. Tous ces travaux démontrent que des sédiments ou diètes contaminés par des HAPs présentent un risque potentiel de toxicité pour des niveaux trophiques plus élevés.

Par ailleurs, on sait peu de chose de la persistance des métabolites dans l'environnement, particulièrement dans les compartiments biotiques, et de leur disponibilité biologique pour les niveaux trophiques supérieurs (Rust et al., 2004b). Des essais biologiques avec des invertébrés indiquent que la consommation de métabolites dans une diète pourrait résulter en un transfert trophique de certains composés transformés plutôt qu'en leur élimination complète de la chaîne alimentaire (Driscoll et McElroy, 1997). Il reste que bien peu de travaux ont exploré l'hypothèse de l'existence d'un transfert trophique des métabolites génotoxiques que certaines espèces, particulièrement chez les polychètes et les poissons, peuvent produire (McElroy and Sisson, 1989). À ce jour, aucun réseau trophique modèle n'a réellement été testé en tenant compte des capacités métaboliques des espèces impliquées dans une interaction trophique pour fin de comparaison de la part de toxicité imputable aux HAPs parents par rapport à leurs métabolites (Baumard et al., 1998). Seuls certains modèles mécanistiques, statistiques, quantitatifs ou prédictifs se sont essayés à investiguer le potentiel de bioaccumulation des HAPs parents et de leurs métabolites chez les organismes aquatiques en tenant compte de leur métabolisme (Stevenson, 2003). Cependant, aucun de ces modèles n'a été couplé à une évaluation toxicologique pour déterminer la signification écologique finale des prédictions obtenues en terme de bioaccumulation et de métabolisme. En somme, il n'existe que peu d'outils d'investigation du potentiel de transfert trophique des HAPs et de leurs métabolites et aucun modèle existant ne convient aux conditions environnementales du FS-ESL.

1.6. Hypothèses et objectifs de recherche

Plusieurs études décrivent combien les poissons et certaines espèces d'invertébrés marins sont capables de rapidement métaboliser les HAPs (Christensen et al., 2002; Giessing et al., 2003). Si d'aventure l'activation métabolique est suffisamment élevée, les HAPs parents issus du milieu ou de l'alimentation voient leurs concentrations rapidement réduites au profit d'une biotransformation en métabolites très réactifs et potentiellement cancérigènes (Rust et al., 2004b). De faibles capacités métaboliques favorisent une bioaccumulation des composés parents tandis que l'inverse contribuera à augmenter la charge corporelle en métabolites dont on ne sait pas grand chose de leur persistance dans le milieu ou de leur biodisponibilité trophique (Rust et al., 2004a).

Ces hypothèses reposant sur le peu d'informations issues des études impliquant des expositions orales aux HAPs (D'Adamo et al., 1997; Pruell et al., 2000; Rice et al., 2000), un des enjeux de nos travaux fut donc de développer un réseau trophique modèle permettant d'évaluer la toxicité des HAPs et de leurs métabolites à partir de sédiments vers des niveaux trophiques supérieurs. On connaît relativement peu la biodisponibilité des HAPs accumulés dans les tissus de certains invertébrés et le risque toxique associé à leur ingestion, encore plus dans les cas de mélanges complexes. Il n'existe aussi que peu d'outils pour prédire cette forme de toxicité sur une base autre que par des analyses chimiques uniquement. Ce faisant, il nous importa donc de développer un modèle novateur et représentatif du FS-ESL permettant d'optimiser certains aspects logistiques et statistiques tels que : la capacité d'élevage des organismes, le contrôle et la reproductibilité des conditions expérimentales, l'indépendance des mesures et la puissance statistique. Le but ultime consistant à concevoir un modèle expérimental suffisamment robuste et

fiable, permettant d'évaluer la réponse toxique de différents biomarqueurs et à terme, adaptable à une variété d'organismes du FS-ESL. Autant d'arguments qui militent en faveur d'un bioessai versatile et évolutif, qui permettrait à raison de coûts raisonnables et sur une courte échelle de temps, d'investiguer à terme, toutes ces différentes problématiques dans une optique de gestion du risque environnemental. Dans le cadre de nos travaux, les objectifs généraux poursuivis furent ainsi de :

- ✓ développer un réseau trophique modèle suffisamment robuste pour des utilisations futures compatibles avec une variété d'espèces, de niches écologiques et de xénobiotiques représentatifs du FS-ESL;
- ✓ d'évaluer la biodisponibilité trophique et la toxicité de HAPs parents et de leurs métabolites à partir d'une proie, le polychète *Nereis virens*, vers un poisson ubiquiste, *Fundulus heteroclitus* (choquemort), utilisé comme modèle expérimental;
- ✓ décrire le patron des réponses biochimiques et histologiques à une exposition orale en utilisant une batterie de biomarqueurs impliqués dans la cascade de réactions toxiques liées à des HAPs parents ou à leurs métabolites.

1.7. Approche expérimentale

À cet effet, un modèle expérimental permettant d'étudier le transfert trophique et la toxicité des HAPs des sédiments vers un polychète benthique puis vers un poisson pélagique fut mis au point puis testé avec un HAP cancérigène modèle (Figure 6). Dans un premier temps, les espèces choisies pour réaliser une incontournable calibration de ce modèle furent le poisson téléostéen *F. heteroclitus*, utilisé comme représentant prédateur, accompagné du vers polychète *N. virens*, à titre de vecteur benthique et proie naturelle potentielle du choquemort (Allen et al., 1994). Le choix du choquemort fut motivé par sa petite taille, sa facilité d'élevage en laboratoire, grâce entre-autre à son régime alimentaire varié, et sa sensibilité aux effets toxiques des HAPs (Van Veld et al., 1997). Le vers *N. virens* est de son côté, une espèce très abondante sur les rives de l'estuaire du St-Laurent, facile à élever en laboratoire et capable d'efficacement métaboliser des HAPs, particulièrement le B[a]P (McElroy et al., 2000). Ce dernier fut utilisé comme HAP cancérigène modèle car largement référencé pour ces effets génotoxiques, notamment sur les poissons (van der Oost et al., 2003). L'adaptabilité de ce bioessai devait permettre à terme, d'évaluer la toxicité d'une variété de proies consommées autre que celles consommées seulement par le choquemort. Considérant que les HAPs génotoxiques ont un mécanisme d'action démontré très semblable chez différentes espèces de poissons et chez les mammifères, notre intention était d'utiliser le choquemort à titre expérimental, afin de fournir de l'information qui rendrait notre modèle applicable à d'autres espèces prédatrices.

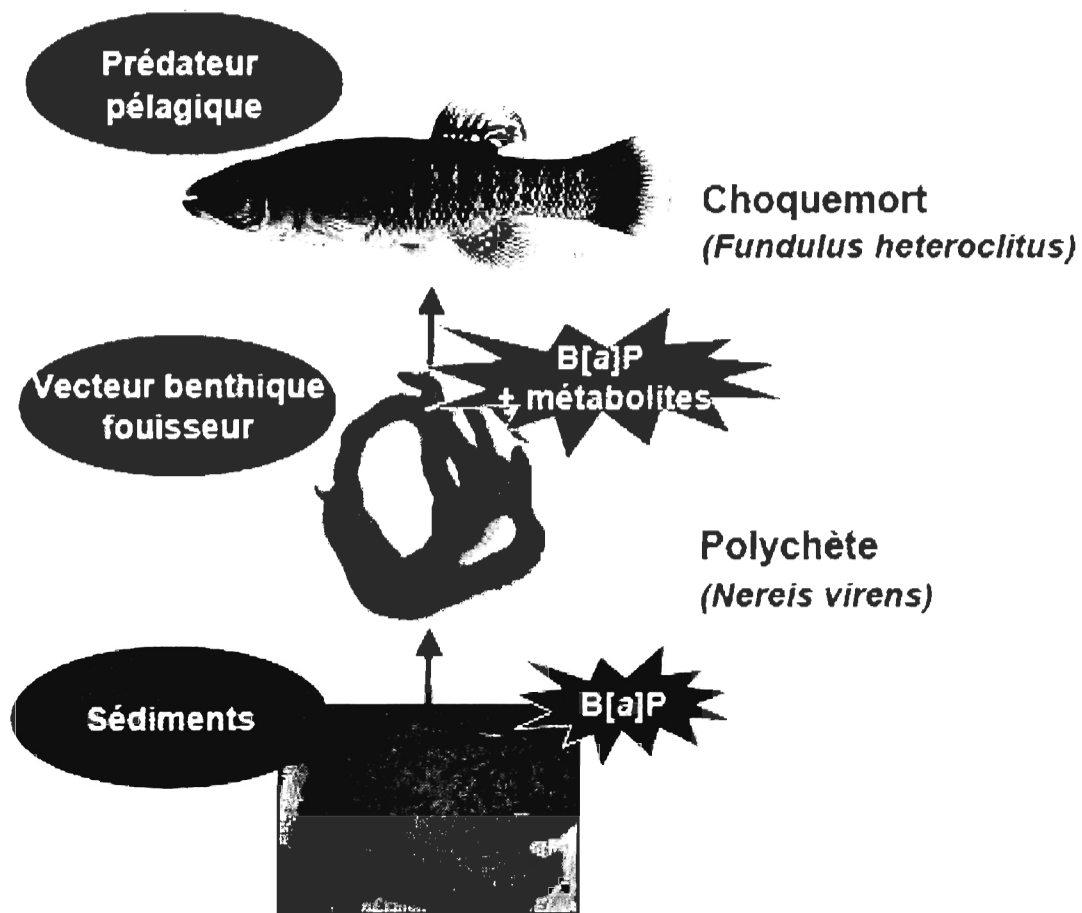


Figure 6 : description du réseau trophique modèle employé dans le cadre de cette étude.

CHAPITRE 2

A FISH BIOASSAY TO EVALUATE THE TOXICITY ASSOCIATED WITH THE INGESTION OF BENZO[*a*]PYRENE-CONTAMINATED BENTHIC PREY

AUTHORS:

Catherine M. Couillard¹, Benjamin Laplatte², Émilien Pelletier²

INSTITUTIONS:

¹ Department of Fisheries and Oceans, Maurice Lamontagne Institute,
Mont-Joli, QC, Canada.

² Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski,
Rimouski, QC, Canada.

2.1. ABSTRACT

The importance of ingestion of contaminated benthic prey as a route of exposure of fish and marine mammals to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) is controversial. Our objective was to develop and validate a fish bioassay to assess the trophic transfer and toxicity of PAHs and their metabolites from benthic prey to a predator. The teleost mummichog (*Fundulus heteroclitus*) was selected as a predator and the polychaete *Nereis virens* as a benthic vector. Benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) was used as a typical carcinogenic PAH. Ten groups of 9 male adult mummichogs were exposed during 21 days to 10 different *Nereis*-based diets contaminated with B[*a*]P by two ways: 1) *post mortem* (PM) contamination with B[*a*]P (6 PM diets, 0-26 µg/g dry weight B[*a*]P) or 2) *in vivo* (IV) exposure to a diet and/or to sediment contaminated with B[*a*]P (4 IV diets, 0-16 µg/g dry weight B[*a*]P). Another group of fish was exposed to commercial fish food (Nutrafin®), used as a reference diet. Condition factor, growth, hepatosomatic and gonadosomatic indices were not affected by the treatments. Exposure to the B[*a*]P-contaminated diets (≥ 3.5 µg/g) caused a significant elevation of ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in the intestine (Kruskal Wallis, $P \leq 0.05$) but not in the liver. Concentrations of benzo[*a*]pyrene-7,8,9,10-tetrol (BP-tetrol), a metabolite of B[*a*]P, was detected in the bile of fish exposed to diet containing 6.8 µg/g of B[*a*]P or more. In addition, fish exposed to the highest doses (≥ 13.4 µg/g) had an increased rate of hepatocellular proliferation indicated by a higher percentage of nuclei expressing the proliferating cellular nuclear antigen (PCNA) (Kruskal Wallis, $P \leq 0.05$). Prevalence of hydropic vacuolation tended to be higher in fish exposed to ≥ 20 µg/g but was not significantly enhanced. Fish exposed to IV diets exhibited responses similar to those observed in fish exposed to PM diets with similar concentrations of B[*a*]P. Thus, the fish bioassay

successfully detected the toxic effects associated with ingestion of benthic prey contaminated with a model PAH, B[a]P. Thus, the bioassay developed in this study could detect effects associated with ingestion of *Nereis* contaminated with B[a]P at environmentally realistic concentrations. This versatile assay could be used to assess the toxicity of a variety of prey species contaminated in the environment or experimentally. The most sensitive biomarker response was induction of EROD in the intestine, indicating the importance of evaluating biomarkers in the intestine in addition to liver in field monitoring.

Keywords: *Fundulus heteroclitus*, *Nereis virens*, Dietary Benzo[a]pyrene, PCNA, Intestine, liver, Ethoxyresorufin-*O*-deethylase

2.2. INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are widespread in estuarine and coastal areas, originating from industrial and urban sources of pollution, as wastewater, outfalls or fumes (Pham and Proulx, 1997; White et al., 1998a; White et al., 1998b). One of the main sources of PAH contamination in the Saguenay Fjord and St. Lawrence Estuary system (SF-SLE, QC, Canada), has been the fume and effluent of the aluminium smelters using Soderberg technology (CEPA, 1994). Because of their hydrophobic behaviour, PAHs tend to be adsorbed or segregated onto suspended particles or in sediments (Chen and White, 2004). Aquatic organisms can be exposed through contact with contaminated water, sediment or food. Chronic exposure of aquatic organisms to high molecular weight PAHs can induce carcinogenicity, alterations of the endocrine and immune systems or impairment in the development and survival of early life stages (Nacci et al., 2002) with impacts at the population level (Rose et al., 2001; Wu et al., 2003). In vertebrates, metabolic abilities are crucial in terms of toxicity because of the biotransformation of carcinogenic PAHs that may lead to oxidative stress, cytotoxicity, preneoplastic and neoplastic lesions. Their activation occurs primarily through the action of different isozymes of the cytochrome P450 monooxygenase (CYP), namely the CYP1A family in fish (van der Oost et al., 2003; Xue and Warshawsky, 2005). CYP catalysis may lead to the production of electrophilic and reactive metabolic intermediates that can form stable covalent bounds with some macromolecules as nucleic acids and proteins, involved in genotoxicity, cytotoxicity, hepatic lesions and cancer initiation in fish (Reichert et al., 1998; van der Oost et al., 2003).

High prevalence of gastro-intestinal tumors in SF-ESL beluga whales (*Delphinapterus leuca*) (Martineau et al., 2002) and liver tumors in St. Lawrence River fish (Couillard et al., 1997; Mikaelian et al., 2002) has been tentatively attributed to exposure to PAHs. Although diet is considered to be a major route of toxicant uptake, studies examining this route for uptake of PAHs in fish are rare (Van Veld et al., 1997; Wu et al., 2003). In most studies, fish are exposed to xenobiotic in water or intraperitoneal injection and most of the time, single PAH are used and are not representative of the complex mixtures found in prey in the field (Au et al., 2004). Currently, little is known about the trophic bioavailability and toxicity of PAHs to upper levels in the food chain (Rust et al., 2004b). Benthic invertebrates that inhabit chronically contaminated sites may accumulate high concentrations of PAHs and have been identified as potential trophic vectors for their predators (Baumard et al., 1998, Pruell et al., 2000; Lemiere et al., 2005). In SF-ESL, this question is of great concern because prey contaminated with PAHs originating from aluminum smelters have been identified as a possible factor in the development of gastro-intestinal cancer in endemic populations of belugas (Martineau et al., 2002). However, this hypothesis is only supported by rare tests in food chain models using prey species or toxic mixtures not representative of the SF-ESL ecosystem (D'Adamo et al., 1997; Lemiere et al., 2005; Rice et al., 2000).

Several studies have shown that most fish and some invertebrate species are able to actively metabolize PAHs (Christensen et al., 2002; Giessing et al., 2003). Different abilities exist among invertebrates. Some species like the polychaete *Nereis virens* have a high capacity to metabolize PAHs whereas some bivalves like *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus edulis*, or *Macoma baltica* have much lower capacity (D'Adamo et al., 1997; Rust et al., 2004a). Bioassays with invertebrates indicate that dietary uptake of metabolites would result in trophic transfer of some

biotransformed compounds rather than a complete elimination from the food web (Driscoll and McElroy, 1997). At a given trophic level, high metabolic activity would reduce parent-PAHs concentrations in association with a gradual biotransformation to PAH-metabolites with production of very reactive and potentially carcinogen compounds. Conversely, low metabolic abilities will promote bioaccumulation of parent-PAHs associated with low burdens of metabolites. Owing to this wide variability of metabolic capacities, PAH-metabolism is an important factor to consider in the case of trophic interactions because it modulates both toxicity and bioaccumulation of PAHs and their metabolites in aquatic organisms (Baumard et al., 1998). Consequently, both parent compounds and their metabolites accumulated in biota could be incorporated into marine food webs.

Very few studies explored the toxic effects associated with this trophic transfer of PAHs and their metabolites from benthic prey to their predators. D'Adamo et al. (1997) have reported increased activity of a CYP1A enzyme, ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD), in sea bass *Dicentrarchus labrax*, after 20 days of dietary exposure to mussels exposed to water and algae contaminated with B[a]P and 9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA). Rice et al. (2000) have shown increased CYP1A expression in liver parenchyma and intestinal mucosal epithelium and formation of hepatic DNA adducts in English soles *Pleuronectes vetulus* fed with *Armandia brevis* polychaetes previously exposed for 28 days to sediment contaminated with 4.3 to 7.1 µg/g dry weight of B[a]P. Lemiere et al. (2005) have measured DNA damage in rats fed with mussels (*Mytilus sp.*) contaminated *in situ* by the Erica oil-spill, demonstrating the bioavailability of genotoxic pollutants accumulated in contaminated prey.

In summary, the importance of ingestion of contaminated benthic prey as a route of PAHs intake in field conditions is still controversial, because the bioavailability of PAHs contained in invertebrate tissues is poorly known, because several benthic organisms are able to actively metabolize PAHs and finally, because the toxicity associated with ingestion of metabolites is poorly known. Thus, the risk of toxic effects associated with the ingestion of benthic prey containing a complex mixture of PAHs and their metabolites cannot be estimated based on chemical analyses alone. So, there is a need for a bioassay. The objectives of this study were: 1) to develop and validate a fish bioassay suitable to evaluate the dietary toxicity of a variety of prey organisms and contaminants of the SF-ESL; 2) to assess the trophic transfer and toxicity of PAHs and their metabolites from benthic prey to a predator; and finally 3) to describe a pattern of biochemical and histological responses using a battery of biomarkers.

For this first-step study, benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) a typical carcinogenic PAH was selected as a source of contamination. A small scale two-step food chain (prey/predator) bioassay was developed using the teleost mummichog (*Fundulus heteroclitus*) as a predator and its potential prey the polychaete *N. virens* as a benthic vector (Allen et al., 1994). Mummichog is abundant in estuaries along the Atlantic Western coast (Smith et al., 1998) and sensitive to B[*a*]P toxicity (Nacci et al., 2002; Rose et al., 2001; Van Veld et al., 1997). *N. virens* is ubiquitous in the SF-SLE (Caron et al., 2004; Ouellette et al., 2004), easy to breed in laboratory and able to metabolize PAHs, especially B[*a*]P (Jorgensen et al., 2005; McElroy, 1985; McElroy, 1990). Toxicity responses were assessed using EROD activity measurement and histopathological abnormalities in liver and intestine tissues.

2.3. MATERIALS AND METHODS

2.3.1. Experimental design

Mummichogs were exposed to diets of *N. virens* contaminated *post mortem* or *in vivo* with B[a]P. In addition to the parent-B[a]P contained in *N. virens* contaminated *post mortem*, *N. virens* contaminated *in vivo* were expected to contain PAH metabolites (McElroy et al., 2000). Fish were distributed into 99 individual basins with standardised and controlled conditions to provide independent measures and statistical power (Figure 1). Only males were selected to remove variability due to sex. In reproductively active fish, male mummichog are expected to have higher CYP1A activity than females (Meyer et al., 2002). Each basin was assigned randomly to one of the eleven following treatments. Mummichogs were exposed to 10 different *N. virens*-based diets contaminated with B[a]P by two different ways: 1) *post mortem* (PM), at six concentrations ranging from 0 to 26 µg/g (dose-response calibration), or 2) *in vivo* (IV), following *N. virens* exposure to four combinations of diet and/or sediment contaminated with B[a]P. Concentrations of B[a]P in the diets were selected to be sublethal and inducing biomarker responses (Van Veld et al., 1997) and were within the range of concentrations reported in benthic organisms collected at PAHs contaminated sites (Naes et al., 1995; 1999). Nutrafin[®] pellets for Cichlids were used as a reference diet.

2.3.2. *Post mortem* contamination of *N. virens* with benzo[a]pyrene

Frozen *N. virens* were purchased from Seabait Ltd (Woodhorn Village, Ashington, UK). A matrix of 180 g lyophilized (freeze-dried) polychaetes was spiked with 16 mL of a solution of 0.7

g/L B[a]P (purity > 98%, Sigma-Aldrich Co., St-Louis, MO, USA) in absolute ethanol/corn oil (50:50) (PM6 treatment). Another batch of 180 g control diet was prepared using 16 mL of the carrier solution (PM1 treatment). In order to produce a range of B[a]P concentrations ranging from 0.0 and 26.0 µg/g of dried food, various proportions of the PM1 and PM6 diets were mixed together to obtain other treatments from PM2 to PM5 as detailed in Table 1.

Table 1. Measured B[a]P concentration (HPLC analysis) in the diets prepared from *N. virens* contaminated *post mortem* (PM).

PM diets	PM1 (g)	PM6 (g)	[B[a]P] (µg/g dw)
PM1	60.0	0.0	0.0
PM2	45.0	15.0	3.5
PM3	30.0	30.0	6.8
PM4	15.0	45.0	13.4
PM5	7.5	52.5	20.0
PM6	0.0	60.0	26.6

2.3.3. *In vivo* contamination of *N. virens* with benzo[a]pyrene

Alive *N. virens* were acquired from Seabait Ltd (Franklyn, ME, USA) in June 2005. Batches of 39 ± 2 g *N. virens* were randomly distributed into 16 basins. Four groups of 4 replicate basins were exposed to one of these following treatments: 1) control food and control sediments (cF/cS); 2) B[a]P-contaminated food and control sediments (CF/cS); 3) control food and B[a]P-contaminated sediments (cF/CS); 4) B[a]P-contaminated food and B[a]P-contaminated sediments

(CF/CS). Sediment was collected from a reference site, at the Baie du Ha ! Ha ! (Parc du Bic, Québec, Canada). The sediment was sieved through a 1 mm mesh sieve and frozen at -20°C for at least 48 h before use to kill residual meiofauna. Contaminated sediment (CS) was contaminated by adding the desired amount of B[a]P dissolved in acetone carrier at 4 mg/ml (~ 100 ml/basin). Solution was added progressively and slowly stirred to the slurry of thawed sediment and seawater into 20x50x20 cm plastic basins. Control sediment (cS) was prepared by mixing sediments with an equivalent volume of acetone only. Each basin received 13.2 ± 0.7 kg of sediment. Then, the basins were kept at 4°C for one week. Assuming most of acetone was evaporated then, the basins were supplied with flowing water for 48 h before the introduction of polychaetes. Each of the 19 L basin received flowing seawater ($26.2 \pm 1.7\%$) at 500-750 ml/min. and $15.8 \pm 1.6^\circ\text{C}$ with the ~ 10 L overlying water maintained aerated (Lee II et al., 1989). Contaminated food (CF) was prepared by mixing 500 g of Nutrafin® with 50 ml of the same B[a]P solution (at 0.7 g/L B[a]P in absolute ethanol/corn oil (50:50) carrier) used to prepare the fish PM diets. Control food (cF) was prepared with an equivalent volume of non-contaminated carrier. Measured concentrations of B[a]P using the methods described by Desbiens et al. (2006) were 27.1 ± 3.4 µg/g in CS and 59.3 ± 2.9 µg/g in CF. *N. virens* were fed with cF or CF twice a day at 2% of their wet body mass (12L/12D photoperiod). At day 27, all the *N. virens* were recovered and pooled by group, lyophilized and kept frozen at -20°C prior to use for preparation of fish IV diets.

2.3.4. Preparation of *N. virens*-based diets

Each PM or IV *N. virens*-based diet was prepared by homogenizing lyophilized worms with 60% of mass equivalent of distilled water into a blender (the final mixture contained approximately

40% water). This mixture was prepared on ice and then pressed with a stainless cookie gun to obtain 1-cm diameter small sticks. These sticks were cut into pellets for preparation of individual rations. Individual rations with the number of pellets corresponding to 3% of the initial wet body mass of each fish. These rations were wrapped into hexane-rinsed aluminium foil and kept at -20°C until use.

2.3.5. Benzo[*a*]pyrene and hydroxylated benzo[*a*]pyrene analysis

Each dried and homogenized tissue sample (200 mg) was placed into a 25-ml Teflon™ tube and extracted with 5 mL of hexane:acetone (50:50, v/v) in ultrasonic bath for 30 min at 30°C, then mechanically shaken for 3 h, and finally sonicated for 30 min. The tube was centrifuged for 15 min at 3000 rpm and the supernatant transferred to a conical flask. The extract was concentrated under a nitrogen flow at 0.5 ml, and then eluted through a clean-up with octadecyl gel column (Supelclean ENVI™ – 18 SPE 3 ml, SUPELCO) with 1-cm silica gel layer at the head of the column with 6 mL of 90:10 hexane:acetone. The cleaned extract was concentrated to 200 µL in an ice bath. B[*a*]P and HO- B[*a*]Ps were analyzed by HPLC with fluorescence detection using the same extract. The pump program for BaP began with 75 % acetonitrile for 1 min and increased to 95 % in 9 min and then to 100 % in the next 10 min, with a final plateau of 15 min. The cycle returned to 75 % acetonitrile after a total run time of 35 min. The excitation wavelength of fluorescence detector was settled at 280 nm and the emission at 410 nm until the end of the program. The pump program for HO-B[*a*]P began with 65 % acetonitrile for 25 min and increased to 100 % in the next 5 min, with a final 5-min plateau (35-min total run). The excitation wavelength of the fluorescence detector was settled at 244 nm and the emission was detected at 394 nm. Quality controls have been conducted using successive injections of standard solutions

for precision and accuracy ($< \pm 10\%$). Using repeated injections of spiked samples, B[a]P and HO-B[a]P recoveries ranged between 65-105%. Concentrations obtained of B[a]P and HO-B[a]P were adjusted for recovery yields.

2.3.6. Mummichog exposure

Adult mummichogs were captured at a reference site at Horton's Creek during May 2005 (New Brunswick, Canada), where the population has been proved to be sensitive to PAHs in earlier studies (Couillard et al., 2005a). Fish were then maintained in the laboratory for approximately one month before the experimental setup. One week before experiment, 99 males (7.6 ± 1.5 g and 9.5 ± 0.5 cm) were anaesthetized with tricaine methane sulfonate MS222 (Sigma-Aldrich Co., St-Louis, MO, USA) weighed and measured before being randomly introduced into the individual 1.5 L experimental basins (14 x 14 x 10 cm). Each plastic basin received a continuous filtered marine water flow at 25 ‰ and 18°C and was exposed to a 16L/8D photoperiod. Fish were acclimatized to the experimental conditions and uncontaminated *N. virens* diet for 7 days before the beginning of the 21-days exposure period. During exposure, fish received a daily ration of 3% of their initial wet body mass of the diet corresponding to their respective treatment. At the end of the exposure period, fish were stunned with a blow to the head a few seconds before sampling. Total body length and mass, liver, gonad and eviscerated carcass masses were measured. The whole gallbladder was preserved and stored at -80°C for analysis of benzo[a]pyrene-7,8,9,10-tetrol concentration. Sections of the central part of liver, and of proximal and middle parts of the intestine were removed and fixed in 10% phosphate-buffered formalin for histopathological and immunohistochemical assessments. The remaining parts of the liver and intestine were minced, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for measurements of EROD activity.

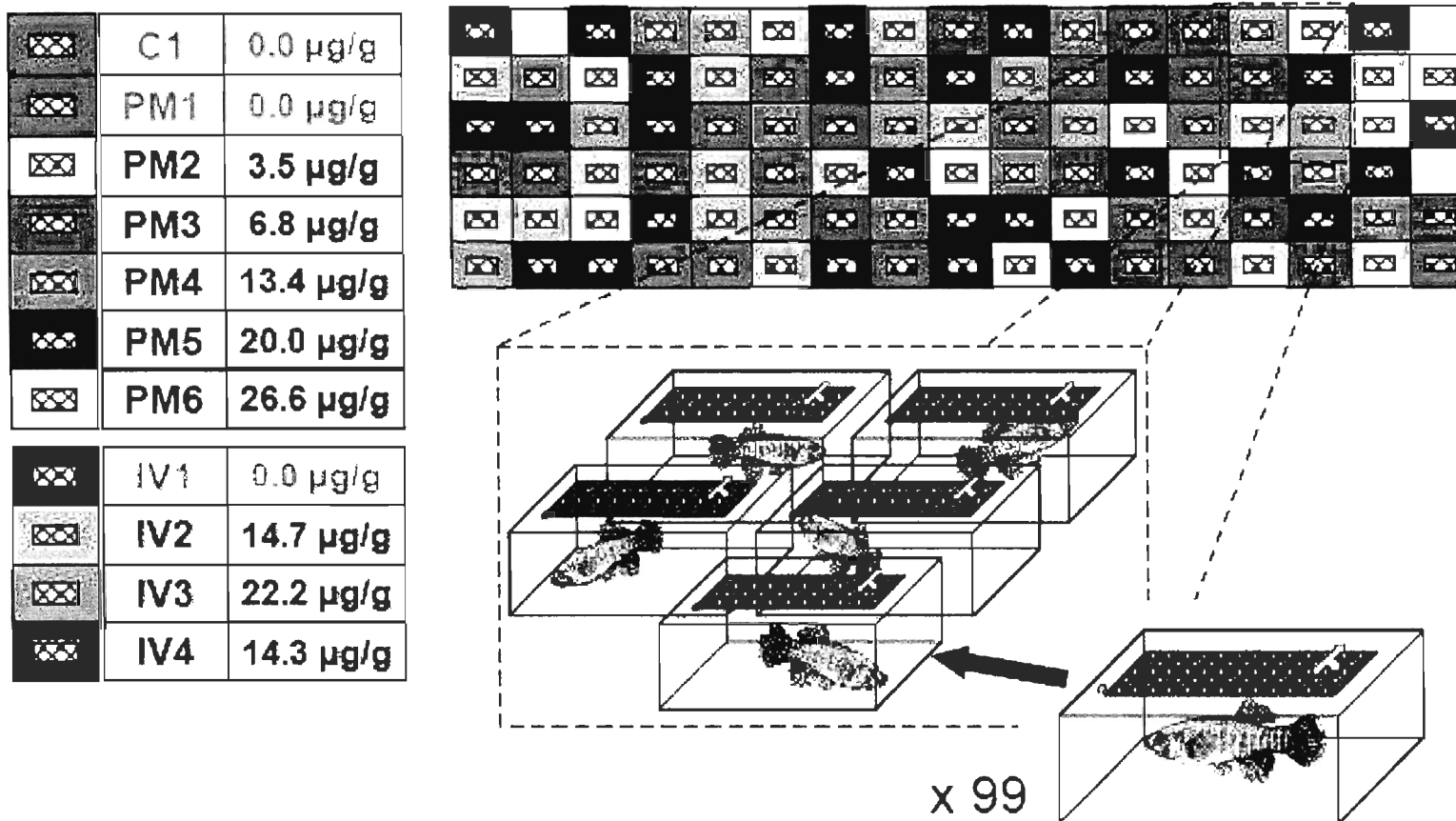


Figure 1. Schematic overview of the experimental set-up. Each basin was assigned randomly to one of the eleven treatments (illustrated by different colours): six *post mortem* (PM1-6, 0 to 26.6 µg measured B[a]P/g dw) contaminated diets; four *in vivo* (IV1-4, 0 to 22.2 µg measured B[a]P/g dw) contaminated diets or Nutrafin[®] commercial fish food used as additional control (C1).

2.3.7. Benzo[*a*]pyrene-7,8,9,10-tetrol analysis in the bile

Each pool of three randomly-selected whole gall bladders (n = 3 pools of 3 gall bladders / treatment) was weighed into an amber vials and homogenized in 400 µl of methanol with a vortex during 1 min. Then, membranes of the gall bladders were crushed with a spatula before filtering the supernatant into a Millex[®] syringe driven unit (Bedford, MA, USA) equipped with a 0.22 µm Millipore[®] filter. Samples were preserved from the light before HPLC analyses. Fluorescence HPLC was done using a Shimadzu LC-10AD liquid chromatograph equipped with a Supelcosil LC-PAH column (25 cm x 3 mm i.d., 5 µm; Supelco, Mississauga, ON, Canada) and a SpectraSYSTEM FL 3000 fluorescence detector. The sample was eluted with mobile phase of 55% methanol in nanopure filtered distilled water with a flow rate of 0.8 mL/min and 40°C column temperature. Detection was done using a wavelength pair of 280 (excitation) and 410 (emission) nm which is appropriate for PAHs metabolites (Padros and Pelletier, 2000). Concentrations were calculated using a standard curve generated from the peak height of benzo[*a*]pyrene-7,8,9,10-tetrol (Sigma-Aldrich Co., St-Louis, MO, USA). Analytical error was estimated to ± 17% using repetitive extractions (n=3) of the same sample.

2.3.8. EROD activity in intestine and liver

The method was adapted from Parrot et al. (1995) and is detailed in Couillard et al. (2004). Briefly, EROD activity in the intestine and liver S9 fractions was measured at 22°C in sterile 96-multiwell microplates (Costar Inc., Corning, NY, USA) using a spectrofluorometric method. Resorufin fluorescence was measured with a Cytofluor[®] II plate reader (Biosearch Co., Bedford,

MA, USA) with a 530 nm excitation filter and a 590 nm emission filter. Reaction mixtures contained 50 μ l S9 in HEPES buffer (0.1 M, pH 7.8), 10 μ l NADPH (20 mg/ml) and 50 μ l of 7-ethoxyresorufin (0.024 mg/ml in DMSO). Activity was quantified by measuring the fluorescence of resorufin at 60 sec. intervals over a total scan time of 13 min. Total protein content of S9 fractions was measured spectrophotometrically (595 nm, Multiskan Ascent[®], Thermo Electron Co., Vantaa, Finland) with Bradford reagent, using bovine serum albumin as a standard (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA). All samples were assayed in triplicate and bovine serum albumin and resorufin were used to generate standard curves for each plate. EROD activity was calculated as pmol resorufin/mg protein/min. Liver homogenates from pools of 12 mummichogs injected IP with 10 mg/kg B[a]P (1.0 mg/ml in corn oil) and sampled 48 h after treatment were used as positive controls (Ploch et al., 1998). EROD activity for positive controls was 21.82 ± 4.53 pmol/min/mg of protein in the liver.

2.3.9. PCNA labeling in intestine and liver

The rate of cellular proliferation in liver and intestine was assessed by immunohistochemistry. Immunohistochemical labeling of PCNA in hepatocytes and enterocytes was performed on 6 μ m tissue sections using a modified method of Ortego et al. (1996) described in Couillard et al. (2005b). Briefly, deparaffinised slides were heated in citrate buffer for antigen retrieval and immersed in 3.0% hydrogen peroxide and 25% methanol for quenching endogenous peroxidase. Sections were incubated overnight at 4°C with a purified anti-human PCNA mouse monoclonal antibody at dilutions of 1:400. The substrate chromogen was 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, and slides were counterstained with Mayer's hematoxylin. In the intestine, the *PCNA labeling extent* (PLE) along intestinal villi was evaluated using a modification of the semi-

quantitative method described in Sanden et al. (2005). Four villi per intestine transversal section (2 sections per fish) were examined, randomly selected in each quarter of the section. The PLE was graded from 1 to 4 using the following criteria: 1/4 (1), 2/4 (2), 3/4 (3) and 4/4 (4) of the villus height, from basis to apex, labelled with a similar intensity than the adjacent crypt. In liver, the *PCNA labeling index* (PLI = percentage of nuclei positively labelled) was measured by scoring at least 600 cells per tissue section per individual, in randomly selected fields examined with a microscope at 630x.

2.3.10. Histopathology

Tissues were embedded in paraffin and sections 5 µm thick were stained with hematoxylin and eosin (Luna, 1968). Presence or absence of inflammatory or degenerative changes was evaluated in the intestine and the liver. In the liver, density of pigmented macrophage aggregates (PMA) was assessed. Increased density of PMA has been induced experimentally in fish treated with various toxic compounds, and has been observed in wild fish exposed to pulp mill effluent and to other environmental contaminants (Couillard et al., 1999). Several known toxic effects of pulp mill effluents could contribute to this response including increased rates of lipid peroxidation associated with induced CYP1A, toxic hemolysis and immunosuppression (Couillard et al., 1999). Total number of PMA were evaluated at 200x magnification in the whole section and by dividing the number of observations by the total area of the section measured in mm² with an image analysis system (Sigma Scan Pro). To be categorised as a PMA, an aggregate of macrophages had to be composed of three or more cells containing yellow to dark brown pigments within their cytoplasm.

2.3.11. Statistical analysis

Morphometric parameters analyzed were total body length (cm) and mass (g), mass gain index (MG = mass D21 / mass D0), condition factor (CF = eviscerated carcass mass (g)/ total body length (cm)³) and hepatosomatic index (HSI = liver mass (g)/eviscerated carcass mass (g)) and gonadosomatic index (GSI = gonad mass (g)/eviscerated carcass mass (g)). Morphometric parameters and biomarker responses were not normally distributed and were compared among treatment using Systat 10.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA) with a Kruskal Wallis test (KW). When significant differences were detected ($P \leq 0.05$), it was followed by a one-way ANOVA on a ranked data set with Tukey's studentized range test. For EROD activity in the intestine (ERODI) and PLI, examination of the data revealed the presence of a sub-group of fish apparently not responding to treatment and causing large variability of the response. The proportion of responding fish (with a response higher to the mean of control, $PM1 + 2 SD$) was determined and compared among treatments using a pairwise Fisher test (F).

2.4. RESULTS

2.4.1. Survival and morphometric parameters

Fish became acclimated fast to the experimental system. Food was easily accepted by all fish and total wet body mass remained relatively stable. Four deaths were counted during the first week of exposure in treatments PM1 (1), IV1 (2) and IV3 (1) without link to the dose of B[a]P. Finally, treatments had no effect of the morphometric parameters assessed including MG, CF, HSI and GSI (KW, $P > 0.05$). For all treatments combined, final means \pm SD for total body length and wet body mass were 8.5 ± 0.5 cm and 7.3 ± 1.3 g respectively, with a mass gain index (MG) of 0.96 ± 0.07 (CF = 1.02 ± 0.07), a HSI of 3.51 ± 0.85 and a GSI of 3.05 ± 0.61 . No more effects were seen on fish health.

2.4.2. Benzo[a]pyrene-7,8,9,10-tetrol analysis in the bile

Quantifiable levels of BP-tetrol were detected in the bile of fish exposed to diets contaminated with more than $6.8 \mu\text{g/g}$ of B[a]P and exhibited a dose-response relationship in fish exposed to PM diets (Figure 2). Concentrations of this metabolite in the bile were significantly increased (up to 20 ng/g of bile) at concentration of $13.4 \mu\text{g/g}$ of B[a]P or higher (KW, $P \leq 0.05$). For the same concentrations of B[a]P, bile metabolite concentrations did not differ between PM and IV diets (KW, $P \geq 0.05$). Among the IV treatments, the IV4 diet induced the highest concentration of BaP tetrols in the bile.

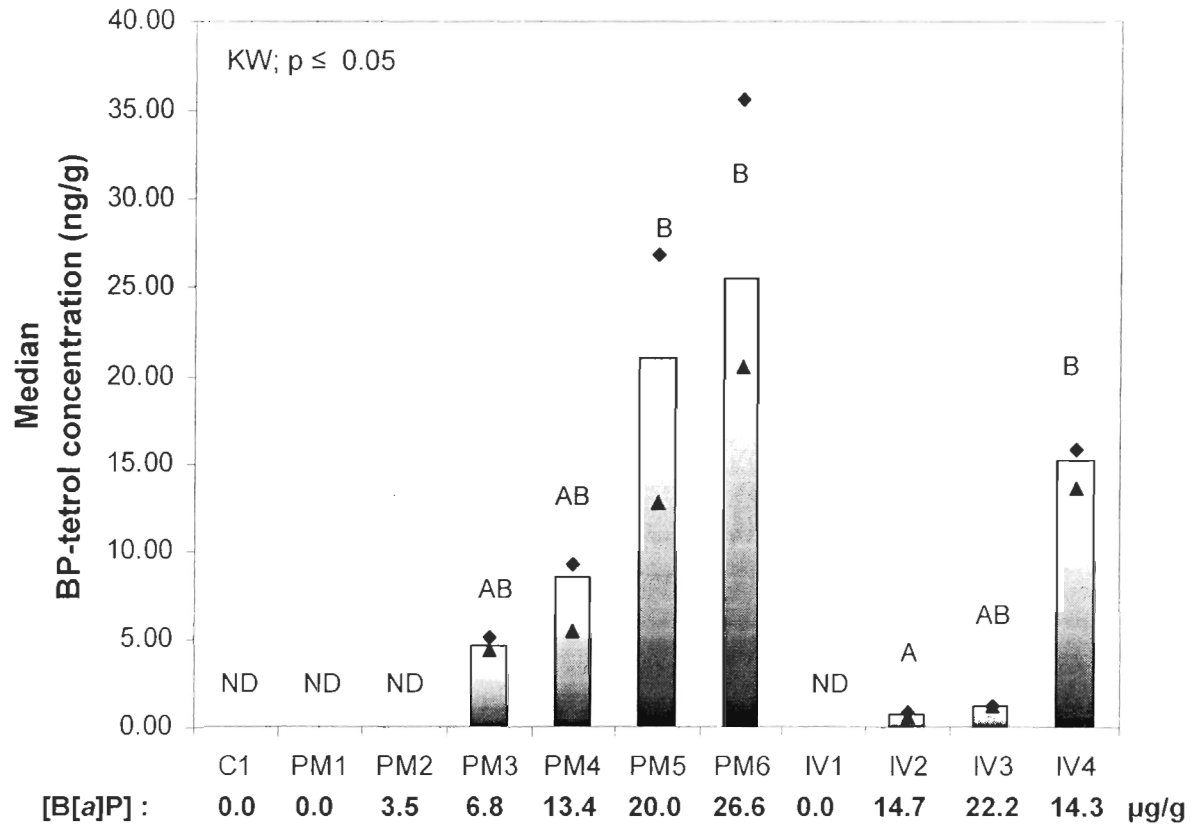


Figure 2. Benzo[*a*]pyrene-7,8,9,10-tetrol concentrations in the bile in mummichogs exposed to diets prepared with *N. virens* contaminated *post mortem* (PM) or *in vivo* (IV) with B[*a*]P or to commercial fish diet (C1).¹

¹ Values are presented as medians, Q1 (▲) and Q3 (◆), n=3 pools of 3 gall bladders per treatment. Measured dry weight concentrations of B[*a*]P in the diets are on the x axis. Medians with different letters indicate significant differences among treatments (Kruskal Wallis, $P \leq 0.05$).

2.4.3. EROD activity in intestine and liver

Exposure to some B[a]P-contaminated diets caused a significant elevation of median EROD activity in the intestine (KW, $P \leq 0.05$) but not in the liver (Figure 3). ERODI activity increased with B[a]P dose up to 40-times higher than controls (PM1) in fish exposed to 20 $\mu\text{g/g}$ of B[a]P contaminated diet (PM5) with lower activity (but not significantly lower) in fish exposed to the highest concentration (PM6). ERODI activity was highly variable with some fish not responding within each treatment. The proportion of fish exhibiting significant ERODI induction (ERODI activity greater than 6.90 pmol/min/mg of protein, mean of PM1 ERODI activity + 2 SD) was significantly enhanced in fish exposed to diets with $\geq 3.5 \mu\text{g/g}$ B[a]P (F, $P \leq 0.05$). For the same concentration of B[a]P, median EROD activity or proportions of fish showing EROD induction did not differ significantly between PM and IV diets for either intestine or liver (Figure 3).

2.4.4. PCNA labelling in intestine and liver

Contrary to what was observed for EROD induction, exposure to some B[a]P contaminated diets caused an enhanced rate of cell proliferation in the liver (KW, $P \leq 0.05$) but not in the intestine (Figure 4). For PLI, within each treatment, the response was highly variable with some individuals exhibiting enhanced hepatocellular proliferation rate and others not responding (Figure 5). The proportion of fish with induction of hepatocellular proliferation (PLI $\geq 2.9\%$, mean of PM1 + 2 SD) was significantly enhanced, compared to controls (PM1), in fish exposed to diets contaminated with $\geq 13.4 \mu\text{g/g}$ B[a]P (F, $P \leq 0.05$). Again, for the same concentration of B[a]P, the rate of cellular proliferation was not significantly different between PM and IV diets for either intestine or liver (Figures 4 and 5).

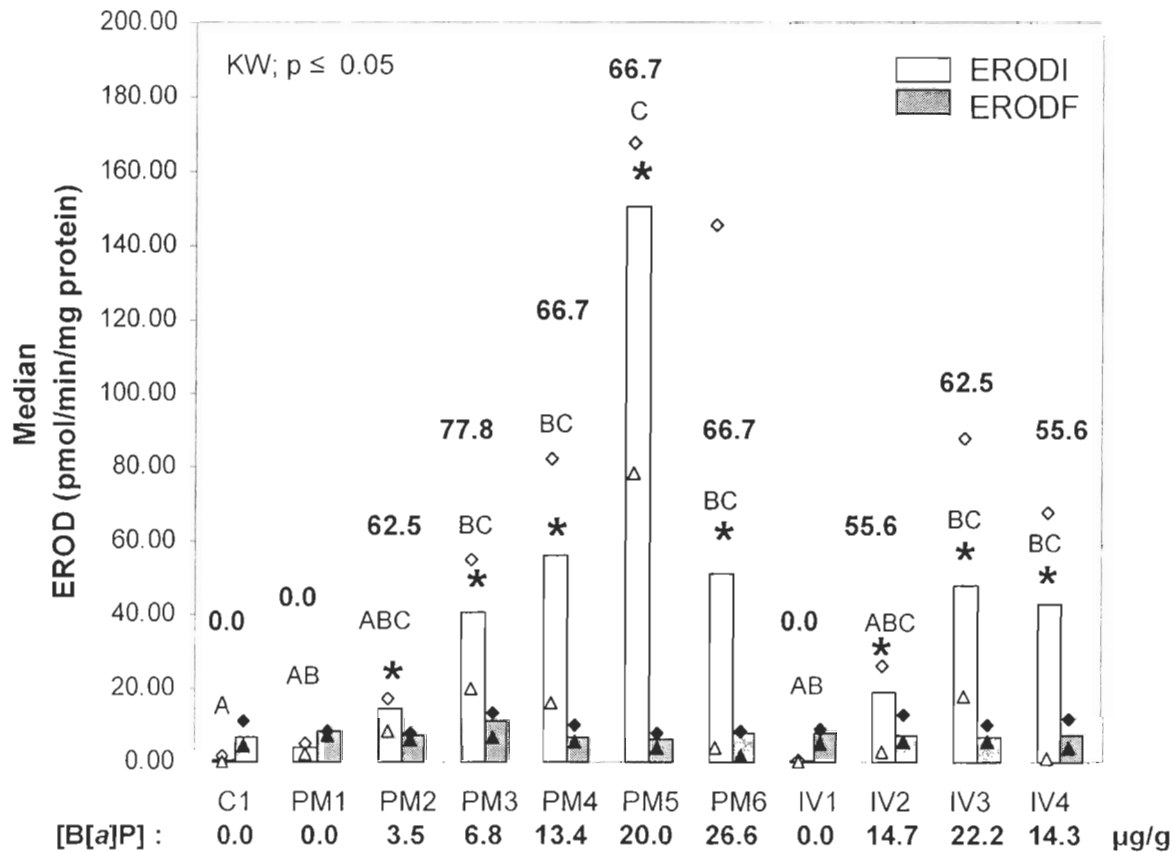


Figure 3. Ethoxyresorufin-*O*-deethylase activity levels in intestine (ERODI - white) and liver (ERODF - grey) in mummichogs exposed to diets prepared with *N. virens* contaminated *post mortem* (PM) or *in vivo* (IV) with B[a]P or to commercial fish diet (C1).²

² Values are presented as medians, Q1 (Δ , \blacktriangle) and Q3 (\diamond , \blacklozenge), n=7-9 per treatment. Measured dry weight concentrations of B[a]P in the diets are on the x axis. Medians with different letters indicate significant differences among treatments (Kruskal Wallis, $P \leq 0.05$) and stars (*) indicate treatments with enhanced proportions of fish with induced EROD activity compared to PM1 controls (Fisher's exact test, $P \leq 0.05$); proportion of fish exhibiting a significant ERODI induction is given above the bars (%).

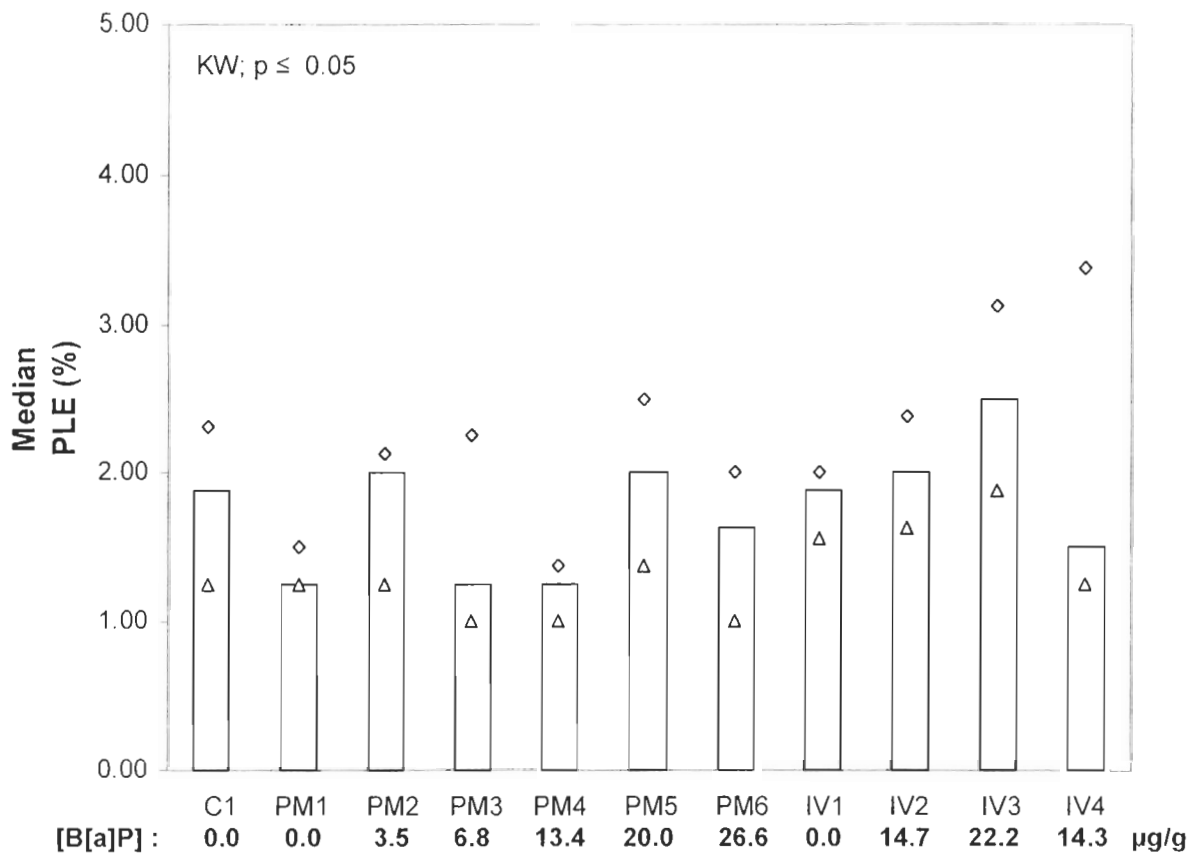


Figure 4. Proliferating cellular nuclear antigen (PCNA) labeling extent in enterocytes along intestinal villi (PLE) in mummichogs exposed to diets prepared with *N. virens* contaminated *post mortem* (PM) or *in vivo* (IV) with B[a]P or to commercial fish diet (C1).³

³ Values are presented as medians, Q1 (△) and Q3 (◇), n=7-9 per treatment. Measured dry weight concentrations of B[a]P in the diets are on the x axis.

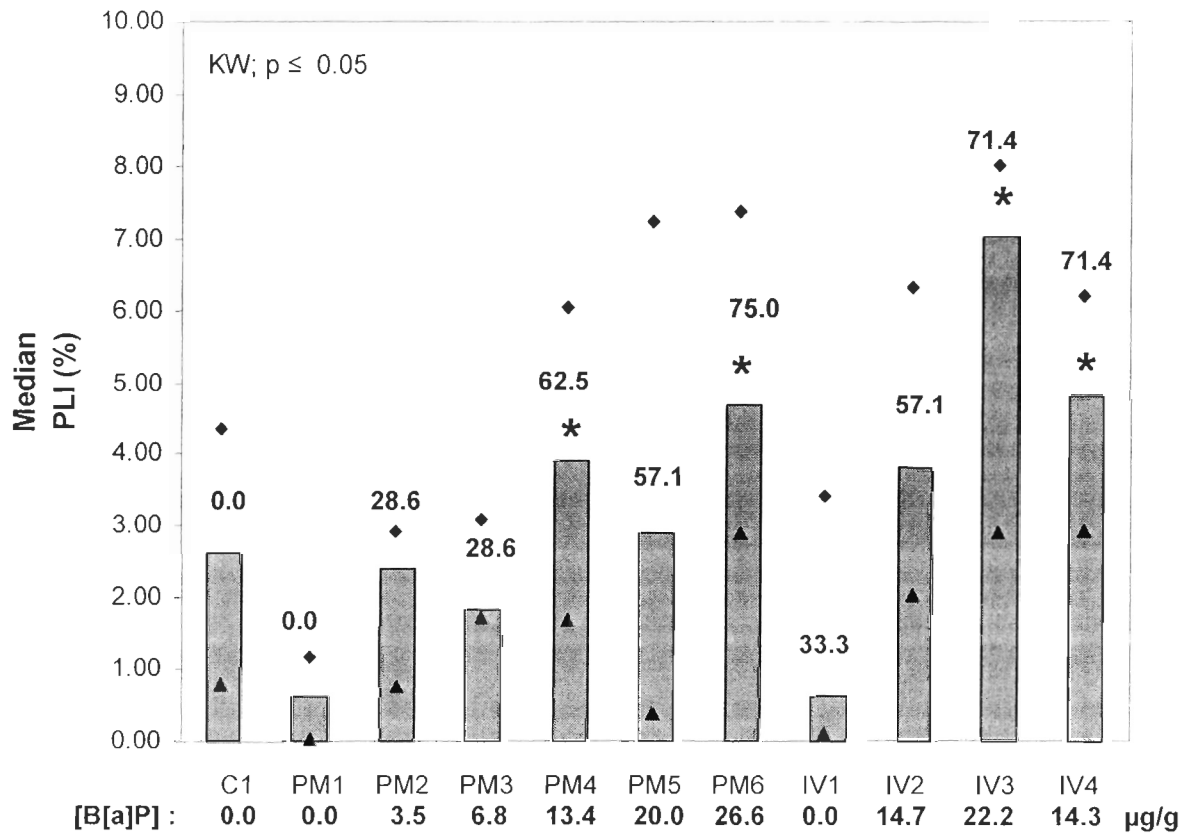


Figure 5. Proliferating cellular nuclear antigen (PCNA) labeling index in liver hepatocytes (PLI) in mummichogs exposed to diets prepared with *N. virens* contaminated *post mortem* (PM) or *in vivo* (IV) with B[a]P or to commercial fish diet (C1).⁴

⁴ Values are presented as medians, Q1 (▲) and Q3 (◆), n=7-9 per treatment. Measured dry weight concentrations of B[a]P in the diets are on the x axis. No difference was detected among treatments (Kruskal Wallis, $P \geq 0.05$), and stars (*) indicate treatments with enhanced proportions of fish with induced PLI compared to controls (Fisher's exact test, $P \leq 0.05$); proportion of fish exhibiting a significant ERODI induction is given above the bars (%).

2.4.5. Histopathology

Hydropic vacuolation of hepatocytes was observed in the liver of mummichog exposed to all treatments (Figure 6). This lesion was characterized by the presence of many clear vacuoles, sometimes aggregated, of variable size in the cytoplasm with nuclei that tended to be displaced to the cell margins (Koehler, 2004). There was no statistically significant effect of BaP treatment on prevalence of hydropic vacuolation but at concentrations of BaP in diets $\geq 20 \mu\text{g/g}$ dry wt, more than 50 % of fishes per treatment were affected by this lesion, with close to 67 % of the fishes affected for PM5 (Table 2). The density of pigmented macrophage aggregates (PMA) in the liver was highly variable and not significantly affected by treatment (KW, $P \geq 0.05$). Parasitic cysts were observed in several liver sections and their prevalence was not related to treatment (data not shown). PMA were occasionally associated with parasitic cysts.

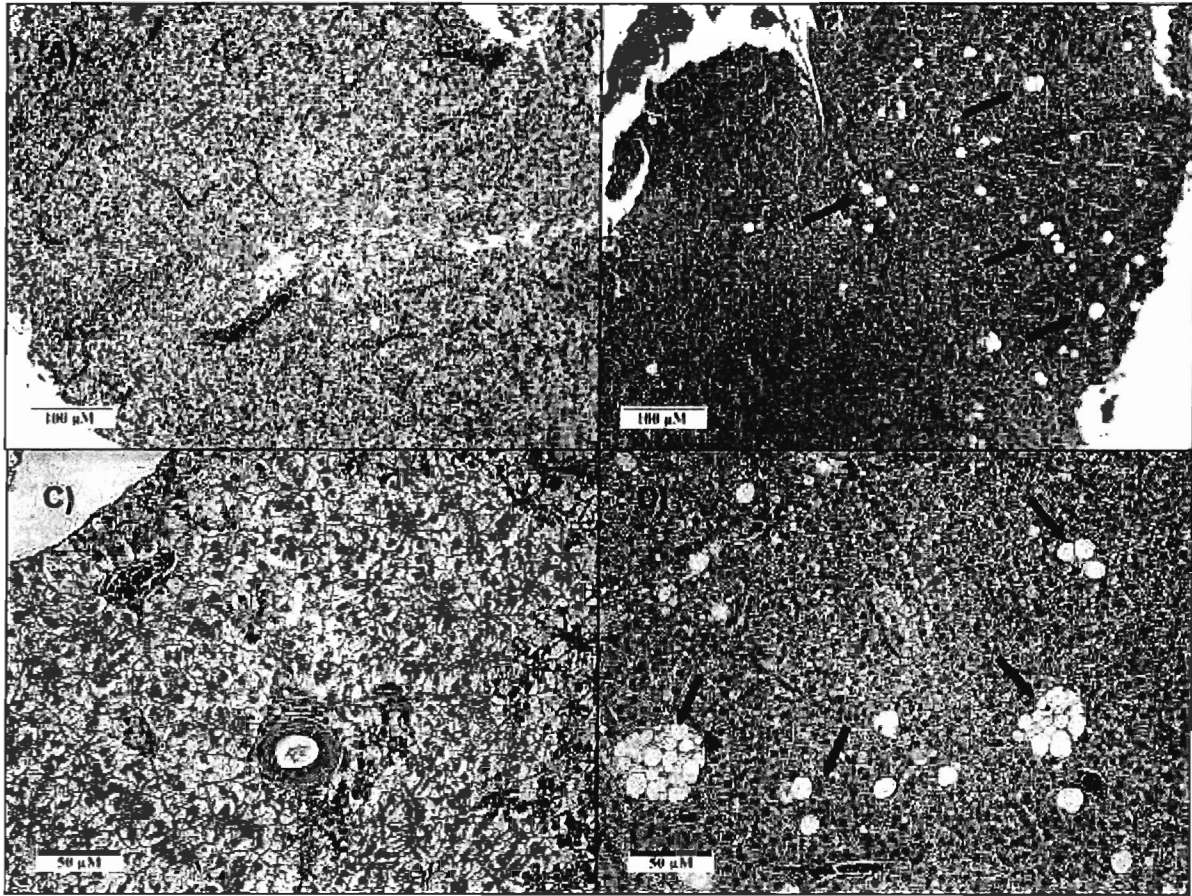


Figure 6. A) and C) normal liver of mummichogs exposed to control diet (PM1) and B) and D) liver exposed to a diet contaminated with 20 µg/g dry weight concentration of B[a]P (PM5) and exhibiting hydropic vacuolation of the hepatocytes (arrows).⁵

⁵ A) and B) shown at 200x; bar = 100 µM; C) and D) shown at 400x; bar = 50 µM. Hematoxylin and eosin.

Table 2. Prevalence of hydropic vacuolation and density of pigmented macrophage aggregates in the liver of mummichogs exposed to diets prepared with *N. virens* contaminated *post mortem* (PM) or *in vivo* (IV) with B[a]P or to commercial fish diet (C1).⁶

Diets	B[a]P (µg/g)	n	PHV	PMA
C1	0.0	9	22.2	0.13 ± 0.19
PM1	0.0	8	37.5	0.10 ± 0.12
PM2	3.5	9	33.3	0.14 ± 0.30
PM3	6.8	9	44.4	0.13 ± 0.25
PM4	13.4	9	22.2	0.10 ± 0.13
PM5	20.0	9	66.7	0.17 ± 0.28
PM6	26.6	9	55.6	0.11 ± 0.17
IV1	0.0	7	42.9	0.16 ± 0.11
IV2	14.7	9	44.4	0.12 ± 0.19
IV3	22.2	8	25.0	0.05 ± 0.08
IV4	14.3	9	33.3	0.21 ± 0.25

⁶ n = number of fish per treatment; PHV = prevalence of hydropic vacuolation (% of affected fish per treatment) and PMA = mean ± SD of pigmented macrophage aggregates density (number/mm²). No differences were seen between treatments for PHV (Kruskal Wallis, P ≥ 0.05).

2.5. DISCUSSION

2.5.1. A successful trophic fish assay

The first objective of our study was to develop and validate a fish bioassay suitable for a variety of prey species and contaminants of the SF-SLE. One key element of this bioassay was to use representative species of the SF-SLE. Following tests of various prototypes of basins, a robust and easily reproducible experimental design was also developed. It appeared that mummichog adapted well to the experimental basins and remained in good health. To control the quantity of food ingested, an original method of preparation of a diet containing *Nereis* and easily adaptable to other types of prey was developed after various tests including tests of acceptability by mummichogs. A control *Nereis*-based diet was accepted well after only 2-3 days of adaptation over a 7-day period of acclimatization to this kind of food before the beginning of exposure.

Several high molecular weight PAHs act with the same mechanism of action as B[a]P and their concentrations can be expressed as B[a]P equivalent concentrations. Concentrations of B[a]P equivalents found in mussels and shrimps in Norway nearby smelter discharges in the middle of the 90's were of the same range than the B[a]P concentrations of our diets (3.3 to 52.0 µg/g) (Naes et al., 1995; 1999). The exposure of the *in vivo* contaminated *Nereis* in controlled conditions proceeded well and *Nereis* could be contaminated with concentrations of 14 to 22 µg/g of parent B[a]P, in the range of those selected for PM diets dose-response curve.

The subsequent exposure of the mummichogs to these two types of diets proceeded well. Mummichogs behaved well during the exposure as shown by a relatively stable body mass. A

small sample size (n=9) was used with high doses of B[a]P for this initial development phase of our bioassay and for further studies, sensitivity of the bioassay could easily be enhanced by increasing sample size and be completed with other biomarkers (like measures of oxidative stress, DNA-adducts, etc.). Increasing the duration of exposure and/or observation of the fish would allow evaluation of cancer progression, particularly in the liver, intestine and pancreas. Because our model is easy to repeat and relatively not expensive, it is adequate for other applications such as assessment of the toxicity associated with the ingestion of a variety of benthic prey species contaminated experimentally or in the natural environment. It has already been proved to be versatile and was used by our team during the summer 2006 to assess the toxicity of *Nereis* collected in the habitat of the SLE and of *Nereis* contaminated with sediments coming from the SF and muds of aluminium works.

The other objectives of this bioassay also consisted to assess the trophic transfer and toxicity of B[a]P and its metabolites from *N. virens* to *Fundulus* using a battery of biomarkers to finally describe a pattern of biochemical and histological responses.

2.5.2. Trophic transfer and metabolism

A metabolite of the B[a]P, the BP-tetrol, was measured in the bile of fish exposed to diets containing concentrations of B[a]P higher than 6,8 µg/g. Therefore, concentrations of BP-tetrol in the bile illustrate that a proportion of metabolites of B[a]P generated in the intestine at high doses, seemed to cross the intestinal barrier to go to the liver, contrary to parent-B[a]P (Ramesh et al., 2004). Rouleau et al. (2006) have also demonstrated using autoradiographic

techniques that the major part of radiolabelled parent-B[a]P is retained in the intestine of the mummichog via dietary exposure.

The activity of EROD in the intestine was up to 40 times higher in fish exposed to a 20 µg/g B[a]P contaminated diet compared to controls. ERODI was our most sensitive biomarkers. The proportion of fish with induced ERODI activity was significantly enhanced with a diet containing 3.5 µg/g of B[a]P or more, which is an environmentally realistic level found in invertebrates collected in highly contaminated sites (Yuen and Au, 2006). At the greatest concentration of B[a]P (PM6, 26.6 µg/g), ERODI activity tended to decrease, a possible inhibition due to toxicity (Couillard et al., 2005a; Willett et al., 2001). Within each treatment, a great interindividual variance was noted, without apparent link with the food uptake, monitored daily (data not shown) suggesting endogenous reasons. This variability could be a consequence of differential exposure, genetic polymorphism and/or post-transcriptional inhibition of CYP1A activity (Wirgin and Waldman, 2004). Differential exposure is not likely an important factor in this experiment using individual tanks and controlled daily rations. Heritable resistance to teratogenicity and to CYP1A inducibility for PAHs has been reported in some populations of *Fundulus heteroclitus* (Meyer et al., 2002). Thus, genetic polymorphism could be a factor contributing to the observed variability. Inhibition of EROD activity as a consequence of oxidative stress and cytotoxicity has also been reported before in *Fundulus* exposed to high concentrations of PAHs (Couillard et al., 2005a). These latter mechanisms could explain the higher variability of ERODI observed in fish exposed to high dietary doses of BaP and the nonmonotonous dose-response. Considerable variation of ERODI has been reported previously in groupers dietary exposed to BaP (Yuen et Au, 2006). A larger fish sample size ($n > 9$) is recommended to increase statistical power for evaluation of

responses of ERODI and hepatocyte proliferation at low exposure levels, for both bioassays and field monitoring.

Our work highlights the pattern of typical biochemical and histological responses of an exposure to dietary PAHs. Mummichogs exposed to B[a]P by intraperitoneal or aqueous routes have been shown to develop CYP1A-mediated responses in the liver in the range of our concentrations (Wassenberg et al., 2002; Willett et al., 2001) but in our study, oral administration of B[a]P has been used in an attempt to mimic one possible natural route of exposure. Mummichogs exposed to the diets of *Nereis* contaminated with B[a]P have exhibited a pattern of biomarkers responses typical of an oral exposure. EROD activity was increased in the intestine but not in the liver, as previously described in mummichogs exposed to 10 µg/g dietary B[a]P by Van Veld et al. (1997) and in juvenile groupers (*Epinephelus coioides*) exposed to 0.25 and 12.5 µg/g dietary B[a]P by Yuen and Au (2006). Thus, parent B[a]P was not apparently transferred from the intestine to the liver in sufficient quantities to induce EROD activity and may be efficiently metabolized in the intestine.

For the same concentration of B[a]P in the diets, IV and PM treatments caused similar levels of activity of EROD and cellular proliferation in the intestine and the liver, as well as concentrations in BP-tetrol in the bile. Thus, B[a]P metabolites that could have been produced in the *Nereis* did not apparently contribute to the observed responses of the biomarkers tested. IV-diets were supposed to contain parent-B[a]P mixed with metabolites generated by the *Nereis*, but no B[a]P metabolites were detected in the IV diets even though *N. virens* is well-known to efficiently metabolize B[a]P (Jorgensen et al., 2005; Rust et al., 2004a). However, the absence of detection of BP-tetrol does not exclude the presence of other metabolites produced by *Nereis*. Actually, the

nature of the B[a]P metabolites produced by polychaetes is poorly known. Consequently, these results indicate that most of the biological responses observed were probably due to ingestion of parent B[a]P. It is not possible to know if there has been absorption of parent B[a]P in the tissues of *N. virens*. Therefore, bioavailability of B[a]P could differ between the PM and the IV diets and among the IV diets. For example, B[a]P tetrols were less abundant, in the bile of fish exposed to the IV2 diet (*Nereis* exposed to B[a]P-contaminated food) compared to the IV4 diet (*Nereis* exposed to B[a]P-contaminated food and sediments) despite similar measured concentrations of B[a]P in these two diets, suggesting different bioavailabilities of B[a]P in these two diets. The sediment used to expose *Nereis* was heavily contaminated and the particles retained in the gut and the skin of the organisms may be an important source of contamination of the IV diets. Further studies should be done about PAHs metabolites characterization in *N. virens* and their potential toxicity and trophic transfer potencies.

2.5.3. Toxicity assessment

The treatments did not have significant effects on the general health of fish (growth, factor of condition), probably because of a good uptake of the experimental food for the large majority of the individuals and possibly, the age of the subjects and the short exposure time. Neither hepatosomatic nor gonadosomatic index were affected by the treatments. This low sensitivity of the internal organs could be the result of an effective biotransformation of the dietary B[a]P by the intestine before its transport to the other tissues, especially the liver (Van Veld et al., 1997). In support of this hypothesis, the exposure to the various B[a]P contaminated diets caused an induction of EROD in the intestine but not in the liver.

B[a]P is well known to up-regulate the expression of the PCNA that is an indicator of cellular proliferation and may be the first sign of abnormalities that precede pathological diseases (Prevodnik et al., 2007). In our study, PCNA labeling showed an opposite pattern to that for EROD activity with an increasing proportion of individuals with a high rate of cellular proliferation in the liver (PLI) but not in the intestine (PLE). Well circumscribed zones of proliferation were difficult to identify on the intestinal villi. PCNA labelled epithelial cells were observed at all levels of the intestinal villi height, although they were generally more abundant in the crypt at the base and in the lower half of the villi. The interplay between cell proliferation, differentiation and apoptosis is a fundamental process for the maintenance of the gastrointestinal system and the active regeneration of enterocytes and short term exposure could explain the absence of visible treatment effects in the intestinal tract (Sanden et al., 2005). On the other hand, PLI responses are consistent with the observation of hydropic vacuolation of the hepatocytes, a degenerative lesion, in fish exposed to the highest concentrations of B[a]P (> 20,0 µg/g).

Hydropic vacuolation of hepatocytes has been described in numerous species of fish exposed to PAHs in the field (Koehler, 2004; Myers et al., 1987; Myers et al., 1998; Stehr et al., 1998). The morphology of hydropic vacuolation in the liver of mummichogs was similar to that observed in bottom fish as winter flounder (*Pleuronectes americanus*), starry flounder (*Platichthys stellatus*), white croaker (*Genyonemus lineatus*) and rock sole (*Lepidopsetta bilineata*) described by Stehr et al. (1998) and that described by Koehler (2004) in european flounder (*Platichthys flesus*). This type of liver lesion could occur at lower concentration with longer exposure and seems to be a useful biomarker to evaluate histopathological responses to contaminant exposure, even if it was not sensitive in our bioassay.

In this study, no indication of histological damage to the intestine was observed (i.e. no change in proliferation rate nor pathological diseases). Nevertheless, Yuen and Au (2006) have correlated EROD induction in the intestine to cytotoxicological alterations (lysosomes accumulation in enterocytes) and thus have validated intestinal EROD induction as an indicator of harmful biological effects. Moreover, demonstration of responses in the liver (elevated concentrations of metabolite in the bile, enhanced hepatocellular proliferation rate and hydropic vacuolation) indicate that exposure to B[a]P contaminated *Nereis* may have initiated toxic responses in the liver independently of EROD induction in this organ, especially at high doses. Therefore, observed higher rate of hepatocellular proliferation may be a response to hepatocellular injury induced by exposure to B[a]P metabolites that could have crossed the intestinal barrier to reach the liver as shown in mammals (Ramesh et al., 2004). It also may be a response to cytokines produced *in situ* in the liver or possibly transported from the intestine via blood (Fournier et al., 1998; Fournier et al., 2000).

The increased density of hepatic PMAs is generally also known as an important liver lesion, especially in the field with a long-time PAHs exposure (Ericson et al., 1999). According to Myers et al. (1987), this alteration is often associated with a degenerative-necrotic condition but the relatively short-time exposure in our study may be an explanation of the absence of effects of the treatments on PMAs density. Both increased density of PMA and increased prevalence of hydropic vacuolation in the liver have been reported in fish sampled at sites contaminated with PAHs (Koehler, 2004; Myers et al., 1987). As suggested by these authors and by our results, these changes are not specific to PAH exposure and could be affected by other factors such as parasitic infection. Because they occur in controls, a larger sample size would be needed to assess the effect of the ingestion of BaP-contaminated prey on these pathological changes. Longer-term

effects of dietary BaP on the prevalence of pathological lesions including preneoplastic and neoplastic changes should be assessed (Culp et al., 2000).

2.6. CONCLUSION

We have succeeded in developing a bioassay that detects the toxic effects associated with ingestion of benthic prey contaminated with a model carcinogenic PAH. This bioassay is versatile and can be used to assess toxicity associated with the ingestion of a variety of invertebrate species contaminated experimentally or in the natural environment. This study was a first calibration and this bioassay could easily be improved and/or adapted for further studies. We are currently using the bioassay to assess the toxicity of *N. virens* collected in the habitat of the beluga. We have also described a pattern of biomarkers responses associated with oral exposure to benthic invertebrates contaminated with B[a]P. EROD response in the intestine, but not in the liver, is suggestive of an efficient biotransformation of dietary parent-B[a]P in the intestine prior to transport to the liver and other tissues. Demonstration of responses in the liver (presence of BP-tetrol in the bile, enhanced PCNA and hydropic vacuolation) indicate that at high doses, metabolites seem to be transferred from the intestine to the liver. Thus, uptake of contaminants via ingestion of the diets has shown that trophic transfer should be considered as a significant route of exposure that may have a toxicological potential in the field. Based on these results we strongly recommend using intestinal biomarkers in addition to hepatic biomarkers in environmental monitoring, in order to evaluate the importance of the oral route of exposure to PAHs in the field. Moreover, the bioavailability and toxicity of the metabolites of PAHs should be further investigated.

2.7. ACKNOWLEDGEMENTS

B. Laplatte would like to dedicate this paper to his father, Denis (1948-1999). We are grateful to B. Légaré for his active collaboration in this project, M.-M. Gamache and M.-G. Fortin for their participation in field sampling and technical assistance and I. Desbiens for performing chemical analyses. Funding was provided by the National sciences and engineering research council of Canada (NSERC) and Alcan International Limited. J. Labrie is specially thanked for his support. This is a contribution of Quebec-Ocean network.

CHAPITRE 3

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'importance de l'ingestion de proies benthiques contaminées comme voie d'exposition des poissons et des mammifères marins aux HAPs, particulièrement dans le FS-ESL, est un sujet controversé. Les objectifs de nos travaux furent donc de : 1) développer un réseau trophique modèle suffisamment robuste pour des utilisations futures compatibles avec une variété d'espèces, de niches écologiques et de xénobiotiques représentatifs du système FS-ESL; 2) évaluer la biodisponibilité trophique et la toxicité de HAPs parents et de leurs métabolites à partir de diverses proies vers un poisson prédateur et ubiquiste; 3) décrire le patron des réponses biochimiques et histologiques à une exposition orale en utilisant une batterie de biomarqueurs impliqués dans la cascade de réactions toxiques liées à des HAPs parents ou à leurs métabolites.

Les étapes clefs de ce projet ont donc tout d'abord consisté à mettre au point un bioessai impliquant des espèces représentatives du FS-ESL et une recette de diète expérimentale permettant d'en contrôler la prise par un poisson prédateur. Le choquemort (*F. heteroclitus*) a été choisi comme modèle expérimental car c'est un poisson téléostéen de petite taille, facile à élever en laboratoire, avec un régime alimentaire varié et sensible aux effets toxiques des HAPs. Le *N. virens*, un ver benthique fouisseur, a été utilisé comme proie car il est abondant sur les rives de l'ESL, facile à élever en laboratoire et capable de métaboliser les HAPs.

Une méthode originale de préparation d'une diète à base de *N. virens* et facilement adaptable à d'autres types de proies a été mise au point après différents essais incluant des tests

d'acceptabilité par les choquemorts. Les *N. virens* étaient lyophilisés, broyés et homogénéisés avec des solutions de B[a]P avant d'en faire des bâtonnets de 1 cm de diamètre, congelés à -20°C puis sectionnés en petites boulettes (annexe A). Suite à des essais de différents prototypes de bassins, un design expérimental robuste et aisément reproductible a été mis au point à l'été 2004 également. Les choquemorts se sont bien adaptés aux bassins expérimentaux et sont restés en bonne santé. Ces derniers ont bien accepté la diète à base de *N. virens* après seulement 2-3 jours d'adaptation sur une période d'une semaine d'acclimatation à cette prise de nourriture.

Par ailleurs, une banque de contrôles négatifs et positifs a été constituée pour les besoins des analyses chimiques et biochimiques avec les tissus de choquemorts mâles adultes qui avaient reçu une injection intrapéritonéale d'huile de maïs ou d'huile de maïs contenant du B[a]P (10 mg/kg). L'activité d'EROD obtenue pour les contrôles positifs fut de $21,82 \pm 4,53$ pmoles/min/mg de protéines dans le foie contre seulement $1,82 \pm 1,28$ pmoles/min/mg de protéines dans l'intestin.

À l'été 2005 nous avons été en mesure de réaliser une expérience complète à l'aide du modèle mis au point en faisant intervenir le vecteur benthique primaire *N. virens* et le poisson prédateur *F. heteroclitus* afin de mesurer des réponses toxiques attendues et déjà bien connues chez ce dernier. La première phase d'exposition des *N. virens* en milieu contrôlé s'est bien déroulée malgré un épisode de mortalité liée à l'acclimatation qui s'est avéré sans conséquence pour la biomasse finale (annexe B). La bonne prise de la nourriture a notamment permis de charger *in vivo* les *N. virens* à près de 16 µg/g de B[a]P parent. Cette diète IV s'accompagnait d'une diète PM, dite de calibration, pour les réponses toxiques, confectionnée avec des *N. virens* contaminés *post mortem* homogénéisés avec des concentrations connues de B[a]P. L'exposition subséquente des choquemorts à ces deux types de diètes, malgré un épisode de 4 mortalités sans lien avec les

traitements, s'est également bien déroulée et les poissons se sont bien comportés pendant toute la durée de l'exposition.

À la lumière de ces premiers constats nous pouvons conclure que notre modèle expérimental semble adéquat pour d'autres applications consistant à évaluer le transfert des HAPs et de leurs métabolites à partir de diverses proies exposées aux HAPs par différentes voies. Notre modèle s'est déjà avéré versatile car notre équipe l'a utilisé au cours de l'été 2006 pour évaluer la toxicité de *N. virens* récoltés dans l'habitat de l'ESL et de *N. virens* contaminés avec des sédiments issus du FS et de boues d'aluminerie. L'analyse des résultats de ces travaux est en cours et devrait d'ailleurs venir adéquatement compléter les informations issues des résultats de notre première expérience, livrés ici, particulièrement en ce qui a trait à la biodisponibilité et à la toxicité relative de mélanges complexes de HAPs fixés aux particules sédimentaires et à la matrice biologique des proies benthiques.

La sensibilité de notre modèle pourrait cependant être encore facilement augmentée en utilisant un nombre de choquemorts plus élevé par traitement ou en augmentant la durée de l'exposition. Augmenter la durée de l'expérience pourrait éventuellement avoir un intérêt aussi pour permettre de révéler certaines lésions précancéreuses, particulièrement à l'intestin, au foie et au pancréas. Le modèle pourrait encore être aisément complexé à d'autres biomarqueurs (tels que des mesures de stress oxydant, de stabilité et morphologie lysosomales, de génotoxicité ; ex : analyses des adduits à l'ADN) ou appliqué à une variété de proies benthiques contaminées en laboratoire ou en milieu naturel. De plus, tout porte à croire qu'il pourrait s'avérer aussi utile pour évaluer la toxicité de proies contaminées avec une grande variété d'autres contaminants environnementaux organiques ou inorganiques.

Un métabolite du B[a]P, le BP-tétrol, a été mesuré dans la bile des choquemorts exposés à des diètes contenant des concentrations de B[a]P supérieures à 6,8 µg/g. En outre, l'exposition aux différentes diètes contaminées au B[a]P a causé une induction d'EROD dans l'intestin mais pas dans le foie. Il semble donc que les métabolites du B[a]P, dans une plus grande proportion que le B[a]P parent, traversent la paroi intestinale pour se rendre au foie. Dans l'intestin, l'induction d'EROD était jusqu'à 40 fois plus élevée chez les choquemorts exposés à une diète contenant 20 µg/g de B[a]P comparés aux témoins (KW, $P \leq 0,05$). Au sein de chaque traitement, une grande variabilité interindividuelle fut constatée, sans lien visible avec la prise de nourriture, ce qui suggère une raison endogène à cette variabilité. Cette dernière peut être issue de la différence de capacité métabolique entre les individus, de certains facteurs de résistance d'origine génétique ou encore d'une inhibition toxique de l'activité du CYP1A aux fortes doses. Par ailleurs, la plus faible concentration de B[a]P causant une induction significative d'EROD dans l'intestin fut de 3,5 µg/g, ce qui est une concentration comparable à celles retrouvés dans des proies benthiques issues de milieux hautement contaminés par les HAPs. En effet, le pourcentage d'individus ayant une activité d'EROD supérieure à 6,90 pmoles/min/mg de protéines (seuil défini par la moyenne d'EROD chez les témoins du traitement PM1 + 2 écarts-types) a significativement augmenté chez les poissons exposés à des diètes contenant minimalement 3,5 µg/g B[a]P (F, $P \leq 0,05$).

Nos travaux ont donc finalement permis de mettre en évidence un patron de réponses biochimiques et histologiques typique d'une exposition aux HAPs par la voie orale et différent de celui décrit auparavant pour les expositions par voie aqueuse ou intrapéritonéale. L'absence d'induction d'EROD dans le foie semble indiquer que le B[a]P parent ne traverse pas l'intestin en quantité suffisante pour causer une induction d'EROD. Ce patron d'induction, positive dans

l'intestin et non dans le foie, est typique d'une exposition orale au B[a]P chez les poissons, alors qu'une exposition par voie aqueuse ou par injection intrapéritonéale (telle que menée pour la conception des contrôles négatifs et positifs) conduit quasi-immanquablement à une induction de la CYP1A dans le foie.

Au terme de l'expérience, il s'est avéré que les traitements ne semblaient pas avoir eu d'effets significatifs sur l'état de santé général des choquemorts (facteur de condition, croissance), probablement en raison d'une bonne prise de nourriture pour la grande majorité des individus et de la courte durée de l'exposition. Les indices hépatosomatique et gonadosomatique, de même que l'activité phagocytaire, indicateur de disfonctionnement immunitaire, (résultats non inclus dans ce mémoire) n'ont pas été affectés non plus par les traitements, contrastant ainsi avec les résultats obtenus pour les autres biomarqueurs. Les résultats de ces paramètres sont fournis à titre indicatif dans l'annexe C pour les mesures morphométriques et dans l'annexe D pour les mesures immunologiques. Cette faible sensibilité apparente des organes internes peut aussi être le résultat d'une biotransformation efficace du B[a]P d'origine orale par l'intestin avant son transport dans le foie, limitant ainsi les quantités disponibles dans l'organisme en composé parent réactif.

Fait intéressant, le taux de marquage au PCNA a présenté un patron inverse à celui d'EROD, soit une augmentation des proportions d'individus avec un taux de prolifération cellulaire élevé dans le foie mais pas dans l'intestin (KW, $P \leq 0,05$). Le pourcentage d'individus ayant un taux de prolifération hépatocellulaire supérieur à 2,9 % (seuil défini par la moyenne chez les témoins de PM1 + 2 écarts-types) a significativement augmenté à partir de concentrations en B[a]P supérieures à 13,4 $\mu\text{g/g}$ (F, $P \leq 0,05$). Des lésions dégénératives, une vacuolisation hydropique

des hépatocytes, furent aussi observées chez les choquemorts de tous les groupes, avec une tendance à des prévalences plus élevées chez les choquemorts exposés aux plus fortes concentrations de B[a]P (> 20,0 µg/g).

Des expériences conduites par le Dr C. Rouleau et son équipe, menées parallèlement aux nôtres ont ainsi fait la démonstration que des quantités importantes de ¹⁴C-B[a]P parent radiomarqué se retrouvaient principalement dans l'intestin et diminuaient fortement une fois rendues dans la bile et encore plus dans le foie (annexe E). En l'absence visible de B[a]P parent transféré vers le foie, le plus fort taux de prolifération cellulaire observé peut être une réponse à un dommage aux hépatocytes potentiellement causée par une exposition aux métabolites du B[a]P. Ces derniers seraient issus de la métabolisation qui a cours dans l'intestin et démontré par les concentrations en BP-tétrol mesurées dans la bile.

Contrairement à nos attentes, pour une même concentration de B[a]P dans la diète, les traitements IV et PM ont causé des niveaux similaires d'activité d'EROD et de proliférations cellulaires dans l'intestin et le foie ainsi que de concentrations en BP-tétrol dans la bile. Ceci semble indiquer que la présence présumée de métabolites dans la diète IV n'a pas influencé ces réponses. Cependant, nous n'avons malheureusement pas été en mesure de détecter la présence et la quantité de métabolites chez les *N. virens* exposés à des sédiments et/ou une diète contaminée au B[a]P. La non-détection de métabolites ne nous permet pas de conclure si ces métabolites ont été produits ou éliminés par les *N. virens*, ni dans quelles quantités, d'autant que nous ne nous sommes intéressés qu'au BP-tétrol. Il est donc impossible de prédire explicitement ici ce qu'il serait advenu de ces métabolites en terme de toxicité directe pour le choquemort. Bien que des études aient pourtant démontré la capacité des *N. virens* d'efficacement métaboliser le B[a]P au

moyen de méthodes de radiomarquage, on ne peut pas non plus élaborer davantage sur la capacité d'absorption du B[a]P parent, de métabolisation du B[a]P parent absorbé, ou d'élimination des métabolites produits chez les *N. virens* de notre expérience. On ne peut donc occulter que la majeure partie de la toxicité induite par les traitements IV puisse aussi avoir été le seul fait de B[a]P parent adsorbé aux sédiments résiduels, soit sur les *N. virens* ou dans leur tractus digestif, expliquant ainsi les similarités des réponses observées pour les traitements PM et IV. Il y aurait donc un enjeu réel à mieux caractériser la nature des différents métabolites produits par les *N. virens* exposés au B[a]P.

Nous avons donc été en mesure de développer un bioessai permettant d'évaluer la biodisponibilité et les effets toxiques associés à l'ingestion des HAPs parents et leurs métabolites contenus dans les proies benthiques contaminées. Ces résultats conduisent fortement à recommander ici l'utilisation de biomarqueurs intestinaux en plus des biomarqueurs hépatiques dans les études de monitoring environnemental, afin d'évaluer l'importance de la voie d'exposition orale aux HAPs sur le terrain. De plus, l'investigation de la biodisponibilité et de la toxicité des métabolites des HAPs devrait continuer d'être un sujet de préoccupation de premier ordre.

LISTE DES RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allen, E.A., P.A. Fell, M.A. Peck, J.A. Gieg, C.R. Guthke, and M.D. Newkirk. 1994. Gut content of common mummichogs, *Fundulus heteroclitus* L., in a restored impounded marsh and in natural reference marshes. *Estuaries* 17:462-471.
- Anulacion, B.F., M.S. Myers, M.L. Willis, and T.K. Collier. 1998. Quantitation of CYP1A expression in two flatfish species showing different prevalences of contaminant-induced hepatic disease. *Marine Environmental Research* 46:7-11.
- Arcaro, K.F., P.W. Keefe, Y. Yang, W. Clayton, and J.F. Gierthy. 1999. Antiestrogenicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast cancer cells. *Toxicology* 133:115-127.
- Au, D.W.T., P. Chen, and C.A. Pollino. 2004. Cytological change in association with ethoxyresorufin-*O*-deethylase induction in fish upon dietary exposure to benzo[*a*]pyrene. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:1043-1050.
- Baumard, P., H. Budzinski, P. Garrigues, J.C. Sorbe, T. Burgeot, and J. Bellocq. 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.
- Beland, P., S. Deguise, C. Girard, A. Lagace, D. Martineau, R. Michaud, D.C.G. Muir, R.J. Norstrom, E. Pelletier, S. Ray, and L.R. Shugart. 1993. Toxic Compounds and Health and Reproductive Effects in St-Lawrence Beluga Whales. *Journal of Great Lakes Research* 19:766-775.
- Caron, A., G. Desrosiers, P.J.W. Olive, C. Retiere, and C. Nozais. 2004. Comparison of diet and feeding activity of two polychaetes, *Nephtys caeca* (Fabricius) and *Nereis virens* (Sars), in

- an estuarine intertidal environment in Quebec, Canada. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 304:225-242.
- CEPA. 1994. Canadian Environmental Protection Act. Priority Substances List - Assessment Report : *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Environment Canada / Health Canada. Ministre des Approvisionnement et Services Canada. National printers INC., Ottawa.
- Chen, G., and P.A. White. 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 567:151-225.
- Christensen, M., O. Andersen, and G.T. Banta. 2002. Metabolism of pyrene by the polychaetes *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina*. *Aquatic Toxicology* 58:15-25.
- Cossa, D., T.-T. Pham, B. Rondeau, B. Quémérais, S. Proulx, and C. Surette. 1998. Bilan massique des contaminants chimiques dans le fleuve Saint-Laurent. Environnement Canada - Région du Québec, Conservation de l'environnement, Centre Saint-Laurent. Rapport scientifique et technique ST-163, 258 p.
- Couillard, C.M., P.V. Hodson, and M. Castonguay. 1997. Correlations between pathological changes and chemical contamination in American eels, *Anguilla rostrata*, from the St-Lawrence River. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 54.
- Couillard, C.M., P.J. Williams, S.C. Courtenay, and G.P. Rawn. 1999. Histopathological evaluation of Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) collected at estuarine sites receiving pulp and paper mill effluent. *Aquatic Toxicology* 44:263-278.
- Couillard, C.M., I.I. Wirgin, M. Lebeuf, and B. Légaré. 2004. Reduction of cytochrome P450 1A with age in Atlantic tomcod from the St. Lawrence estuary, Canada: relationship with emaciation and possible effect of contamination. *Aquatic Toxicology* 68:235-247.

- Couillard, C.M., K. Lee, B. Légaré, and T.L. King. 2005a. Effect of dispersant on the composition of the water-accommodated fraction of crude oil and its toxicity to larval marine fish. *Environ Toxicol Chem.* 24 (6):1:496-504
- Couillard, C.M., M. Lebeuf, M.G. Ikonou, G.G. Poirier, and W.J. Cretney. 2005b. Low hepatic ethoxyresorufin-*O*-deethylase activity correlates with high organochlorine concentrations in Atlantic tomcod from the Canadian east coast. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:2459-2469.
- Courtenay, S.C., P.J. Williams, C. Grunwald, B. Konkle, T.L. Ong, and I.I. Wirgin. 1994. An assessment of within-group variation of CYP1A1 mRNA inducibility in environmentally exposed and chemically treated Atlantic tomcod. *Environmental Health Perspectives* 102:85-90.
- Culp, S.J., A.R., Warbritton, B.A., Smith, E.E., Li, and F.A., Beland. 2000. DNA adduct measurements, cell proliferation and tumor mutation induction in relation to tumor formation in B6C3F1 mice fed coal or benzo[*a*]pyrene. *Carcinogenesis* 21:1433-1440.
- D'Adamo, R., S. Pelosi, P. Trotta, and G. Sansone. 1997. Bioaccumulation and biomagnification of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. *Marine Chemistry* 56:45-49.
- Desbiens, I., and E. Pelletier. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons derived from aluminium smelters in the Saguenay system (Québec, Canada): assessment in particulate and sedimentary phases and in benthic organisms. *Proceedings of the SETAC North America 27th Annual meeting, 5-9 November 2006, Montréal, Québec, Canada.* P. 181.
- Dey, W.P., T.H. Peck, C.E. Smith, and G.L. Kremer. 1993. Epizootology of hepatic neoplasia in Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) from the Hudson River estuary. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* Vol. 50:1897-1907.

- Dreyer, A., C. Blodau, J. Turunen, and M. Radke. 2005. The spatial distribution of PAH depositions to peatlands of Eastern Canada. *Atmospheric Environment* 39:3725-3733.
- Driscoll, S.B.K., and A.E. McElroy. 1997. Elimination of sediment-associated benzo[*a*]pyrene and its metabolites by polychaete worms exposed to 3-methylcholanthrene. *Aquatic Toxicology* 39:77-91.
- Eisler, R. 1987. Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. Contaminant Hazard Review Fish and Wildlife Service Biological Report 85: 1.11. Washington, D.C.
- Environnement Illimitée. 1990. Caractérisation de la qualité des sédiments du port de Montréal, rapport préparé pour Environnement Canada, Conservation et Protection, région du Québec. Environnement Illimitée Inc., Montréal, QC.
- Ericson, G., B. Liewenborg, E. Lindesjoo, C. Naf, and L. Balk. 1999. DNA adducts in perch (*Perca fluviatilis*) from a creosote contaminated site in the River Angermanalven, Sweden. *Aquatic Toxicology* 45:181-193.
- Fournier, M., A. Lacroix, I. Voccia, and P. Brousseau. 1998. Phagocytic and metabolic activities of macrophages from mummichog naturally exposed to pulp mill effluents in the Miramichi river. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40:177-183.
- Fournier, M., V. Dégas, T. Colborn, F.O. Omara, F. Denizeau, E.F. Potworowski, and P. Brousseau. 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.
- French, B.L., W.L. Reichert, T. Hom, M. Nishimoto, H.R. Sanborn, and J.E. Stein. 1996. Accumulation and dose-response of hepatic DNA adducts in English sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to a gradient of contaminated sediments. *Aquatic Toxicology* 36:1-16.

- Gagnon, M., P. Bergeron, J. Leblanc, and R. Siron. 1998. Synthèse des connaissances sur les aspects physiques et chimiques de l'eau et des sédiments de l'estuaire moyen du Saint-Laurent. Pêches et Océans Canada, Division de la gestion de l'habitat et des sciences de l'environnement, Institut Maurice Lamontagne. Rapport technique, Zones d'intervention prioritaire 15, 16 et 17, 119 p.
- Gearing, J.N., D.E. Buckley, and J.N. Smith. 1991. Hydrocarbon and metal contents in a sediment core from Halifax Harbour : a chronology of contamination. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48:2344-2354
- Germain, A., F. Perron, and R. van Coillie. 1993. Cheminement, écotoxicité et réglementation pour les HAPs dans l'environnement. Environnement Canada, Conservation et Protection, région du Québec.
- Giessing, A.M.B., L.M. Mayer, and T.L. Forbes. 2003. Synchronous fluorescence spectrometry of 1-hydroxypyrene: a rapid screening method for identification of PAH exposure in tissue from marine polychaetes. *Marine Environmental Research* 56:599-615.
- Hellou, J., J.F. Payne, and C. Hamilton. 1994. Polycyclic aromatic compounds in Northwest Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Environmental Pollution* 84:197-202.
- Jorgensen, A., A.M.B. Giessing, L.J. Rasmussen, and O. Andersen. 2005. Biotransformation of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene in the marine polychaete *Nereis virens*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:2796-2805.
- Koehler, A. 2004. The gender-specific risk to liver toxicity and cancer of flounder (*Platichthys flesus* (L.)) at the German Wadden Sea coast. *Aquatic Toxicology* 70:257-276.
- Lee II, H., B. Boese, J. Pelletier, M. Winsor, D. Specht, and R. Randall. 1989. Guidance manual: bedded sediment bioaccumulation tests EPA/600/x-89/302. U.S. Environmental Protection Agency. 232 p.

- Lemiere, S., C. Cossu-Leguille, A. Bispo, M.-J. Jourdain, M.-C. Lanhers, D. Burnel, and P. Vasseur. 2005. DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by the 'Erika' oil-spill. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 581:11-21.
- Livingstone, D.R. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 120:43-49.
- Luna, L.G. 1968. *Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. McGraw-Hill, New York, 258 p.
- Martel, L., M.J. Gagnon, R. Massé, and A. Leclerc. 1987. The spatio-temporal variations and fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the Saguenay Fjord, Québec, Canada *Water Research* 21:699-707.
- Martineau, D., K. Lemberger, A. Dallaire, P. Labelle, T.P. Lipscomb, P. Michel, and I. Mikaelian. 2002. Cancer in wildlife, a case study: Beluga from the St Lawrence estuary, Québec, Canada. *Environmental Health Perspectives* 110(3):285-292.
- McElroy, A.E. 1985. In vivo metabolism of benzo[*a*]anthracene by the polychaete *Nereis virens*. *Marine Environmental Research* 17:133-136.
- McElroy, A.E., and J.D. Sisson. 1989. Trophic transfer of benzo[*a*]pyrene metabolites between benthic marine organisms. *Marine Environmental Research* 28:265-269.
- McElroy, A.E. 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in the polychaete *Nereis virens*. *Aquatic Toxicology* 18:35-50.
- McElroy, A., K. Leitch, and A. Fay. 2000. A survey of in vivo benzo[*a*]pyrene metabolism in small benthic marine invertebrates. *Marine Environmental Research* 50:33-38.

- Meyer, J.N., D.E. Nacci, and R.T. Di Giulio. 2002. Cytochrome P4501A (CYP1A) in killifish (*Fundulus heteroclitus*): heritability of altered expression and relationship to survival in contaminated sediments. *Toxicological Sciences* 68:69-81.
- Mikaelian, I., Y. de Lafontaine, J.C. Harshbarger, L.L. Lee, and D. Martineau. 2002. Health of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) with elevated tissue levels of environmental contaminants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21:532-541.
- Myers, M.S., L.D. Rhodes, and B.B. McCain. 1987. Pathologic anatomy and patterns of occurrence of hepatic neoplasms, putative preneoplastic lesions, and other idiopathic hepatic conditions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *J. National Cancer Institute* 78:333-363.
- Myers, M.S., L.L. Johnson, T. Hom, T.K. Collier, J.E. Stein, and U. Varanasi. 1998. Toxicopathic hepatic lesions in subadult English sole (*Pleuronectes vetulus*) from Puget Sound, Washington, USA: Relationships with other biomarkers of contaminant exposure. *Marine Environmental Research* 45:47-67.
- Myers, M.S., B. Anulacion, B. French, T. Hom, W. Reichert, L. Hufnagle, and T. Collier. 2000. Biomarker and histopathologic responses in flatfish following site remediation in Eagle Harbor, WA. *Marine Environmental Research* 50:435-436.
- Myers, M.S., L.L. Johnson, and T.K. Collier. 2003. Establishing the Causal Relationship between Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Exposure and Hepatic Neoplasms and Neoplasia-Related Liver Lesions in English Sole (*Pleuronectes vetulus*). *Human and Ecological Risk Assessment* 9:67-94.
- Nacci, D.E., M. Kohan, M. Pelletier, and E. George. 2002. Effects of benzo[a]pyrene exposure on a fish population resistant to the toxic effects of dioxin-like compounds. *Aquatic Toxicology* 57:203-215.

- Naes, K., J. Knutzen, and L. Berglind. 1995. Occurrence of PAH in marine organisms and sediments from smelter discharge in Norway. *The Science of the Total Environment* 163:93-106.
- Naes, K., K. Hylland, E. Oug, L. Förlin, and G. Ericson. 1999. Accumulation and effects of aluminium smelter-generated polycyclic aromatic hydrocarbons on soft-bottom invertebrates and fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18:2205-2216.
- Ortego, L.S., W.E. Hawkins, Y. Zhu, and W.W. Walker. 1996. Chemically-induced hepatocyte proliferation in the medaka (*Oryzias latipes*). *Marine Environmental Research* 42:75-79.
- Ouellette, D., G. Desrosiers, J.-P. Gagne, F. Gilbert, J.-C. Poggiale, P.U. Blier, and G. Stora. 2004. Effect of temperature on *in vitro* sediment reworking processes by a gallery biodiffusor, the polychaete *Neanthes virens*. *Marine Ecology Progress Series* 266:185-193.
- Padros, J., and E. Pelletier. 2000. In vivo formation of (+)-anti-benzo[a]pyrene diol-epoxide-plasma albumin adducts in fish. *Marine environmental research* 50:347-351.
- Parrott, J., P.V. Hodson, M.R. Servos, S.Y. Huestis, and D.G. Dixon. 1995. Relative potency of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans for inducing mixed-function oxygenase activity in rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 14.
- Pelletier, É., S. Ouellet, and M. Pâquet. 1991. Long-term chemical and cytochemical assessment of oil contamination in estuarine intertidal sediments. *Marine Pollution Bulletin* 22:273-281.
- Pelletier, É., G. Canuel, J. Padros, Y. Clermont, and C. Gobeil. 1999. Concentrations d'hydrocarbures aromatiques polycycliques chez quatre espèces de poissons de fond et deux espèces de crustacés de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent et du fjord du

- Saguenay. Rapport statistique canadien des sciences halieutiques et aquatiques, 1052, 20 p.
- Pham, T.-T., and S. Proulx. 1997. PCBs and PAHs in the Montreal Urban Community (Quebec, Canada) wastewater treatment plant and in the effluent plume in the St Lawrence River. *Water Research* 31:1887-1896.
- Ploch, S.A., L.C. King, and R.T. Di Giulio. 1998. Comparative time-course of benzo[a]pyrene-DNA adduct formation, and its relationship to CYP1A activity in two species of catfish. *Mar. Environ. Res.* 46:345–349.
- Prevodnik, A., K. Lilja, and T. Bollner. 2007. Benzo[a]pyrene up-regulates the expression of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and multixenobiotic resistance polyglycoprotein (P-gp) in Baltic Sea blue mussels (*Mytilus edulis L.*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 145:265-274.
- Pruell, R.J., B.K. Taplin, D.G. McGovern, R. McKinney, and S.B. Norton. 2000. Organic contaminant distributions in sediments, polychaetes (*Nereis virens*) and American lobster (*Homarus americanus*) from a laboratory food chain experiment. *Marine Environmental Research* 49:19-36.
- Ramesh, A., S.A. Walker, D.B. Hood, M.D. Guillén, K. Schneider, and E.H. Weyand. 2004. Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Journal of Toxicology* 23:301-333.
- Reichert, W.L., M.S. Myers, K. Peck-Miller, B. French, B.F. Anulacion, T.K. Collier, J.E. Stein, and U. Varanasi. 1998. Molecular epizootiology of genotoxic events in marine fish: Linking contaminant exposure, DNA damage, and tissue-level alterations. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 411:215-225.

- Rhodes, S., A. Farwell, L.M. Hewitt, M. MacKinnon, and D.G. Dixon. 2005. The effects of dimethylated and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of the Japanese medaka. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60:247-258.
- Rice, C.A., M.S. Myers, M.L. Willis, B.L. French, and E. Casillas. 2000. From sediment bioassay to fish biomarker - connecting the dots using simple trophic relationships. *Marine Environmental Research* 50:527-533.
- Rose, W.L., B.L. French, W.L. Reichert, and M. Faisal. 2001. Persistence of benzo[*a*]pyrene-DNA adducts in hematopoietic tissues and blood of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic Toxicology* 52:319-328.
- Rouleau, C., Y. Clermont, S. St-Pierre, J. Auclair, and E. Pelletier. 2006. Transfer of 4 labelled PAHs in a model estuarine food chain. Proceedings of the SETAC North America 27th Annual meeting, 5-9 November 2006, Montréal, Québec, Canada. P. 181.
- Rust, A.J., R.M. Burgess, B.J. Brownawell, and A.E. McElroy. 2004a. Relationship between metabolism and bioaccumulation of benzo[*a*]pyrene in benthic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:2587-2593.
- Rust, A.J., R.M. Burgess, A.E. McElroy, M.G. Cantwell, and B.J. Brownawell. 2004b. Influence of soot carbon on the bioaccumulation of sediment-bound polycyclic aromatic hydrocarbons by marine benthic invertebrates : an interspecies comparison. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:2594-2603.
- Sanden, M., M.H.G. Berntssen, A. Kroghdahl, G.-I. Hemre, and A.-M. Bakke-McKellep. 2005. An examination of the intestinal tract of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr fed different varieties of soy and maize. *Journal of Fish Diseases* 28:317-330.

- Smith, M.W., R.W. Chapman, and D.A. Powers. 1998. Mitochondrial DNA analysis of Atlantic Coast, Chesapeake Bay, and Delaware Bay populations of the teleost *Fundulus heteroclitus* indicates temporally unstable distributions over geologic time. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 7:79–87.
- Stark, A., J.T. Abrajano, J. Hellou, and J.L. Metcalf-Smith. 2003. Molecular and isotopic characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon distribution and sources at the international segment of the St. Lawrence River. *Organic Geochemistry* 34:225-237.
- Stehr, C.M., L.L. Johnson, and M.S. Myers. 1998. Hydropic vacuolation in the liver of three species of fish from the U.S. West Coast: lesion description and risk assessment associated with contaminant exposure. *Diseases of aquatic organisms* 32:119-135.
- Stevenson, R.W. 2003. Development and application of a model describing the bioaccumulation and metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in a marine benthic food web. MRM Project. School of Resource and Environmental Management, Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia, Canada, 157 p.
- US-EPA. 1987. Quality criteria for water 1986 US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- van der Oost, R., J. Beyer, and N.P.E. Vermeulen. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13:57-149.
- Van Veld, P.A., W.K. Vogelbein, M.K. Cochran, A. Goksøyr, and J.J. Stegeman. 1997. Route-specific cellular expression of cytochrome P4501A (CYP1A) in fish (*Fundulus heteroclitus*) following exposure to aqueous and dietary benzo[*a*]pyrene. *Toxicology and Applied Pharmacology* 142:348-359.

- Wassenberg, D.M., E.E. Swails, and R.T. Di Giulio. 2002. Effects of single and combined exposures to benzo[a]pyrene and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl on EROD activity and development in *Fundulus heteroclitus*. *Marine Environmental Research* 54:279-283.
- White, P.A., C. Blaise, and J.B. Rasmussen. 1997. Detection of genotoxic substances in bivalve molluscs from the Saguenay Fjord (Canada), using the SOS chromotest. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 392:277-300.
- White, P.A., and J.B. Rasmussen. 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 410:223-236.
- White, P.A., J.B. Rasmussen, and C. Blaise. 1998a. Genotoxic substances in the St. Lawrence system I : industrial genotoxins sorbed to particulate matter in the St. Lawrence, St. Maurice, and Saguenay rivers, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17:286-303.
- White, P.A., J.B. Rasmussen, and C. Blaise. 1998b. Genotoxic substances in the St. Lawrence system II : extracts of fish and macroinvertebrates from the St. Lawrence and Saguenay rivers, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17:304-316.
- Willett, K.L., D. Wassenberg, L. Lienesch, W. Reichert, and R.T. Di Giulio. 2001. In vivo and in vitro inhibition of CYP1A-dependent activity in *Fundulus heteroclitus* by the polynuclear aromatic hydrocarbon fluoranthene. *Toxicology and Applied Pharmacology* 177:264-271.
- Wirgin, I.I., Grunwald, C., Courtenay, S., Kremer, G.-L., Reichert, W.L. and J.E. Stein. 1994. A biomarker approach to assessing xenobiotic exposure in Atlantic tomcod from the North American Atlantic coast. *Environmental Health Perspectives* 102:764-770.
- Wu, R.S.S., C.A. Pollino, D.W.T. Au, G.J. Zheng, B.B.H. Yuen, and P.K.S. Lam. 2003. Evaluation of biomarkers of exposure and effect in juvenile Aroleated grouper

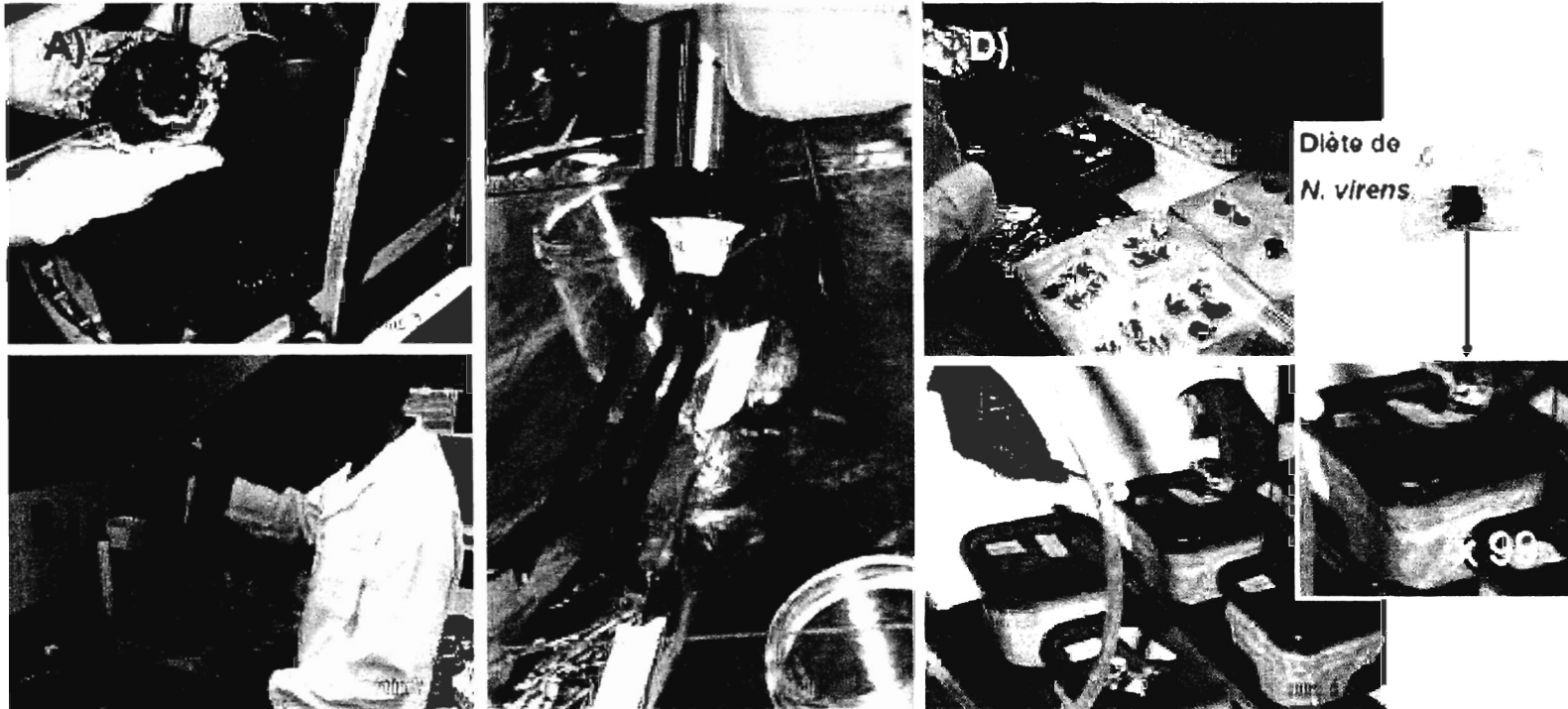
(*Epinephelus areolatus*) on foodborne exposure to benzo[*a*]pyrene. *Environmental Toxicology and Chemistry* 7:1568-1573.

Xue, W., and D. Warshawsky. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206:73-93.

Yuen, B.B.H., and D.W.T. Au. 2006. Temporal changes of ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activities and lysosome accumulation in intestine of fish on chronic exposure to dietary benzo[*a*]pyrene: linking EROD induction to cytological effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25:2593-2600.

ANNEXE – A

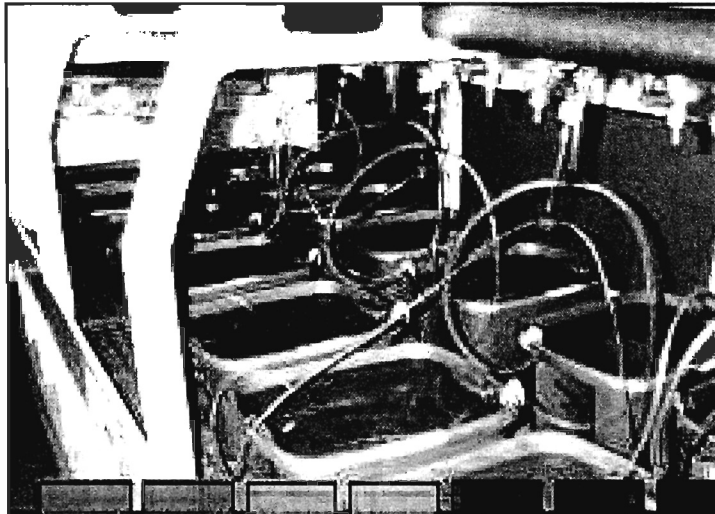
PRÉPARATION DES DIÈTES EXPÉRIMENTALES



Les *N. virens* exposés *in vivo* (A) puis récoltés, ou contaminés *post mortem* (B), composèrent les différentes diètes de l'expérience d'exposition des choquemorts. Ces deux souches furent par la suite toutes deux lyophilisées, broyées et mêlées à de l'eau distillée avant d'être façonnées en bâtonnets de 1 cm de diamètre au moyen d'une douille en acier inoxydable (C) puis découpées en portions individuelles et congelées dans du papier d'aluminium (D) avant d'être finalement distribuées quotidiennement aux différents traitements PM1 à 6 ou IV 1 à 4 (E).

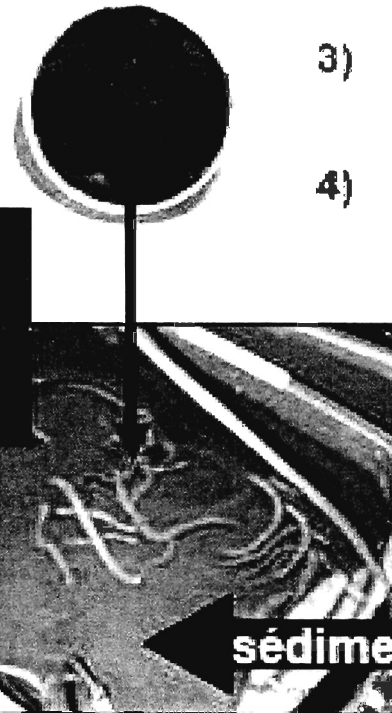
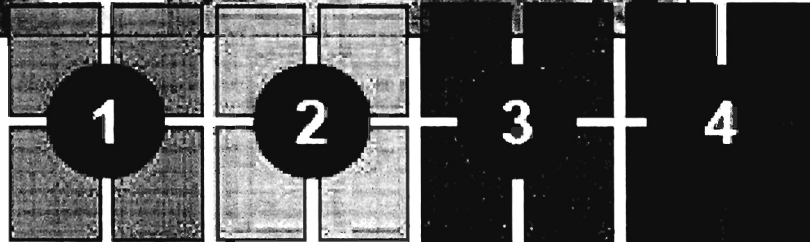
ANNEXE – B

MONTAGE ET RESULTATS DE L'EXPERIENCE D'EXPOSITION DES *NEREIS*



Nutrafin®
0 or 27
 $\mu\text{g/g B[a]P}$

- 1) Nourriture et sédiment contrôlés
- 2) Nourriture contaminée et sédiment contrôlé
- 3) Nourriture contrôlée et sédiment contaminé
- 4) Nourriture et sédiment contaminés



0 or 59
 $\mu\text{g/g B[a]P}$

Tableau récapitulatif, pour les *N. virens* dont les diètes IV des choquemorts furent issues, les moyennes du nombre total d'individus (n) et du poids total individuel humide (P) par bassin au début (J-0) et à la fin de l'exposition *in vivo* (J-27) ; du pourcentage de mortalité (M)⁷ ; de l'indice de gain de masse corporelle (GM) et la moyenne ± écart-type des concentrations finales en B[a]P-parent (BP) obtenues pour les différents traitements (T). Les traitements étaient constitués d'une combinaison croisée de nourriture (N) et de sédiments (S) contrôles (c) et/ou contaminés (C) au B[a]P dont les concentrations ([B[a]P]) sont données en µg/g de poids sec.

	T	J-0				[B[a]P]		J-27			
		n	P	N	S	n	M	P	GM	BP	
IV1	Nc/Sc	152	3,98	1,0 ± 0,5	0,2 ± 0,1	113	25,66	5,07	1,27	2,0 ± 0,1	
IV2	NC/Sc	155	3,93	59,3 ± 2,9	0,2 ± 0,1	123	20,65	4,72	1,20	14,7 ± 0,7	
IV3	Nc/SC	162	3,75	1,0 ± 0,5	27,1 ± 3,4	131	19,14	4,45	1,19	22,2 ± 0,6	
IV4	NC/SC	160	3,77	59,3 ± 2,9	21,0 ± 4,3	119	25,63	4,40	1,17	14,3 ± 1,2	

⁷ Mortalité liée à un manque d'oxygène rencontré lors du transport des *N. virens* depuis leur ferme d'élevage jusqu'à nos laboratoires.

ANNEXE – C

RÉSULTATS DES PARAMÈTRES MORPHOMÉTRIQUES POUR LES CHOQUEMORTS À LA FIN DE L'EXPÉRIENCE

Tableau récapitulatif pour chaque traitement le nombre total d'individus (n) et les moyennes \pm écart-types des paramètres morphométriques mesurés sur les choquemorts à la fin de l'expérience (J-21) : longueur totale (L en cm) ; masse totale humide (M en g) ; indice de gain de masse corporelle (GM) ; facteur de condition (FC), indices hépto- et gonadosomatiques (IHS et IGS). (KW, P > 0.05)

	Nutrafin®	DIÈTES PM						DIÈTES IV			
	C1	PM1	PM2	PM3	PM4	PM5	PM6	IV1	IV2	IV3	IV4
L	8.5 \pm 0.6	8.3 \pm 0.3	8.3 \pm 0.4	8.8 \pm 0.5	8.7 \pm 0.6	8.5 \pm 0.4	8.5 \pm 0.5	8.6 \pm 0.5	8.5 \pm 0.4	8.5 \pm 0.3	8.4 \pm 0.4
M	7.3 \pm 1.9	7.0 \pm 0.9	6.7 \pm 0.9	8.3 \pm 1.5	7.9 \pm 1.8	7.1 \pm 1.2	7.2 \pm 1.3	7.7 \pm 1.2	7.2 \pm 1.2	7.2 \pm 0.9	7.1 \pm 1.3
GM	0.96 \pm 0.03	0.97 \pm 0.07	0.94 \pm 0.05	0.94 \pm 0.07	0.96 \pm 0.06	0.92 \pm 0.11	0.94 \pm 0.12	0.99 \pm 0.06	1.01 \pm 0.08	0.99 \pm 0.07	0.98 \pm 0.03
FC	1.03 \pm 0.07	1.05 \pm 0.09	1.02 \pm 0.04	1.03 \pm 0.08	1.01 \pm 0.04	0.98 \pm 0.08	1.01 \pm 0.10	1.02 \pm 0.07	1.00 \pm 0.05	0.99 \pm 0.05	1.03 \pm 0.06
IHS	3.64 \pm 0.70	3.46 \pm 1.29	3.33 \pm 0.77	3.36 \pm 0.93	3.26 \pm 0.80	3.34 \pm 0.64	2.92 \pm 1.12	3.83 \pm 0.68	4.18 \pm 0.77	3.44 \pm 0.36	3.85 \pm 0.82
IGS	3.16 \pm 0.52	3.40 \pm 1.05	2.93 \pm 0.28	3.02 \pm 0.53	3.02 \pm 0.65	2.69 \pm 0.70	3.11 \pm 0.56	2.84 \pm 0.41	3.25 \pm 0.47	3.28 \pm 0.80	2.92 \pm 0.51
n	9	8	9	9	9	9	9	7	9	8	9

ANNEXE – D

RÉSULTATS DEVOILÉS AVEC L'AIMABLE AUTORISATION DU Dr. M. FOURNIER

Tableau récapitulatif des moyennes \pm écart-types des pourcentages de phagocytes (M1, macrophages contenant une bille et plus) et de l'activité phagocytaire (M3, pourcentage de macrophages contenant trois billes ou plus), indicateur de dysfonctionnement immunitaire, obtenues dans le rein antérieur droit des choquemorts à la fin de l'expérience (J-21). Aucun effet des différents traitements n'a été observé sur ces deux variables (KW; $p > 0,05$).

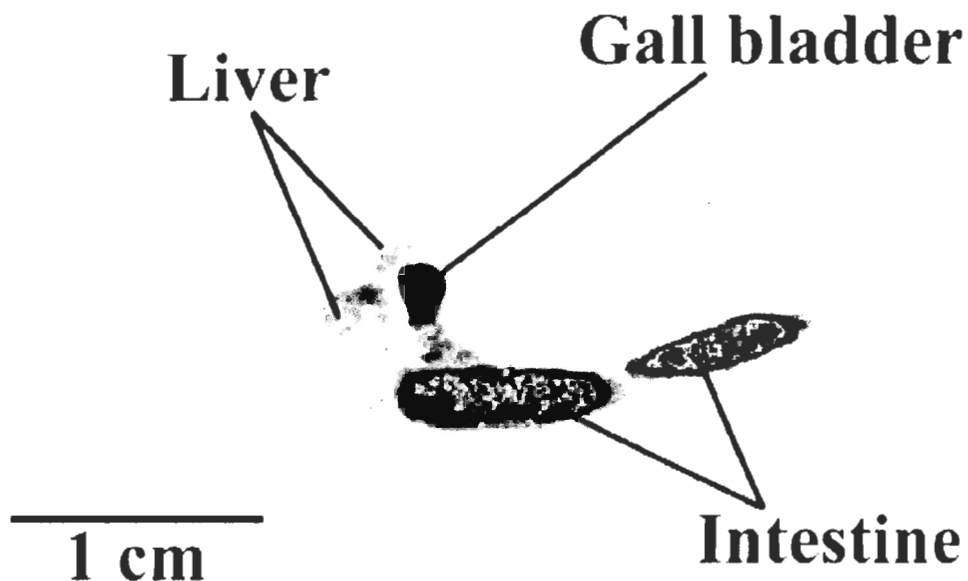
DIÉTÉS	n	M1	M3
C1	9	47.2 \pm 11.5	21.0 \pm 7.3
PM1	8	45.2 \pm 16.5	18.1 \pm 9.1
PM2	9	47.1 \pm 9.6	20.1 \pm 6.7
PM3	9	48.2 \pm 16.3	19.4 \pm 8.3
PM4	9	39.9 \pm 10.6	16.3 \pm 6.6
PM5	9	44.0 \pm 12.3	18.9 \pm 8.3
PM6	9	47.8 \pm 22.1	21.6 \pm 15.4
IV1	7	43.2 \pm 5.3	16.4 \pm 2.7
IV2	9	43.5 \pm 7.1	17.9 \pm 3.7
IV3	8	45.7 \pm 12.6	17.5 \pm 5.8
IV4	9	52.0 \pm 22.1	23.3 \pm 14.7

Protocole utilisé dans le cadre de notre expérience (tel que cité dans le projet d'article) :

Phagocytic activity in the anterior kidney - The right anterior kidney was removed under sterile conditions and mashed with medium using a syringe and stainless steel grid into a petri dish containing RPMI-1640 medium. The cell suspensions were then filtered through nylon wool into Pasteur pipettes, washed two times in RPMI, and then retrieved by centrifugation at 1200 rpm for 10 min. Phagocytosis assay was done using a modified method of Brousseau et al. protocol (1999) as described in Dautremepuits et al. (2006). A duplicate of 500 µl volume of each cellular suspension was adjusted to 1×10^6 cells/ml in 5 ml polypropylene round bottom tubes (Sarstedt, non-adherent tube). Fluorescent latex beads (d = 1.87 µm) (Polysciences, PA, USA) were added to the cell suspensions to give a 100:1 (beads:cell) ratio. Tubes were covered with paraffin and protected against light. Cells and beads were incubated at 20°C for 18 h. Following incubation period, cellular suspensions were layered separately over 3 ml of RPMI supplement with 3% of bovine serum albumin (BSA) and 10% of FBS. Elimination of free beads was performed by centrifugation at 800 rpm at 4°C for 8 min. Cell pellets were then resuspended in 0.5 ml of 0.5% formaldehyde diluted in Hematall (Becton Dickinson, CA, USA). Cells were analysed by FC and 10,000 events were recorded. Analyses were done using two biomarkers defined as the percentage of phagocytes (macrophages containing one bead or more; M1) and then as the phagocytosis activity (percentage of macrophages containing three beads or more; M3).

ANNEXE – E

RÉSULTATS DEVOILÉS AVEC L'AIMABLE AUTORISATION DU Dr. C. ROULEAU



**Distribution of ^{14}C -benzo-a-pyrene
in mummichog 7 d after ingestion with food
(^{14}C concentration, lowest to highest, $\rightarrow \rightarrow \blacksquare \rightarrow \blacksquare \rightarrow \square \rightarrow \blacksquare$)**

Distribution du ^{14}C -B[a]P chez un choquemort 7 jours après ingestion d'une diète de *N. virens* contaminée. On en constate la forte concentration dans l'intestin comparativement à la vésicule biliaire et encore davantage par rapport au foie où le ^{14}C -B[a]P n'est présent qu'en trace.