

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
AVANT-PROPOS	iii
RÉSUMÉ	iv
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
CHAPITRE I	
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 Problématique	1
1.1.1 Rejets d’eaux usées municipales dans le milieu aquatique.....	1
1.1.2 Caractéristiques des eaux usées de la communauté urbaine de Montréal.....	2
1.1.3 Voies d’exposition des poissons aux contaminants	4
1.2 Espèces cibles	5
1.2.1 Le doré	5
1.3 Traçage isotopique de la matière organique particulaire provenant des eaux usées municipales	7
1.3.1 Les isotopes stables : généralités	7
1.3.2 Matière organique particulaire provenant des eaux usées de la CUM ...	9
1.4 Les biomarqueurs	10
1.4.1 Activité EROD	11
1.4.2 Dommages structuraux à l’ADN	17
1.4.3 Isotopes stables et biomarqueurs	21
1.5 Objectif de l’étude	23
1.6 Références	24
CHAPITRE II	
IMPACT OF A MAJOR MUNICIPAL EFFLUENT ON A LARGE RIVER FOOD WEB: ISOTOPIC TRACING OF PHYSIOLOGICAL EFFECTS ON MOBILE TOP PREDATOR FISH SPECIES	33
Abstract	35
Introduction	36

Methods.....	40
Study site	40
Sampling	40
<i>In vivo</i> CYP induction	41
Laboratory analyses	42
Data analyses	44
Results and discussion	44
Stable isotope analyses	44
Biomarkers and $\delta^{15}\text{N}$ values	47
Conclusion	49
Aknowledgements.....	51
References.....	51
Tables.....	59
Figure captions.....	61
Figures.....	62
CHAPITRE III	
CONCLUSION GÉNÉRALE	67
3.1 Principaux résultats.....	67
3.1.1 Analyses isotopiques.....	67
3.1.2 Lien entre les biomarqueurs et les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$	70
3.2 Références	71

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Localisation du point de rejet de l'effluent de la station d'épuration des eaux usées de la CUM dans le fleuve Saint-Laurent	3
1.2	Mécanisme d'induction du CYP1A (modifiée de Larno, 2004).....	13

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ach	Acétylcholinestéras
ADN	Acide désoxyribonucléique
AhR	Récepteur aryl-hydrocarbure (de l'anglais aryl hydrocarbon receptor)
APA	Alkaline precipitation assay
ARNm	Acide ribonucléique messenger (ARN messenger)
BPCs	Biphényles polychlorés
CUM	Communauté urbaine de Montréal
CYP1A	Cytocrome P450 de la famille 1A
$\delta^{13}\text{C}$	Rapport de l'isotope lourd de carbone (13) sur l'isotope léger (12)
$\delta^{15}\text{N}$	Rapport de l'isotope lourd d'azote (15) sur l'isotope léger (14)
EROD	Éthoxyrésorufine-O-dééthylase
GRIL	Groupe de recherche interuniversitaire en limnologie et en environnement aquatique
GST	Gluthation S-Transférase
HAHs	Hydrocarbures aromatiques halogénés
HAPs	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
KCl	Chlorure de potassium
MDDEFP	Ministère du développement durable de l'environnement et des parcs du Québec
MFFP	Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs du Québec
Min	Minute
Mg	Milligramme
MOPPE	Matière organique particulaire provenant des égouts

MT	Métallothionéines
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OCs	Organochlorés
PBBs	Polybromobiphényles
PCDDs	Polychlorodibenzodioxines
PCDFs	Polychlorodibenzofuranes
PCTs	Polychloroterphényles
Pmol	Picomole (10^{-12} d'une mole)
PMS	Fractions post-mitochondriales (de l'anglais post-mitochondrial supernatant) aussi appelées fractions S9
ROS	Dérivé réactif de l'oxygène (de l'anglais Reactive oxygen species)
RSI	Réseau de suivi ichtyologique
UQTR	Université du Québec à Trois-Rivières
SDS	Dodécylsulfate de sodium
X	Xénobiotique

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Problématique

1.1.1 Rejets d'eaux usées municipales dans le milieu aquatique

Partout à travers le monde, les milieux aquatiques reçoivent des quantités importantes de matière organique et de contaminants provenant de rejets d'effluents municipaux. Les eaux usées municipales représentent d'ailleurs, en volume, la plus importante source de pollution des eaux de surface canadiennes. Elles sont constituées des eaux usées résidentielles, industrielles, commerciales et institutionnelles de même que des rejets d'égouts pluviaux (Gouvernement du Canada, 2010; Chambers *et al.*, 1997).

Au Canada, les eaux usées municipales reçoivent majoritairement un traitement avant d'être rejetées dans l'environnement. En effet, en 2009, 84 % de la population canadienne était liée à un réseau d'égouts avec traitement primaire, secondaire ou tertiaire. Le reste de la population était soit équipé d'installations sceptiques (13 %) ou d'aucun système (3 %). Plus le niveau de traitement des eaux usées est élevé, plus les effluents sont débarrassés des débris, des particules grossières, des matières en suspension, des microorganismes, des éléments nutritifs et des nombreux produits chimiques qu'elles contiennent. Toutefois, malgré les procédés de traitement appliqués, certains polluants demeurent et contaminent les eaux de surface (Environnement Canada, 2012; Chambers *et al.*, 1997).

Parmi les impacts engendrés par ces contaminants on recense les limitations des usages récréatifs comme les fermetures de plages ou les restrictions de cueillette de mollusques, l'enrichissement en substances nutritives conduisant au développement

indésirable d'algues et à l'eutrophisation des plans d'eau, les restrictions de la consommation d'eau potable et l'appauvrissement en oxygène dissout (Gouvernement du Canada, 2010; Chambers *et al.*, 1997). Dans plusieurs régions du Canada, les impacts écologiques sont nombreux et les rejets d'eaux usées municipales ont mené à la dégradation et à la contamination de l'habitat entraînant l'appauvrissement de la diversité et de l'abondance des organismes aquatiques de même que des changements dans la structure des communautés biologiques. Finalement, les eaux usées municipales sont une source importante de substances toxiques (métaux lourds, pesticides organochlorés, BPCs, HAPs, composés oestrogéniques, etc.) parmi lesquelles plusieurs sont persistantes (ayant une faible biodégradabilité) et bioaccumulées (ayant l'aptitude à s'accumuler dans les organismes) et donc en lien avec la problématique de consommation du poisson (Chambers *et al.*, 1997). Notons également que les rejets urbains sont des sources reconnues de perturbateurs endocriniens ayant la capacité d'induire la féminisation des moules et des poissons (Quinn *et al.*, 2004; Metcalfe *et al.*, 2001; Harries *et al.*, 1997).

1.1.2 Caractéristiques des eaux usées de la communauté urbaine de Montréal

La station d'épuration des eaux usées de la communauté urbaine de Montréal (CUM) dessert une population de plus de 1,9 million de personnes (Bélanger, 2010). Le territoire couvert par le réseau de collecte des eaux usées comprend l'île Bizard et l'ensemble de l'île de Montréal. Le volume des apports institutionnels, commerciaux et industriels est de 27 % par rapport aux eaux domestiques (Gesuale *et al.*, 2010 in Bélanger, 2010).

La station d'épuration de la CUM utilise un traitement primaire. Après avoir débarrassé mécaniquement les eaux usées des débris et des particules grossières, on applique un traitement physico-chimique dont une première étape de coagulation-floculation vise à agglomérer les particules fines. La seconde étape consiste à laisser décanter les floccs ainsi formés. Les floccs et les autres matières se déposant au fond des décanteurs forment les boues et les matières flottant en surface sont les écumes.

Les boues et les écumes sont extraites de l'eau par essorage, asséchées, brûlées puis enfouies dans un dépotoir (Ville de Montréal, 2012; Bélanger, 2010).

L'effluent de la station d'épuration de la CUM se jette directement dans le fleuve Saint-Laurent à la hauteur de l'Île-aux-Vaches (Figure 1.1) via une conduite localisée à une profondeur de 7 m sous l'eau et à 4,5 km au large de l'île de Montréal. Le débit journalier moyen de l'effluent varie entre 2,5 millions de m³ d'eau par jour par temps sec et 7,6 millions de m³ par jour en temps de pluie, ce qui en fait la troisième plus importante station d'épuration au monde (Ville de Montréal, 2012). Le panache de l'effluent persiste sur plusieurs dizaines de kilomètres vers l'aval tel que l'indiquent les modélisations du taux de dilution de l'effluent effectuées à l'aide de la Rhodamine et par simulation numérique (Boudreau *et al.*, 2005; Boulanger, 1984 *in* deBruyn et Rasmussen, 2002). Les mesures de conductivité prises par deBruyen et Rasmussen (2002) indiquent qu'à l'embouchure de lac St-Pierre, la concentration de l'effluent était d'environ 1 % à l'été 1999, pour un débit comparable à celui de l'année 2009 (Bélanger, 2010). L'effluent contient plusieurs substances chimiques toxiques telles les BPCs et les HAPs (Pham, 1999), des métaux lourds (Pham, 1999; Deschamps *et al.*, 1998), de même des produits pharmaceutiques et des perturbateurs endocriniens (Bélanger, 2010).

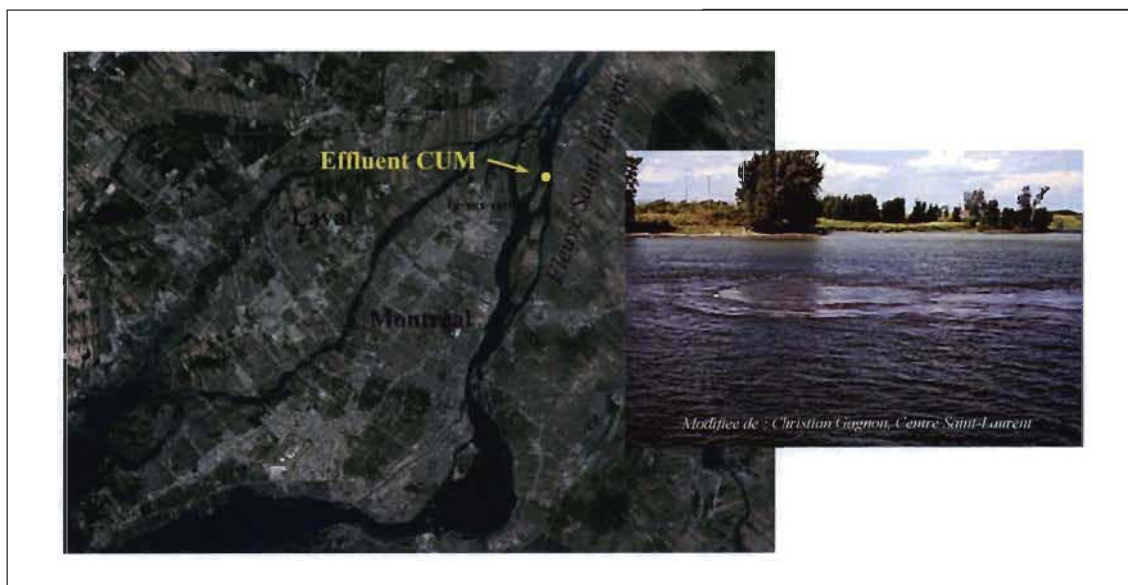


Figure 1.1 Localisation du point de rejet de l'effluent de la station d'épuration des eaux usées de la CUM dans le fleuve Saint-Laurent.

1.1.3 Voies d'exposition des poissons aux contaminants

Les deux principales voies d'exposition des poissons aux contaminants sont : (1) la voie directe (dans l'eau, par les branchies et dans une moindre mesure par le tégument) et (2) la voie trophique, soit via l'alimentation. La voie trophique constitue la principale voie d'exposition pour de nombreux contaminants persistants (ayant une faible biodégradabilité) et bioaccumulés (ayant l'aptitude à s'accumuler dans les organismes) tels que les BPCs, certains métaux lourds, les pesticides organochlorés, etc. (Persic, 2004; Loizeau *et al.*, 2001).

L'étude des impacts de l'exposition des poissons à une source de contaminants est habituellement réalisée *in situ* à l'aide de petites espèces au domaine vital très restreint, comme les cyprins par exemple ou encore *ex situ* à l'aide de bioessais. Toutefois, l'étude des impacts chez les grandes espèces de poissons pose problème en raison de leur plus grande mobilité. L'exposition réelle à la source de contamination devient alors difficile à quantifier. Néanmoins, certaines grandes espèces sont d'un grand intérêt puisque ce sont les espèces faisant l'objet de pêche récréative et/ou commerciale et qui sont donc les plus consommés. À cet égard, puisque ces grandes espèces se situent fréquemment à des niveaux trophiques élevés, le phénomène de bioamplification des contaminants est également préoccupant pour la santé humaine. La bioamplification résulte du transfert des contaminants via le réseau trophique et a pour résultat que la concentration d'un contaminant dans un organisme est supérieure à celle de ses aliments (Gobas *et al.*, 1999).

En l'occurrence, puisque l'exposition directe des espèces de poissons mobiles est difficilement quantifiable et considérant que la voie trophique constitue une voie majeure d'exposition aux contaminants et de transfert de ceux-ci à travers le réseau trophique aquatique, l'exposition trophique apparaît utile afin de quantifier l'exposition des poissons mobiles aux contaminants provenant de l'effluent de la CUM.

1.2 Espèces cibles

Aux fins de la présente étude, deux grandes espèces de poissons mobiles et piscivores ont été ciblées, soit le doré jaune (*Sander vitreus*) et le doré noir (*Sander canadensis*). Il s'agit également d'espèces présentant un intérêt certain pour la pêche sportive et/ou commerciale et donc pour la consommation humaine. La section suivante présente un bref survol de la biologie de ces espèces de même que de l'état des populations dans le fleuve Saint-Laurent.

1.2.1 Le doré

Au Québec, on trouve deux espèces de doré : le doré jaune et le doré noir. Toutes deux appartiennent à la famille des percidés. Les deux espèces, d'allure générale semblable, se distinguent notamment par quelques détails morphologiques de même que par leur comportement, leur aire de répartition et les habitats qu'ils fréquentent (Arvais *et al.*, 2012).

L'habitat du doré est constitué des eaux peu profondes et troubles des lacs et des grandes rivières, avec des températures préférentielles se situant entre 13 et 21 °C. Contrairement au doré jaune, le doré noir fait également des incursions occasionnelles dans les eaux saumâtres du fleuve Saint-Laurent (Bernatchez et Giroux, 2000). L'alimentation du doré passe très rapidement des invertébrés aux poissons, en fonction de la taille des individus (Scott et Crossman, 1974). En effet, le doré se nourrit de zooplancton durant ses premières semaines de vie et adopte ensuite une diète essentiellement piscivore, s'accommodant d'une large variété d'espèces proies selon leur disponibilité (Bernatchez et Giroux, 2000).

La fraie du doré jaune a lieu au printemps, lorsque la température de l'eau se situe entre 5,6 et 11,1 °C (Scott et Crossman, 1974). La fraie du doré noir a également lieu au printemps généralement après celle du doré jaune (Bernatchez et Giroux, 2000). Les œufs sont habituellement déposés sur fond propre et graveleux, en eau peu profonde et bien oxygénée. Dans le fleuve Saint-Laurent, la maturité sexuelle est généralement

atteinte à deux ans chez les mâles des deux espèces, à trois ans chez les femelles doré noir et à cinq ans chez les femelles doré jaune (Bernatchez et Giroux, 2000).

Le doré est depuis longtemps l'un des poissons les plus prisés des pêcheurs sportifs québécois, surtout pour la qualité de sa chair, le plaçant au deuxième rang des espèces les plus pêchées derrière l'omble de fontaine. Le doré jaune est davantage apprécié que le doré noir par les pêcheurs puisqu'il atteint une taille intéressante avant même d'être sexuellement mature, contrairement au doré noir qui conserve une petite taille, même à maturité. Selon les données de 2008, dans tout le Québec, la pêche sportive au doré représentait 300 000 pêcheurs, 8 millions de dorés pêchés et des retombées économiques de l'ordre de 234 millions de dollars (Arvisais *et al.*, 2012).

La pêche commerciale au doré était autrefois pratiquée sur plusieurs grands plans d'eau et sur l'ensemble du fleuve Saint-Laurent. Elle a cependant été radicalement réduite au début des années 1970 en raison de taux de contamination de l'eau par le mercure supérieurs aux normes de commercialisation des produits de la pêche. Depuis, elle n'est autorisée que dans le fleuve Saint-Laurent, entre le pont Laviolette et la pointe est de l'île d'Orléans. Au Québec, en 2008, la pêche commerciale au doré s'est traduite par des captures de 25 000 dorés jaunes (10 tonnes) et 5000 dorés noirs (2 tonnes) pour des revenus de 55 000 \$ (Arvisais *et al.*, 2012).

Depuis 1995, le réseau de suivi ichtyologique (RSI) du MDDEFP (aujourd'hui le MFFP) prélève des données sur les communautés de poissons du fleuve Saint-Laurent. Les données couvrant la période 1995-2009 ont été utilisées afin de dresser un portrait de l'état des stocks de dorés jaunes et de dorés noirs dans le fleuve Saint-Laurent.

Les résultats révèlent que le doré noir est considéré comme étant disparu du lac Saint-François. Par contre, dans les lacs Saint-Louis et Saint-Pierre et en aval du pont Laviolette, les populations de doré noir sont considérées comme étant en santé. Une augmentation de leur abondance est même observée. Pour ce qui est du doré jaune, il est également considéré comme étant en déclin dans le lac Saint-François. Toutefois, sa

population est en bonne condition dans le lac Saint-Louis. Dans le lac Saint-Pierre et en aval du pont Laviolette, les populations sont considérées comme étant à risque ou en déclin. En aval du pont Laviolette, il y a un important déséquilibre de la population : faible nombre de générations représentées, abondance totale en baisse et faible abondance de femelles matures résultant d'un taux de mortalité élevé. La combinaison d'exploitations sportive et commerciale dans le tronçon Bécancour-Batiscan, couplées au fait qu'il s'agit d'habitats moins favorables à l'espèce, peuvent expliquer l'état des stocks. Un plan de gestion du doré pour la période 2011 à 2016 a été mis en place afin d'améliorer la qualité de la pêche, la structure des populations et l'abondance des géniteurs (Arvisais *et al.*, 2012).

1.3 Traçage isotopique de la matière organique particulaire provenant des eaux usées municipales

1.3.1 Les isotopes stables : généralités

Les isotopes stables sont devenus, au cours des trois dernières décennies, d'importants outils d'investigation en écologie. Les différentes applications des isotopes stables à l'écologie des poissons comprennent entre autres l'étude des positions trophiques, des migrations, des mécanismes de bioaccumulation des polluants et de distinction des stocks. Les principaux éléments dosés sont le carbone, l'azote, l'oxygène, l'hydrogène, le soufre et le strontium (Michener et Lathja, 2007).

Les isotopes sont des atomes d'un même élément, possédant le même nombre de protons, mais dont le nombre de neutrons diffère. Ces isotopes ont donc des masses atomiques différentes, lesquelles différences peuvent être déterminées à l'aide d'un spectromètre de masse, sur des tissus préalablement séchés et réduits en une fine poudre (ici le foie). Les isotopes sont dits stables lorsqu'ils sont énergétiquement stables par opposition aux isotopes radioactifs. Un isotope stable tend à avoir des quantités de neutrons et de protons similaires (Michener et Lathja, 2007).

Les isotopes légers (ayant le moins de neutrons) sont plus abondants alors que les isotopes lourds sont souvent présents sous forme de traces. Par exemple, l'azote existe naturellement sous deux isotopes stables, soient le ^{14}N (99,64 %) et le ^{15}N (0,36 %). Les variations des abondances en isotopes stables sont exprimées par la notation delta (δ), sous la forme d'un rapport de l'isotope lourd sur l'isotope léger. Ce rapport, exprimé en ‰, est comparé à celui d'un standard international (l'azote atmosphérique en ce qui concerne l'azote) selon l'équation :

$$\delta^{15}\text{N} = \left(\frac{{}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}_{\text{échantillon}}}{{}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}_{\text{référence}}} - 1 \right) * 1000$$

Un delta positif indique une plus grande teneur en isotope lourd dans l'échantillon que dans la référence alors qu'un delta négatif indique que l'échantillon est pauvre en isotope lourd par rapport à la référence (Michener et Lathja, 2007).

De façon générale, le signal isotopique de tout composé dépend à la fois de la composition isotopique de la source (diète) et du phénomène de fractionnement isotopique (Michener et Lathja, 2007). La composition isotopique des tissus des animaux est généralement étroitement liée à la composition isotopique de leur diète. Ainsi, suivant une modification de la composition isotopique de sa diète, un organisme verra ses tissus devenir progressivement en équilibre isotopique avec la nouvelle diète. Ce phénomène est d'une part lié à la croissance et d'autre part au renouvellement métabolique du tissu existant (Phillips et Eldridge, 2006). En milieu naturel, il semble que la croissance soit le principal facteur de changement de la composition isotopique des tissus de poisson suite à un changement dans la diète (Maruyama *et al.*, 2001; Vander Zanden *et al.*, 1998). Par ailleurs, lors de l'incorporation d'éléments comme le carbone, l'azote ou le soufre dans le tissu animal, il se produit un enrichissement en isotope lourd par rapport à la nourriture (phénomène de fractionnement isotopique). L'enrichissement est faible pour le carbone et le soufre par exemple. Toutefois, dans le cas de l'azote, on note un enrichissement moyen du $\delta^{15}\text{N}$ de l'ordre de $+ 3.4 \pm 1.1\%$ d'un niveau trophique au niveau supérieur, ce qui en fait un élément utile dans l'étude des positions trophiques (Michener et Lathja, 2007; Minagawa et Wada, 1984).

1.3.2 Matière organique particulaire provenant des eaux usées de la CUM

La matière organique particulaire provenant des égouts (MOPPE) est constituée d'un mélange de débris organiques et de microorganismes comme les bactéries et les algues auxquels peuvent être liés de nombreux contaminants. Elle constitue une source de nourriture de haute qualité pour les consommateurs primaires. La consommation de sédiments contaminés étant la principale voie d'exposition des détritivores aux composés organiques hydrophobes et à certains métaux, la MOPPE représente par conséquent un important vecteur de transfert de contaminants dans le réseau trophique aquatique (Costello et Read, 1994).

De nombreux travaux ont démontré qu'il est possible de suivre l'incorporation de la MOPPE dans le réseau trophique aquatique du milieu récepteur, au moyen des isotopes stables de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) (deBruyn *et al.*, 2003; deBruyn et Rasmussen, 2002; Tucker *et al.*, 1999). En effet, des différences ont été observées entre la signature isotopique de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) de la matière organique particulaire elle-même, des organismes benthiques et des poissons exposés à des eaux usées municipales comparativement à ceux provenant de sites non exposés. Ceci s'explique par le fait que la MOPPE, qui est d'origine terrestre, présente typiquement un $\delta^{15}\text{N}$ plus faible que la matière organique particulaire autochtone au milieu aquatique, dû à l'usage d'engrais synthétisés à base d'azote atmosphérique présentant un $\delta^{15}\text{N}$ très faible ($\approx 0\text{‰}$) (Michener et Lathja, 2007).

Les travaux de deBruyn *et al.* (2003) estiment à 13 tonnes le flux quotidien de matière particulaire provenant de l'effluent des eaux usées de la CUM vers le réseau trophique du fleuve Saint-Laurent, dont 184 kg d'azote et 13 kg de phosphore. Leurs résultats démontrent qu'aux sites exposés à l'effluent, la production secondaire journalière des macroinvertébrés est de 1,8 à 4,1 fois plus élevée qu'aux sites non exposés. Par ailleurs, l'enrichissement par la MOPPE entraîne aussi une augmentation de la production journalière de poissons par la consommation d'algues et de débris (1,3 à 4,4 fois), d'invertébrés (1,7 à 10 fois) et de poissons (11 à 73 fois). L'analyse des isotopes stables révèle également qu'à l'intérieur du panache de dispersion de l'effluent,

les changements de $\delta^{15}\text{N}$ chez les consommateurs primaires et secondaires indiquent une ingestion importante de MOPPE, jusqu'à 10 km en aval du point de rejet de l'effluent (deBruyn *et al.*, 2003).

1.4 Les biomarqueurs

En écotoxicologie, les biomarqueurs sont utilisés en tant qu'outils pour déceler des changements moléculaires, biochimiques, cellulaires, physiologiques ou comportementaux susceptibles de révéler l'exposition d'un organisme à une contamination chimique présente ou passée (Lagadic, 2002). Ils permettent de détecter des mécanismes biochimiques impliqués dans les étapes précoces de l'intoxication. Leur utilisation nous informe sur l'effet biologique à travers la mise en œuvre d'un mécanisme connu (Vindimian, 2001).

Les biomarqueurs ont longtemps été classifiés selon trois catégories : les biomarqueurs d'exposition, d'effets et de sensibilité (Amiard et Amiard-Triquet, 2008). La définition proposée par de Lafontaine *et al.* (2000) ne retient que deux catégories et emploie plutôt les termes biomarqueurs de *défense* et de *dommages*. Les biomarqueurs de *défense* révèlent l'activation de mécanismes de défense de l'organisme envers un xénobiotique (composés chimiques d'origine exogène) alors que les biomarqueurs de *dommages* témoignent d'atteintes biologiques de l'organisme exposé pouvant se traduire par une incapacité à se reproduire, voire à survivre par exemple. Nous retiendrons cette nomenclature dans les sections suivantes.

Chez les poissons, parmi les biomarqueurs de défense couramment utilisés, on compte par exemple l'induction de l'activité de l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD), des métallothionéines (MT) et du Gluthation S-Transférase (GST). Quelques un des biomarqueurs de dommages d'usage fréquent sont par ailleurs l'inhibition des acétylcholinestérases (Ach), l'induction de la peroxydation lipidique et les dommages à l'ADN (Amiard et Amiard-Triquet, 2008; Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Certains auteurs retiennent les dommages à l'ADN comme faisant partie des biomarqueurs

d'exposition et tout effet biologique subséquent lié à l'exposition aux génotoxiques et entraînant les dommages au matériel génétique, comme biomarqueurs d'effet (Shugart, 2000). Ici, selon la définition proposée par de Lafontaine *et al.* (2000), les dommages à l'ADN seront retenus à l'intérieur de la classe des biomarqueurs de dommages.

L'utilisation combinée d'un biomarqueur de défense et d'un biomarqueur de dommages vise à tracer un portrait plus complet de l'exposition des poissons aux contaminants et des effets néfastes potentiels sur la santé des organismes exposés. Ainsi, les deux prochaines sections mettront l'emphase sur les biomarqueurs qui ont été sélectionnés pour la présente étude soient : l'activité EROD et les dommages à l'ADN.

1.4.1 Activité EROD

Le biomarqueur le plus étudié jusqu'à présent chez le poisson est certainement l'induction du cytochrome P450 1A au niveau du tissu hépatique, qui peut être quantifiée en particulier par la mesure de l'activité EROD. Les premières études effectuées *in situ* datent des années 70 et depuis les trente dernières années, ce biomarqueur a fait l'objet d'un nombre considérable d'études chez plus de 150 espèces de poissons, en laboratoire comme sur le terrain (Whyte *et al.*, 2000). En plus de répondre à une vaste gamme de contaminants chimiques ayant une structure et des propriétés toxiques similaires, l'induction de l'activité EROD est rapide, ce qui en fait un indicateur précoce de contamination (Monod, 1997 *in* Larno, 2004).

L'activité EROD a été utilisée avec succès dans divers contextes de contamination chimiques tels que le rejet d'effluents industriels (en particulier provenant de l'industrie papetière utilisant un procédé de blanchiment Kraft), la contamination des sédiments et les déversements chimiques (Whyte *et al.*, 2000). L'activité EROD a également été utilisée pour mesurer l'impact de rejets d'effluents agricoles et municipaux sur les poissons (Dévier *et al.*, 2013; Jeffries *et al.*, 2008; Mc Ardle *et al.*, 2000). Par ailleurs, les travaux de Gagné *et al.* se sont intéressés plus particulièrement aux effets de

l'effluent des eaux usées de la CUM sur l'activité EROD des bivalves du fleuve Saint-Laurent (Gagné *et al.*, 2004; Gagné *et al.*, 2002).

Les monooxygénases à cytochrome P 450

Plusieurs composés organiques toxiques sont lipophiles et peuvent s'accumuler dans les réserves lipidiques des organismes et dans les membranes cellulaires. La présence de telles molécules entraîne rapidement l'activation des systèmes biochimiques de détoxification dont l'un des rôles est de rendre plus hydrosolubles ces composés toxiques afin de faciliter leur excréation par voie rénale, biliaire ou branchiale (Larno, 2004). Le foie transforme ces composés toxiques en molécules plus facilement excrétables en deux phases (I et II). Les monooxygénases à cytochrome P450 de la sous-famille 1A (ou CYP1A), dont l'EROD fait partie, sont des complexes enzymatiques impliqués dans la phase I. Ils ont pour fonction l'oxydation du substrat au moyen de réactions chimiques diverses afin d'en augmenter la solubilité (Whyte *et al.*, 2000). Durant la phase II, des enzymes greffent une molécule endogène très polaire sur le substrat oxydé, le rendant ainsi plus facilement excrétable (Larno, 2004).

Chez les poissons, les CYP1A sont surtout concentrés au niveau du foie bien qu'ils soient également présents dans d'autres tissus tels les reins, le tube digestif et les branchies. Ils sont généralement localisés dans le réticulum endoplasmique lisse des cellules. Ces hémoprotéines sont capables de métaboliser à la fois les xénobiotiques et les molécules endogènes, par exemple, les stéroïdes et les acides gras (Whyte *et al.*, 2000).

Mécanisme d'induction du CYP1A

L'aspect le plus intéressant du CYP1A comme biomarqueur est son inductibilité. C'est-à-dire l'augmentation de sa production dans les cellules exposées à des contaminants chimiques. En effet, l'activité du CYP1A est souvent indétectable chez des poissons non exposés comparativement à des valeurs élevées chez les poissons exposés à certains contaminants (Stegeman et Lech, 1991 *in* Whyte *et al.*, 2000). Les différentes

étapes menant à l'induction du CYP1A ont été abondamment étudiées chez les mammifères et semblent opérer de manière similaire chez les poissons (Whyte *et al.*, 2000). L'induction du CYP1A est initiée par la liaison d'un xénobiotique (X) à un récepteur cytosolique de type AhR (de l'anglais *aryl hydrocarbon receptor*), spécifique des inducteurs possédant une structure plane et aromatique (Figure 1.2). La translocation du complexe X-AhR dans le noyau de la cellule active l'expression du gène, sa transcription en ARN messager (ARNm) et la traduction de la protéine CYP1A (Larno, 2004).

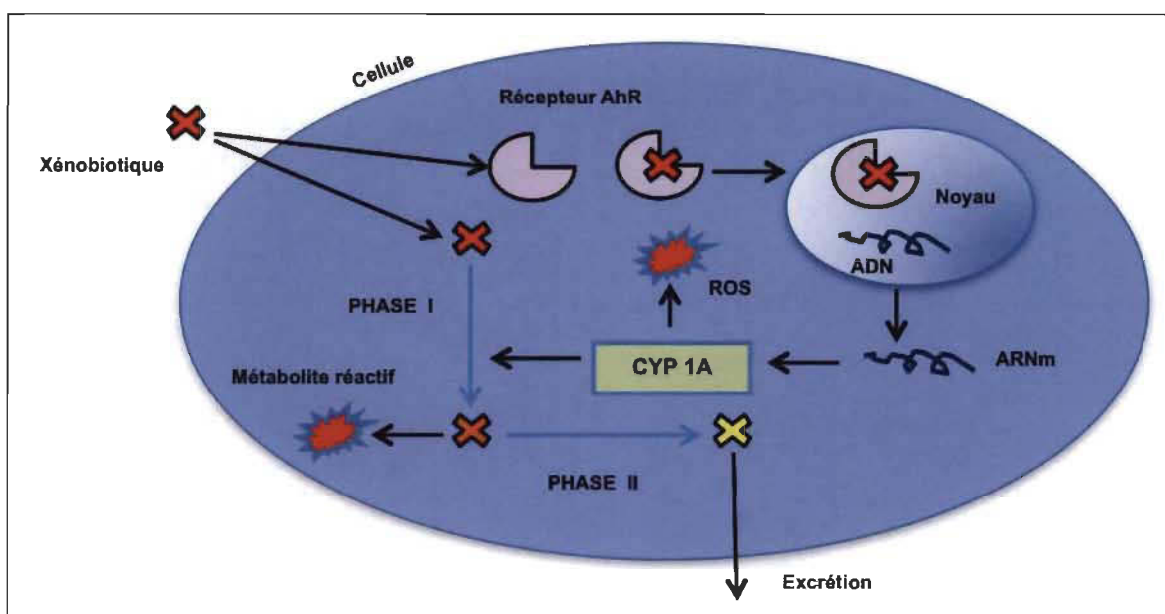


Figure 1.2 Mécanisme d'induction du CYP1A (modifiée de Larno, 2004).

Les xénobiotiques les plus susceptibles d'induire le CYP1A sont les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les hydrocarbures aromatiques halogénés (HAHs) tels les dioxines et furanes chlorés (PCDDs et PCDFs) et les polychlorobiphényles (BPCs), tous des polluants majeurs des écosystèmes aquatiques de par leur toxicité et leur persistance (Larno, 2004). D'autres contaminants sont également des agonistes des récepteurs AhR soit les polybromobiphényles (PBBs), les polychloroterphényles (PCTs) de même que certains insecticides, pesticides, métaux et substances naturelles et pharmaceutiques (Stegeman et Hanh, 1994 *in* Whyte *et al.*, 2000). Ces xénobiotiques représentent à la fois des inducteurs et des substrats des CYP1A (Larno, 2004).

Bien que le rôle du CYP1A soit de favoriser l'élimination des composés toxiques par biotransformation, il peut survenir que le produit de la phase I soit encore plus toxique que le composé d'origine (Guengerich et Liebler, 1985). Ainsi, il y a parfois formation de molécules réactives ou de ROS (*reactive oxygen species*) mutagènes et potentiellement cancérigènes, pouvant provoquer des dommages à l'ADN (Whyte *et al.*, 2000) (Figure 1.2).

Protocole de mesure et avantages de la méthode

On peut déceler l'induction du CYP1A aux différentes étapes de la réponse en quantifiant l'ARNm, la protéine ou les activités catalytiques associées. Cependant, la quantification de l'ARNm et de la protéine sont longues et coûteuses contrairement aux mesures de l'activité enzymatique et plus particulièrement celle de l'EROD (Larno, 2004; Whyte *et al.*, 2000).

Le protocole de mesure de l'activité EROD consiste à fournir au CYP1A un substrat, la 7-éthoxyrésorufine, dont la dééthylation libère de la résorufine. Puisque la résorufine possède la propriété naturelle de fluorescence, il est possible de la quantifier au moyen d'un spectromètre à fluorescence. Le tissu (ici le foie) est d'abord homogénéisé puis centrifugé afin d'obtenir les fractions post-mitochondriales (ou PMS de l'anglais post-mitochondrial supernatant) aussi appelées fractions S9, qui se trouvent dans le surnageant et qui contiennent les CYP1A. Après l'ajout de 7-éthoxyrésorufine et en présence d'une source biologique d'électrons (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH)), l'intensité de la fluorescence mesurée au spectromètre à fluorescence sur microplaque est directement proportionnelle à la quantité de résorufine formée, elle-même corrélée à la quantité d'enzyme contenue dans l'échantillon (Larno, 2004). La fluorescence produite par minute est ensuite rapportée en quantité de résorufine par l'intermédiaire d'une courbe standard de sel de sodium de résorufine. Les résultats sont exprimés en $\text{pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protéines selon la méthode décrite par Bradford (1976).

En plus d'être rapide et relativement peu coûteuse, la mesure de l'activité EROD met en évidence la présence d'un ensemble de contaminants capables de se lier aux récepteurs AhR sans recourir aux méthodes analytiques ne permettant d'identifier qu'un à un les contaminants et de mesurer leurs concentrations dans le poisson (Whyte *et al.*, 2000). Par ailleurs, de nombreux HAPs et HAHs sont rapidement métabolisés par les poissons ce qui peut résulter en une sous-estimation de l'exposition aux contaminants lorsqu'elle est basée sur les concentrations mesurées dans les tissus de poisson. Ainsi, l'induction de l'activité EROD permet une évaluation plus directe de la signification toxicologique de la présence de contaminants par l'observation des perturbations physiologiques qu'ils engendrent chez les poissons (Kleinow *et al.*, 1987).

De plus, l'induction de l'activité EROD est un indicateur extrêmement sensible de la présence d'agonistes des récepteurs AhR et constitue donc souvent la première réponse détectable de l'exposition à des contaminants. Enfin, l'activité EROD témoigne des impacts cumulatifs de tous les agonistes des récepteurs AhR auxquels les poissons ont été exposés, peu importe si ces derniers sont détectés analytiquement ou non (Whyte *et al.*, 2000).

Facteurs de modulation de l'induction du CYP1A

Depuis les tout débuts de l'utilisation du CYP1A comme biomarqueur, de très nombreuses études ont été menées afin de déterminer les facteurs biologiques et abiotiques pouvant moduler son induction outre la contamination chimique. Ces connaissances sont essentielles afin d'en interpréter adéquatement les résultats. Les principaux facteurs qui influencent l'activité EROD chez les poissons sont l'espèce, l'âge et le stade reproducteur (Whyte *et al.*, 2000).

En ce qui a trait à l'espèce, il existe des différences à la fois entre les niveaux de base de l'activité EROD et les niveaux induits par l'exposition à la contamination chimiques d'une espèce de poisson à l'autre. Les facteurs physiologiques tels que la

vitesse à métaboliser et à excréter les contaminants, la taille, le contenu lipidique et la longévité influencent la réponse aux contaminants (Bucheli et Fent, 1995).

Par ailleurs, l'âge du poisson affecte directement la réponse du CYP1A particulièrement en lien avec leur durée d'exposition aux contaminants; la concentration de contaminants dans les tissus de poissons s'accroissant généralement avec l'âge. Le stade de développement joue également un rôle dans la sensibilité des individus aux contaminants chimiques (Whyte *et al.*, 2000).

Enfin, l'un des facteurs de modulation de l'activité EROD ayant été le plus étudié est la différence notée entre les mâles et les femelles en période de fraie, alors que les femelles montrent généralement un niveau d'activité plus faible que celui des mâles (Stegeman et Hanh, 1994 *in* Whyte *et al.*, 2000). Ce phénomène est dû aux quantités importantes de 17 β -estradiol synthétisées par les femelles en période de reproduction, une hormone stéroïdienne capable d'inhiber l'activité EROD (Webb et Gagnon, 2002).

D'autres facteurs tels le régime alimentaire (niveau trophique), le sexe et la température peuvent également faire varier l'activité EROD chez les poissons (Whyte *et al.*, 2000; Bucheli et Fent, 1995). Ainsi, tous ces facteurs doivent être contrôlés lors de l'établissement du plan d'échantillonnage ou pris en compte lors de l'interprétation des résultats (Whyte *et al.*, 2000).

Finalement, l'activité EROD peut également être inhibée par un certain nombre de substances chimiques. En effet, plusieurs substances inductrices du CYP1A peuvent, sous certaines conditions, avoir un effet inhibiteur. C'est le cas des PCDDs et PCDFs, reconnues comme étant des inducteurs typiques du CYP1A et qui, à des doses élevées et selon certaines combinaisons, peuvent mener à une activité EROD plus faible qu'attendu. L'induction du CYP1A est également inhibée par certains mélanges de congénères de BPCs. Certains métaux peuvent aussi inhiber l'activité du CYP1A, et ce, à différentes étapes de son cycle d'induction (Whyte *et al.*, 2000).

Signification biologique de l'activité EROD

Bien que les agonistes des récepteurs AhR n'engendrent pas nécessairement d'effets toxiques directs, l'on peut croire que les changements biochimiques qu'ils induisent puissent avoir des impacts à des niveaux supérieurs de l'organisation biologique (Whyte *et al.*, 2000). L'induction de l'activité EROD est en effet corrélée à plusieurs effets toxiques observables chez les poissons et les mammifères, notamment au niveau de la reproduction, de l'embryogénèse et des fonctions immunitaires. Des changements morphologiques et histopathologiques ont également été mis en relation avec l'exposition à des contaminants capables d'induire le CYP1A. L'un des effets les plus souvent associés à l'induction de l'activité EROD chez le poisson est la cancérogénèse provoquée par le métabolisme des HAPs en agents mutagènes par le CYP1A (Whyte *et al.*, 2000). Il existe donc des traits pathologiques chez des poissons en lien avec l'induction du CYP1A qui peuvent être mis en relation avec une contamination chimique du milieu (Larno, 2004). Ainsi, l'induction de l'activité EROD s'avère très utile pour témoigner de la présence de molécules représentant un danger écotoxicologique pour le milieu aquatique (Flammarion *et al.*, 2000).

1.4.2 Dommages structuraux à l'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN), porteur du matériel génétique est retrouvé dans les cellules de tous les êtres vivants. Dans le noyau cellulaire, la molécule d'ADN est en constante transition entre une entité fonctionnelle stable à double brin et sans discontinuité et une forme intermédiaire instable dont l'intégrité structurale est en changement. En conditions cellulaires normales, ce dernier état est transitoire et peut être déclenché par divers processus physiologiques tels que la réplication de l'ADN par exemple. Les changements structuraux alors engendrés sont rapidement réparés ou encore font partie de la nouvelle forme stable de la structure (Shugart, 2000).

Toute modification non programmée de la structure de la molécule d'ADN peut avoir des conséquences biologiques importantes. Certains contaminants chimiques ou agents physiques (par exemple les rayons ultra-violets) sont dits *génotoxiques*,

c'est-à-dire qu'ils ont la capacité d'interagir et d'endommager la structure de la molécule d'ADN (Shugart, 2000). L'évaluation des dommages à l'ADN constitue donc un outil adapté à l'évaluation des propriétés génotoxiques des polluants environnementaux et à la détection de leur présence dans le milieu naturel (Shugart, 2000; Hebert et Luiker, 1996).

Cassures des brins d'ADN

Il existe plusieurs types de modifications structurelles de la molécule d'ADN. Alors que certaines modifications structurelles sont spécifiques à un agent génotoxique en particulier, d'autres sont induites par une grande variété de génotoxiques. Par exemple, plusieurs agents chimiques tels que le benzo-a-pyrène (un type de HAPs), crée un lien covalent avec l'ADN et forme ce que l'on appelle un adduit à l'ADN. Cette modification structurelle devient alors une empreinte spécifique du génotoxique en cause (Shugart, 2000). D'autres agents génotoxiques peuvent quant à eux provoquer des cassures des brins d'ADN. Les cassures des brins d'ADN sont induites par une large gamme de génotoxiques via divers mécanismes. Ces cassures reflètent en effet la présence de génotoxiques agissant directement sur la molécule d'ADN ou encore provoquant d'autres lésions structurelles à l'origine de sites abasiques (sites où la base azotée est manquante) et alcali-labiles (sites fragilisés générant des cassures en condition de pH alcalin) (Larno, 2004; Shugart, 2000).

Il existe deux types de cassures des brins d'ADN, soit les cassures simple brin et double brins. La cassure simple brin n'affecte qu'un seul des deux brins de la molécule d'ADN et est générée directement par les agents endommageant l'ADN. Ce type de lésion est réparée grâce aux enzymes de la voie de réparation par excision de bases (élimination de base) qui reconstituent le brin lésé à partir du brin opposé qui sert de matrice (Michel, 2011). La cassure double brins correspond quant à elle à une cassure des deux brins de la molécule d'ADN, à la même position ou presque. Elle est considérée comme la forme la plus toxique des dommages de l'ADN. Difficile à réparer,

elle est cytotoxique et peut être à l'origine de mutations et même de mort cellulaire (Michel, 2011).

La mesure des cassures des brins d'ADN a été utilisée avec succès comme biomarqueur de dommages chez divers organismes exposés à la contamination du milieu aquatique tant sous forme de bioessais (Liu *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2014; Nwani *et al.*, 2013; Santos et Martinez, 2012; Gagné *et al.*, 2011 et 1995) que d'études réalisées *in situ* (Delphino Vieira *et al.*, 2014; Lacaze *et al.*, 2011; Maria *et al.*, 2006; Moraes de Andrade *et al.*, 2004; Flammarion *et al.*, 2002; Gagné *et al.*, 2002).

Réparation de l'ADN

La réponse de ce biomarqueur à une exposition génotoxique peut également renseigner sur les processus dynamiques associés au maintien de l'intégrité de l'ADN, c'est-à-dire à sa capacité de réparation. En effet, une diminution du taux de cassures des brins d'ADN a été observée sur des érythrocytes de poissons provenant de sites contaminés aux HAPs, aux BPCs et aux métaux lourds et maintenus en laboratoire en conditions saines pour une période de deux à trois mois (Devaux *et al.*, 1998; Pandrangi *et al.*, 1995 *in* Larno, 2004). La réduction de la mesure des cassures des brins d'ADN résulte du fait que les processus de réparation de l'ADN surpassent l'effet génotoxique du contaminant; la mesure des cassures des brins d'ADN étant toujours la résultante du couplage entre l'effet génotoxique et le potentiel de réparation (Larno, 2004). Par ailleurs, soulignons que les propriétés métaboliques et physiologiques des cellules (capacité de réparation, de détoxification, de renouvellement, etc.) sont variables d'un tissu à l'autre, ce qui explique l'hétérogénéité des quantités de cassures des brins d'ADN mesurées sur différents tissus d'organismes exposés à une pollution environnementale (Gagné *et al.*, 2011; Monteiro *et al.*, 2011; Maria *et al.*, 2006; Rajaguru *et al.*, 2003). Malgré cette variabilité entre les différents tissus étudiés, les résultats de ces études révèlent, de façon générale, une augmentation des cassures des brins d'ADN en fonction de concentrations en génotoxiques plus élevées.

Toutefois, l'exposition des organismes à une pollution génotoxique n'est pas toujours associée à une diminution significative de l'intégrité de leur ADN (Debenest *et al.*, 2013; Gagné *et al.*, 2006; Gagné *et al.*, 2004; Bombail *et al.*, 2001; Theodorakis *et al.*, 2000). Il a été démontré que la quantité de cassures des brins d'ADN est fonction de la formation d'adduits, de l'augmentation du nombre de sites alkali-labiles ou de sites abasiques et du taux d'activité de réparation de l'ADN (Debenest *et al.*, 2013). Chez des organismes exposés à des composés génotoxiques, on devrait observer initialement une augmentation du nombre de cassures des brins d'ADN à mesure que les processus de réparation ont lieu. Toutefois, cette augmentation devrait être suivie par une diminution alors que les processus de réparation deviennent saturés et épuisés. Par exemple, les travaux de Gagné *et al.* (2006) ont montré qu'une augmentation des cassures des brins d'ADN était parfois observée chez des organismes bivalves prélevés dans des sites contaminés de l'estuaire du Saint-Laurent, alors qu'une diminution était observée dans des sites encore plus lourdement contaminés (Debenest *et al.*, 2013).

Enfin, l'exposition chronique des organismes vivants à un fort niveau de contamination environnementale peut mener à des processus d'acclimatation et d'adaptation qui permettent aux individus de maintenir l'intégrité de leur matériel génétique (Larno, 2004). L'influence des mécanismes adaptatifs doit donc être prise en considération dans le cadre d'études de l'impact d'une contamination *in situ*. En outre, l'interprétation des résultats doit tenir compte des caractéristiques de l'habitat telles que le niveau de pollution, la conductivité, la salinité (Debenest *et al.*, 2013) et la température de l'eau (Michel, 2011). Également, chez les organismes étudiés, le stade reproductif (Blaise *et al.*, 2002), le sexe et l'âge (Dévier *et al.*, 2013) peuvent aussi faire varier les niveaux de cassures des brins d'ADN.

Essai par précipitation alcaline

Depuis quelques décennies, plusieurs méthodes ont été mises au point afin de détecter les dommages à l'ADN. En ce qui a trait spécifiquement aux cassures des brins d'ADN, notons entre autres l'électrophorèse sur gel, l'essai comètes (*comet assay*) et

l'essai par précipitation alcaline (*Alkaline Precipitation Assay* ou APA) (Shugart, 2000). Ici, l'essai APA développé par Olive (1988) a été retenu en raison de sa sensibilité, de sa simplicité, de sa rapidité d'exécution et du grand nombre d'échantillons pouvant être traités à la fois. Le principe de cette méthode est d'isoler les cassures simple et double brins d'ADN, de l'ADN intègre dans la cellule. La méthode consiste à lyser les cellules d'un tissu (ici le foie) dans une solution de dodécylsulfate de sodium (SDS) suivi par l'addition de chlorure de potassium (KCl), ce qui provoque la formation d'un précipité qui peut être isolé par centrifugation. Ce précipité contient les protéines et les acides nucléiques en association avec les protéines. En l'absence de dommage, la majeure partie de l'ADN se retrouve dans ce précipité. Toutefois, lorsque des cassures des brins d'ADN sont créées, l'ADN lésé se retrouve dans le surnageant. La proportion d'ADN qui se retrouve dans le surnageant est, par conséquent, une mesure des dommages à l'ADN (Olive, 1988). L'ADN présent dans le surnageant est ensuite quantifié au spectromètre à fluorescence sur microplaque en utilisant la teinture de Hoescht dans les conditions décrites par Bester *et al.* (1994) afin de compenser pour l'interférence causée par l'utilisation de SDS. La fluorescence est ensuite rapportée en quantité d'ADN par l'intermédiaire d'une courbe standard d'ADN de sperme de saumon. Les résultats sont exprimés en μg d'ADN/mg protéines selon la méthode décrite par Bradford (1976).

1.4.3 Isotopes stables et biomarqueurs

L'utilisation combinée des isotopes stables et de divers biomarqueurs, ou la mesure analytique d'un contaminant en particulier fait l'objet d'une littérature relativement abondante notamment en ce qui a trait à l'étude des positions trophiques. On retrouve toutefois un nombre assez restreint d'études combinant les isotopes stables et les biomarqueurs chez des organismes mobiles en lien avec l'exposition à une source de contamination. Quelques exemples de publications présentant l'utilisation conjointe des isotopes stables et de biomarqueurs et répondant à divers objectifs sont présentés ci-après.

Notons d'abord les travaux de Vuori *et al.*, (2012) qui ont étudié plusieurs variables écophysiologiques chez différents stocks de saumons atlantiques (*Salmo salar*) durant leur période d'engraissement en mer Baltique. Plusieurs biomarqueurs de stress oxydatif de même que l'activité EROD ont été utilisés comme indicateurs de stress environnementaux alors que les isotopes stables ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) ont permis de déterminer la diète et la position trophique. L'étude a démontré que les données génétiques de même que celles issues de biomarqueurs de stress oxydatif, de l'activité EROD et des isotopes stables peuvent être combinées afin d'étudier la position trophique, la prévalence de proies et les stress environnementaux chez une population comprenant différents stocks de saumons atlantiques en mer Baltique.

Ensuite, une étude menée par Velando *et al.* (2010) s'est intéressée aux impacts du déversement pétrolier du *Prestige* au large des côtes espagnoles en 2002 chez le goéland leucophée (*Larus michahellis*) appartenant à des colonies exposées et non exposées, 17 mois suivant l'incident. Pour ce faire, les auteurs ont utilisé l'activité EROD hépatique par voie chirurgicale comme biomarqueur de défense et les isotopes stables afin de suivre l'incorporation de produits pétroliers dans le réseau trophique marin. Les résultats ont démontré que les goélands provenant de colonies exposées étaient encore exposés à des restes pétroliers et que cette exposition était reliée aux habitudes alimentaires des individus. Cette étude a permis de mettre en lumière que l'utilisation combinée d'outils vétérinaires, écotoxicologiques et écologiques, constitue une approche utile pour le suivi d'importants déversements pétroliers.

Afin d'examiner le potentiel des contaminants organochlorés (OCs) comme traceurs de processus écologiques, Fisk *et al.*, (2002) ont mesuré les OCs, le $\delta^{15}\text{N}$ et le $\delta^{13}\text{C}$ et analysé les contenus stomacaux de requins du Groenland (*Somniosus microcephalus*) capturés dans le Déroit de Davis (mer du Labrador). Les OCs et les isotopes stables ont également été mesurés chez des turbots (*Reinhardtius hippoglossoides*) et les isotopes stables chez des phoques annelés (*Phoca hispida*) et des phoques du Groenland (*Pagophilus groenlandicus*). Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ suggéraient que le requin du Groenland se positionne à un niveau trophique similaire à celui du turbot et

du phoque annelé, mais à un niveau trophique supérieur au phoque du Groenland. Les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ ont indiqué une source de carbone d'origine plus pélagique chez le requin et le turbot que chez les phoques. Les fortes concentrations d'OCs mesurées chez le requin comparativement à celles mesurées chez le turbot et le phoque annelé suggèrent que le requin serait à un niveau trophique plus élevé que prédit par les isotopes stables. Enfin, la présence d'un phoque annelé dans l'estomac d'un des requins et les niveaux élevés d'OCs suggèrent que les phoques soient une proie commune des requins du Groenland. Cette étude a donc permis de démontrer l'utilité des OCs comme complément aux isotopes stables, en tant qu'indicateur de la position trophique.

Finalement, Cabana et Rasmussen (1994) ont observé que la signature isotopique de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) de touladis (*Salvelinus namaycush*) provenant de plusieurs lacs variait grandement pour une même espèce. Afin d'expliquer ces variations, les auteurs ont mesuré la longueur de la chaîne trophique en présence et en l'absence de deux niveaux trophiques intermédiaires (un crustacé et un poisson). Les auteurs ont conclu que le $\delta^{15}\text{N}$ peut non seulement être utilisé comme mesure de la position trophique, mais que ces résultats étaient également supportés par les niveaux de mercure mesurés dans les tissus de ces mêmes touladis. Les travaux de Kiriluk *et al.* (1995) ont par ailleurs démontré que l'enrichissement du $\delta^{15}\text{N}$ à travers le réseau trophique aquatique du lac Ontario indiquait une forte corrélation entre la bioamplification de substances chimiques persistantes (BPCs et mirex par exemple) et la position trophique de l'organisme telle que déterminée par les isotopes stables de l'azote.

1.5 Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude était d'évaluer la possibilité de tracer des impacts physiologiques chez deux espèces de poissons mobiles et piscivores exposées à l'effluent de la station d'épuration de la CUM à l'aide de l'exposition trophique telle que déterminée par la signature isotopique de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) des tissus des poissons. Pour ce faire, le $\delta^{15}\text{N}$ a été mesuré dans le foie de dorés jaunes (*Sander vitreus*) et de dorés noirs (*Sander canadensis*) capturés dans le fleuve Saint-Laurent, sur un tronçon d'environ

200 km, incluant le point de rejet de la CUM, de même des sites situés en amont et en aval de ce dernier. Chez ces mêmes individus, l'activité EROD et les cassures des brins d'ADN ont été mesurées comme biomarqueurs de défense et de dommages respectivement, afin de témoigner des impacts physiologiques induits par l'exposition à l'effluent de la CUM.

Hypothèse retenue

Notre hypothèse de départ était la suivante :

L'activité EROD et les cassures des brins d'ADN varieront en fonction de l'exposition trophique des poissons à l'effluent de la CUM. Plus précisément, l'intensité du lien trophique entre les poissons et l'effluent de la CUM va expliquer l'induction de ces deux biomarqueurs.

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

1.6 Références

- Amiard, J.-C. et C. Amiard-Triquet. 2008. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 372 p.
- Arvisais, M., Nadeau, D., Legault, M., Fournier, H., Bouchard, F. et Y. Paradis. 2012. Plan de gestion du doré au Québec 2011-2016. Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs, Direction générale de l'expertise sur la faune et ses habitats, Direction de la faune aquatique, 73 p.
- Bélanger, P. 2010. Analyse écotoxicologique de l'effluent traité des eaux usées de la ville de Montréal. Essai présenté au Centre universitaire de formation en environnement en vue de l'obtention du grade de maître en environnement (M. Env.). Centre universitaire de formation en environnement de l'Université de Sherbrooke. 72 p.
- Bernatchez, L. et M. Giroux. 2000. Les poissons d'eau douce du Québec et leur répartition dans l'Est du Canada. Broquet, Boucherville. 350 p.
- Bester, M.J., Potgieter, H.C. et W.J.H Vermaak. 1994. Cholate and pH reduce interference by SDS in the determination of DNA with Hoescht. Analytical Biochemistry. 223: 299-305.

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

- Blaise, C., Gagné, F., Pellerin, J., Hansen, P.-D. et S. Trottier. 2002. Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay Fjord with the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Environmental Toxicology*. 17: 170-186.
- Bombail, V., Aw, D., Gordon, E. et J. Batty. 2001. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere*. 44: 383-92.
- Boudreau, P., Leclerc, M. et Y. Secretan. 2005. Révision des taux de dilution de l'effluent de l'Île-aux-Vaches dans le fleuve Saint-Laurent par simulation numérique. Étude réalisée dans le cadre du Réseau de Recherche en Écotoxicologie du Saint-Laurent en collaboration avec la ville de Montréal (Environnement). Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Québec, Rapport INRS-ÉTÉ #R-794, 34 p.
- Boulanger, F. 1984. Station d'épuration de la CUM. Répercussions environnementales d'un déversement d'eaux usées prétraitées à l'émissaire de l'Île-aux-Vaches. Final report. [In French.] Montreal Urban Community, Water Treatment Service, Montreal, Quebec, Canada.
- Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*. 72: 248-254.
- Bucheli, T.D. et K. Fent. 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 25: 201-68.
- Cabana, G. et J.B. Rasmussen. 1994. Modelling food chain structure and contaminant bioaccumulation using stable nitrogen isotopes. *Nature*. 372: 255-257.
- Chambers, P.A., Allard, M., Walker, S.L., Marsalek, J., Lawrence, J., Servos, M., Busnarda, J., Munger, K.S., Jefferson, C., Kent, R.A., Wong, M.P. et K., Adare. 1997. Impacts of municipal wastewater effluents on Canadian waters: a review. *Water Quality Research Journal of Canada*. 32: 659-713.
- Costello, M.J., et P. Read. 1994. Toxicity of sewage sludge to marine organisms: a review. *Marine Environmental Research*. 37: 23-46.
- deBruyn, A.M.H., Marcogliese, D.J. et J.B. Rasmussen. 2003. The role of sewage in a large river food web. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 60: 1332-1344.

- deBruyn, A.M.H. et J.B. Rasmussen. 2002. Quantifying assimilation of sewage-derived organic matter by riverine benthos. *Ecological Applications*. 12(2): 511-520.
- Debenest, T., Gagné, F., Burgeot T., Blaise, C. et J. Pellerin. 2013. DNA integrity assessment in hemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) in the Saguenay Fjord (Québec, Canada). *Environmental Science and Pollution Research*. 20: 621-629.
- de Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P. et H.M. Chan. 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology*. 50: 51-71.
- Delphino Vieira, E.D., da Silva Almeida, M., Galindo, B.A., Pereira, L. et C. Bueno dos Reis Martinez. 2014. Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. *Neotropical Ichthyology*. 12(1): 153-164.
- Deschamps, G., Leveau, T. et P.J. Cejka. 1998. Évolution des contaminants toxiques dans les eaux usées à la station d'épuration de la Communauté urbaine de Montréal en 1995 et 1996. Communauté urbaine de Montréal, Service de l'environnement, Réseau de Suivi écologique. Final Report. RSÉ 98-01.
- Devaux, A., Flammarion, P., Bernardon, V., Garric, J. et G. Monod. 1998. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Marine Environmental Research*. 46: 257-262.
- Dévier, M.-H., Le Dû-Lacoste, M., Akcha, F., Morin, B., Peluhet, L., Le Menach, K., Burgeot, T. et H. Budzinski. 2013. Biliary PAH metabolites, EROD activity and DNA damage in dab (*Limanda limanda*) from Seine Estuary (France). *Environmental Science and Pollution Research*. 20: 708-722.
- Environnement Canada. 2012. Indicateur de traitement des eaux usées municipales [En ligne].
<http://www.ec.gc.ca/indicateurs-indicators/default.asp?lang=Fr&n=2647AF7D-1>
(Page consultée le 22 novembre 2012)
- Fisk, A.T., Tittlemier, S.A., Pranschke, J.L. et R.J. Norstrom. 2002. Using anthropogenic contaminants and stable isotopes to assess the feeding ecology of Greenland sharks. *Ecology*. 83: 2162-2172.

- Flammarion, P., Devaux, A. et J. Garric. 2000. Marqueurs biochimiques de pollution dans les écosystèmes aquatiques continentaux. Exemples d'utilisation et perspectives pour le gestionnaire. Bulletin Français De La Pêche et de La Pisciculture. 357/358: 209-226.
- Flammarion, P., Devaux, A., Nehls, S., Migeon, B., Noury, P. et J. Garric. 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). Ecotoxicology and Environmental Safety. 51: 145-53.
- Gagné, F., André, C., Cejka, P., Hausler, R. et M. Fournier. 2011. Alterations in DNA metabolism in *Elliptio complanata* mussels after exposure to municipal effluents. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 154: 100-107.
- Gagné, F. et C., Blaise. 1995. Evaluation of the genotoxicity of environmental contaminants in sediments to rainbow trout hepatocytes. Environmental Toxicology and Water Quality. 10: 217-229.
- Gagné, F., Blaise, C., Aoyama, I., Luo, R., Gagnon, C., Couillard, Y., Campbell, P. et M. Salazar. 2002. Biomarker Study of a Municipal Effluent Dispersion Plume in Two Species of Freshwater Mussels. Environmental Toxicology. 17: 149-159.
- Gagné, F., Blaise, C. et J. Hellou. 2004. Endocrine disruption and health effects of caged mussels, *Elliptio complanata*, placed downstream from a primary-treated municipal plume for 1 year. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Toxicology and Pharmacology. 138: 33-44.
- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Pelletier, E. et J. Strand. 2006. Health status of *Mya arenaria* bivalves collected from contaminated sites in Canada (Saguenay Fjord) and Denmark (Odense Fjord) during their reproductive period. Ecotoxicology and Environmental Safety. 64: 348-361.
- Gesuale, G., Tremblay, L., Cejka, P.J., Deslandes, J.C. et R. Hausler. 2010. Ozonation en colonne pour la désinfection des eaux usées de la ville de Montréal 2005-2007. Station d'épuration des eaux usées de la Ville de Montréal, Rapport synthèse, 143 p. (Confidentiel).
- Gobas, F.A.P.C., Wilcockson, J.B., Russel, R.W. et G.D. Haffner. 1999. Mechanism of biomagnification in fish under laboratory and field conditions. Environmental Science and Technology. 33: 133-141.
- Gouvernement du Canada. 2010. Projet de Règlement sur les effluents des systèmes d'assainissement des eaux usées. Gazette du Canada, Partie I. 144(12).

- Guengerich, F.P. et D.C. Liebler. 1985. Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolites. *Critical Reviews in Toxicology*. 14: 259-307.
- Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J.P., Tyler, C.R. et N. Zaman. 1997. Estrogenic activity in five UK rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16: 534-542.
- Hebert, P.D. et M.M., Luiker 1996. Genetic effects of contaminant exposure - towards an assessment of impacts on animal populations. *The Science of the Total Environment*. 191: 23-58.
- Jeffries, K.M., Jackson, L.J., Peters, L.E. et K.R. Munkittrick. 2008. Changes in population, growth, and physiological indices of longnose dace (*Rhinichthys cataractae*) in the Red Deer River, Alberta, Canada. *Archives of environmental contaminant and toxicology*. 55(4): 639-651.
- Kiriluk R.M., Servos, M.R., Whittle D.M., Cabana G. et J.B. Rasmussen. 1995. Using ratios of stable nitrogen and carbon isotopes to characterize the biomagnification of DDE, mirex, and PCB in a Lake Ontario pelagic food web. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 52: 2660-2674.
- Kleinow, K.M, Melancon, M.J. et J.J. Lech. 1987. Biotransformation and induction: implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. *Environmental Health Perspectives*. 71: 105-19.
- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A. et O. Geffard. 2011. DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: a tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environmental Pollution*. 159: 1682-1691.
- Lagadic, L. 2002. Biomarkers: useful tools for the monitoring of aquatic environments. *Revue de médecine vétérinaire*. 153(8-9): 581-588.
- Larno, V. 2004. Réponses génétiques et physiologiques de populations de chevaine (*Leuciscus cephalus*) à la contamination chimique dans le bassin du Rhône. Thèse présentée devant l'Université Claude Bernard-Lyon 1 pour l'obtention du diplôme de doctorat, spécialité « Toxicologie de l'Environnement ». 263 pages et annexes.
- Liu, J., Lu, G., Wu, D. et Z. Yan. 2014. A multi-biomarker assessment of single and combined effects of norfloxacin and sulfamethoxazole on male goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 102: 12-17.

- Loizeau, V., Abarnou, A., Cugier, P., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, A.-M. et A. Menesguen. 2001. A Model of PCB Bioaccumulation in the Sea Bass Food Web from the Seine Estuary (Eastern English Channel). *Marine Pollution Bulletin*. 43(7-12): 242-255.
- Maria, V.L., Pacheco, M. et M.A. Santos. 2006. *Anguilla anguilla* L. Genotoxic responses after in situ exposure to freshwater wetland (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Environment International*. 32: 510-515.
- Maruyama, A., Yamada, Y., Rusuwa, B. et M. Yuma. 2001. Change in stable nitrogen isotope ratio in the muscle tissue of a migratory goby, *Rhinogobius* sp., in a natural setting. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 58(11): 2125-2128.
- McArdle, M., Elskus, A., McElroy, A., Larsen, B., Benson, W. et D. Schlenk. 2000. Estrogenic and CYP1A response of mummichogs and sunshine bass to sewage effluent. *Marine Environmental Research*. 50: 175-179.
- Metcalf, C.D., Metcalfe, T.L., Kiparissis, Y., Koenig, B.G., Khan, C., Hughes, R.J., Croley, T.R., March, R.E. et T. Potter. 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by *in vivo* assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20: 297-308.
- Michel, C. 2011. Biomarqueurs de génotoxicité chez *Dreissena polymorpha* : indicateurs de la pression chimique urbaine et variabilité naturelle des lésions de l'ADN. Thèse Doctorale Spécialité « Ecotoxicologie ». Université Pierre et Marie Curie Paris VI, Ecole Doctorale Géosciences et Ressources Naturelles. 218 p.
- Michener, R. et K., Lathja. 2007. *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Edited by Robert Michener and Kate Lathja. 2nd ed., 566 p.
- Minagawa, M., et E. Wada. 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 48: 1135-1140.
- Monod, G. 1997. L'induction du cytochrome P4501A. In: *Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects fondamentaux* (eds. Lagadic L., Caquet T., Amiart J. C., Ramade F.), Paris, pp. 33-51.
- Monteiro, V., Cavalcante, D.G.S.M., Viléla, M.B.F.A., Sofia, S.H. et C.B.R. Martinez. 2011. *In vivo* and *in vitro* exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology*. 104: 291-298.

- Moraes de Andrade, V., da Silva, J., da Silva, F.R., Heuser, V.D., Dias, J.F., Yoneama, M.L. et T.R.O. de Freitas. 2004. Fish as Bioindicators to Assess the Effects of Pollution in Two Southern Brazilian Rivers Using the Comet Assay and Micronucleus Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 44: 459-468.
- Nwani, C.D., Nagpur, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B. et W.S. Lakra. 2013. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. *Environmental toxicology and pharmacology*. 36: 539-547.
- Olive, P.L. 1988. DNA precipitation assay: A rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 11: 487-95.
- Pandurangi, R., Petras, M., Ralph, S. et M. Vrzoc. 1995. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environmental Molecular Mutagenesis*. 26: 345-356.
- Persic, A. 2004. Modalités de contamination par les polluants organiques persistants des réseaux trophiques lagunaires. Application de la méthode des isotopes stables. Thèse présentée pour obtenir le Grade de Docteur en Sciences de l'Université Paris XI Orsay. Spécialité : Science de la Vie. 206 p. et annexes.
- Pham, T.T., Proulx, S., Brochu, C. et S. Moore. 1999. Composition of PCBs and PAHs in the Montreal Urban Community wastewater and in the surface water of the St. Lawrence river (Canada). *Water, Air, and Soil Pollution*. 111: 251-270.
- Phillips, D.L. et P.M. Eldridge. 2006. Estimating the timing of diet shifts using stable isotopes. *Oecologia*. 147: 195-203.
- Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J. et C. Mothersill. 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology*. 66(3): 279-292.
- Rajaguru, P., Suba, S., Palanivel, M. et K. Kalaiselvi. 2003. Genotoxicity of a Polluted River System Measured Using the Alkaline Comet Assay on Fish and Earthworm Tissues. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 41: 85-91.
- Santos, R., Palos-Ladeiro, M., Besnard, A., Vulliet, E., Porcher, J.M., Bony, S., Devaux, A. et W. Sanchez. 2014. Kinetic response of a genotoxicity biomarker in the three-spined stickleback and implication for environmental monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 102: 6-11.

- Santos, T.G. et C.B.R. Martinez. 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*. 89: 1118-1125.
- Scott, W.B. et E.J. Crossman. 1974. Poissons d'eau douce du Canada. Bulletin 184. Office des recherches sur les pêcheries du Canada. 1026 p.
- Shugart, L.R. 2000. DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology*. 9: 329-340.
- Stegeman, J.J. et M.E. Hahn. 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins D.C. and Ostrander G.K. (Eds.) *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 87-206.
- Stegeman, J.J. et J.J. Lech. 1991. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environmental Health Perspectives*. 90: 101-9.
- Theodorakis, C.W., Swartz, C.D., Rogers, W.J., Bickham, J.W., Donnelly, K.C. et S.M. Adams. 2000. Relationship between genotoxicity, mutagenicity, and fish community structure in a contaminated stream. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 7: 131-143.
- Tucker, J., Sheats, N., Giblin, A.E., Hopkinson, C.S. et J.P. Montoya. 1999. Using stable isotopes to trace sewage-derived material through Boston Harbor and Massachusetts Bay. *Marine Environmental Research*. 48: 353-375.
- Vander Zanden, M.J., Hulshof, M., Ridgway, M.S. et J.B. Rasmussen. 1998. Application of stable isotope techniques to trophic studies of age-0 smallmouth bass. *Transactions of the American Fisheries Society*. 127: 729-739.
- Vasseur, P. et C. Cossu-Leguille. 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International*. 28(8): 711-717.
- Velando, A., Munilla, I., Lopez-Alonso, M., Freire, J. et C. Pérez. 2010. EROD activity and stable isotopes in seabirds to disentangle marine food web contamination after the Prestige oil spill. *Environmental Pollution*. 158(5): 1275-1280.
- Ville de Montréal. 2012. Le portail officiel de la ville de Montréal [En ligne]. http://ville.montreal.qc.ca/portal/page?_pageid=6497,54345571&_dad=portal&_schema=PORTAL (Page consultée le 13 novembre 2012)

- Vindimian, E. 2001. La surveillance biologique des impacts toxiques dans l'environnement. *Cellular and Molecular Biology*. 47 (Supplément): 67-79.
- Vuori, K., Kiljunen, M., Kanerva, M., Koljonen, M.-L. et M. Nikinmaa. 2012. Stock-specific variation of trophic position, diet and environmental stress markers in Atlantic salmon *Salmo salar* during feeding migrations in the Baltic Sea. *Journal of Fish Biology*. 81: 1815-1833.
- Webb D. et M.M. Gagnon. 2002. Biomarkers of exposure in fish inhabiting the Swan-Canning Estuary, Western Austria - a preliminary study. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 9(4): 259-269.
- Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J. et D.E. Tillitt. 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure. *Critical Reviews in Toxicology*. 30(4): 347-570.

Rapport-Gratuit.com

CHAPITRE II

IMPACT OF A MAJOR MUNICIPAL EFFLUENT ON A LARGE RIVER FOOD WEB: ISOTOPIC TRACING OF PHYSIOLOGICAL EFFECTS ON MOBILE TOP PREDATOR FISH SPECIES

Manuscrit en attente de soumission au journal

Environmental Science & Technology

Centre de Recherche sur les Interactions bassins Versants - Écosystèmes aquatiques (RIVE). Département des sciences de l'environnement, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, G9A 5H7, Canada.

Impact of a major municipal effluent on a large river food web: isotopic tracing of physiological effects on mobile top predator fish species

Isabelle Villemure¹, Gilbert Cabana¹, François Gagné³, Yves Paradis² and
Hélène Glémet¹

¹ Centre de Recherche sur les Interactions bassins Versants - Écosystèmes aquatiques (RIVE). Département des sciences de l'environnement, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, G9A 5H7, Canada.

² Ministère des forêts, de la faune et des parcs du Québec (MFFP), 880, Chemin Ste-Foy, 2^e étage, Québec, Québec, G1S 4X4, Canada.

³ Environnement Canada, Centre Saint-Laurent, 105, rue McGill, Montréal, Québec, H2Y 2E7, Canada.

Corresponding author: Gilbert Cabana

E-mail: gilbert.cabana@uqtr.ca

(819) 376-5011, ext. 3366

Keywords: Walleye – Sauger – St-Lawrence river – Sewage derived particulate organic matter (SDPOM) – Water contamination – Ecotoxicology – Stable isotopes – Nitrogen – Trophic exposure – Biomarkers – EROD – DNA strand breaks

Abstract

The Montreal Urban Community (MUC) wastewater treatment plant is the third largest treatment facility in the world and represents the most important sewage-derived particulate organic matter (SDPOM) and contaminant (both polychlorinated biphenyls (PCBs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)) input into the St-Lawrence river system. Fish can be exposed to contaminants by both waterborne (direct) or dietary (trophic) pathways, the latter constituting a major exposure pathway to numerous persistent and bioaccumulative contaminants. The aim of this study was to assess the possibility of predicting physiological impacts of SDPOM contaminants on two mobile top predator fish species exposed to MUC effluent using trophic exposure as determined by nitrogen stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$) signature in fish tissue. More specifically, $\delta^{15}\text{N}$, and physiological impact biomarkers (EROD activity and DNA strand breaks) were measured in liver tissue of walleye (*Sander vitreus*) and sauger (*Sander canadensis*) collected over 200 km including upstream and downstream areas of the MUC effluent outfall point. Our results show that for both fish species, average liver $\delta^{15}\text{N}$ values were systematically lowest at the effluent outfall point and lower in the plume compared to all other sites indicating a strong trophic connection to SDPOM originating from MUC outfall. Liver EROD activities varied inversely to $\delta^{15}\text{N}$ values, with no relationship with distance from the outfall point, suggesting $\delta^{15}\text{N}$ signature in fish tissue can be used to predict EROD induction in large fish species that are mobile and are captured in locations other than where they feed. For DNA strand breaks, only a relationship with distance from effluent was apparent suggesting that direct exposure of fish to waterborne contaminants is seemingly more important than the trophic pathway for inducing DNA cellular damage. This study clearly demonstrates for the first time that the St-Lawrence foodweb from Beauharnois to Lake St-Pierre is largely influenced by SDPOM from the MUC effluent at the highest trophic level in adult, piscivorous, fish species and that trophic exposure assessed by nitrogen stable isotope signature is a good proxy for predicting contaminant effects in large mobile fish.

Introduction

In Canada, as well as throughout the world, sewage is a major threat to receiving waters as it releases an important quantity of organic matter and contaminants that can potentially harm aquatic biota (Chambers *et al.*, 1997). The Montreal Urban Community (MUC) wastewater treatment plant is the third largest treatment facility in the world serving 1.9 million people on the Island of Montreal and Île Bizard (Bélanger, 2010). The MUC wastewater treatment plant is a primary treatment facility. After mechanical removal of larger wastes and particules, wastewater is cleared from smaller particules by coagulation and passed through settling ponds. Solids are then removed and without any further water disinfection treatment, the effluent is discharged directly into the St-Lawrence River via an underwater pipe at a depth of 7 m and a distance of 4.5 km from the Island of Montreal (figure 1) (Ville de Montréal, 2012; Bélanger, 2010). The effluent is discharged at a mean daily rate of 2.5 to 7.6 million m³/d depending on precipitation levels (Ville de Montréal, 2012).

The general trajectory of the MUC wastewater plume has been described using a numerical simulation as shown on figure 1 (Boudreau, 2005). A study conducted by Gagnon and Turcotte (2007) showed that values of water pH, conductivity and redox potential, measured downstream of the outfall, were returning to similar upstream values within 8, 5 and 2 km respectively. Values for dissolved organic carbon, particular organic carbon and suspended particulate matter were also returning to similar upstream values within 8 km. Furthermore, Gagnon and Saulnier (2003) suggest that around 50% of the effluent is diluted within the first 500 m downstream from the station closest to the effluent outfall. A 75% dilution of the effluent is achieved by 5 km downstream and can reach up to 90% within the first 10 km.

The effluent is primarily composed of sewage-derived particulate organic matter (SDPOM) but also contains several particle-associated contaminants such as PCBs and PAHs (Pham *et al.*, 1999), heavy metals (Pham *et al.*, 1999; Deschamps *et al.*, 1998), as well as pharmaceutical products and endocrine disrupters (Bélanger, 2010). Daily flux of sewage-derived particulate organic matter (SDPOM) from MUC wastewater treatment

plant into the St-Lawrence River is important and estimated at 13 tons (deBruyn *et al.*, 2003). Since SDPOM is a mixture of organic detritus and microorganisms such as algae and bacteria often associated with contaminants (deBruyn and Rasmussen, 2002), it is considered a high-quality food source and can represent an important vector for transfer of sewage-associated contaminants to aquatic consumers (Costello and Read, 1994). The incorporation of particulate organic matter released from sewage treatment plants into aquatic food webs has been shown to be traceable with nitrogen stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$) (deBruyn *et al.*, 2003; deBruyn and Rasmussen, 2002; Tucker *et al.*, 1999). Indeed, a downward shift in $\delta^{15}\text{N}$ values in macroinvertebrates within the effluent plume downstream of the MUC effluent outfall has been associated with their consumption of sewage-derived resources (deBruyn *et al.*, 2003; deBruyn and Rasmussen, 2002). Fish at higher trophic levels will also display depressed values as a result of predation on fish having consumed those macroinvertebrates. Since on average, a constant enrichment of $\delta^{15}\text{N}$ values of $3.4 \pm 1.1\%$ per trophic level occurs, predator fish exposed to effluent wastewater can be differentiated from non-exposed fish since the former will have much lower $\delta^{15}\text{N}$ values than the non-exposed ones.

Ecotoxicological studies of contaminants released by municipalities have commonly used either small organisms with low mobility collected at strategic sites or caged individuals placed in similar areas to characterize the effects of these substances on aquatic ecosystems. Investigating contaminant bioaccumulation in larger, more mobile species, such as piscivorous fish, is more problematic since the length of time free-ranging individuals are exposed to the effluent is unknown. Nevertheless, large species are of great interest because of recreational and/or commercial fishing, and therefore, human consumption. Moreover, as those large fish species are often located at high trophic levels, contaminant bioamplification phenomenon is an issue of concern for human health (Gobas *et al.*, 1999).

Fish can be exposed to contaminants by both waterborne (direct) or dietary (trophic) pathways, the latter constituting a major exposure pathway to numerous persistent and bioaccumulative contaminants such as BCPs, heavy metals and

organochlorine (OCs) pesticides (Persic, 2004; Loizeau *et al.*, 2001). While direct exposure is particularly difficult to evaluate in large fish species because of their mobility, trophic exposure, can be determined independently of movement using $\delta^{15}\text{N}$ measurements. Nitrogen stable isotope ($\delta^{15}\text{N}$) signature in fish tissue could thus represent a useful alternative for evaluating fish exposure to MUC effluent in large mobile species. In addition, trophic exposure could potentially show a relationship with any physiological impacts on fish that can be revealed using ecotoxicological tools such as biomarkers.

Biomarkers are widely employed to evaluate physiological impacts of contamination exposure on fish and other aquatic organisms. They are used as tools to detect molecular, biochemical, cellular, physiological or behavioral changes that can reveal an organism's present or passed exposition to contamination (Lagadic, 2002). In contrast to the simple measurement of contaminants accumulating in body tissues, biomarkers can offer a more complete and biologically more relevant information on the potential impact of toxic pollutants on the health of organisms (de Lafontaine *et al.*, 2000; Vander Oost *et al.*, 1996). Moreover, they can detect initial responses to environmental perturbations and contamination (Vindimian, 2001). Biomarkers are often classified in three categories: biomarkers of exposition, of effect and of sensitivity (Amiard and Amiard-Triquet, 2008). In the context of biomonitoring and in order to categorize biomarkers according to their type of response, de Lafontaine *et al.* (2000) suggest biomarkers of *defense* (e.g. ethoxyresorufin-O-deethylase activity (EROD)) or as biomarker of *damage* (e.g. DNA strand breaks).

Measurement of EROD activity in fish liver is a well-established defense biomarker (Whyte *et al.*, 2000) that has been successfully used on fish in several contamination contexts such as pulp and paper industry as well as agricultural and municipal effluents (Dévier *et al.*, 2013; Jeffries *et al.*, 2008; Mc Ardle *et al.*, 2000; Soimasuo *et al.*, 1998). Additionally, Gagné *et al.* have particularly focused on the influence of MUC effluent on mussel EROD activity in the St-Lawrence River (Gagné *et al.*, 2004; Gagné *et al.*, 2002). EROD activity is influenced by a large number of

chemicals such as PAHs, PCBs, halogenated aromatic hydrocarbons (HAHs), polybrominated biphenyls (PBBs), polychlorinated terphenyls (PCTs), as well as some insecticides, pesticides, metals and pharmaceutical agents (Stegeman and Hanh, 1994). Finally, because of its prompt response, EROD activity is often termed an *early warning system* of contaminant exposure (Whyte *et al.*, 2000).

Some environmental chemicals are classified as *genotoxicants*, since they have the capacity to interact with and damage the structure of the DNA molecule, often with a concomitant adverse affect on biological integrity (Shugart, 2000). Therefore, evaluation of DNA damages such as measurement of DNA strand breaks can be used as a biomarker of damage (Shugart, 2000). Some of the most common chemical genotoxicants in aquatic systems are PAHs, PCBs, some herbicides, pesticides, metals and pharmaceutical agents (Santos and Martinez, 2012; Gagné *et al.*, 2004; Bombai *et al.*, 2001; Devaux *et al.*, 1998; Hebert and Luiker, 1996). DNA strand breaks have been successfully used on various aquatic organisms exposed to contamination either with bioassays (Liu *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2014; Nwani *et al.*, 2013; Santos and Martinez, 2012; Gagné *et al.*, 2011 and 1995) or *in situ* studies (Delphino Vieira *et al.*, 2014; Lacaze *et al.*, 2011; Maria *et al.*, 2006; Moraes de Andrade *et al.*, 2004; Flammarion *et al.*, 2002; Gagné *et al.*, 2002).

The aim of this study was to assess the possibility of predicting physiological impacts of SDPOM contaminants on two mobile top predator fish species exposed to MUC effluent using trophic exposure as determined by nitrogen stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$) signature in fish tissue. More specifically, $\delta^{15}\text{N}$ was measured in liver tissue of walleye (*Sander vitreus*) and sauger (*Sander canadensis*) collected in the St-Lawrence River, over 200 km including upstream and downstream areas of the MUC effluent outfall point. EROD activity and DNA strand breaks were also measured in liver tissue of both species representing defense and damage biomarkers in order to detect any physiological impacts induced by exposure to MUC effluent.

Methods

Study site

The St-Lawrence River has its freshwater source in the Great Lakes and before reaching the Atlantic Ocean, it flows through an estuary and Gulf with marine features. The freshwater portion of the river includes three fluvial lakes (from upstream to downstream: Lake Saint-François, Lake Saint-Louis and Lake Saint-Pierre) and a fluvial section with a mean flow rate of about 8450 m³/s. The St-Lawrence River is made up of five main different water masses, each with its own distinct natural physical and chemical characteristics. In order of importance, the water masses are: the clear green waters of the Great Lakes, the humic brown waters of the Ottawa River, mixed waters of the Ottawa River and of the north shore tributaries, mixed waters the Great Lakes and of the south shore tributaries and waters of the Quebec City region (Environment Canada, 2013).

Near Montreal, the Great Lakes and the Ottawa River respectively contribute an average of 80% and 16% of all inputs to the St-Lawrence River (Environment Canada, 2013). Lateral mixing in this section of the St-Lawrence is very slow. There is a narrow mixing zone between the Great Lakes and the Ottawa River water masses that persists at least to the mouth of Lake Saint-Pierre. The MUC effluent plume is discharged into the middle of this mixed water mass and seems to widen very gradually downstream (figure 1). As both Ottawa and St-Lawrence Rivers are regulated, and exhibit large daily, seasonal, and interannual variation in water levels, width and concentration of the plume can also experience some variations (Verrette, 1990).

Sampling

Walleye (*Sander vitreus*), sauger (*Sander canadensis*) and primary consumers (freshwater mussels (*Dreissena polymorpha* and *Elliptio complanata*) and gastropods (*Pleurocera acuta* and *Bithynia tentaculata*) were collected in the St-Lawrence river, upstream and downstream of the city of Montreal, Quebec, Canada, during the second

week of June and the third week of August 2009 (water temperature, 15°C-25°C). The area sampled covered almost 200 km extending approximately from the city of Beauharnois to the city of Nicolet (figure 2). The research vessel, *Lampsilis* from UQTR equipped with a trawl was used to sample 32 sites within which a total of 62 walleyes, 33 saugers and 47 primary consumers were caught. Length and weight of each fish were noted, and liver tissue was sampled and kept at -80°C for isotopic, EROD activity and DNA strand breaks analyses. Whole soft tissue of primary consumers was also sampled and kept at -80°C for isotopic analyses. Similar sized fish (mean total length \pm S.D.: walleyes = 302 mm \pm 5 and saugers = 324 mm \pm 30) were selected for isotope/biomarker analyses in order to reduce any size-related bias.

In vivo CYP induction

Animals

In order to determine basal and physiological limits of EROD activity as well as establish a quality control for EROD assays, walleye were purchased from Trois-Lacs fishfarm (Wotton, Qc, Canada) in July 2012. A total of 15 adult males (mean total length \pm S.D = 353 mm \pm 19) were held at 15°C in flow-through water outside tanks (volume: 8.5 m³) and fed live juvenile rainbow trout at a rate of 100 individuals every four days. All fish were held for two weeks before use (Smith *et al.*, 2012; Rees and Li, 2002). Feeding was suspended 48 h before treatment (Smith and Wilson, 2010).

Injections

Walleye were exposed to either 25, 50 and 100 mg kg⁻¹ body weight of β -Naphthoflavone (BNF, MP Biomedicals), a well known EROD activity inducer in fish (Smith and Wilson, 2010; Lemaire *et al.*, 1996), dissolved in corn oil (Doering *et al.*, 2012; Durieux *et al.*, 2012; Smith *et al.* 2012) and administered via i.p. injection, under anesthetic (80 mg/L ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (MS-222)). Injection volume did not exceed 10 μ L/g total body weight (Smith *et al.*, 2012). Some of the control fish were injected with corn oil carrier alone whereas others received no

injections (Smith *et al.*, 2012; Smith and Wilson, 2010; Al-Arabi and Goksøyr, 2002). Doses were established following the most commonly used (Durieux *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2012; Smith and Wilson, 2010; Al-Arabi and Goksøyr, 2002; Rees and Li, 2002; Goksøyr *et al.*, 1991). A unique subcutaneous elastomere injection was used to identify each dosage group (n = 3).

All fish were sacrificed 96-h post injection (Durieux *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2011) and livers were collected, frozen on dry ice and stored at -80°C until use.

Laboratory analyses

EROD activity

Liver samples were homogenized in 25 mM Hepes-NaOH buffer (pH 7.4), 140 mM NaCl, 0,1 mM dithiothreitol, 1 µg/mL aprotinin protease inhibitor. Homogenization was on ice using a Polytron homogenizer. Samples were centrifuged (15 000g, 20 min, 4°C) and the supernatants were recovered and stored at -80°C until use. Measurements were taken using microplates and the reaction mixture contained 50 µL supernatant, 36 µM 7-ethoxyresorufin and 45 µM NADPH in 25mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) with 0.01% Tween 20. The excitation and emission fluorescence wavelengths were set at 540 and 590nm, respectively. Measurements were made every 3 minutes during 1 hour (Bio-Tek, Synergy H4 Multi-Mode Reader). Total proteins were determined in duplicate using the method described by Bradford (1976) (Bio-Tek, Synergy H4 Multi-Mode Reader). EROD activity was expressed in pmol min⁻¹ mg⁻¹ protein (coefficient of variation (CV) did not exceed 6.2% for EROD activity and 6.7% for proteins respectively).

DNA damage

Levels of protein-free DNA strand breaks were determined by the alkaline DNA precipitation assay (Gagné and Blaise, 1995; Olive, 1988). Liver samples were homogenized on ice using polypropylen pestels in 20 mM Hepes-NaOH buffer (pH 7.5),

150 mM KCl. Liver tissue homogenate (25 μ L) was mixed with 200 μ L 2% SDS, 10 mM EDTA, 10 mM Tris base and 40 mM NaOH. After 1 minute incubation at room temperature, 200 μ L 0.12 M KCl was added and incubated at 60°C for 10 minutes. DNA associated with proteins was precipitated by cooling the mixture to 4°C for 30 minutes. The mixture was then centrifuged at 8000 g for 5 min (4°C). The excitation and emission fluorescence wavelengths were set at 360 and 460 nm, respectively. Assay measurements were made using microplates and the levels of DNA strand breaks in the supernatant were measured using Hoechst dye in the presence of 0.4 M NaCl, 4 mM sodium cholate and 0.1 M Tris base (pH 8.5), to reduce the possible interference of traces of SDS in the supernatant (Bester *et al.*, 1994) (Cary Eclipse Fluorometer). Total proteins were determined in duplicate using the method described by Bradford (1976) (Cary 100 UV-Vis). Results were expressed in μ g of protein-free DNA per mg protein. Samples were also run in duplicate (coefficient of variation (CV) did not exceed 8.5% for DNA strands and 8.6% for proteins respectively).

Isotopic analyses

Liver samples were dried at 60°C for at least 48 hours and ground into a homogenous powder. Isotopic analyses were performed at the University of New Brunswick (Finnigan Delta Plus mass spectrometer). Isotopic ratios were expressed following the standard equation:

$$\delta^{15}\text{N} = \left(\frac{{}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}_{\text{sample}}}{{}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}_{\text{standard}}} - 1 \right) * 1000$$

where isotopic ratios are expressed as the relative parts per thousand (‰) ratio between a sample and a known reference material, which, by convention, is atmospheric nitrogen (N_2). 4% of samples were run in duplicate (coefficient of variation (CV) did not exceed 4.8%).

Data analyses

Linear regressions were performed for individuals captured within the fluvial portion of the study area (from outfall point to a distance of about 50 km downstream) to determine the influence of either trophic link ($\delta^{15}\text{N}$) or distance (km) from the MUC outfall on both biomarkers (EROD activity and DNA strand breaks). A total of 44 individuals (20 saugers and 24 walleyes) were included in those analyses. Data for both biomarkers have been Log transformed in order to reduce heteroscedasticity.

Results and discussion

Stable isotope analyses

Our results show that for both fish species, average liver $\delta^{15}\text{N}$ values were systematically lower (approximately 3 to 8‰) at the effluent outfall point compared to all other sites, indicating a strong trophic connection to SDPOM from MUC outfall (figure 3). In fact, SDPOM, which is of terrestrial origin, typically presents a lower $\delta^{15}\text{N}$ than aquatic particulate organic matter (POM) due to the use of fertilizers made from atmospheric nitrogen which has very low $\delta^{15}\text{N}$ ($\approx 0\text{‰}$) (Michener and Lathja, 2007). At upstream sites, liver $\delta^{15}\text{N}$ varied from 13.0‰ to 14.5‰ for sauger (mean value: $13.6\text{‰} \pm 0.8$) and 12.9‰ to 15.8‰ for walleye (mean value: $14.4\text{‰} \pm 0.7$) respectively whereas $\delta^{15}\text{N}$ values dropped to $10.5\text{‰} \pm 1.8$ and $8.1\text{‰} \pm 0.8$ at the effluent outfall point (figure 3, table 1). A similar effect of SDPOM on $\delta^{15}\text{N}$ values has also been observed for other fish species and for other tissues exposed to MUC effluent in the same study area, where yellow perch (*Perca flavescens*), lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*), and silver redhorse (*Moxostoma anisurum*) show a systematic decrease in muscle, fin, and blood $\delta^{15}\text{N}$ (6 to 11‰) at the effluent site compared to other sites (Cabana *et al.*, in prep.). Presumably, a large drop in fish $\delta^{15}\text{N}$ at the effluent site reflects the assimilation of SDPOM present in the food web. The influence of SDPOM has also been shown for benthivorous fish (white sucker (*Catostomus commersoni*), johnny darter (*Etheostoma nigrum*), and spottail shiner (*Notropis hudsonius*)) where $\delta^{15}\text{N}$ values were 5.4‰ lower at sewage-exposed versus reference sites (de Bruyn *et al.*, 2003).

Interestingly, while young-of-the-year piscivorous fish (northern pike (*Esox lucius*) and walleye (*Sander vitreus*)), showed on average a 4.7‰ $\delta^{15}\text{N}$ decrease in sewage exposed sites compared to reference ones, no significant drop in $\delta^{15}\text{N}$ was observed for older fish (age-1+ and older) (de Bruyn *et al.*, 2003). The latter contrast with our results since both mature sauger and walleye in our study clearly show a marked $\delta^{15}\text{N}$ response to foodweb SDPOM at the effluent. This represents a first demonstration of a strong trophic connection to SDPOM at MUC outfall in mobile top-predator fish species from a large fluvial system such as the St-Lawrence River.

Most of the lowest $\delta^{15}\text{N}$ values for both species were observed in fish captured at the effluent outfall point (figure 3). Moreover, downstream of the outfall, lowest $\delta^{15}\text{N}$ values were observed for individuals caught in the effluent plume in comparison to individuals captured outside of the plume, except for a small group of 5 saugers. This suggests that fish captured in the plume are faithful to their food sources. Indeed, an increase in productivity has been observed at MUC sewage-enriched sites compared to reference sites where higher daily production was observed for: secondary production of macroinvertebrates (1.8 to 4.1 fold), and fish production based on either algivory-detrivory (1.3 to 4.4 fold), invertivory (1.7 to 10 fold), or piscivory (11 to 73 fold) (de Bruyn *et al.*, 2003). This abundant food source prevailing from the MUC outfall, could explain the attraction fish have to the plume and their motivation to remain and benefit from the extremely productive environment found there.

Our results also revealed a similar $\delta^{15}\text{N}$ pattern for primary consumers as for fish, where at upstream sites, $\delta^{15}\text{N}$ varies from 7.0 to 11.8‰ (mean value: 8.8‰ \pm 1.1) and drops to 1.1‰ \pm 0.7 at the effluent outfall point. These results are consistent with deBruyn and Rasmussen (2002) where, a noticeable drop of 6.7 and 6.8‰ in $\delta^{15}\text{N}$ values occurred for primary consumers (snails (*Bithynia tentaculata*) and zebra mussels (*Dreissena polymorpha*)) at the MUC effluent outfall. This drop concorded with that observed for particulate organic matter, since samples collected immediately upstream of the outfall point and about 1 km downstream had contrasting $\delta^{15}\text{N}$ values of +3.4 and -3.4‰ respectively.

For both fish and invertebrates, $\delta^{15}\text{N}$ values increase markedly after the outfall point, within the first 10 km and over a distance of almost 100 km, gradually returning close to values measured upstream (14.6, 12.4 and 7.4‰ for sauger, walleye and primary consumers, respectively) (figure 3, table 1). Immediately after the outfall point, as SDPOM is transported downstream, presumably it gradually disappears from the food web by either sedimentation and/or dilution. This is consistent with observed values of dissolved organic carbon (DOC), particulate organic carbon (POC) and suspended particulate matter (SPM) measured by Gagnon and Turcotte (2007) that returned close to those measured upstream MUC outfall within 8 km. Gagnon and Saulnier (2003) also showed that MUC effluent dilution would reach 90% within the first 10 km. Finally, de Bruyn *et al.*, (2003) also showed that such shifts in $\delta^{15}\text{N}$ of primary and secondary consumers connected to SDPOM occur mainly within the first 10 km downstream from the outfall. Our results clearly demonstrate the decreasing effects of SDPOM assimilation by both secondary and primary consumers as SDPOM from MUC is transported downstream over a large distance of almost 100 km.

As expected, both fish species (that are piscivorous) exhibit consistently higher $\delta^{15}\text{N}$ than primary consumers, reflecting the enrichment in $\delta^{15}\text{N}$ values of consumers relative to their food, (average enrichment of $3.4 \pm 1.1\%$ per trophic level) (Minagawa and Wada, 1984). Thus, consumer's $\delta^{15}\text{N}$ increases with its trophic level, which can be used to determine the number of trophic levels between the consumer itself and an organism located at the bottom of the foodweb (Post, 2002; Vander Zanden *et al.* 1997; Cabana and Rasmussen 1994). It is noteworthy that the decreased in $\delta^{15}\text{N}$ observed in primary consumers matches those of the fish species, suggesting that there is no loss of trophic level at the outfall point (figure 3). To support this observation, trophic level for both fish species was estimated at the outfall point as well as for mean upstream and downstream sites using the following equation (Cabana and Rasmussen, 1996):

$$\text{Trophic position}_{\text{consumer}} = ((\delta^{15}\text{N}_{\text{consumer}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{baseline}}) / 3,4) + 2$$

where $\delta^{15}\text{N}_{\text{consumer}}$ is the estimated trophic position for both fish species; $\delta^{15}\text{N}_{\text{baseline}}$ is the $\delta^{15}\text{N}$ value of primary consumers; 2 is the expected trophic position of primary

consumers; and 3,4 is the average enrichment in $\delta^{15}\text{N}$ values of consumers relative to their food ($3.4 \pm 1.1\%$ per trophic level) (Minagawa and Wada, 1984).

Results clearly show no decrease in trophic position at the outfall suggesting that the observed decrease in fish $\delta^{15}\text{N}$ is most likely associated with SDPOM incorporation into their usual prey (table 1).

Biomarkers and $\delta^{15}\text{N}$ values

Figure 4 presents the relationship between fish EROD activity and both $\delta^{15}\text{N}$ values (a), and the distance of the capture site from the outfall point (b). A clear negative relationship was found between EROD activity and $\delta^{15}\text{N}$ values ($R^2 = 0.34$), where the highest values of EROD activity were mostly associated with individuals having the lowest $\delta^{15}\text{N}$ values and vice versa (figure 4a). As previously mentioned, those fish with the lowest $\delta^{15}\text{N}$ were sampled at the CUM outfall, where they apparently feed on prey that are trophically linked to effluent SDPOM. These results suggest that EROD induction is related to the trophically-induced $\delta^{15}\text{N}$ signature reflecting exposure of fish to varying levels of SDPOM-associated contaminants from ingested prey. They also represent a first demonstration of concomitant changes occurring in $\delta^{15}\text{N}$ signature and in physiological EROD induction in individual fish over a 50 km study area over which the coupled $\delta^{15}\text{N}$ -EROD response to SDPOM from CUM is clearly evident.

Downstream of the effluent outfall point, no clear relationship was observed between EROD activity and the distance of capture site from the outfall point over a distance of 50 km (figure 4b). In fact, while EROD activity in fish is seemingly higher at the outfall point, it becomes quite variable as the distance from outfall point increases precluding any observable relationship with EROD activity. Gagné *et al.*, (2002) showed a marked difference of 1.5 to 2.5 fold-higher EROD activity in the digestive gland of caged mussels (*Elliptio complanata*) in a site close to outfall (5 km downstream of CUM effluent outfall point) compared to upstream reference site. While most fish captured at the effluent point probably fed there, it is likely that as the distance from the outfall point

increased, fish movement away from where they were feeding occurred, for example excursion outside the effluent plume, or upstream-downstream displacements. It follows that because of fish mobility in large species such as walleye and sauger, capture site does not necessarily represent where fish were feeding and EROD induction to SDPOM-associated contaminant levels in prey.

Table 2 presents the levels of liver EROD activity induced experimentally by i.p. β -Naphthoflavone injections in walleye. Comparatively, levels found in fish from the study area exceeded both lower and upper limits determined experimentally with BNF injections in walleye. EROD activity varied from 0.9 to 9.0 pmol resorufin min^{-1} mg prot. $^{-1}$ for walleye and from 0.4 to 9.9 pmol resorufin min^{-1} mg prot. $^{-1}$ for sauger (data not shown). The wide range of observed EROD activities in wild fish may be due to species-specific induction differences since when only wild walleye are considered, EROD values are closer to the experimentally-determined range. Whyte *et al.* (2000) proposes categorizing EROD induction based on levels relative to control ones. Contaminants that induce EROD activity in fish less than 10-fold above control levels are considered “weak” EROD inducers, 10 to 100-fold are “moderate” EROD inducers, and compounds that elicited greater than 100-fold induction over control fish are “strong” EROD inducers. If considering EROD activity variations observed in fish from our study area, we could consider EROD induction to be weak to moderate for walleye (10-fold) and moderate for sauger (25-fold).

Figure 5 presents the relationship between fish DNA strand breaks and both $\delta^{15}\text{N}$ values (a), and the distance of the capture site from the outfall point (b). Whereas no apparent relationship ($R^2 = 0.01$) was found between DNA strand breaks and $\delta^{15}\text{N}$ values for both fish species (figure 5a) distance of capture site from the effluent outfall is clearly important ($R^2 = 0.28$) (figure 5b). The latter result suggests that DNA integrity does not appear to be influenced by trophic exposure to SDPOM-associated contaminants as was the induction of EROD activity in walleye and sauger. The lack of coupling between levels of DNA strand breaks and $\delta^{15}\text{N}$ values in fish, suggest that exposure of fish to varying levels of SDPOM-associated contaminants from ingested prey

(trophic exposure pathway) is apparently insufficient to cause cellular DNA damage. Alternatively, direct exposure to waterborne contaminant levels (direct exposure pathway) might be more important in inducing DNA strand breaks in fish than trophic exposure. Indeed, at the MUC effluent discharge site, water contaminant levels are high with average concentrations of 1.34 ± 0.71 and 326 ± 229 ng L⁻¹ for PCBs and PAHs respectively making the CUM effluent the principal source of both PCBs and PAHs in the St-Lawrence river (Pham *et al.*, 1999). Following mixing with the surrounding river water, effluent plume concentrations decrease gradually downstream (figure 1). Furthermore, a significant increase in DNA breaks has been demonstrated for several fish species including turbot (Peters *et al.* 1997), rainbow trout (Inzunza *et al.* 2006) and flounder (Woo *et al.* 2006) exposed to waterborne PAHs and/or PCBs environmental pollutants. Common carp (*Cyprinus carpio*) directly downstream of an urban and industrial outfall also present high levels of DNA strand breaks when compared to fish collected further downstream (Rajaguru *et al.*, 2003). Together these observations are coherent with observed levels of DNA strand breaks in walleye and sauger where cellular damage presumably decreases as waterborne contaminants from MUC effluent are progressively diluted over the 50 km distance from the outfall point. Conversely in invertebrates, levels of DNA strand breaks did not change or were reduced in several tissues of caged mussels (*Elliptio complanata*) upon exposure to CUM effluent, during one year (Gagné *et al.* 2004) and 62 days (Gagné *et al.*, 2002). These contradictory results might implicate an inhibition of the DNA repair mechanism operating during chronic exposure of invertebrates to the MUC effluent and is likely not relevant in the present study given fish mobility.

Conclusion

An isotopic anomaly was observed for two fish species over a large study area of almost 200 km in the St-Lawrence River, which included areas both upstream and downstream of the major effluent outfall point of MUC. For both walleye and sauger, average liver $\delta^{15}\text{N}$ values were systematically lowest at the effluent outfall point and lower in the plume compared to all other sites indicating a strong trophic connection to

SDPOM originating from MUC outfall. These results suggest that fish readily feed at the outfall and plume given the extremely productive environment provided by SDPOM (de Bruyn *et al.*, 2003). A similar $\delta^{15}\text{N}$ pattern observed for primary consumers allowed to ascertain that firstly, trophic level loss was not what drives $\delta^{15}\text{N}$ depression in fish at the effluent outfall or elsewhere. Secondly, that SDPOM assimilation decreases similarly in invertebrates as in fish, as SDPOM from MUC is transported downstream over a large distance of almost 100 km. This study demonstrates that the St-Lawrence River foodweb from Beauharnois to Lake St-Pierre is largely influenced by SDPOM from MUC effluent despite the presence of other important SDPOM inputs, for example from the Outaouais urban community municipal effluent (via Ottawa River) and Longueuil and Laval municipal effluents (Environnement Canada, 2013). Moreover, that the incorporation of SDPOM in the St-Lawrence River foodweb is observed at the highest trophic level in adult, piscivorous, and mobile fish species.

Our study also shows for the first time that, nitrogen stable isotope ($\delta^{15}\text{N}$) signature in fish tissue can be used to predict EROD induction in large fish species that are mobile and are captured in locations other than where they feed. While fish EROD activities clearly varied in relation to $\delta^{15}\text{N}$ values, no relationship was evident with distance, from the outfall point over a distance of 50 km. EROD induction was highest in walleye and sauger having more negative $\delta^{15}\text{N}$ values reflecting exposure to varying levels of SDPOM-associated contaminants from ingested prey. Contrary to EROD, DNA integrity does not appear to be influenced by trophic exposure to SDPOM-associated contaminants in walleye and sauger, as no relationship between DNA strand breaks and $\delta^{15}\text{N}$ values was apparent. In fact, it would seem that trophic exposure is not sufficient to cause DNA damage. Direct exposure of walleye and sauger to waterborne contaminants from the effluent outfall over a distance of 50 km, is seemingly more important in inducing DNA cellular damage. Since biomarkers do not always react the same way in complex mixtures of pollutants (Flammarion *et al.*, 2002), our study reiterates the usefulness of using multiple biomarkers in ecotoxicological studies to assess effects on the physiology of organisms. In further studies, it would be interesting to use a multiple-tissue isotopic approach that would enable to distinguish long-term

from short-term trophic linkage to SDPOM, because of differences in tissue turnovers. A multiple-tissue isotopic approach could thus potentially greatly sharpen interpretation of biomarker-isotopic coupling as it would provide a better resolution of feeding history.

Aknowledgements

The authors are grateful to Pierre Magnan, Marc Mingelbier and all MFFP technicians and trainees as well as colleagues and collaborators of the 2009 Lampsilis mission. The authors also thank Chantale André and Kevin Jean for performing EROD activity and Marco A. Rodriguez for comments and suggestions on the manuscript. The contribution of Pisciculture de la Jacques-Cartier, Dany Bouchard, Alexandre East and Yannick Bergeron is also recognized. This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Groupe for Interuniversity Research in Limnology and Aquatic environment (GRIL) and by the UQTR fondation.

References

- Al-Arabia, S.A.M. and A. Goksøyr. 2002. Cytochrome P4501A responses in two tropical fish species, riverine catfish (*Rita rita*) and marine mudfish (*Apocryptes bato*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C.* 131: 61-71.
- Amiard, J.-C. and C. Amiard-Triquet. 2008. *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques.* Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 372 p.
- Bélanger, P. 2010. *Analyse écotoxicologique de l'effluent traité des eaux usées de la ville de Montréal. Essai présenté au Centre universitaire de formation en environnement en vue de l'obtention du grade de maître en environnement (M. Env.).* Centre universitaire de formation en environnement de l'université de Sherbrooke. 72 p.
- Bester, M.J., Potgieter, H.C. and W.J.H. Vermaak. 1994. Cholate and pH reduce interference by sodium dodecyl sulfate in the determination of DNA with Hoechst. *Analytical Biochemistry.* 223: 299-305.

- Bombail, V., Aw, D., Gordon, E. and J. Batty. 2001. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere*. 44: 383-92.
- Boudreau, P., Leclerc, M. and Y. Secretan. 2005. Révision des taux de dilution de l'effluent de l'Île-aux-Vaches dans le fleuve Saint-Laurent par simulation numérique. Étude réalisée dans le cadre du Réseau de Recherche en Écotoxicologie du Saint-Laurent en collaboration avec la ville de Montréal (Environnement). Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Québec, Rapport INRS-ÉTÉ #R-794, 34 p.
- Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*. 72: 248-254.
- Cabana, G., Paradis, Y., Glemet, H. and M. Mingelbier. In preparation. Measuring trophic linkage and duration of exposure of large mobile fish to municipal effluents using N isotopes.
- Cabana, G. and J.B. Rasmussen. 1994. Modelling food chain structure and contaminant bioaccumulation using stable nitrogen isotopes. *Nature*. 372: 255-257.
- Cabana, G. and J.B. Rasmussen. 1996. Comparison of aquatic food chain using nitrogen isotopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 10844-10847.
- Chambers, P.A., Allard, M., Walker, S.L., Marsalek, J., Lawrence, J., Servos, M., Busnarda, J., Munger, K.S., Jefferson, C., Kent, R.A., Wong, M.P. and K. Adare. 1997. Impacts of municipal wastewater effluents on Canadian waters: a review. *Water Quality Research Journal of Canada*. 32: 659-713.
- Costello, M.J. and P. Read. 1994. Toxicity of sewage sludge to marine organisms: a review. *Marine Environmental Research*. 37: 23-46.
- deBruyn, A.M.H., Marcogliese, D.J. and J.B. Rasmussen. 2003. The role of sewage in a large river food web. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 60: 1332-1344.
- deBruyn, A.M.H. and J.B. Rasmussen. 2002. Quantifying assimilation of sewage-derived organic matter by riverine benthos. *Ecological Applications*. 12(2): 511-520.

- de Lafontaine Y., Gagné, F., Blaise, C. Costan, G., Gagnon, P. and H.M. Chan. 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology*. 50(2000): 51-71.
- Delphino Vieira, E.D., da Silva Almeida, M., Galindo, B.A., Pereira, L. and C. Bueno dos Reis Martinez. 2014. Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. *Neotropical Ichthyology*. 12(1): 153-164.
- Deschamps, G., Leveau, T. and P.J. Cejka. 1998. Évolution des contaminants toxiques dans les eaux usées à la station d'épuration de la Communauté urbaine de Montréal en 1995 et 1996. Communauté urbaine de Montréal, Service de l'environnement, Réseau de Suivi écologique. Final Report. RSÉ 98-01.
- Devaux, A., Flammarion, P., Bernardon, V., Garric, J. and G. Monod. 1998. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Marine Environmental Research*. 46: 257-262.
- Dévier, M.-H., Le Dû-Lacoste, M., Akcha, F., Morin, B., Peluhet, L., Le Menach, K., Burgeot, T. and H. Budzinski. 2013. Biliary PAH metabolites, EROD activity and DNA damage in dab (*Limanda limanda*) from Seine Estuary (France). *Environmental Science and Pollution Research*. 20: 708-722.
- Doering, J.A., Wiseman, S., Beitel, S.C., Tandler, B.J., Giesy, J.P. and M. Hecker. 2012. Tissue specificity of aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediated responses and relative sensitivity of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to an AhR agonist. *Aquatic Toxicology*. 114: 125-133.
- Durieux, E.D.H., Connon, R.E., Werner, I., D'Abronzio, L.S., Fitzgerald, P.S., Spearow, J.L. and D.J. Ostrach. 2012. Cytochrome P4501A mRNA and protein induction in striped bass (*Morone saxatilis*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 38: 1107-1116.
- Environnement Canada. 2013. Hydrography of the St. Lawrence River [Online]. <http://www.ec.gc.ca/stl/default.asp?lang=En&n=59C4915D-1> (Page visited on november 22th 2014)
- Flammarion, P., Devaux, A., Nehls, S., Migeon, B., Noury, P. and J. Garric. 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 51: 145-53.

- Gagné, F., André, C., Cejka, P. Hausler, R. and M. Fournier. 2011. Alterations in DNA metabolism in *Elliptio complanata* mussels after exposure to municipal effluents. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C.* 154: 100-107.
- Gagné, F. and C. Blaise. 1995. Genotoxicity of environmental contaminants in sediments to rainbow trout hepatocytes. *Environmental Toxicology and Water Quality.* 10: 217-229.
- Gagné, F., Blaise, C., Aoyama, I., Luo, R., Gagnon, C., Couillard, Y., Campbell, P. and M. Salazar. 2002. Biomarker Study of a Municipal Effluent Dispersion Plume in Two Species of Freshwater Mussels. *Environmental Toxicology.* 17: 149-159.
- Gagné, F., Blaise, C. and J. Hellou. 2004. Endocrine disruption and health effects of caged mussels, *Elliptio complanata*, placed downstream from a primary-treated municipal plume for 1 year. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. Toxicology and Pharmacology.* 138: 33-44.
- Gagnon, C. and I. Saulnier. 2003. Distribution and fate of metals in the dispersion plume of a major municipal effluent. *Environmental Pollution.* 124: 47-55.
- Gagnon, C. and P. Turcotte. 2007. Rôle des colloïdes dans la spéciation physique des métaux dans un panache majeur de dispersion d'eaux usées municipales. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science.* 20(3): 275-285.
- Gobas, F.A.P.C., Wilcockson, J.B., Russel, R.W. and G.D. Haffner. 1999. Mechanism of biomagnification in fish under laboratory and field conditions. *Environmental Science and Technology.* 33: 133-141.
- Goksøyr, A., Andersson, T., Buhler, D.R., Stegeman, J.J., Williams, D.E. and L. Forlin. 1991. Immunochemical cross-reactivity of i-naphthoflavone-inducible cytochrome P450 (P4501A) in liver microsomes from different fish species and rat. *Fish Physiology and Biochemistry.* 9(1): 1-13.
- Hebert, P.D. and M.M., Luiker 1996. Genetic effects of contaminant exposure towards an assessment of impacts on animal populations. *The Science of the Total Environment.* 191: 23-58.
- Inzunza, B., Orrego, R., Penalosa, M., Gavilan, J.F. and R. Barra. 2006. Analysis of CYP4501A1, PAHs metabolites in bile, and genotoxic damage in *Oncorhynchus mykiss* exposed to Biobío River sediments, Central Chile. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 65: 242-251.

- Jeffries, K.M., Jackson, L.J., Peters, L.E. and K.R. Munkittrick. 2008. Changes in population, growth, and physiological indices of longnose dace (*Rhinichthys cataractae*) in the Red Deer River, Alberta, Canada. *Archives of environmental contaminant and toxicology*. 55(4): 639-651.
- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A. and O. Geffard. 2011. DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: a tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environmental Pollution*. 159: 1682-1691.
- Lagadic, L. 2002. Biomarkers: useful tools for the monitoring of aquatic environments. *Revue de médecine vétérinaire*. 153(8-9): 581-588.
- Lemaire, R.F., Forlin, L., and D.R. Livingstone. 1996. Responses of hepatic biotransformation and antioxidant enzymes to CYP1A inducers (3-methylcholanthrene, β -naphthoflavone) in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), dab (*Limanda limanda*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. 36: 141-160.
- Liu, J., Lu, G., Wu, D. and Z. Yan. 2014. A multi-biomarker assessment of single and combined effects of norfloxacin and sulfamethoxazole on male goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 102: 12-17.
- Loizeau, V., Abarnou, A., Cugier, P., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, A.-M. and A. Menesguen. 2001. A Model of et Bioaccumulation in the Sea Bass Food Web from the Seine Estuary (Eastern English Channel). *Marine Pollution Bulletin*. 43(7-12): 242-255.
- Maria, V.L., Pacheco, M. and M.A. Santos. 2006. *Anguilla anguilla* L. Genotoxic responses after in situ exposure to freshwater wetland (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Environment International*. 32: 510-515.
- McArdle, M., Elskus, A., McElroy, A., Larsen, B., Benson, W. and D. Schlenk. 2000. Estrogenic and CYP1A response of mummichogs and sunshine bass to sewage effluent. *Marine Environmental Research*. 50: 175-179.
- Michener, R. and K. Lathja. 2007. *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Edited by Robert Michener and Kate Lathja. – 2nd ed., 566 p.
- Minagawa, M., and E. Wada. 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains. Further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 48: 1135-1140.

- Moraes de Andrade, V., da Silva, J., da Silva, F.R., Heuser, V.D., Dias, J.F., Yoneama, M.L. and T.R.O. de Freitas. 2004. Fish as Bioindicators to Assess the Effects of Pollution in Two Southern Brazilian Rivers Using the Comet Assay and Micronucleus Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 44: 459-468.
- Nwani, C.D., Nagpur, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B. and W.S. Lakra. 2013. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. *Environmental toxicology and pharmacology*. 36: 539-547.
- Olive, P.L., 1988. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 11: 487-495.
- Persic, A. 2004. Modalités de contamination par les polluants organiques persistants des réseaux trophiques lagunaires. Application de la méthode des isotopes stables. Thèse présentée pour obtenir le Grade de Docteur en Sciences de l'Université Paris XI Orsay. Spécialité : Science de la Vie. 206 p. et annexes.
- Peters, L.D., Morse, H.R., Waters, R. and D.R. Livingstone. 1997. Responses of hepatic cytochrome P450 1A and formation of DNA-adducts in juveniles of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Aquatic Toxicology*. 38: 67-82.
- Pham, T.T., Proulx, S., Brochu, C. and S. Moore. 1999. Composition of PCBs and PAHs in the Montreal Urban Community wastewater and in the surface water of the St. Lawrence river (Canada). *Water, Air, and Soil Pollution*. 111: 251-270.
- Post, D.M. 2002. Using stable isotopes to estimate trophic positions: Models, methods, and assumptions. *Ecology*. 83: 703-718.
- Rajaguru, P., Suba, S., Palanivel, M. and K. Kalaiselvi. 2003. Genotoxicity of a Polluted River System Measured Using the Alkaline Comet Assay on Fish and Earthworm Tissues. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 41: 85-91.
- Rees, C.B. and W. Li. 2002. Development and application of a real-time quantitative PCR assay for determining CYP1A transcripts in three genera of salmonids. *Aquatic Toxicology*. 66: 357-368.
- Santos, R., Palos-Ladeiro, M., Besnard, A., Vulliet, E., Porcher, J.M., Bony, S., Devaux, A. and W. Sanchez. 2014. Kinetic response of a genotoxicity biomarker in the three-spined stickleback and implication for environmental monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 102: 6-11.

- Santos, T.G. and C.B.R. Martinez. 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*. 89: 1118-1125
- Shugart, L.R. 2000. DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology*. 9: 329-340.
- Smith, E.M., Iftikar, F.I., Higgins, S., Irshad, A., Jandoc, R., Lee, M. and J.Y. Wilson. 2012. *In vitro* inhibition of cytochrome P450-mediated reactions by gemfibrozil, erythromycin, ciprofloxacin and fluoxetine in fish liver microsomes. *Aquatic Toxicology*. 109: 259-266.
- Smith, E.M. and J.Y. Wilson. 2010. Assessment of cytochrome P450 fluorometric substrates with rainbow trout and killifish exposed to dexamethasone, pregnenolone-16 α -carbonitrile, rifampicin, and β -naphthoflavone. *Aquatic Toxicology*. 97: 324-333.
- Soimasuo M.R., Karels A.E., Leppanen H., Santti R., and A.O.J. Oikari. 1998. Biomarker responses in whitefish (*Coregonus lavaretus* L. s.l.) experimentally exposed in a large lake receiving effluents from pulp and paper industry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 34: 69-80.
- Stegeman J.J. and M.E. Hahn. 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins D.C. and Ostrander G.K. (Eds.) *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 87-206.
- Tucker, J., Sheats, N., Giblin, A.E., Hopkinson, C.S. and J.P. Montoya. 1999. Using stable isotopes to trace sewage-derived material through Boston Harbor and Massachusetts Bay. *Marine Environmental Research*. 48: 353-375.
- Van der Oost, R., Goksoyr, A., Celander, M., Heida, H. and N.P.E Vermeulen. 1996. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Toxicology*. 36: 189-222.
- Vander Zanden, M.J., Cabana, G. and J.B. Rasmussen. 1997. Comparing trophic position of freshwater fish calculated using stable nitrogen isotope ratios ($\delta^{15}\text{N}$) and literature dietary data. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 54: 1142-1158.

- Verrette, J.L. 1990. Délimitation des principales masses d'eau du St-Laurent (Beauharnois à Québec). Final Report. Les Consultants Hydriques for Environment Canada, Conservation and Protection, Quebec Region, St. Lawrence Centre, Montreal, Quebec, Canada.
- Ville de Montréal. 2012. Le portail officiel de la ville de Montréal [Online]. http://ville.montreal.qc.ca/portal/page?_pageid=6497,54345571&_dad=portal&_schema=PORTAL (Page visited on november 20th 2014)
- Vindimian, E. 2001. La surveillance biologique des impacts toxiques dans l'environnement. Cellular and Molecular Biology. 47 (Supplément): 67-79.
- Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J. and D.E. Tillitt. 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure. Critical Reviews in Toxicology. 30(4): 347-570.
- Woo, S., Kim, S., Yum, S., Yim, U.H. and T.K. Lee. 2006. Comet assay for the detection of genotoxicity in blood cells of flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to sediments and polycyclic aromatic hydrocarbons. Marine Pollution Bulletin. 52: 1768-1775.

Tables

Table 1. Fish and primary consumer $\delta^{15}\text{N}$ values (mean \pm SD) and trophic level estimates for sauger and walleye for upstream and downstream sites, and outfall point.

	<i>Upstream sites</i>	<i>Outfall point</i>	<i>Downstream sites</i>
	<i>$\delta^{15}\text{N}$ (‰)</i>		
Primary consumers	8.8 \pm 1.1	1.1 \pm 0.7	7.4 \pm 1.6
Sauger	13.6 \pm 0.8	10.5 \pm 1.8	14.6 \pm 2.2
Walleye	14.4 \pm 0.7	8.1 \pm 0.8	12.4 \pm 1.5
	<i>Trophic level</i>		
Sauger	3.4	4.8	4.1
Walleye	3.7	4.1	3.5

Table 2. Liver EROD activity (mean \pm SD) of walleye exposed experimentally to various BNF doses. Dose 0* refers to non-injected while 0** refers to fish that were injected with corn oil carrier alone. For each dose, n = 3.

Dose BNF (mg/kg)	EROD (pmol resorufin min ⁻¹ mg prot ⁻¹)	Log transformed EROD activity
0*	2.3 \pm 0.5	0.4
0**	1.4 \pm 0.2	0.1
25	4.4 \pm 1.1	0.6
50	5.4 \pm 3.6	0.7
100	6.2 \pm 2.3	0.8

Figure captions

Figure 1. Location of the MUC effluent outfall and plume dispersion into the St-Lawrence River as determined by numerical simulation (Boudreau, 2005).

Figure 2. Study area and location of sampling sites for walleye (yellow circles) and sauger (black circles) in the St-Lawrence River during summer 2009.

Figure 3. Variation of $\delta^{15}\text{N}$ measured in liver tissue of walleye and sauger and whole soft tissue of primary consumers (freshwater mussels and gastropods) along study area (mean per site \pm SD). Distance zero represents the CUM effluent outfall point whereas negative and positive distances are located respectively upstream and downstream the outfall. Large circles indicate individuals captured within the effluent plume.

Figure 4. Individual EROD activity (log transformed) as a function of $\delta^{15}\text{N}$ in liver tissue (a) and as a function of distance from the effluent outfall point (b) measured in liver tissue of walleye and sauger caught at the outfall and downstream, in the fluvial portion of the study area (approximately 50 km). Large circles and crosses indicate individuals captured within the effluent plume and at the effluent outfall point respectively.

Figure 5. Individual DNA strand breaks (log transformed) as a function of $\delta^{15}\text{N}$ in liver tissue (a) and as a function of distance from the effluent outfall point (b) measured in liver tissue of walleye and sauger caught at the outfall and downstream, in the fluvial portion of the study area (approximately 50 km). Large circles and crosses indicate individuals captured within the effluent plume and at the effluent outfall point respectively.

Figures

Figure 1

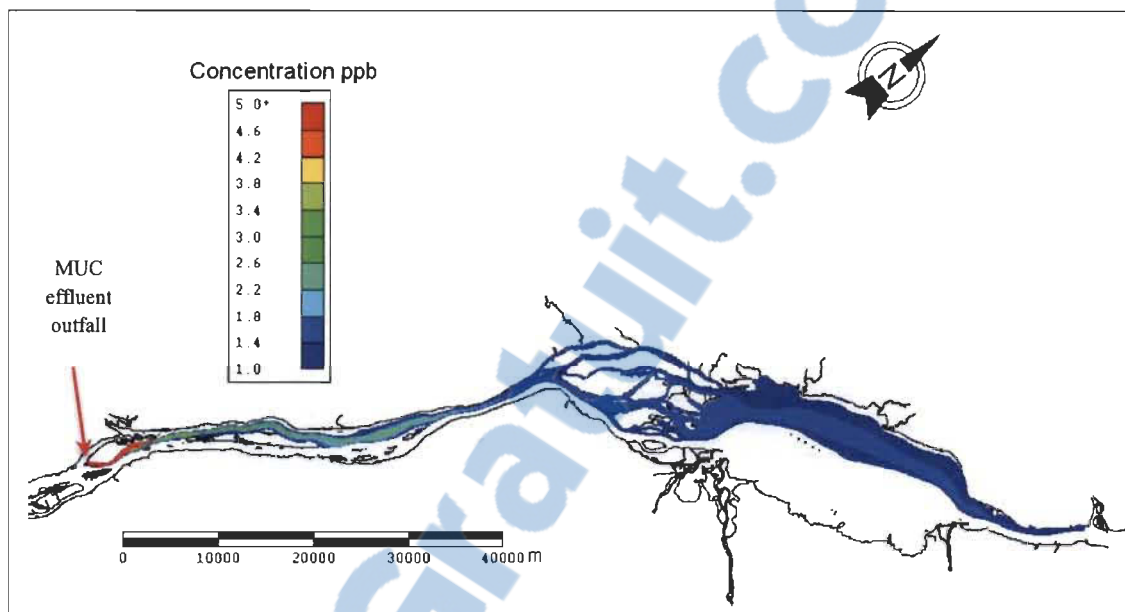


Figure 2

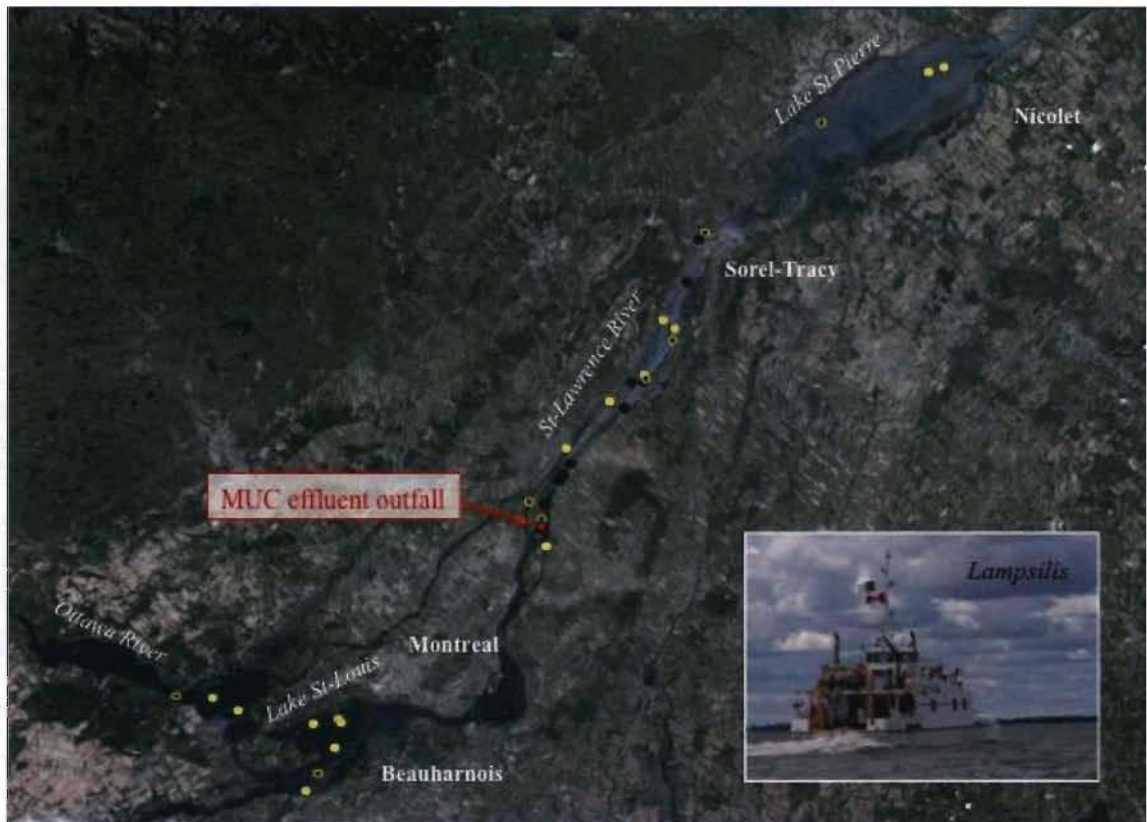


Figure 3

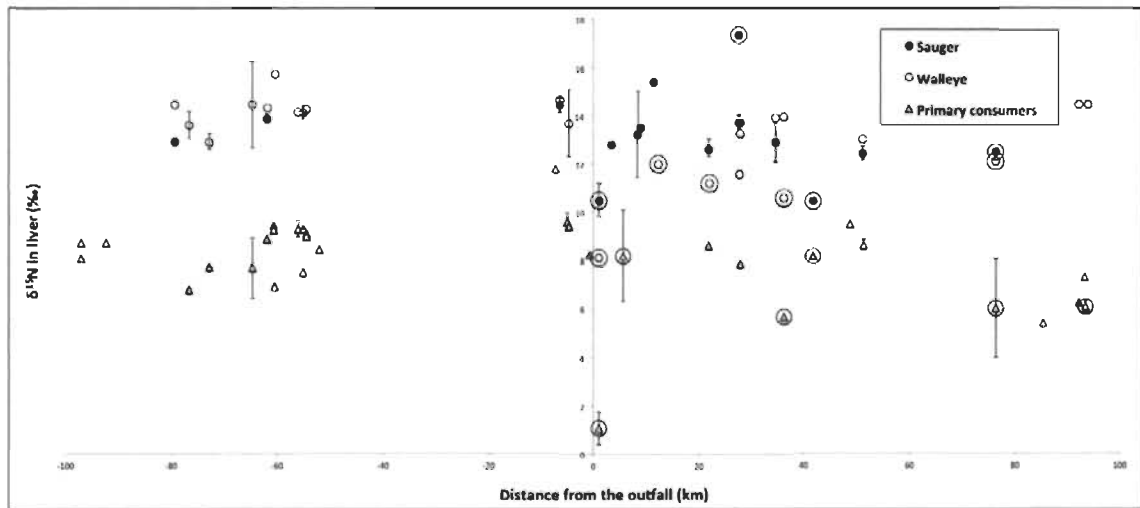
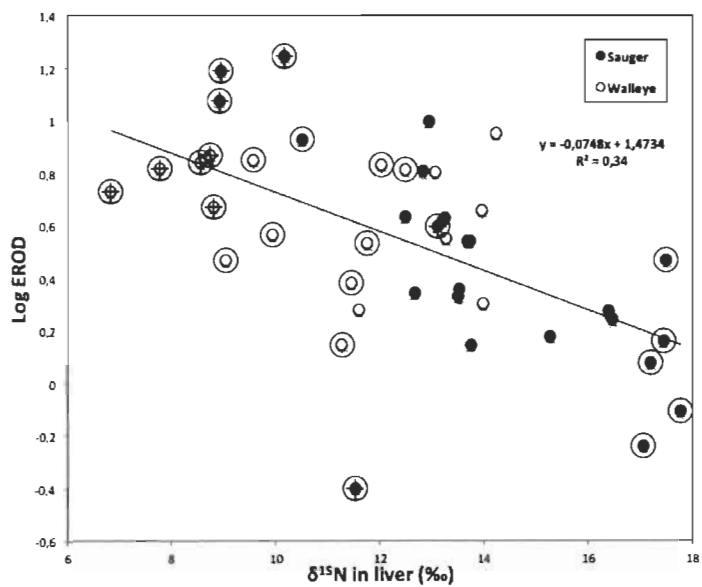


Figure 4

a)



b)

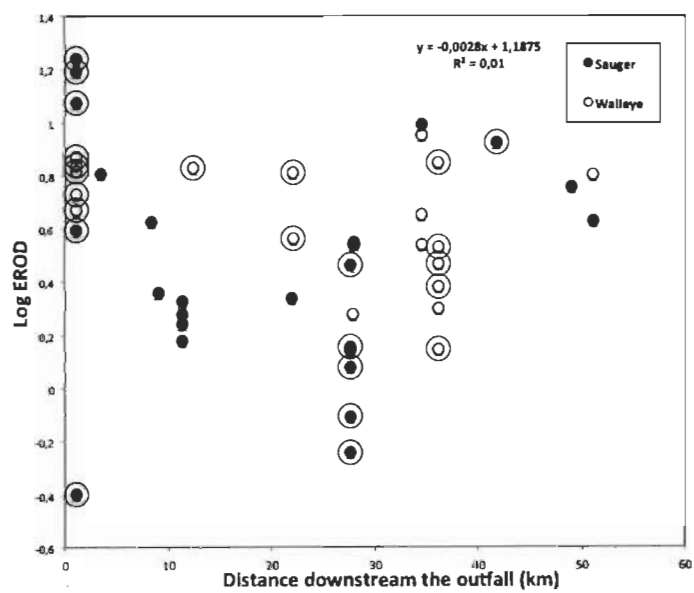
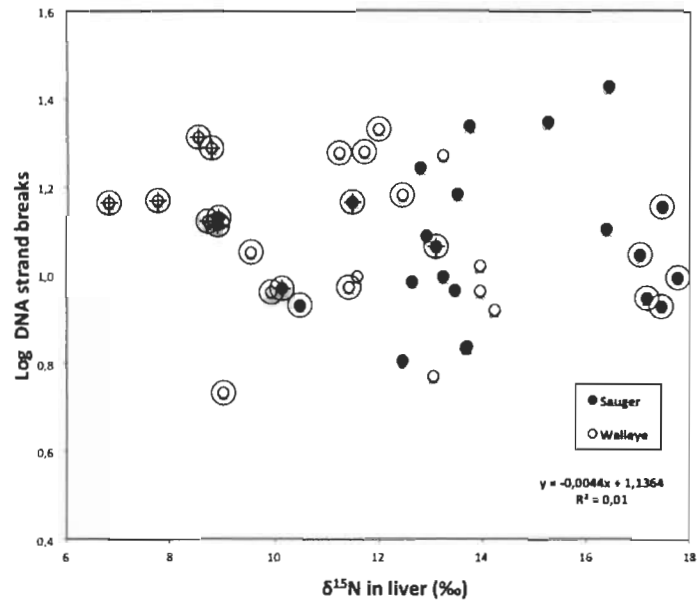
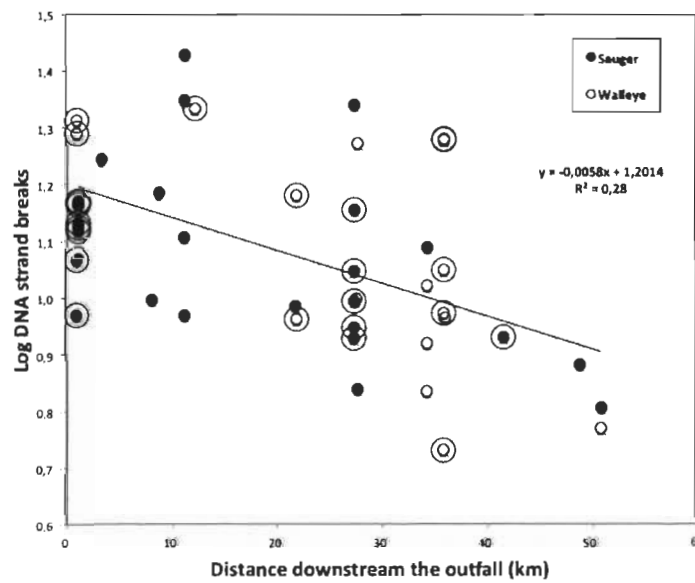


Figure 5

a)



b)



CHAPITRE III

CONCLUSION GÉNÉRALE

3.1 Principaux résultats

L'objectif de cette étude était d'évaluer la possibilité de tracer des impacts physiologiques chez deux espèces de poissons mobiles et piscivores exposées à l'effluent de la station d'épuration de la CUM à l'aide de l'exposition trophique telle que déterminée par la signature isotopique de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) des tissus des poissons. Pour ce faire, le $\delta^{15}\text{N}$ a été mesuré dans le foie de dorés jaunes (*Sander vitreus*) et de dorés noirs (*Sander canadensis*) capturés dans le fleuve Saint-Laurent, sur un tronçon d'environ 200 km, incluant le point de rejet de la CUM, de même des sites situés en amont et en aval de ce dernier. Chez ces mêmes individus, l'activité EROD et les cassures des brins d'ADN ont été mesurées comme biomarqueurs de défense et de dommages respectivement, afin de témoigner des impacts physiologiques induits par l'exposition à l'effluent de la CUM.

3.1.1 Analyses isotopiques

Une anomalie isotopique clairement reliée à l'effluent de la CUM a été démontrée chez le doré jaune et le doré noir, et ce, à grande échelle spatiale sur le fleuve Saint-Laurent (200 km). En effet, nos résultats ont démontré que chez chacune des deux espèces cibles, les valeurs moyennes de $\delta^{15}\text{N}$ mesurées dans le foie étaient systématiquement plus faibles à l'effluent qu'à tous les autres sites (approximativement 3 à 8 ‰), indiquant un fort lien trophique avec la matière organique particulaire provenant des égouts (MOPPE) de la CUM. Ceci s'explique par le fait que la MOPPE, qui est d'origine terrestre, présente typiquement un $\delta^{15}\text{N}$ plus faible que la matière organique particulaire autochtone au milieu aquatique dû à l'usage d'engrais synthétisés

à base d'azote atmosphérique présentant un $\delta^{15}\text{N}$ très faible ($\approx 0\text{‰}$) (Michener et Lathja, 2007).

De plus, en aval du point de rejet de l'effluent, les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ les plus faibles ont été mesurées chez les poissons capturés à l'intérieur du panache de l'effluent comparativement aux individus capturés à l'extérieur de celui-ci (exception faite d'un petit groupe de 5 dorés noirs). Ces résultats suggèrent que les poissons capturés à l'intérieur du panache sont fidèles à leur source de nourriture. L'enrichissement provenant de l'effluent de la CUM et entraînant une augmentation générale de la production de biomasse animale à l'intérieur du panache de dispersion (Bruyn *et al.*, 2003) pourrait expliquer l'attraction des poissons pour le panache et leur motivation à y demeurer pour s'y alimenter.

Nos résultats ont également révélé un patron similaire chez les consommateurs primaires (moules et gastéropodes) avec une baisse marquée des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ à l'effluent de l'ordre de 6 à 11 ‰. Ces résultats sont cohérents avec les valeurs contrastantes de $\delta^{15}\text{N}$ mesurées sur des échantillons de matière organique particulaire prélevée immédiatement en amont du point de rejet de l'effluent de la CUM (+ 3,4 ‰) et sur des échantillons de MOPPE prélevés 1 km en aval (-3,4 ‰) (deBruyn et Rasmussen, 2002).

En aval du point de rejet de l'effluent, autant chez les poissons que chez les consommateurs primaires, les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ ont montré une augmentation marquée à l'intérieur des premiers 10 km pour atteindre progressivement, des valeurs similaires aux valeurs mesurées en amont. À partir du point de rejet de l'effluent, à mesure que la MOPPE est transportée vers l'aval, elle semble graduellement disparaître du réseau trophique probablement dû aux phénomènes combinés de déposition et de dilution. Gagnon et Turcotte (2007) ont d'ailleurs démontré que les valeurs élevées de carbone organique dissout, de carbone organique particulaire et de matières en suspension mesurées dans le panache de l'effluent revenaient à des valeurs similaires à celles mesurées en amont à l'intérieur des premiers 8 km en aval du point de rejet de la CUM.

Par ailleurs, le pourcentage de dilution du panache de l'effluent atteindrait 90 % à 10 km en aval du point de rejet (Gagnon et Saulnier, 2003). Nos résultats ont clairement démontré l'effet décroissant chez les poissons et les invertébrés de l'assimilation de la MOPPE provenant de l'effluent de la CUM, et ce sur une distance d'environ 100 km vers l'aval.

Tel qu'attendu, les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ mesurées chez le doré jaune et le doré noir (des espèces de poissons piscivores) étaient constamment plus élevées que celles mesurées chez les consommateurs primaires, reflétant l'enrichissement en isotope lourd du consommateur par rapport à sa proie (enrichissement moyen de $3,4 \pm 1,1$ ‰ par niveau trophique) (Minagawa et Wada, 1984). Cet enrichissement d'un niveau trophique au niveau trophique supérieur permet de déterminer le nombre de niveaux trophiques entre un consommateur et un organisme situé à la base du réseau trophique (Post, 2002; Vander Zanden *et al.* 1997; Cabana et Rasmussen, 1994). Il est intéressant de souligner que la baisse marquée des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ observée chez les consommateurs primaires suivait celle observée chez les poissons, suggérant qu'aucune perte de niveau trophique n'a lieu au site de l'effluent. Afin de confirmer ces observations, le niveau trophique des deux espèces de doré a été déterminé à l'aide de la formule suivante (Cabana et Rasmussen, 1996) :

$$\text{Position trophique}_{\text{poisson}} = ((\delta^{15}\text{N}_{\text{poisson}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{consommateur primaire}}) / 3,4) + 2$$

Où 2 représente le niveau trophique des consommateurs primaires et 3,4 l'enrichissement moyen par niveau trophique (Minagawa and Wada, 1984).

Les résultats ont clairement démontré que la baisse des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ observée chez les poissons au site de rejet de l'effluent de la CUM n'est pas attribuable à une perte de niveau trophique, mais plutôt à l'incorporation de la MOPPE dans le réseau trophique du fleuve Saint-Laurent.

Globalement, nos résultats suggèrent fortement que malgré la présence d'autres sources de MOPPE telles que l'effluent de la communauté urbaine des Outaouais (via la

rivière des Outaouais) de même que les effluents municipaux des villes de Laval et de Longueuil (Environnement Canada, 2013), l'effluent de la CUM est de loin la plus importante source de MOPPE intégrant le réseau trophique du fleuve Saint-Laurent entre la municipalité de Beauharnois et le lac Saint-Pierre. Il s'agit d'une première démonstration d'un lien trophique important entre la MOPPE provenant de l'effluent de la CUM et deux espèces de poissons mobiles et piscivores du fleuve Saint-Laurent.

3.1.2 Lien entre les biomarqueurs et les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$

Nos résultats ont démontré une relation négative claire entre l'activité EROD et les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ ($R^2 = 0,34$). Comme mentionné précédemment, les poissons présentant les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ les plus faibles ont été capturés au site de l'effluent de la CUM où ils s'alimentent de proies trophiquement liées à la MOPPE. Ces résultats suggèrent que l'induction de l'activité EROD reflète l'exposition trophique des poissons à différents niveaux de contaminants associés à la MOPPE. Toutefois, aucune relation n'a pu être établie entre l'activité EROD et la distance du site de capture du poisson par rapport au point de rejet de l'effluent sur une distance de 50 km vers aval. En effet, alors que l'activité EROD mesurée chez les poissons capturés à l'effluent est généralement élevée, les valeurs deviennent très variables vers l'aval. Ces observations suggèrent qu'en raison de la mobilité des grandes espèces de poissons telles que les dorés, les sites de capture des individus ne soient pas nécessairement représentatifs des sites d'alimentation et conséquemment des niveaux d'activité EROD tels qu'induits par l'ingestion de proies trophiquement liées à la MOPPE. Ces résultats constituent une première démonstration d'un lien évident entre l'exposition trophique à la MOPPE de la CUM ($\delta^{15}\text{N}$) et l'activité EROD induite chez deux espèces de poissons mobiles et piscivores sur un tronçon de 50 km du fleuve Saint-Laurent.

Contrairement aux résultats obtenus pour l'activité EROD, aucune relation n'a pu être établie entre les niveaux de cassures des brins d'ADN et les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ pour les deux espèces de poissons. Toutefois, on observe une relation importante entre les cassures des brins d'ADN et la distance du site de capture par rapport au point de rejet

de l'effluent ($R^2 = 0,28$). Le maintien de l'intégrité de l'ADN ne semble donc pas être affecté par l'exposition trophique des deux espèces de doré aux contaminants associés à la MOPPE. Il apparaît plutôt que la contamination provenant de l'exposition directe soit plus importante que celle de l'exposition trophique dans l'induction de cassures des brins d'ADN. En effet, les niveaux de contamination de l'eau au site de rejet de l'effluent de la CUM sont importants, avec des concentrations moyennes de l'ordre de $1,34 \pm 0,71$ et 326 ± 229 ng L⁻¹ pour les BPCs et les HAPs respectivement, lesquelles concentrations s'abaissent graduellement suivant le mélange avec les eaux réceptrices (Pham *et al.*, 1999). Ces observations sont cohérentes avec les niveaux de cassures des brins d'ADN mesurés chez les deux espèces de doré alors que les niveaux de cassures des brins d'ADN décroissent avec la distance par rapport au point de rejet de l'effluent et probablement aussi en fonction de la baisse des concentrations de contaminants du panache de l'effluent sur une distance de 50 km.

En conclusion, cette étude constitue une première démonstration que le réseau trophique du fleuve Saint-Laurent, entre Beauharnois et le lac Saint-Pierre, est largement influencé par la MOPPE provenant de l'effluent de la CUM, et ce, à l'apex du réseau trophique, chez des individus adultes de deux espèces de poissons mobiles et piscivores. Également, nos résultats ont démontré pour la première fois qu'il est possible de tracer les effets physiologiques de l'exposition trophique aux contaminants, chez des espèces de poissons mobiles et piscivores à l'aide de la signature isotopique de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$).

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

3.2 Références

- Cabana, G. et J.B. Rasmussen. 1994. Modelling food chain structure and contaminant bioaccumulation using stable nitrogen isotopes. *Nature*. 372: 255-257.
- Cabana, G. et J.B. Rasmussen. 1996. Comparison of aquatic food chain using nitrogen isotopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 10844-10847.
- deBruyn, A.M.H., Marcogliese, D.J. et J.B. Rasmussen. 2003. The role of sewage in a large river food web. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 60: 1332-1344.

- deBruyn, A.M.H. et J.B. Rasmussen. 2002. Quantifying assimilation of sewage-derived organic matter by riverine benthos. *Ecological Applications*. 12(2): 511-520.
- Environnement Canada. 2013. Hydrography of the St. Lawrence River [Online]. <http://www.ec.gc.ca/stl/default.asp?lang=En&n=59C4915D-1> (Page visited on november 22th 2014)
- Flammarion, P., Devaux, A., Nehls, S., Migeon, B., Noury, P. et J. Garric. 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 51: 145-53.
- Gagnon, C. et I. Saulnier. 2003. Distribution and fate of metals in the dispersion plume of a major municipal effluent. *Environmental Pollution*. 124: 47-55.
- Gagnon, C. et P. Turcotte. 2007. Rôle des colloïdes dans la spéciation physique des métaux dans un panache majeur de dispersion d'eaux usées municipales. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*. 20(3): 275-285.
- Michener, R. et K., Lathja. 2007. *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Edited by Robert Michener and Kate Lathja. – 2nd ed., 566 p.
- Minagawa, M., et E. Wada. 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains. Further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 48: 1135-1140.
- Pham, T.T., Proulx, S., Brochu, C. et S. Moore. 1999. Composition of PCBs and PAHs in the Montreal Urban Community wastewater and in the surface water of the St. Lawrence river (Canada). *Water, Air, and Soil Pollution*. 111: 251-270.
- Post, D.M. 2002. Using stable isotopes to estimate trophic positions: Models, methods, and assumptions. *Ecology*. 83: 703-718.
- Vander Zanden, M.J., Cabana, G. et J.B. Rasmussen. 1997. Comparing trophic position of freshwater fish calculated using stable nitrogen isotope ratios ($\delta^{15}\text{N}$) and literature dietary data. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 54: 1142-1158.