Projet national d'investigation sur les causes – Cycle 4

Rapport final

Février 2007

Tibor Kovacs[1], Mark Hewitt[2], Deborah MacLatchy[3], Pierre Martel[1], Mark McMaster[2], Joanne Parrott[2], Glen Van Der Kraak[4] et Michael R. van den Heuvel[5]

[1] Institut canadien de recherches sur les pâtes et papiers, Pointe-Claire (QC), Canada
[2] Division de recherches de la protection de l'écosystème aquatique, Environnement Canada, Burlington (ON), Canada
[3] Institut canadien des rivières et département de biologie, Université du Nouveau- Brunswick, Saint-Jean (NB) Canada
[4] Département de biologie intégrative, Université de Guelph, Guelph (ON) Canada
[5] Institut canadien des rivières et département de biologie, Université de l'Île-du-Prince-Édouard, (Î.-P.-É) Canada

Environment Canada Environnement Canada

Paprican

UPEI

UNB Saint John

UNIVERSITY of GUELPH

Sommaire exécutif

Les travaux décrits dans ce rapport constituent la première partie d'un projet visant à sélectionner les essais en laboratoire les plus appropriés pour mener des études d'investigation sur les causes (ISC) et d'investigation sur les solutions (ISS) en vue d'éliminer les effets reliés aux effluents sur la reproduction des poissons. Le projet global nécessite des investigations similaires devant être réalisées à deux autres emplacements d'usine, suivies par l'utilisation des essais en laboratoire sélectionnés avec les effluents provenant de cinq usines, avant et après un biotraitement.

Les études décrites dans ce rapport représentent un volume de travail sans précédent effectué sur les effluents d'une usine (l'usine de pâte kraft blanchie de Smurfit-Stone à La Tuque, au Québec) dans un délai relativement court (mai 2006 à janvier 2007). Les études comprenaient une évaluation des poissons sauvages dans la rivière qui reçoit les effluents ainsi qu'une série d'essais en laboratoire avec quatre espèces de poisson, jumelés à des analyses chimiques poussées des effluents vérifiés. Les essais en laboratoire ont été effectués sur des périodes allant de quelques jours seulement à plus de six mois et ont couvert l'évaluation des indicateurs de reproduction des poissons à partir du niveau biochimique jusqu'à la production d'œufs. Les résultats des études réalisées sur les effluents de l'usine de La Tuque ont permis d'établir les conclusions suivantes :

- Le travail sur le terrain et les données d'études de suivi des effets environnementaux es (ESEE) du Cycle 4 récemment soumises ont démontré que les effluents de l'usine de La Tuque n'ont pas causé la réduction de la taille des gonades des poissons sauvages comme c'était le cas dans les cycles précédents de ESEE.

- Les réactions minimales des poissons dans tous les essais en laboratoire évaluées dans cette étude étaient conformes aux observations effectuées sur les poissons sauvages.
  - L'essai sur le cycle de vie réalisé avec les ménés tête-de-boule a démontré que la condition générale des poissons exposés aux effluents de l'usine de La Tuque était similaire à celle des poissons sauvages vivant en aval de l'usine et les divers essais à moyen et court terme sur trois espèces différentes ont fourni une évaluation précise de l'état de reproduction des poissons exposés aux effluents de l'usine.

- Malgré les réactions minimales observées chez les poissons de laboratoire, les effets sur certains paramètres à de fortes concentrations d'effluent de l'usine de La Tuque ont illustré la valeur potentielle de ces paramètres pour les travaux de ISC et de ISS.

- Basés sur les résultats de cette étude, le paramètre de la production d'œufs dans les essais en laboratoire semble avoir le plus grand potentiel pour évaluer le potentiel des effluents à affecter la reproduction des poissons puisque les effets reliés aux effluents se sont avérés similaires (c.-à-d. une légère stimulation dans des effluents à faibles concentrations et à concentrations intermédiaires, et une production d'œufs réduite à des concentrations d'effluent s'établissant à 65 et 100 %) pour trois espèces de poisson.

- Des indications ont démontré que l'effet des effluents d'usine sur la production d'œufs peut être évalué de façon fiable sur une période plus courte que l'on croyait auparavant et, si cela est confirmé par des études futures, ceci ferait des essais utilisant le paramètre de la production d'œufs (possiblement en utilisant différentes espèces de poisson) l'un des outils pour les travaux de ISC et de ISS.

- L'empreinte chimique et les réactions différentielles des ménés tête-de-boule dans des essais effectués au cours du projet ont suggéré que la qualité des effluents provenant d'une usine pourrait varier quelque peu, indiquant la nécessité d'effectuer une caractérisation chimique continue des effluents et la complexité de la tâche d'identifier le(s) agent(s) causal(s).

- Bien que les résultats de la première étape du projet décrits dans ce rapport fournissent de l'information utile, la sélection finale des outils de diagnostique pour les travaux de ISC et de ISS ne sera possible que lorsque le projet global sera parachevé.

Introduction

L'évaluation nationale des trois premiers cycles du programme d'étude de suivi des effets environnementaux (ESEE) a montré que les effluents des fabriques de pâtes et papiers causent un enrichissement général du milieu récepteur ainsi qu'une perturbation métabolique chez les poissons (Lowell et al., 2005). En conséquence de la perturbation métabolique les poissons assignent moins d'énergie à la reproduction comme en témoigne les facteurs de conditions, les poids des foies plus élevés et les gonades plus petites des poissons habitant les eaux contaminées par les effluents. Quand des effets sont identifiés, le programme des ESEE demande une investigation sur les causes (ISC) et une investigation sur les solutions (ISS) pour que les effets soient réduits ou entièrement éliminés. Dans le cas d'un enrichissement organique les causes sont le carbone, l'azote et le phosphore bien que l'élément clé, ou la combinaison des éléments qui causent l'enrichissement peut être spécifique à chaque site. Dans le cas d'un enrichissement organique, parce que les agents causals sont connus, les fabriques peuvent procéder directement vers une étude d'ISS ayant pour objectif de minimiser l'apport de nutriments.

Dans le cas d'une perturbation métabolique des poissons le(s) agent(s) causal(s) ne sont pas connus et des études exhaustives et détaillées d'ISC et d'ISS seront nécessaires pour remédier à la situation. Pour faciliter le processus, un consortium de recherche formé de scientifiques du milieu académique, du gouvernement et de l'industrie a été mis sur pied. Ce consortium a développé un plan pour se charger de ce problème. Ce plan consiste en cinq activités: i) préparation d'une revue de la littérature pour mettre à jour ce qui est connu et identifier les lacunes dans nos connaissances (complétée en 2005 ; voir Kovacs et al., 2006); ii) sélection et/ou développement d'outils diagnostiques pour les études d'ISC/ISS; iii) études d'ISC; iv) études d'ISS; et v) études de confirmation des solutions mises en place.

Les efforts se concentrent actuellement sur la sélection et/ou le développement des outils diagnostiques qui seront utilisés pour le travail d'ISC/ISS. Les travaux d'ISC/ISS doivent se faire dans des conditions contrôlées en laboratoire. Donc, les tests en laboratoire utilisés à cette fin doivent êtres capables de montrer les mêmes types de réponses observés dans les poissons lors des études d'ESEE. De plus, les tests de laboratoire doivent être pratiques en termes de temps d'exécution et de quantité d'effluent requis. Un projet de recherche a été développé pour répondre à ces besoins. Ce projet requiert que l'étude des poissons soit faite à trois usines (représentatives des effets observés chez les poissons sauvages et des types majeurs de procédés de mise en pâte au Canada) ainsi qu'une série de tests en laboratoire avec les effluents de ces trois usines. Les tests de laboratoire sélectionnés pour l'évaluation utilisent différentes espèces de poissons et examinent les effets des effluents sur plusieurs marqueurs de la capacité de reproduction. De plus, ces test on différents besoins d'effluent et différentes durées dans le temps. Sur la base des résultats des travaux aux trois usines, des tests de laboratoire seront sélectionnés pour tester les effluents de cinq usines échantillonnées avant et après le traitement biologique. Le but visé est d'identifier le test ou le groupe de tests de laboratoire qui peuvent être utilisé de la manière la plus efficace pour les études d'ISC/ISS ciblées vers l'élimination des effets causés par les effluents d'usine sur la disruption métabolique des poissons.

Usine selectionnée et plan de travail

Une usine de pâte kraft blanchie (DNED, DED) de La Tuque, au Québec, produisant environ 1200 t/j de panneau de carton, boites de produits alimentaires et boites White Top a été sélectionnée pour la première phase de ce projet. Les produits sont fabriqués à partir de 23 % de bois de résineux, 60 % de brin de scie et 17 % de bois dur. L'usine utilise 87,000 m^3 d'eau par jour pour le procédé et 17,000 m^3 d'eau par jour de plus pour le refroidissement. Les eaux de procédé de l'usine sont acheminées à une usine de traitement par boues aérobies activées à l'oxygène ayant un temps de rétention hydraulique de 9.8 h, avant d'être rejeté à la rivière Saint-Maurice.

Des poissons sauvages furent échantillonnés en amont et en aval du point de rejet des effluents de l'usine en septembre 2006. Les tests en laboratoire avec l'effluent de l'usine ont été complété entre mai 2006 et janvier 2007 selon le plan de travail du projet illustré ci-joint :

Investigateurs principaux et organisation	Travail sur le terrain	Méné tête-de-boule Cycle vital	Méné tête-de-boule Court et moyen terme	Truite arc-en-ciel VTG	Choquemort Cycle vital	Choquemort Court terme	Poisson zèbre	Épinoche	Analyse chimique
1. McMaster NWRI	Automne 2006								
2. Parrott NWRI		Printemps 2006 à janvier 2007							
3. Kovacs/Martel Paprican			Printemps et automne 2006	Printemps 2006					
4. MacLatchy UNB					Printemps à automne 2006	Printemps 2006			
5. Van Der Kraak U. of Guelph							Printemps2006		
6. van den Heuvel UPEI								Hiver 2006/ 2007	
7. Hewitt/Sherry & Parrott NWRI, O'Connor Paprican									Printemps 2006 à janvier 2007

Les résultats obtenus par chaque investigateur principal/organisations sont décrits dans les sept sections suivantes.

Constatations

1. Études sur le terrain à La Tuque

L'objectif des cueillettes de poissons sauvages était : (1) de mener une étude semblable à celle de ESEE avec des poissons provenant du même site que celui de la source des effluents pour les essais en laboratoire et (2) d'évaluer des paramètres additionnels de reproduction chez les poissons sauvages qui correspondent aux paramètres utilisés dans les études en laboratoire pour le ISC. Ceci incluait la mesure des niveaux plasmatiques de stéroïdes reproducteurs et de vitellogénine (VTG), la production d'hormones stéroïdes *in vitro*, les caractéristiques sexuelles secondaires, l'histologie gonadale et l'activité des oxygénases hépatiques à fonction mixte.

Méthodes

La sélection du site pour les études concernant les poissons sauvages correspondait aux études précédentes effectuées à ce site, comprenant Hodson et al., 1992; Gagnon et al., 1994 et Alliance Environment, 2007. Trois sites ont été échantillonnés pour les poissons; un site de référence en amont du barrage Beaumont, un site désigné de champ proche en aval de la décharge des effluents mais en amont du barrage à La Tuque et un site de champ éloigné en aval de la décharge des effluents et en aval du barrage à La Tuque (Alliance Environnement, 2007). Des meuniers noirs (*Catostomus commersoni*) ont été recueillis à partir des trois sites sélectionnés entre le 12 et le 22 septembre 2006, en utilisant des ensembles temporaires de filets maillants de quatre pouces. La pêche au site désigné immédiatement en aval était difficile et dangereuse en raison des forts courants créés par le rétrécissement de la rivière directement en amont du barrage et de l'apport d'eau. Le site désigné immédiatement en aval représentait environ 750 m de secteur propre à la pêche et contenait un habitat qui différait considérablement du site désigné de référence en aval du barrage.

Protocole d'échantillonnage

Les meuniers noirs ont été immobilisés dans un bloc de mousse et des prélèvements sanguins ont été effectués à partir des vaisseaux caudaux au moyen d'une seringue et d'un tube Vaccutainer héparanisé immédiatement avant l'échantillonnage. Le sang a été conservé sur de la glace avant la séparation du plasma par centrifugation; le plasma a été immédiatement congelé dans de l'azote liquide. Les niveaux plasmatiques de testostérone (T) (les deux sexes), de 17β-oestradiol (E2; femelles) et de 11-kétotestostérone (11-KT; mâles) à partir des échantillons de plasma ont été quantifiés par le biais de procédures d'épreuve radio-immunologique (RIA), (McMaster et al. 1992). Chaque poisson a été rendu inconscient par commotion et a été mesuré pour obtenir la longueur à la fourche (± 0,01cm) et le poids corporel (± 0,01 g). Les organes internes ont été retirés et les gonades (± 0,01 g) et le foie (± 0,01 g) ont été pesés. Les poissons mâles ont été évalués en fonction du nombre et du développement des tubercules nuptiaux selon une échelle subjective allant de 0 (pas de tubercule) à 6 (tubercules nuptiaux sur tout le corps, McMaster et al. 1991). Les poissons des deux sexes ont également été annotés en regard des accumulations de graisse viscérale en utilisant une échelle subjective allant de 1 à 5 également adaptée de McMaster et al. (1991), (1 représentant très peu de graisse viscérale et 5 représentant de grandes quantités).

Une portion de tissu hépatique a été placée dans un Cryovial et congelée dans de l'azote liquide pour le transport de retour à Burlington pour que soit effectuée une analyse éthoxyrésorufine-O-déséthylase (EROD) (Parrott et al. 1999). Au cours de l'échantillonnage, un sous-échantillon de tissu ovarien a été prélevé sur 12 meuniers noirs femelles et placé dans des flacons séparés dans un milieu d'incubation pour une détermination subséquente de production *in vitro* d'hormones stéroïdes (McMaster et al., 1995). Un sous-échantillon de tissu ovarien a été pesé et les follicules ont été comptés manuellement et ensuite multipliés par le poids des gonades pour évaluer le taux de fécondité total (nombre total d'œufs/poisson). Un échantillon additionnel de tissu gonadal provenant du mâle et de la femelle a également été fixé dans une solution de formol tamponné à une concentration de 10 % en vue d'une évaluation histologique. Les structures d'âge (opercules) ont été obtenues de tous les poissons en vue d'une analyse chronologique qui a été réalisée à l'Institut national de recherche sur les eaux, à Burlington, en Ontario.

Analyse statistique

Les poissons mâles et femelles ont été analysés séparément. L'examen des différences potentielles de site en ce qui a trait à la longueur et au poids corporel des poissons ont été évaluées en utilisant l'analyse de la variance (ANOVA). Le cœfficient de condition (longueur c. le poids corporel; K), l'indice gonadosomatique (ISG) (ratio du poids des gonades par rapport au poids corporel), l'indice hépaticosomatique (ISH) (ratio du poids du foie par rapport au poids corporel), la croissance (âge c. la longueur et ou le poids) et le nombre d'œufs (fécondité c. la longueur, le poids et le poids des gonades) ont été évalués en utilisant l'analyse de covariance (ANCOVA). Les données ont été vérifiées en fonction de la normalité et évaluées en regard de l'homogénéité en utilisant l'essai Levine avant l'analyse; des transformations logarithmiques ont également été utilisées lorsque les données ne correspondaient pas aux hypothèses. Des essais Kruskal-Wallis non paramétriques ont servis à comparer les stéroïdes du plasma, la production de stéroïdes *in vitro*, et les données concernant la fécondité et l'âge entre les sites. Toutes les analyses de données ont été réalisées par le biais du logiciel statistique SYSTAT 9,0 (Wilkinson 1990).

Résultats et discussion

Les meuniers noirs femelles recueillis en aval du barrage de La Tuque étaient plus longs et plus lourds que les poissons femelles de référence en amont ($p<0,029$). Les femelles en aval avaient également un cœfficient de condition plus élevé par rapport aux femelles de référence en amont ($p=0,041$) et étaient plus âgées ($p<0,001$) (Tableau 1.1). L'examen de la croissance des poissons a été évalué en ce qui a trait à la fois au poids et à la longueur des poissons. Les meuniers noirs femelles recueillis aux deux sites en aval de la décharge démontraient une croissance réduite, comparativement aux femelles de référence en amont, en termes à la fois de longueur ($p<0,004$) (Diagramme 1.1) et de poids ($p<0,048$). Le développement gonadal des meuniers noirs femelles lorsque exprimé en fonction du poids corporel ou de la longueur a démontré des différences de site significatives dans les pentes des régressions ($p=0,037$, 0,045, respectivement). Lorsque les données ont été examinées graphiquement, les femelles du champ lointain semblent investir plus d'énergie dans le développement reproductif, particulièrement en ce qui concerne les poissons plus gros (plus lourds et plus longs) (Diagramme 1.2). Bien que les nombres absolus de fécondité sont plus élevés chez les femelles du champ éloigné, relativement à la longueur, au poids et à la

taille des gonades, il n'existe pas de différences entre les sites (p>0,05). Les meuniers noirs femelles recueillis à partir des deux sites désignés (champ proche et champ éloigné) avaient des foies significativement plus gros, comparativement aux femelles de référence en amont (p<0,001) (Diagramme 1.3). Les stocks de gras interne sont réduits de façon significative chez les femelles exposées provenant des deux sites désignés (p<0,027).

Les meuniers noirs mâles recueillis dans le site désigné de champ proche étaient plus légers (p<0,005) et plus courts (p<0,05) que les mâles exposés du site désigné de champ éloigné, mais étaient similaires en terme d'âge (p>0,057). Il n'y avait pas de différence dans la condition entre les sites (p>0,107), mais les mâles du champ proche présentaient une croissance plus lente que les mâles de référence (âge c. longueur p=0,006) (Diagramme 1.4). Il n'y avait pas de différence dans le développement testiculaire par rapport à la longueur des poissons entre les trois sites (p=0,990). Concernant le poids des poissons, il n'y avait également pas de différence entre les sites en ce qui a trait à la taille des testicules (p=0,907). Les poids des foies des mâles démontraient des différences importantes entre les sites en ce qui a trait à la relation entre le poids du foie et le poids corporel (p<0,016). Les poissons exposés du champ proche démontrent des pentes similaires mais possèdent des foies plus gros, comparativement aux mâles de référence. Les mâles du champ éloigné possèdent des pentes très différentes, alors que les gros poissons ont des foies beaucoup plus volumineux. (Diagramme 1.5). Il n'y avait pas de différence entre les sites dans le stockage de graisse énergétique pour les mâles (p>0,78). Les caractéristiques sexuelles secondaires des mâles ne différaient pas non plus à la suite de leur exposition.

Tableau 1.1. Meuniers noirs recueillis à un point de référence en amont et à deux sites en aval de l'usine de pâte sur la rivière St-Maurice près de La Tuque, au Québec.

Sexe	Paramètre	Référence (Beaumont)	En aval de l'usine (champ proche)	En aval du barrage (champ éloigné)
Femelle	Longueur (cm)	44,1 ± 0,6	42,2 ± 0,9	46,3 ± 0,6*
	Poids (g)	1206,6 ± 45,5	1138,6 ± 62,9	1462,0 ± 52,3*
	K	1,40 ± 0,02	1,51 ± 0,04	1,46 ± 0,02*
	Poids des gonades (g)	45,72 ± 1,94	46,59 ± 2,86	62,16 ± 3,26
	Poids du foie (g)	11,40 ± 0,54	15,18 ± 0,98*	20,05 ± 1,17*
	Fécondité	33657 ± 1444	31971 ± 2351	39267 ± 1641
	Indice de graisse	2,6 ± 0,3	1,1 ± 0,2*	1,6 ± 0,2*
	Âge (ans)	7,3 ± 0,4	9,1 ± 1,1	11,9 ± 0,8*
	N	20	11	22
Mâle	Longueur (cm)	42,0 ± 0,6	39,4 ± 0,6*	42,4 ± 0,49
	Poids (g)	1065,9 ± 42,0	929,5 ± 38,5*	1065,9 ± 42,0
	K	1,42 ± 0,02	1,51 ± 0,03	1,48 ± 0,03
	Poids des gonades (g)	65,80 ± 3,62	59,94 ± 4,02	69,33 ± 2,69^
	Poids du foie (g)	7,96 ± 0,39	8,88 ± 0,62*	11,70 ± 0,85^
	Indice des tubercules nuptiaux	2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,2	2,1 ± 0,2
	Indice de graisse	1,5 ± 0,3	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,3
	Âge (ans)	8,1 ± 0,7	8,6 ± 0,7	10,9 ± 1,2
	N	20	16	15

* Différence appréciable par rapport aux poissons de référence (p<0,05)
^ Interaction significative dans la relation entre les variables ANCOVA entre les sites.

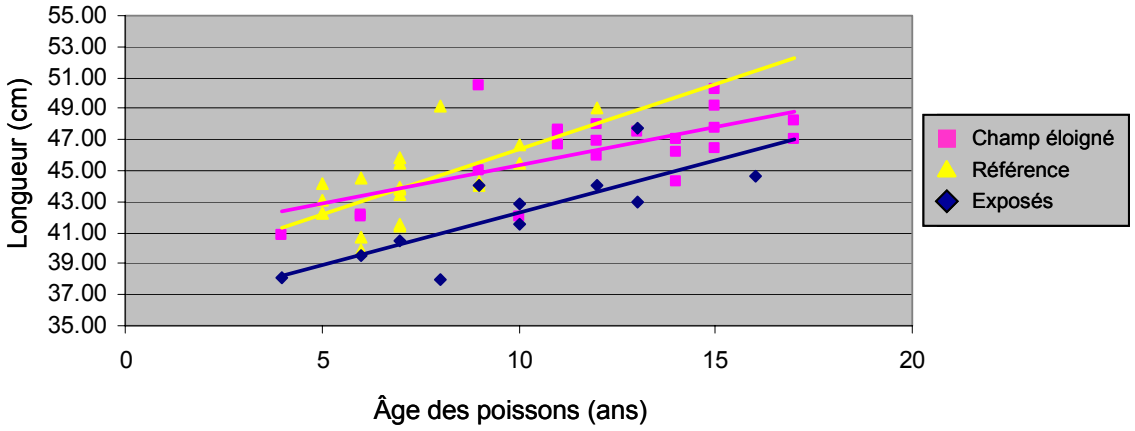

Diagramme 1.1. La croissance des meuniers noirs femelles (longueur du poisson c. âge du poisson) démontre une croissance réduite chez les femelles recueillies en aval de la décharge des effluents, comparativement aux femelles de référence en amont.

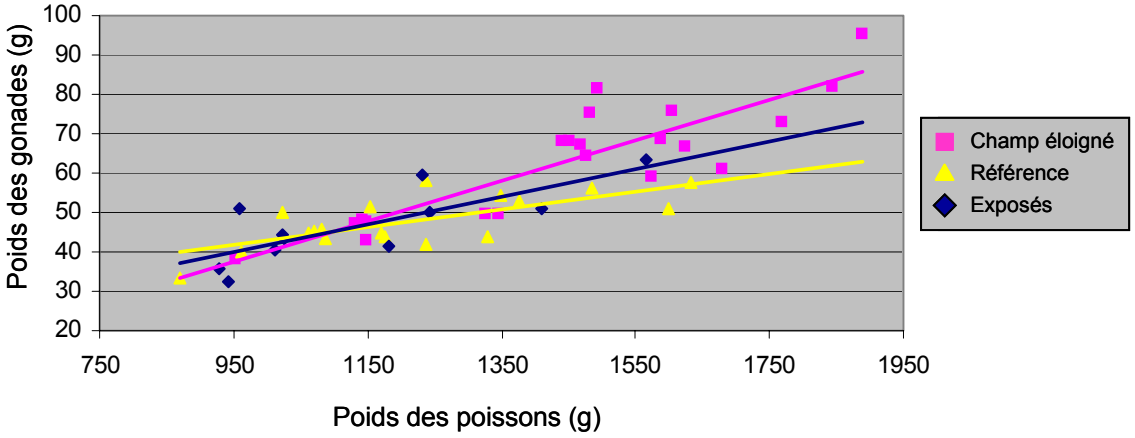

Diagramme 1.2. L'investissement des meuniers noirs femelles dans la croissance génésique (poids des gonades c. poids corporel) indique que les femelles exposées du champ lointain investissent plus d'énergie dans les tissus de reproduction lorsqu'elles sont plus grosses.

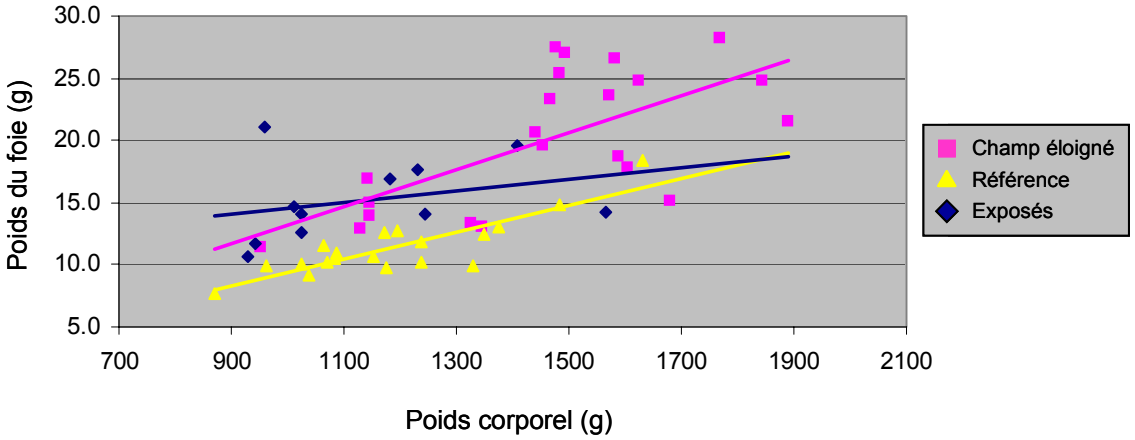

Diagramme 1.3. Le poids du foie des meuniers noirs femelles c. leur poids corporel indique que les poissons exposés provenant des deux sites ont des foies plus gros.

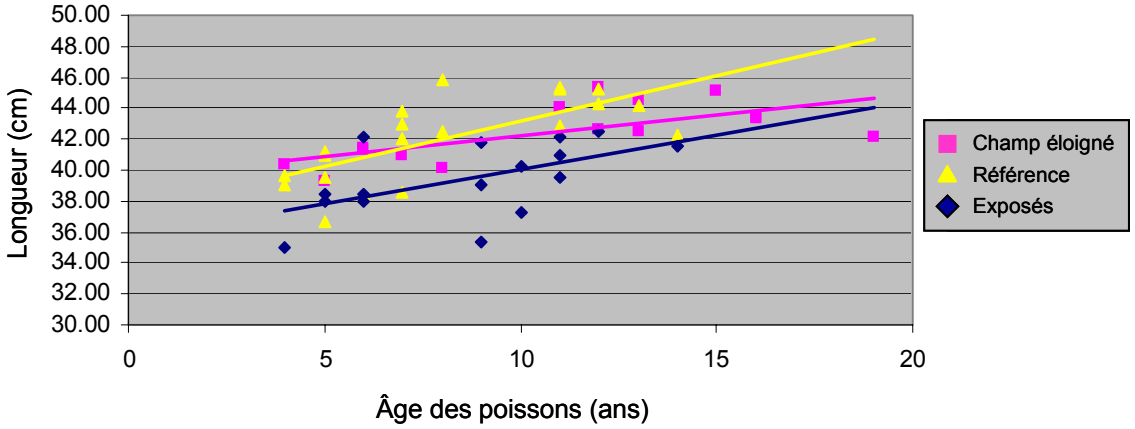

Diagramme 1.4. La croissance des meuniers noirs mâles (longueur du poisson c. l'âge du poisson) démontre une croissance réduite chez les meuniers noirs mâles exposés du champ proche.

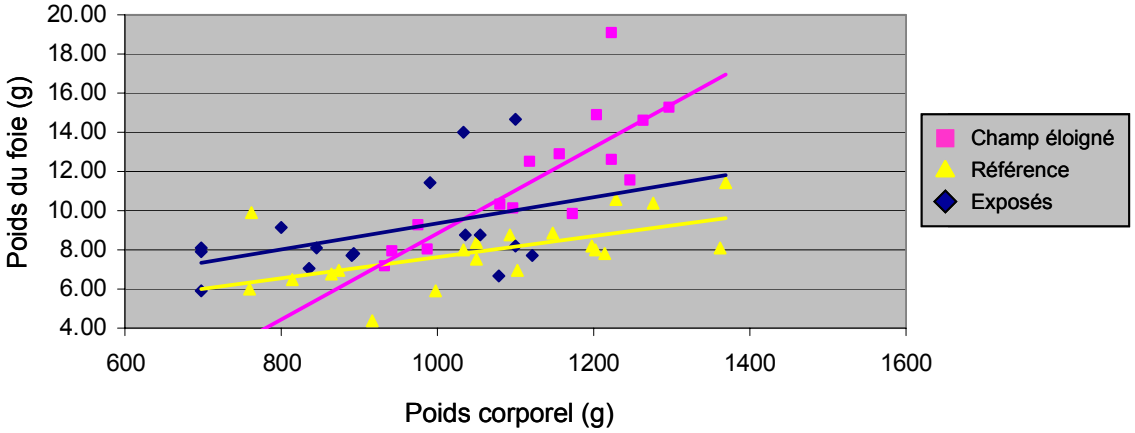

Diagramme 1.5. Le poids du foie des meuniers noirs mâles c. le poids corporel démontre une augmentation du poids du foie chez les poissons exposés du champ proche et une relation différente entre le gain de poids du foie et le gain de poids corporel chez les mâles exposés du champ éloigné.

Production d'hormones stéroïdes

Les niveaux du plasma des deux principaux stéroïdes de reproduction biologiquement actifs ont été mesurés tant chez les meuniers noirs mâles que femelles. Les niveaux plasmatiques de E2 et de T étaient similaires chez les femelles recueillies dans les trois sites ($p>0,05$) (Tableau 1.2). Bien que les niveaux plasmatiques de 11-KT étaient également semblables entre les trois sites, les meuniers noirs mâles recueillis en aval de la décharge des effluents ont démontré des niveaux plasmatiques réduits de T ($p<0,05$).

Les follicules des meuniers noirs femelles ont été incubés *in vitro* soit dans des conditions basales (milieu nutritif seulement) ou soit dans des conditions stimulées (gonadotrophine chorionique humaine [hCG]). Les follicules provenant de tous les sites ont répondu de façon positive à la stimulation hCG en terme de production de E2 et de T ($p>0,05$) (Tableau 1.3). La production basale de E2 a été réduite en follicules provenant des femelles du champ éloigné en aval du barrage et la production stimulée de E2 a été accrue chez les femelles exposées du champ

proche (p<0,05). Aucune autre différence de production de stéroïdes entre les sites n'a été découverte.

Tableau 1.2. Les niveaux plasmatiques de testostérone (les deux sexes), de 17β-estradiol (femelles) et de 11-kétotestostérone (mâles) dans le plasma recueillis chez les meuniers noirs provenant des trois sites sur la rivière St-Maurice près de La Tuque, Québec.

Sexe	Stéroide (pg/ml)	Référence (Beaumont)	En aval de l'usine (champ proche)	En aval du barrage (champ éloigné)
Femelle	17β-estradiol	558,4 ± 96,1	589,2 ± 121,4	621,1 ± 149,9
	Testostérone	273,0 ± 44,9	267,4 ± 61,9	225,8 ± 54,7
Mâle	11-kétotestostérone	1756,9 ± 382,8	2204,4 ± 531,9	1381,9 ± 222,2
	Testostérone	482,0 ± 78,0	289,1 ± 68,0*	303,7 ± 88.7*

Tableau 1.3. La production de stéroïdes *in vitro* par les follicules ovariens recueillis chez les meuniers noirs à partir des trois sites sur la rivière St-Maurice près de La Tuque, Québec. La production a été mesurée dans des conditions d'incubation basale ou suivant une stimulation de gonadotrophine chorionique humaine (hCG)

Stéroïde (pg/10 follicules)	Traitement	Référence (Beaumont)	En aval de l'usine (champ proche)	En aval du barrage (champ éloigné)
17β-estradiol	Basal	55,88 ± 7,76	83,11 ± 13,46	28,4 ± 4,09*
	hCG	90,97 ± 11,86	169,27 ± 21,56*	80,23 ± 12,62
Testostérone	Basal	21,27 ± 3,1	26,48 ± 7,4	14,83 ± 1,59
	hCG	47,89 ± 12,34	79,46 ± 15,86	36,36 ± 5,08

L'analyse des niveaux plasmatiques de VTG ainsi que l'activité des oxygénases hépatiques à fonction mixte n'ont pas encore été achevées.

Conclusions

Bien que des études de recherche antérieures (Hodson et al., 1992; Gagnon et al., 1994) et les cycles ESEE (cycles 2 et 3) aient démontré des effets sur la reproduction engendrés par les effluents de l'usine de La Tuque, aucun effet négatif sur la taille des gonades n'a été découvert dans cette étude. Ceci correspond bien aux études du Cycle 4 soumises récemment et menées à l'automne 2005 où aucune réduction dans le développement gonadal n'a été décelée (Alliance Environnement, 2007). À partir des paramètres de la ESEE qui ont été mesurés, la croissance des meuniers noirs en aval de la décharge des effluents est plus lente et la taille de leur foie est accrue, comparativement aux poissons de référence en amont. Il y avait certaines indications relatives à des modifications concernant la reproduction en raison du fait que les poissons mâles en aval de la décharge présentaient des taux réduits de T, mais ceci ne s'est pas traduit en terme de modification au niveau des caractéristiques sexuelles secondaires mâles. La production *in vitro* de stéroïdes par le tissu ovarien des femelles a échoué à démontrer des tendances constantes qui étaient similaires à ce qui a été trouvé en ce qui a trait aux niveaux plasmatiques de stéroïdes.

2. Essai de cycle de vie sur les ménés tête-de-boule

L'essai de cycle de vie constitue le deuxième ancrage de cette étude. Dans cet essai, les poissons sont exposés, à partir de l'état ovulaire, de l'étape de l'éclosion et du stade juvénile jusqu'à la maturité sexuelle, et la capacité reproductrice des poissons est surveillée pendant environ trois mois. Grâce à ceci, on considère qu'il s'agit là du meilleur potentiel de reproduire la condition des poissons sauvages. Les paramètres comprennent la croissance, la production ovulaire, le développement des caractéristiques sexuelles secondaires, le temps de maturation, les événements de frai ainsi que les indicateurs biochimiques. La durée de l'essai est d'environ six mois.

L'essai a débuté le 20 juillet 2006 et le jour 1 après l'éclosion était le 25 juillet 2006. L'essai s'est terminé le 29 janvier – 1er février 2007.

Méthodes

Expositions des poissons aux effluents

Un volume de 2000 litres d'effluent a été expédié hebdomadairement de La Tuque à Burlington (ON). Le transport prenait entre un et trois jours. L'effluent était entreposé à 4 °C jusqu'à son utilisation. L'effluent coulait à travers un diluteur qui le mêlait à de l'eau du laboratoire de Burlington. Les concentrations d'exposition s'établissaient à 0, 1, 3, 10, 30 et 100 % d'effluent. Il y avait quatre répétitions de chacune des concentrations d'effluent et huit répétitions des cuves de contrôle (eau de laboratoire). Les débits s'établissaient à 30 mL/min pour chaque aquarium, ce qui fournissait environ quatre renouvellements de solution par 24 heures (Tableau 2.1).

Éclosion des œufs et croissance des poissons

Les méthodes concernant l'éclosion des œufs et les soins apportés aux poissons en croissance sont détaillés dans Parrott et Blunt (2005). Les œufs fertilisés de ménés tête-de-boule ont été placés dans des godets d'incubation à fond grillagé de 200 ml à l'intérieur d'aquariums de 12 L. L'éclosion était surveillée et les poissons recevaient deux fois par jour de la nourriture composée de crevettes des salines nouvellement écloses (HBS) et plus fréquemment, au fur et à mesure de leur croissance (Tableau 2.1). Au jour 7, les larves après l'éclosion ont été transférées dans des aquariums. Les poissons ont été pesés les 32e, 46 e, 54 e, 77 e, 90 e, 102e et 133 e journées après l'éclosion (jae). Le nombre de poissons a été réduit à 20 le 32e jae, ensuite à 15 le 46e jae et à 12 le 54e jae.

Maturation des poissons et reproduction

Les caractéristiques sexuelles secondaires ont commencé à se développer et environ 30 % des poissons pouvaient être distingués en tant que mâles et femelles au 77e jae. Trois tuiles de reproduction ont été ajoutées dans chacun des aquariums pour promouvoir les comportements de maturation et de reproduction. Les caractéristiques sexuelles secondaires de 55 % des poissons étaient évidentes au 90e jae. Au 102e jour, les poissons ont été réduits à huit, retenant cinq femelles et trois mâles par aquarium pour l'étape de reproduction de l'expérience. Les œufs ont

été comptés, évalués en terme de fertilisation, enlevés des tuiles et placés dans des godets d'incubation dans de l'eau claire aérée. Le succès de l'éclosion a été surveillé ainsi que les malformations et les anomalies chez les larves. Le diamètre des œufs a été mesuré dans plusieurs pontes d'œufs provenant de chacun des traitements.

Tableau 2.1. Conditions d'essai pour l'essai du cycle de vie chez les ménés tête-de-boule.

Date(s) d'échantillonnage des effluents	Hebdomadairement, du 12 juillet 2006 au 29 janvier 2007
Étape de pré-exposition	Aucune
Exposition aux effluents, jr	Cycle de vie de 189 à 192 jours après éclosion, 194-197 jr au total
Renouvellement de solution (#/jr)	4 volumes / jour
Quantité d'effluent utilisée	28 000 L (29 semaines)
Répétitions	8 pour contrôle, 4 pour chaque concentration d'effluent
Densité de charge, g/L/jour	0,3 g/L/jour
Alimentation	Nourris deux fois par jour avec des crevettes salines nouvellement écloses avec l'ajout d'une bouillie de crevettes salines surgelées (et décongelées) au fur et à mesure de leur maturation
Paramètres mesurés	• Succès de l'éclosion, survie des larves, croissance sur une période de temps • Longueur, poids, cœfficient de condition des adultes • Indice somatique hépatique, indice somatique gonadal des adultes • Caractéristiques sexuelles secondaires • Production d'œufs, nombre de frai • Fertilisation des œufs, éclosion des œufs • chez les mâles : production de testostérone par les testicules • Chez les femelles : production de testostérone et d'oestradiol par les ovaires
pH	7,82 ± 0,012 (n = 420)
Oxygène dissous, mg/L	7,58 ± 0,024 (n = 420)
Température, °C	24,2 ± 0,023 (n = 420)

Échantillonnage des poissons et classement des caractéristiques sexuelles

Aux 189e– 192e jae, les poissons ont été échantillonnés tel que décrit dans Parrott et Blunt (2005) avec les exceptions suivantes. Des échantillons sanguins ont été effectués par prélèvement au pédoncule caudal après anesthésie avec de l'essence de girofle.

Les caractéristiques sexuelles secondaires des mâles ont été évaluées comme suit : le point de l'arête dorsale a été classé comme absent (0 point) ou présent (1 point). Le coussinet adipeux dorsal, classé d'après une échelle de 0 (pas de coussinet) à 5 (coussinet très bien développé). Les tubercules nuptiaux ont été comptés sous un microscope à dissection, et le nombre de gros tubercules a été noté. La répartition des bandes a été évaluée d'après une échelle de 0 (pas de bande) à 5 (bandes très foncées et prononcées). Les poissons ayant une tête noire et pas de bandes ont reçu une note de 2. L'indice mâle a été calculé en tant que somme de la note du point de l'arête + la note du coussinet adipeux dorsal + (les tubercules nuptiaux et les gros tubercules nuptiaux/5). L'indice mâle total consistait en l'indice mâle plus la note pour les bandes. La séparation de la répartition des bandes a été faite lorsque les poissons ont été échantillonnés, compte tenu que cette caractéristique peut changer (les bandes peuvent s'estomper).

Dans le cas des poissons femelles, la longueur et la largeur de l'ovipositeur ont été mesurées sous un microscope à dissection et la région triangulaire de l'ovipositeur a été calculée en terme de longueur x largeur / 2. Le sexe de tous les poissons a été déterminé extérieurement à l'exception d'un poisson immature.

Analyses statistiques

Les données ont été analysées en utilisant Systat 10.2. Les paramètres de croissance : longueur (mm), poids (g), cœfficient de condition (CD), ISH, ISG, longueur de l'ovipositeur (mm), largeur de l'ovipositeur (mm), région de l'ovipositeur (mm^2), indice des bandes, indice mâle et indice total mâle, ont été évalués pour déterminer les différences entre les traitements en utilisant ANOVA. Des différences significatives à partir des contrôles ont été évaluées en utilisant des tests T jumelés (variances séparées) pour déterminer les niveaux d'importance. Les valeurs P ont été illustrées dans les diagrammes et les tableaux par des astérisques : $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}009$, ***$p < 0{,}001$.

Résultats et discussion

Éclosion des œufs et survie des larves

Il n'y avait pas de différence dans l'éclosion des œufs exposés aux effluents de l'usine de pâte. Le succès de l'éclosion s'est établi à plus de 90 % et la survie des poissons à plus de 32 jae variant de 68 % dans 30 % d'effluent jusqu'à 85 % dans 100 % d'effluent (données non illustrées).

Croissance des poissons

Au cours de l'expérience, les poissons ont été pesés occasionnellement en tant que groupes pour évaluer la progression de la croissance sur une période de temps (Diagramme 2.1). La croissance des poissons juvéniles était similaire dans tous les traitements d'effluent jusqu'au 77^{e}jae. La croissance des poissons au 90e jae a démontré une légère diminution du poids des poissons exposés à 30 % et 100 % d'effluent. Cette tendance s'est poursuivie et s'est avérée statistiquement significative au 102e jae. Au 133e jae, le sexe des poissons a pu être identifié, et les mâles et les femelles ont pu être pesés séparément. Le poids des mâles a été nettement réduit à la suite d'une exposition de 30 % et 100 % d'effluent au 133e jae.

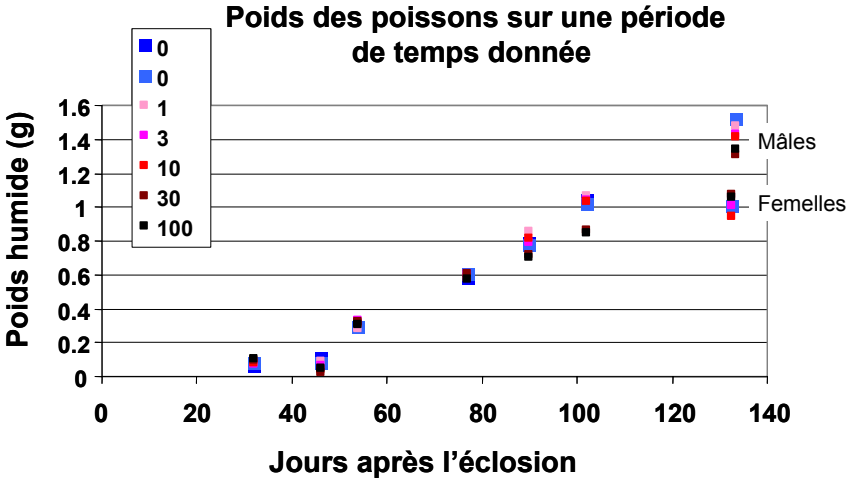

Diagramme 2.1 Poids des ménés tête-de-boule exposés à diverses concentrations d'effluent d'usine de pâte.

À la fin de l'expérience lorsque les poids et les longueurs de chacun des poissons ont été déterminés, la croissance des poissons a été réduite par l'exposition aux effluents. Les mâles exposés à aussi peu que 1 % d'effluent affichaient une longueur significativement plus petite que les mâles de contrôle (Diagramme 2.2). Le poids des mâles a diminué à des concentrations d'effluent de 30 et 100 % (Tableau 2.2). Les femelles ont également démontré cette tendance de diminution de longueur, affichant des diminutions statistiques significatives à des concentrations d'effluent de 10 % et plus (Diagramme 2.2). Le cœfficient de condition (CD) s'est élevé chez les mâles exposés à des concentrations d'effluent de 3 à 100 % et chez les femelles exposées à 30 et 100 % d'effluent (Tableau 2.2).

Poids des organes

Les foies des poissons exposés à de fortes concentrations d'effluent d'usine de pâte étaient hypertrophiés. L'ISH chez les poissons mâles et femelles était élevé lorsqu'exposés aux effluents de La Tuque à des concentrations de 30 % et au dessus (Tableau 2.2). La taille des gonades n'a pas été affectée par l'exposition aux effluents de l'usine, à l'exception des femelles exposées à 100 % d'effluent qui présentaient un ISG accru de façon significative.

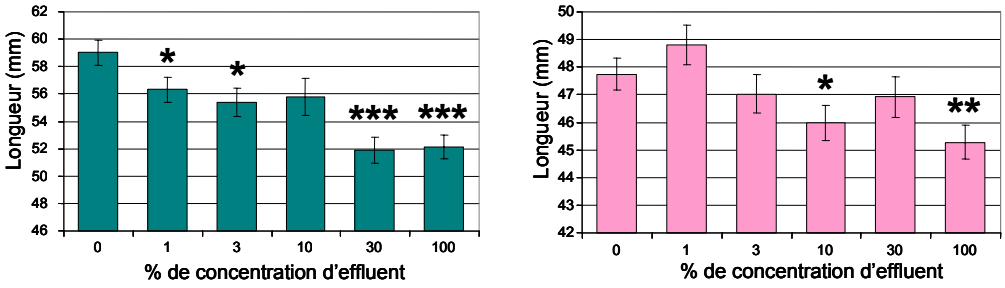

Diagramme 2.2 Longueur moyenne (± erreur-type) des ménés tête-de-boule femelles (panneau de gauche) et des mâles (panneau de droite) exposés aux effluents d'usine de pâte (astérisques définis au dessous du tableau 2.2.

Caractéristiques sexuelles secondaires

Il n'y avait aucune présence de caractéristiques sexuelles mâles chez les poissons femelles ou de caractéristiques sexuelles femelles chez les mâles (tel que déjà constaté dans des expositions à des effluents d'usine de pâte, Parrott et al., 2004).

Des concentrations élevées d'effluent ont réduit les caractéristiques sexuelles mâle, alors qu'une exposition à des concentrations faibles d'effluent a accru les caractéristiques sexuelles mâles (Tableau 2.2). L'indice total mâle a été réduit de façon significative chez les poissons mâles exposés à 100 % d'effluent. Ceci a été causé par une diminution significative de l'indice de

bandes des mâles exposés à 100 % d'effluent. L'indice mâle (la somme du point de l'arête dorsale, et des notes du coussinet dorsal et des tubercules nuptiaux) a été augmenté chez les mâles exposés à 1 % jusqu'à 10 % d'effluent et l'indice total mâle s'est accru chez les mâles exposés à 1 et 10 % d'effluent.

Production d'œufs

Il n'existait pas de différence reliée aux effluents en terme de temps pour la première fraie. La mise à la reproduction a débuté au 89e jae dans un aquarium à des concentrations d'effluent de 0,3 % et 30 %, respectivement. D'autres concentrations d'exposition ont débuté la mise à la reproduction au 90e jae (1 %) ou 93e jae (10 % et 100 %).

La production totale d'œufs a été augmentée de façon significative chez les poissons exposés aux effluents de La Tuque à des concentrations de 1 % jusqu'à 30 % (Diagramme 2.3). Il y avait une indication d'une diminution de la production d'œufs chez deux des quatre répétitions des poissons exposés à 100 % d'effluent, mais lorsque toutes les répétitions ont été regroupées, la variabilité de la production d'œufs parmi les répétitions à une exposition de 100 % d'effluent était élevée; ainsi aucune différence significative comparativement à la production d'œufs de contrôle n'a été détectée.

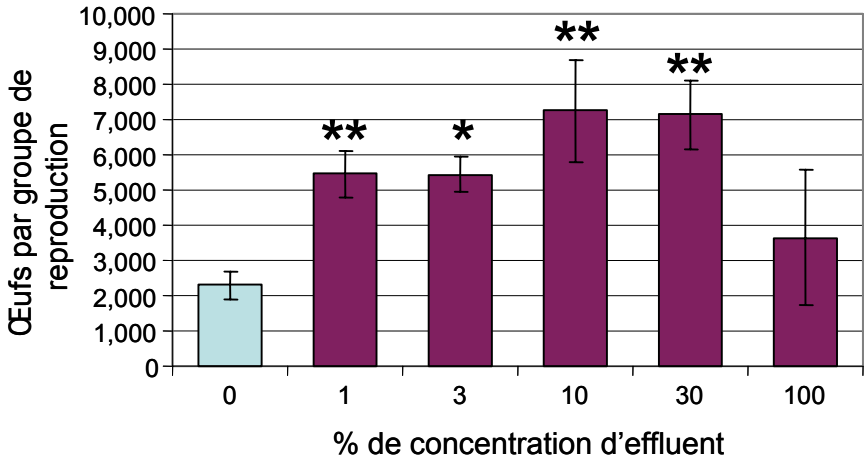

Diagramme 2.3 Production moyenne d'œufs (± erreur-type) par groupe de reproduction (3 mâles et 5 femelles par aquarium) de ménés tête-de-boule exposés aux effluents d'usine de pâte (astérisques définis au dessous du tableau 2.2.).

Conclusions

- De faibles concentrations (1 et 3 %) d'effluent de La Tuque ont diminué la longueur des poissons mâles, mais augmenté le cœfficient de condition et les caractéristiques sexuelles secondaires mâles. Aucun changement n'a été enregistré chez les ménés tête-de-boule femelles exposées à de faibles concentrations d'effluent.
- La majorité des concentrations d'effluent (1 % à 30 %) ont augmenté de façon significative la production d'œufs des ménés tête-de-boule.
- L'exposition à des concentrations élevées d'effluent (30 à 100 %) a causé une diminution de croissance et une augmentation du cœfficient de condition.
- L'essai du cycle de vie des ménés tête-de-boule a été en mesure de refléter les effets aperçus chez les poissons sauvages capturés en aval de la décharge des effluents de La Tuque : des poissons plus petits présentant des foies hypertrophiés.

Tableau 2.2. Valeurs moyennes et erreur-type (E-T) pour les paramètres de croissance et les caractéristiques sexuelles secondaires des ménés tête-de-boule matures mâles et femelles. Les paramètres de croissance étaient : longueur (mm), poids (g), cœfficient de condition (CD), indice somatique hépathique (ISH), indice somatique gonadal (ISG), longueur de l'ovipositeur (mm), largeur de l'ovipositeur (mm), région de l'ovipositeur (mm^2), indice des bandes, indice mâle et indice total mâle

FEMELLES

Concn (%)	n	Longueur (mm)	E-T	Poids (g)	E-T	CD	E-T	ISH	E-T	ISG	E-T
0	34	47,8	0,58	1,25	0,04	1,14	0,022	2,90	0,13	15,5	0,732
1	18	48,8	0,71	1,34	0,06	1,14	0,022	3,21	0,333	15,7	0,987
3	14-15	47,0	0,71	1,17	0,05	1,12	0,033	3,47	0,322	15,4	0,960
10	17	**46,0***	0,63	1,15	0,06	1,17	0,037	3,37	0,249	14,5	1,09
30	19	46,9	0,74	1,31	0,07	**1,26***	0,038	**4,29*****	0,194	17,3	0,907
100	18	**45,3****	0,62	1,30	0,06	**1,38*****	0,029	**3,69***	0,288	**19,9****	1,25

	n	Longueur ovi (mm)	E-T	Largeur ovi (mm)	E-T	Région ovi (mm^2)	E-T
0	30-35	2,38	0,092	1,16	0,06	1,42	0,10
1	18-19	2,26	0,076	1,19	0,08	1,37	0,12
3	15	2,25	0,091	1,16	0,07	1,30	0,078
10	16-17	2,18	0,10	1,16	0,06	1,28	0,10
30	14-19	**1,97***	0,12	1,04	0,08	1,10	0,15
100	17-18	**2,13***	0,082	1,19	0,05	1,29	0,085

MÂLES

Concn (%)	n	Longueur (mm)	E-T	Poids (g)	E-T	CD	E-T	ISH	E-T	ISG	E-T
0	23-25	59,0	0,91	2,72	0,15	1,30	0,029	2,59	0,103	1,30	0,086
1	11-12	**56,3***	0,90	2,61	0,12	1,43	0,057	3,07	0,187	1,21	0,112
3	11	**55,4***	1,0	2,59	0,14	**1,52****	0,045	2,88	0,239	1,41	0,124
10	12	55,8	1,3	2,60	0,21	**1,47****	0,042	2,94	0,206	1,07	0,099
30	11-12	**51,9*****	0,96	**2,05*****	0,14	**1,46***	0,054	**3,98*****	0,204	1,56	0,147
100	11	**52,1*****	0,88	**2,01*****	0,11	**1,41***	0,031	**4,06****	0,44	1,66	0,166

	n	Indice de bandes	E-T	Indice mâle	E-T	Indice total mâle	E-T	Région Ovi (mm^2)	E-T
0	21-25	4,29	0,23	4,15	0,33	8,51	0,44	0,153	0,021
1	10-12	4,20	0,29	**6,20****	0,52	**10,5***	0,77	0,197	0,034
3	12	4,08	0,31	**5,74***	0,50	9,83	0,66	0,153	0,027
10	11-12	4,18	0,33	**5,78***	0,65	**10,2***	0,66	0,179	0,023
30	11-12	3,46	0,37	4,32	0,42	7,92	0,50	0,204	0,028
100	10-11	**1,90*****	0,46	3,34	0,34	**5,18*****	0,63	0,222	0,042

$p < 0,05$, ** $p < 0,009$, ***$p < 0,001$

3. Tests à court et moyen terme avec le méné tête-de-boule et la truite arc-en-ciel

L'objectif de cette étude était d'établir l'application de tests à court (<12 j) et moyen terme (< 30 j) pour le travail d' ISC et d'ISS visant a éliminer/réduire les effets des effluents d'usines sur la reproduction des poissons. Deux espèces dulcicoles, le méné tête-de-boule (*Pimephales promelas*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), ont été utilisées pour cette portion du projet.

Méthodes

Test de reproduction du méné tête-de-boule mature

Des ménés tête-de-boule adultes (12 mois d'âge) ont été utilisés dans le test à court terme (septembre 2006) et dans le test à moyen terme (mai et juin 2006). Les poissons, séparés selon le sexe, ont été élevés dans l'eau du laboratoire (aussi utilisée pour faire les dilutions) tel que décrit dans Martel et al. (2004).

Les deux tests, a court (six jours de pré-exposition et 21 jours d'exposition aux effluents) et moyen terme (sept jours de pré-exposition et 21 jours d'exposition aux effluents) sont des adaptations du test développé par Ankley et al. (2001) et ont été utilisés auparavant à Paprican pour des études avec des effluents (Martel et al., 2004 ; Kovacs et al., 2005) Pour la phase de pré-exposition, les poissons ont été distribués en groupes de deux mâles et quatre femelles par aquariums, contenant chacun deux substrats de frai. La phase d'exposition aux effluents (0 %, 1 %, 10 %, 30 % et 100 % d'effluent) a été initiée en sélectionnant des groupes de poissons qui ont démontrés une bonne performance reproductrice (≥18 œufs/femelle/jour, ≥3 événements de frai sur 7 jours) durant la phase de pré-exposition et ces groupes ont été assignés au hasard à l'un des quatre réplicatifs pour chacun des traitements. Le détail des conditions du test est présenté au Tableau 3.1.

Les poisons ont été contrôlés pour le nombre d'événements de frai, la production d'oeufs et leur fertilisation. Le succès de l'éclosion des œufs a seulement été contrôlé dans le test â moyen terme. À la fin du test, chaque poisson a été pesé et mesuré (les facteurs de condition poids/longueur^3 ont été calculés) et examinés pour l'expression des caractéristiques sexuelles secondaires en utilisant les critères décrits plus tôt (Martel et al., 2004). À la fin du test à moyen terme, les poissons ont été sacrifiés et les gonades excisées et pesées pour calculer l'indice somatique (poids des gonades/poids du corps x 100). Le reste du poisson (incluant la tête, la queue et les viscères excepté les gonades) a été homogénéisé et analysé pour le T (mâles et femelles), l'E2 (femelles) et la vitellogénine chez les mâle tel que décrit auparavant (Martel et al., 2004)

Tests avec la truite immature

Des truites arc-en-ciel immatures ont été utilisées dans des tests de 7 j pour mesurer les niveaux corporaux de la vitellogénine (VTG), une protéine normalement produite seulement par les femelles matures durant l'oogenèse. Les poissons ont été exposés à des concentrations de 0 % (témoin), 10 %, 30 % et 100 % v/v, dans des contenants de 15 L pendant sept jours avec des

renouvellements quotidiens des solutions d'effluent. Les conditions du test sont présentées au Tableau 3.2.

À la fin de la période d'exposition les truites ont été pesées et homogénéisées dans un tampon phosgel à 4 °C et centrifugées à 3100 g pendant 10 minutes. Les surnageants résultants ont été entreposés à -85 °C jusqu'au moment de l'analyse par le biais de procédures d'épreuve immunologiques pour la vitellogénine de truite des Laboratoires Biosense (Bergen, Norvège). Tous les échantillons ont été analysés en double.

Tableau 3.1. Conditions des tests à court et moyen termes avec le méné tête-de-boule.

Date(s) d'échantillonnage des effluents	Test à moyen terme: 30 mai, 6 juin et 13 juin 2006 Test à court terme : 5 septembre 2006
Phase de pré-exposition	7 j pour le test à moyen terme et 6 j pour le test à court terme
Exposition aux effluents, j	21 j pour test à moyen terme et 5 j pour test à court terme
Renouvellements (#/d)	4
Quantité d'effluent utilisé	Test à moyen terme: 5922 L Test à court terme: 1340 L
Réplications	4 (2 mâles et 4 femelles dans 12.5 L)
Densité, g/L	0.33 à 0.40
Alimentation	*Ad libitum*; artémies (*Artemia salina*) fraîches trois fois par jours
Paramètres mesurés	Test à moyen terme • production d'oeufs, nombre de d'événements de frai, • fertilisation et éclosion des oeufs, • longueur, poids, • caractéristiques sexuelles secondaires • chez les mâles: testostérone vitellogénine • chez les femelles: testostérone oestradiol Test à court terme: • production d'oeufs, nombre de d'événements de frai, fertilisation • longueur et poids
pH	7.4 à 8.5
Oxygène dissout, % saturation	55 à 92
Température, °C	24 à 26

Tableau 3.2. Conditions des tests à court terme avec la truite arc-en-ciel immature.

Date d'échantillonnage de l'effluent	13 juin 2006
Exposition aux effluents, j	7
Renouvellements (#/j)	1
Quantité d'effluent utilisé	148 L
Replication	1 (8 poissons dans 15 L)
Densité, g/L	0.33 to 0.49
Alimentation	aucune
Paramètre mesuré	Vitellogénine
pH	7.1 à 8.6
Oxygène dissout, % saturation	75 à 96
Température, °C	12 à 13

Analyse statistiques

Les analyses statistiques ont été faites avec les logiciels STATGRAPHICS Centurion XV Professional (StatPoint Inc., Herndon, VA) et TOXSTAT version 3.5 (1996, Lincoln Research Associates, Bisbee AZ), en suivant les recommandations d'Environnement Canada (2005) sur les méthodes statistiques à employer pour l'analyse des résultats de tests de toxicité. Toutes les comparaisons statistiques ont été faites au niveau de signification de 5 % ($p<0.05$). Lorsque nécessaire les données ont été transformées en log pour respecter les conditions de normalité et d'homogénéité. Quand les données respectaient les conditions de normalité et d'homogénéité, les moyennes d'œufs produits par femelle par jour, le nombre d'événement de frai , le % de fertilisation et d'éclosion des œufs fertilisés ont été compares pour leurs différences significatives par analyse variance (ANOVA) avec l'aquarium étant l'unité de réplication. Le poids du corps et la longueur, le poids des gonades, les niveaux corporaux de E2, T et vitellogénine ont été comparés pour leurs différences significatives en utilisant un modèle d'ANOVA avec les aquariums comme facteur hiérarchique. Pour le poids des gonades un facteur covariant du poids du corps et pour le poids des poissons un facteur covariant de longueur ont été ajoutés. Quand les données ne respectaient pas les conditions de normalité et d'homogénéité, le test non paramétrique Kruskal-Wallis a été utilisé pour déterminer si l'exposition a causé un effet significatif en utilisant les moyennes des paramètres des réplicats. Dans les cas ou l'ANOVA indiquait un effet significatif de l'effluent, le test de Dunnett's ou le test Least Significant Differences (LSD) a été utilise pour identifié les concentrations d'effluent qui étaient significativement différentes des témoins. Quand le tes de Kruskal-Wallis indiquait un effet significatif de l'exposition à l'effluent, le test Steel's Many-One Rank a été utilise pour identifier les concentrations d'effluents qui ont causé une différence significative par rapport aux témoins.

Résultats et discussion

Test de reproduction du méné tête-de-boule à moyen terme

Production d'oeufs et frai: La production d'oeufs des poisons exposés à 100 % d'effluent a été significativement réduite par rapport au témoin (Tableau 3.3). Les concentrations d'effluent plus basses apparaissent avoir causé une légère augmentation de la production d'œufs, mais cette augmentation n'est pas statistiquement significative. Une inspection visuelle des résultats (Diagramme 3.1) montre que la production cumulative d'œufs, durant la phase de pré-exposition et la phase d'exposition aux effluents, était similaire pour tout les traitements excepté à 100 % d'effluent ou la production d'œufs est très diminuée. L'effluent n'a pas affecté de façon significative le nombre d'événements de frai, le pourcentage de fertilisation et d'éclosion. Ceci est différent de plusieurs tests précédents à Paprican ou une moindre production d'œufs est associée à une réduction du nombre des événements de frai (Martel et al., 2004 ; Kovacs et al., 2005 et Kovacs et al., 2007), ce qui suggère que l'effluent de l'usine de La Tuque pourrait avoir affecté la production d'une façon différente.

Tableau 3.3. Production d'oeufs, nombre d'événement de frai, pourcent d'oeufs fertilisés et larves par des ménés tête-de-boule dans un test à court terme avec l'effluent de l'usine de La Tuque. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne (±E-T). Les nombres entre crochets représentent l'étendue.

Traitement	Oeufs/Femelle/Jour	Nombre d'Événements de Frai	Œufs Fertilisés, %	Larves Écloses, %
Témoin	36 (4) [27-46]	14 (0.5) [13-16]	80 (2.5) [76-87]	73 (6) [65-89]
1 % effluent	41 (5.5) [24-49]	16 (1.5) [12-18]	63 (8) [41-76]	57 (5.5) [48-72]
10 % effluent	43 (7) [33-62]	15 (0.5) [14-16]	68 (5) [55-78]	54 (11.5) [29-74]
30 % effluent	38 (7.5) [19-51]	13 (1) [10-14]	68 (6.5) [51-79]	74 (6.5) [63-92]
100 % effluent	17* (4.5) [7-25]	10 (2) [5-14]	64 (18.5) [11-19]	56 (13) [29-91]

* Différence statistiquement significative par ANOVA et le test Least Significant Differences (LSD) ($p < 0.05$).

Indices somatiques : L'IGS moyen des mâles et des femelles est présenté à la Diagramme 3.2. Il n'y a aucune différence significative entre les poissons du témoin et des groupes exposés aux effluents. De même, aucun des quatre paramètres morphologiques des mâles (résultats non illustrés) n'ont été affecté par l'effluent. Chez les femelles, le poids du corps est significativement réduit dans le traitement à 10 % d'effluent seulement (résultats non illustrés) et ceci est plus probablement du a une aberration plutôt qu'une conséquence de l'exposition a l'effluent.

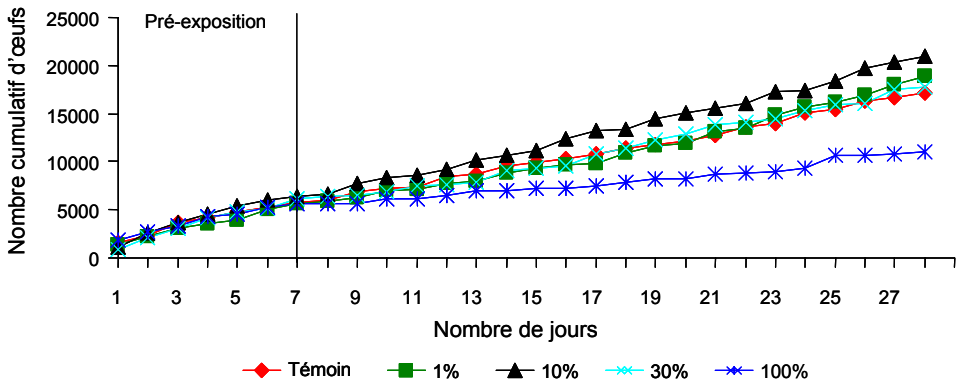

Diagramme 3.1. Production cumulative d'oeufs durant le test à moyen terme avec l'effluent de l'usine de La Tuque durant les mois de mai et juin 2006.

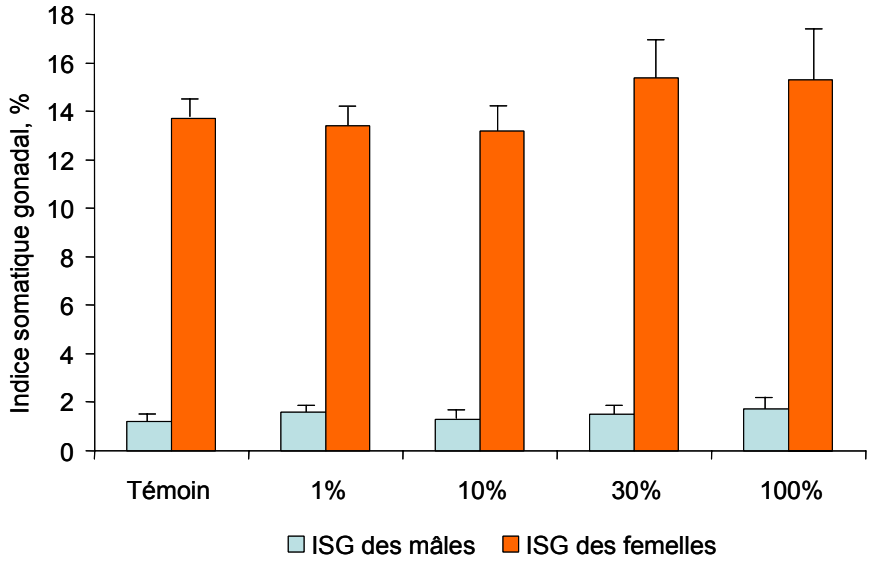

Diagramme 3.2. Indice somatique des gonadal (moyenne et écart-type) des ménés tête-de-boule mâles et femelles dans le test à moyen terme avec l'effluent de l'usine de La Tuque.

Caractéristiques sexuelles secondaires: Chez les mâles, le nombre de tubercules, le point de la nageoire dorsale et la taille du bourrelet dorsal n'ont pas été affectés par l'exposition à l'effluent (résultats non montrés). Les classements pour l'ensemble de la coloration des mâles a été significativement réduite par l'exposition à 100 % d'effluent. Sur une échelle de 0 à 5, les poissons du témoin se classent à 2.8 ± 0.16 (moyenne ± ES) et les poissons du groupe de 100 % d'effluent se classent à 2.3 ± 0.18. La différence est attribuable à des bandes de couleurs plus pâles. Chez les femelles, la longueur de l'ovipositeur était significativement plus courte dans le groupe d'exposition à 100 % d'effluent (longueur de l'ovipositeur des témoins 4.0 ± 0.13 mm ; longueur de l'ovipositeur du groupe exposé à 100 % d'effluent 3.3 ± 0.16 mm). Les bandes plus pâles des mâles et les ovipositeurs plus courts des femelles exposés à la concentration de 100 %

d'effluent correspondent à la réduction de la production d'œufs observée à la même concentration. Aucune évidence de masculinisation des femelles ou de féminisation des mâles n'a été observée.

Hormones stéroïdes et vitellogénine : Chez les mâles, la T et la VTG n'ont pas été significativement affectés par l'exposition à l'effluent (Diagramme 3.3). Bien que le niveau moyen de VTG dans les poissons exposés à 100 % d'effluent était environ 6 fois plus élevées que chez les poissons des autres groupes , cette différence a été causée par seulement un poisson ayant une concentration de VTG de 19,000 ng/g. Les sept autres mâles avaient des niveaux de VTG de ≥642 ng/g, soit similaires aux témoins. Chez les femelles, les niveaux de T et E2 n'ont pas été affectés par l'exposition à l'effluent (Diagramme 3.4).

Test de reproduction du méné tête-de-boule à court terme

Juste avant le début de ce projet, des études à Paprican avec des effluents provenant d'usines de pâte thermomécanique (PTM) ont indiquées que la durée du test à moyen terme avec le méné tête-de-boule pouvaient être réduite de façon substantielle sans perdre de sensibilité, rendant le test plus adapté aux investigations d'ISC/ISS. Les résultats ont montres que les effets d'un effluent d'usine PTM sur la production d'œufs en particulier étaient identiques, si les poissons étaient exposés aux effluents pendant 21 j ou seulement pour ≤ 7 j (Kovacs et al., 2007). Sur la base de ces résultats prometteurs avec des effluents de PTM, il valait la peine d'inclure le test à court terme avec le méné tête-de-boule dans ce projet.

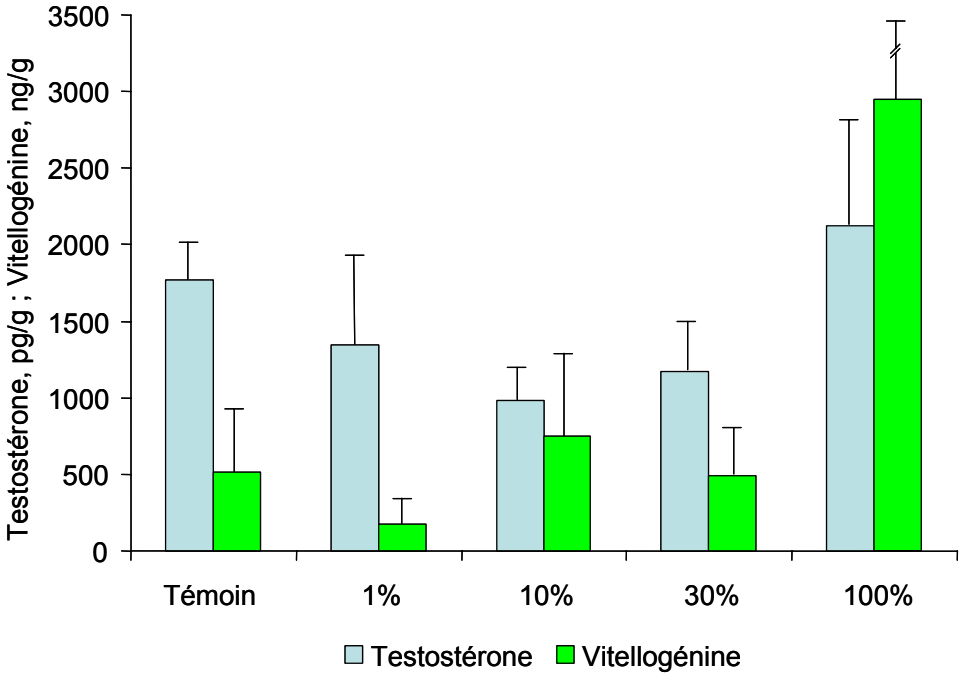

Diagramme 3.3. test à moyen terme : Niveaux de testostérone et de vitellogénine (moyenne et E-T) dans les homogénats des ménés tête-de-boule mâles.

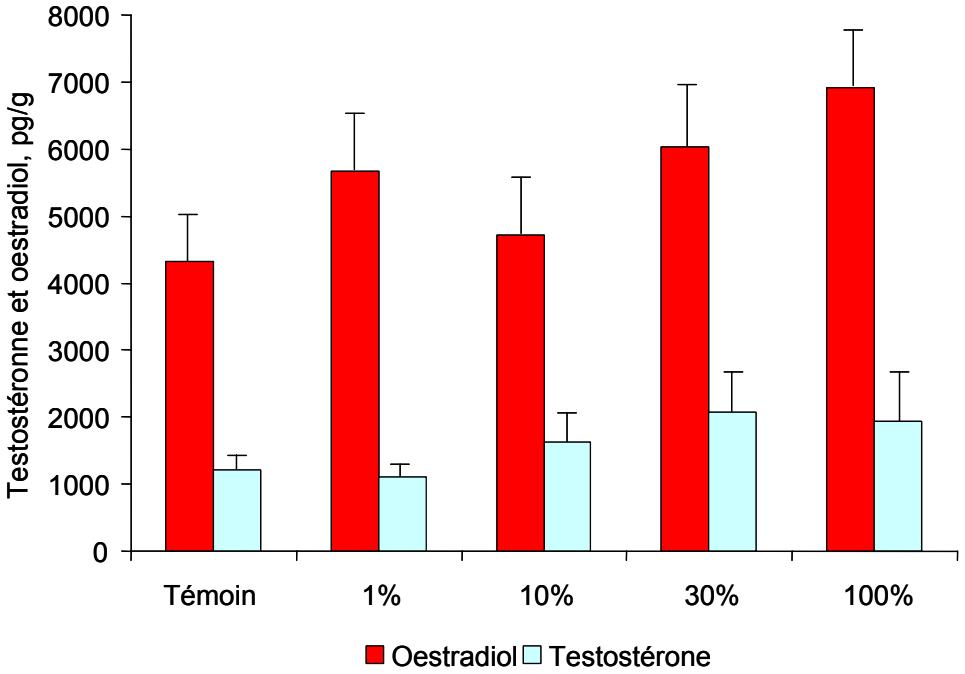

Diagramme 3.4. Test à moyen terme: Niveaux d'oestradiol et de testostérone (moyenne et E-T) dans les homogénats des ménés tête-de-boule femelles.

À l'exception de la fertilisation des oeufs, aucun des paramètres (longueur/poids et caractéristiques sexuelles secondaires, résultats non illustrés) ne furent affectés par l'effluent dans ce test à court terme fait en septembre 2006 (Tableau 3.4). Le pourcentage d'œufs fertilisés était significativement réduit dans les groupes exposés à 10 % et 100 % d'effluent, mais pas dans le groupe exposé à 30 % d'effluent. Les effets inconsistants et indépendants de la concentration sur la fertilisation des œufs pourraient être la conséquence de la durée relativement court du test. Selon notre expérience, quand des ménés tête-de-boule sexuellement naïfs commencent à frayer, la fertilisation et même l'éclosion des œufs produits durant la première semaine de frai peut être très variable. À cause de cela, la fertilisation des œufs et leur éclosion ne sont peut-être pas des paramètres valables pour un test à court terme avec le méné tête-de-boule.

Comme cela s'est produit dans le test à moyen terme, la production d'œufs a augmenté, mais pas de manière significative suite à l'exposition à l'effluent aux concentrations de 1 % à 30 % (Tableau 3.4 et Figure 3.5). Cependant, par contraste avec le test à moyen terme, le test à court terme n'a pas montré de diminution de la production d'œufs à la concentration de 100 %. Cette différence entre les deux tests aurait pu se produire i) parce que le test à court terme est moins sensible ou ii) a cause d'un changement dans la qualité des effluents entre mai/juin 2006 et septembre 2006.

Tableau 3.4. Production d'oeufs, nombre d'événements de frai et pourcent d'oeufs fertilisés par les ménés tête-de-boule dans un test à court terme avec l'effluent de l'usine de La Tuque. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne (± E-T). Les nombres entre crochets représentent l'étendue.

Traitement	Œufs/Femelle/Jour	Nombre d'événements de frai	Œufs fertilisés, %
Témoin	48 (42) [45-53]	4 (0.5) [3-5]	90 (2) [86-94]
1 % effluent	60 (13.5) [27-83]	4 (0.5) [2-5]	90 (2.5) [85-96]
10 % effluent	73 (13) [50-105]	4 (0.25) [4-5]	58* (12) [23-78]
30 % effluent	56 (9) [44-83]	5 (0.3) [4-5]	72 (10) [50-92]
100 % effluent	53 (7) [37-70]	4 (0.3) [3-4]	68* (5) [56-78]

* Différence statistique significative par ANOVA et le test de Dunnet's ($p < 0.05$)

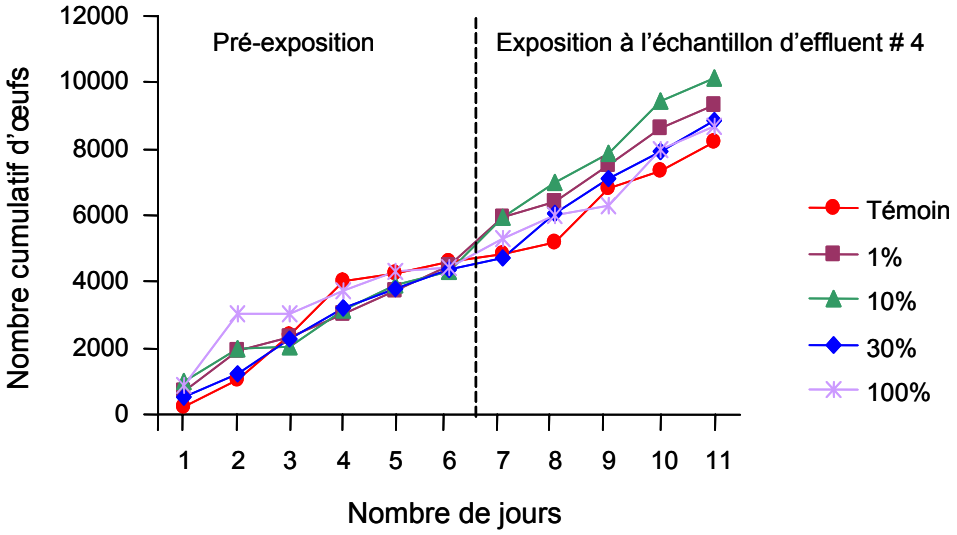

Diagramme 3.5. Production cumulative d'œufs durant le test à court terme avec l'effluent de l'usine de La Tuque durant le mois de septembre 2006.

Les faits suggèrent qu'un changement de la qualité des effluents est la cause la plus probable de la différence observée. Premièrement, les résultats de production d'œufs pour les cinq premiers jours du test à moyen terme fait en mai/juin 2006 ont été analysés pour les effets des effluents car cette durée correspond à la durée du test à court terme de septembre 2006. Une simple comparaison avec un test-t entre la production des poissons du groupe témoin et ceux exposés à 100 % d'effluent indique que ceux-ci montraient déjà une diminution significative de la production d'œufs après seulement cinq jours d'exposition. Ceci montre qu'une durée d'exposition plus courte n'a pas rendu le test moins sensible. Deuxièmement, le profile chimique

des effluents fournit un aperçu supplémentaire d'un changement dans le temps de la qualité des effluents (voir la Section 7).

Niveaux de vitellogénine dans les truites immatures

L'effluent n'a pas eu d'effet statistiquement significatif sur les niveaux de VTG dans les homogénats préparés à partir des corps de truites arc-en-ciel (Diagramme 3.6).

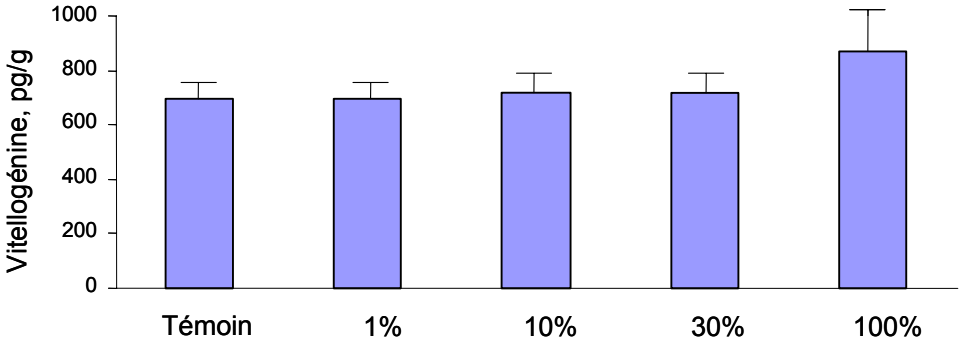

Diagramme 3.6. Niveaux de VTG (moyenne et E-T) mesurés à partir d'homogénats de truite arc-en-ciel immature exposées pendant 7 j aux effluents de l'usine de La Tuque.

Conclusions

- L'effluent de l'usine de La Tuque a des effets minimaux (seulement à la concentration de 100 %) ou pas d'effets sur les indicateurs de capacité de reproduction des ménés tête-de-boule et truite arc-en-ciel évalués dans des test à court et à moyen terme. Ceci est en accord général avec les résultats de l'étude de suivi des poissons sur le terrain ainsi que les résultats du test de cycle vital avec le méné tête-de-boule.
- La production d'oeufs apparaît être le paramètre le plus utile dans les tests avec le méné tête-de-boule.
  Ce paramètre :
  - A fourni des patrons de réponse dépendants de la concentration consistants, c'est à dire une légère augmentation aux concentrations entre 1 % et 30 % dans les tests à court et à moyen terme et une réduction significative à 100 % dans le test à moyen terme.
  - A détecté des différences dans la qualité des effluents, c'est à dire l'effluent contenant le moins de substances organiques extractibles n'a pas eu d'effet sur la production d'œufs alors que l'effluent avec le plus de substances organiques a réduit la production d'œufs à la concentration de 100 % (voir la Section 7).
- Les résultats indiquent que les effets des effluents sur la production d'œufs des ménés tête-de-boule peuvent être détecté de façon tout aussi sure par des tests à court terme que par des tests à moyen terme ou de cycle vital. Le test à court terme serait plus applicable aux études d'ISC/ISS.

4. Essais à court et moyen terme avec des choquemorts

L'objectif des essais avec les choquemorts était d'étudier les effets des effluents chez une espèce estuarienne. Les choquemorts sont endémiques sur la Côte Est du Canada et des États-Unis et constituent une espèce importante de contrôle dans des applications sur le terrain, dans des cours d'eau artificiels et en laboratoire pour les effluents des usines de pâtes et papiers (Leblanc et al., 1997; Dubé et MacLatchy, 2000; 2001). Plusieurs usines canadiennes sont situées sur la Côte, et il est important d'évaluer les effets des effluents dans un environnement salin puisque les processus physiologiques des poissons peuvent différer dans ces environnements. Les essais à court terme et à moyen terme (reproduction) ont été normalisés (MacLatchy et al., 2003; Peters, 2005) en les comparant à des désintégrateurs endocriniens modèles.

Méthodes

Deux ensembles d'exposition à l'effluent final de La Tuque ont été menés sur les choquemorts (*Fundulus heteroclitus*) à l'Université du Nouveau-Brunswick, à Saint-Jean (NB). Dans le premier ensemble d'exposition, les choquemorts mâles et femelles ont été exposés pendant sept jours pour déterminer les effets sur le système endocrinien de reproduction. Dans le deuxième ensemble, des choquemorts adultes ont été exposés à l'effluent avant et pendant un essai de reproduction adulte; les effets sur les rejetons ont également été évalués au cours de l'exposition à l'effluent jusqu'à l'automne. La référence à l'automne n'est vraiment pas très utile. Une durée serait plus appropriée. Dans les deux expériences, les choquemorts ont été acclimatés à des conditions d'essai à renouvellement continu pendant cinq jours avant l'exposition à l'effluent. Les concentrations d'effluent pour les deux essais étaient de 0 % (contrôle), 1 %, 10 %, 30 % et 100 %. Les détails des paramètres d'exposition se retrouvent aux Tableaux 4.1 et 4.2. Les effluents étaient livrés une fois par semaine et étaient aérés et maintenus à 4 °C dans des conteneurs de stockage isolés et ramenés à la température ambiante quotidiennement avant leur utilisation.

Au cours de l'exposition qui a duré sept jours, l'échantillonnage a été réalisé le 9 juin 2006 puisque les niveaux maxima de reproduction coïncidaient avec la pleine lune (11 juin 2006). Le cœfficient de condition, l'ISG et l'ISH ont été calculés à partir des mesures du poids corporel et de la longueur, du poids des gonades et du poids du foie. Les niveaux de T, 11-KT et E2 dans le plasma ont été mesurés en utilisant le RIA. La T et le 11-KT ont été mesurés chez les mâles, la T et le E2 chez les femelles. Les gonades ont été incubées dans le Medium 199 en vue d'une synthèse de stéroïdes *in vitro*; les foies ont immédiatement été congelés à -80ºC et conservés pour effectuer une analyse des niveaux d'hydroxylase (l'analyse n'est pas achevée). MacLatchy et al., (2003, 2005) incluent les détails des protocoles pour les expositions et les analyses des paramètres .

Dans l'essai de reproduction des choquemorts, (Peters, 2005), les adultes mâles recrudescents (n=6/aquarium) ont été exposés dans trois cuves / traitement et les adultes femelles recrudescentes (n=6/aquarium) dans trois cuves / traitement séparées pendant 18 jours (jusqu'au 6 juillet 2006). La présence de douves cutanées et de poux du poisson a provoqué le regroupement des poissons les plus sains dans 18 aquariums (n=6 contrôle; n=3 autres traitements) contenant trois mâles et trois femelles aux fins de reproduction. Au cours de la

période de frai, une cage grillagée (faite à partir de filets aquicoles) a été placée dans chacun des aquariums, à 2-3 cm du fond. Les œufs tombent dans le fond mais les adultes sont empêchés de les consommer. Les œufs ont été recueillis quotidiennement pendant sept jours en raclant la cuve au moyen d'une fine épuisette. Les concentrations de l'exposition ont été maintenues pendant toute la semaine de collecte. Les œufs recueillis ont été placés dans des boîtes de Petri à une densité de 40 œufs par boîte, et les concentrations d'exposition ont été replacées manuellement dans chacune des boîtes une fois par jour jusqu'à l'éclosion des œufs. Le 13 juillet 2006, les adultes ont été euthanasiés et l'exposition s'est poursuivie avec les œufs.

Tableau 4.1. Exposition des choquemorts adultes pendant sept jours

Paramètre d'exposition	
Date(s) de l'échantillonnage	9 juin 2006
Renouvellements de solution (#/jour)	4
Répétitions	6 (0 %); 3 (1, 10, 30, 100 %)
Densités de charge	3,69 ± 0,014 g/L
Paramètres mesurés	K, ISH, ISG; plasma T, 11-KT et E2
pH, DO, température	pH 7-8; >80 %; t=19 ± 2 C

Tableau 4.2. Essai de reproduction pour les choquemorts adultes.

Paramètre d'exposition	
Date(s) d'échantillonnage	6-13 juillet 2006; diverses, de juillet à octobre 2006
Renouvellements de solution (#/jour)	4
Répétitions	6 (0 %); 3 (1, 10, 30, 100 %)
	3,12 ± 0,40/3.73 ± 0,014 g/L (F/M isolés) 2,81 ± 0,38 g/L (reproduction F & M)
Paramètres mesurés	Production cumulative d'œufs; % d'œufs fertilisés; période d'éclosion; taille à l'éclosion et à 5 semaines; survie
pH, DO, température	pH 7-8; >80 %; t=19 ± 2 °C

Les œufs ont été inspectés visuellement tous les jours pour vérifier le développement de segmentation et les œufs non fertilisés ont été retirés. Les concentrations d'essai ont été maintenues selon chaque traitement durant tout le développement jusqu'à la fin de l'exposition; le développement jusqu'au stade juvénile a été suivi. Après l'éclosion, les larves ont été transférées dans des béchers de 50 ml contenant des concentrations d'exposition appropriées à une densité de 10 larves par bécher. Les jeunes poissons ont été remis dans l'aquarium d'essai originel (contenant 5 L de traitement approprié) lorsque la membrane vitelline a été entièrement absorbée et que les poissons ont commencé à nager. Les larves ont été nourries de crevettes des salines (*Artemia sp.* nauplius) deux fois par jour et de moulées pour alevins une fois par jour.

La taille des larves a été vérifiée au moment de l'éclosion et à cinq semaines en prenant des mesures de longueur moyenne de 25 poissons dans chacune des cuves. La survie des poissons a été surveillée jusqu'au 17 octobre 2006. À la fin de l'expérience, les poissons ont été suranesthésiés pour les euthanasier.

Analyses statistiques

Les données ont été vérifiées en ce qui a trait à la normalité et évaluées en fonction de leur homogénéité en utilisant l'essai Levine avant l'analyse; des transformations logarithmiques ont été utilisées si les données ne répondaient pas aux hypothèses. Les poids corporels, les stéroïdes du plasma, la période d'éclosion, la taille à l'éclosion, la taille à cinq semaines, le % de survie et le % de fertilisation ont été testés avec plusieurs critères de classification de l'ANOVA (Kruskal-Wallis si non paramétriques) suivis d'essais Tukey ou Dunn. Les critères de classification de l'ANCOVA ont été utilisés pour vérifier la condition, la taille des gonades et du foie (selon la Section 1, Enquête sur les poissons sauvages). La production cumulative d'œufs a été vérifiée par deux facteurs d'ANOVA. Les analyses statistiques ont été menées avec SigmaStat 3 et Systat 11 (Systat Software Inc., San Jose, CA).

Résultats et discussion

Exposition des choquemorts adultes pendant sept jours

Il n'y avait pas de différences significatives parmi le K, le ISH ou le ISG des poissons mâles et femelles, à l'exception des foies beaucoup plus petits chez les mâles à une concentration de 100 % (Tableau 4.3). Il n'y avait également pas de différence dans les niveaux de stéroïdes du plasma, à l'exception d'une réduction de 11-KT chez les mâles à une concentration de 1 % (Tableau 4.3).

Essai de reproduction des choquemorts adultes

La fécondité (total des œufs pondus/femelle) a été augmentée de façon significative chez les poissons exposés à une concentration de 30 et 100 % des effluents de La Tuque (Diagramme 4.1). Le pourcentage de fertilisation variait d'un niveau bas de 71,2 $\pm$ 13 % (0 %) à un niveau élevé de 90,2 $\pm$ 0,76 % (1 %) mais il n'y avait pas de différences importantes parmi les traitements (données non illustrées). Il n'y avait pas de différences significatives en ce qui a trait au moment de l'éclosion (Diagramme 4.2). À l'éclosion, les concentrations de 1 et 100 % d'effluent avaient des larves plus grosses (Diagramme 4.3A); à la cinquième semaine, les poissons dans une concentration de 10 % étaient plus gros que les poissons de contrôle, mais il n'y avait pas de différence parmi les poissons exposés à une concentration de 1-100 % d'effluent (Diagramme 4.3B). La survie jusqu'au 17 octobre 2006 n'a pas varié parmi les traitements et s'échelonnait de 100 % (1 % d'effluent) à 74,7 $\pm$ 10 % (100 % d'effluent); la survie dans 0 % d'effluent s'établissait à 98,2$\pm$ 2,0 %

Tableau 4.3. Cœfficient de condition (K), indice somatique gonadal (ISG), indice somatique hépatique (ISH) et niveaux de stéroïdes du plasma chez les choquemorts mâles et femelles exposés aux effluents de La Tuque pendant sept jours en juin 2006. Toutes les valeurs sont moyennes ± (E-T). Les valeurs affichant d'autres lettres sont très différentes (p<0,05). Tailles des échantillons (0 % répétitions = 6; 1-100 % = 3).

Traitement	Poids (g)	K (%)	ISG (%)	ISH (%)	T (ng/L)	11-KT (ng/L)	E2 (ng/L)
Mâles							
0 %	8,83 (0,68)	1,43 (0,065)	1,86 (0,19)	2,05a (0,40)	0,699 (0,29)	1,51a (0,21)	
1 %	8,00 (0,63)	1,48 (0,11)	1,94 (0,18)	1,47ab (0,21)	0,223 (0,014)	0,602b (0,087)	
10 %	8,21 (1,21)	1,32 (0,15)	2,13 (0,32)	2,55a (0,74)	0,388 (0,11)	0,969ab (0,26)	
30 %	8,89 (1,0)	1,35 (0,097)	1,43 (0,22)	1,22ab (0,12)	0,338 (0,014)	0,733ab (0,11)	
100 %	9,5 (0,81)	1,22 (0,079)	1,82 (0,25)	0,784b (0,13)	0,359 (0,011)	1,10ab (0,23)	
Femelles							
0 %	9,43 (1,2)	1,17 (0,19)	5,87 (1,4)	2,60 (0,40)	0,710 (0,16)		3,44 (0,55)
1 %	10,3 (1,1)	1,52 (0,11)	4,31 (1,0)	2,38 (0,35)	0,743 (0,16)		3,39 (0,51)
10 %	11,1 (1,2)	1,28 (0,17)	3,98 (0,39)	1,90 (0,094)	0,520 (0,036)		3,95 (0,77)
30 %	10,4 (0,64)	1,38 (0,069)	4,36 (0,52)	1,75 (0,23)	0,460 (0,035)		3,74 (0,38)
100 %	9,57 (0,91)	1,40 (0,07)	3,81 (0,45)	1,68 (0,16)	0,484 (0,021)		3,12 (0,45)

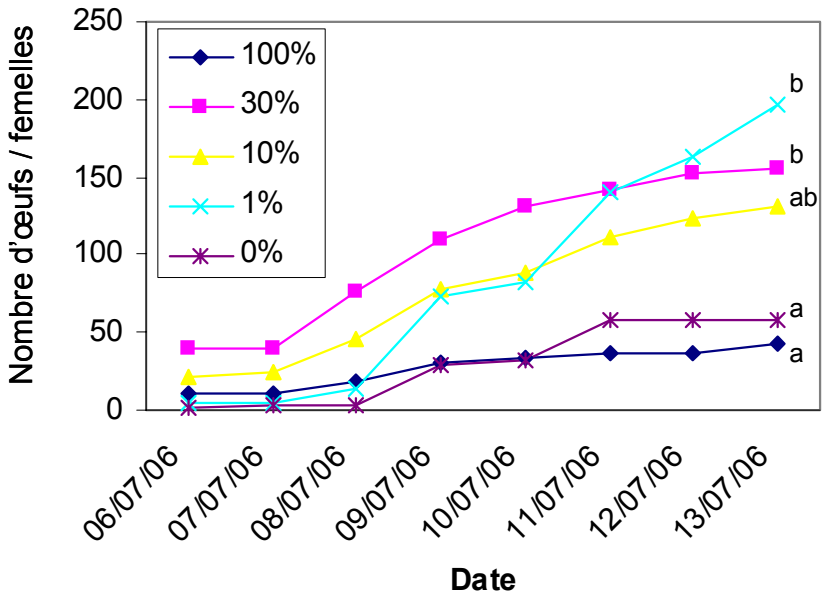

Diagramme 4.1. Le total des œufs pondus par les choquemorts femelles exposées à l'effluent final de La Tuque entre le 7 juin 2006 et le 13 juin 2006.

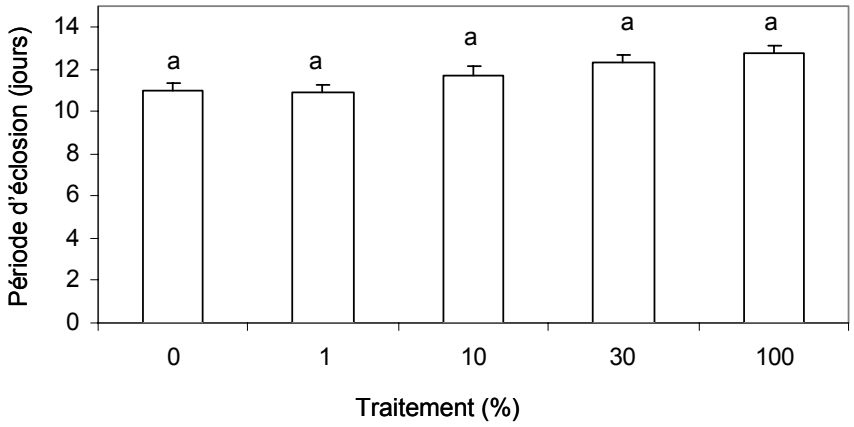

Diagramme 4.2. Période moyenne d'éclosion des larves de choquemorts provenant des parents et les œufs exposés à l'effluent de La Tuque en juin 2006.

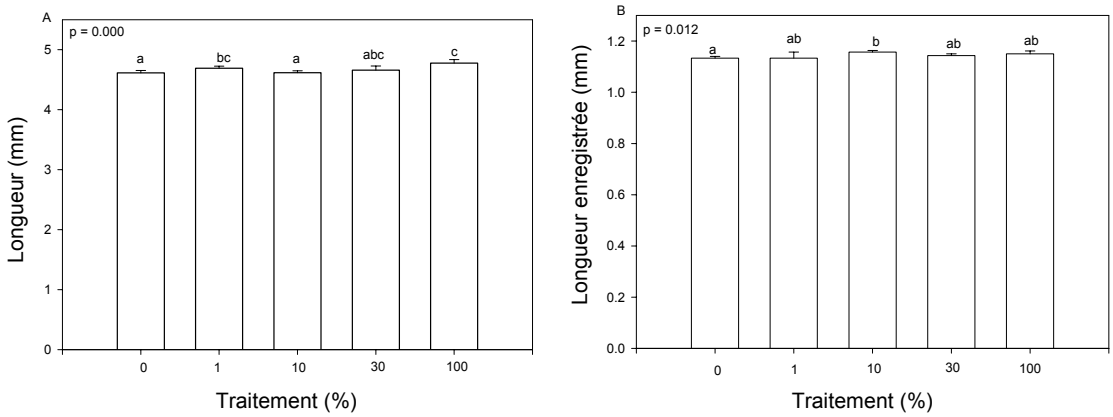

Diagramme 4.3. Longueur (A) à l'éclosion et longueur (transformation logarithmique) (B) à la cinquième semaine après l'éclosion des rejetons de choquemorts exposés à l'effluent de La Tuque.

Conclusions

L'effet prédominant des effluents de La Tuque sur les choquemorts est une augmentation générale de la production cumulative d'œufs et de la taille à des concentrations moyennes d'effluent.

5. Essais sur les poisons zèbres

Les poissons zèbres ont été utilisés pour évaluer les effets des effluents des usines de pâte sur la production d'œufs et l'expression génétique ovarienne. Les poissons zèbres ont été choisis pour ces études parce qu'ils sont sexuellement mature toute l'année en laboratoire, ce qui pourrait permettre de surmonter les problèmes inhérents de reproduction saisonnière avec d'autres espèces pour les essais. De même, les essais pour évaluer les effets des effluents sur la production d'œufs pourraient être menés à l'intérieur de périodes de temps relativement courtes avec des volumes limités d'effluent. Les études antérieures avec les poissons zèbres ont démontré que l'exposition aux condensats de récupération des produits chimiques des usines kraft a réduit la production d'œufs et l'expression de l'ARNm de gènes sélectionnés qui contrôlent les étapes du chemin biosynthétique des stéroïdes (Ings, 2006).

Méthodes

Les poissons zèbres adultes sexuellement matures ont été exposés à différentes concentrations d'effluent pendant sept jours et les effets sur la production d'œufs ont été contrôlés (Tableau 5.1). Les poissons zèbres adultes provenaient de DAP International (Etobicoke (ON). Les poissons ont été transférés au Hagen Aqualab de l'Université de Guelph où ils ont été maintenus dans des unités d'habitats aquatiques, (Aquatic Habitats, Apopka FL) à une température de 28 °C dans une enceinte environnementale. Les poissons ont été maintenus dans de l'eau de puits recirculée durant des photopériodes de 12 heures de clarté et 12 heures de noirceur. Les poissons étaient nourris à satiété de deux à trois fois par jour avec un mélange commercial pour alevins (Martin Mills, Elmira, ON) et des vers de vase congelés (Oregon Desert Brine Shrimp Co., Lakeview, OR).

Les poissons zèbres adultes sexuellement matures ont été identifiés selon leur sexe et deux poissons zèbres mâles et deux femelles ont été placés dans des contenants de reproduction stationnaires avec un litre d'eau de puits du Hagen Aqualab. Ces récipients consistaient en deux contenants de plastique empilés l'un sur l'autre. Le fond du contenant supérieur a été remplacé par un grillage pour que les œufs puissent tomber et être séparés des poissons jusqu'à la cueillette. Chaque traitement contenait six contenants de reproduction qui ont été placés dans un ordre aléatoire dans de grands bains d'eau à une température de 28º C. L'eau était renouvelée quotidiennement et les poissons ont été maintenus dans des conditions expérimentales pendant deux jours avant la période de pré-exposition qui a duré sept jours. Les poissons ont ensuite été exposés pendant sept jours à des concentrations de 0, 1, 10, 30 et 65 % d'effluents d'usine de pâte dilués avec de l'eau de puits du Hagen Aqualab. Les effluents étaient remplacés sur une base journalière.

Les œufs dans les contenants de reproduction ont été recueillis par siphonnement à l'aide d'une pipette Pasteur et comptés. À la fin de l'exposition, les poissons ont reçu une surdose de MS-222 (Sigma, St. Louis, MO) et pesés. Les ovaires des poissons dans chacun des contenants de reproduction ont été pesés et entreposés dans un RNALater® (Ambion, Austin, TX) à une température de 4 °C jusqu'à la séparation en croissance primaire, aux stades de follicules pré-vitellogéniques et vitellogéniques pour l'extraction de l'ARN. Les corps ont été congelés

instantanément dans de l'azote liquide et entreposés à une température de -80º C avant l'extraction des stéroïdes.

L'extraction de l'ARN, la transcription inverse et la PCR en temps réel ont suivi les méthodes décrites par Ings et Van Der Kraak (2006). Les gènes évalués incluaient la protéine régulatrice aigüe de stéroïdes (StAR), P450-aromatase A (P450-aromA) et stéroïdes 3β-hydroxy déshydrogénase (3β-HSD).

Tableau 5.1. Conditions d'essai pour les essais à court terme avec les poissons zèbres adultes

Date(s)	Juillet 11-26 2006
Étape de pré-exposition	2 jr pour confirmer le dépôt des œufs 7 jr de cueillette des œufs pour la base de référence
Exposition aux effluents, jr	7 jr pour la cueillette des œufs pour vérifier les effets du traitement
Renouvellements de la cuve (#/jr)	Exposition non stationnaire, renouvellement quotidien
Quantité d'effluents utilisée	52 litres : concentrations à 0, 1, 10, 30 et 65 % d'effluent
Répétitions	6 (2 mâles et 2 femelles dans 1 L)
Densité de charge, g/L	1,2- 2,8 g/l
Alimentation	*À satiété*; moulée pour alevins deux fois par jour; vers de vase à tous les deux jours
Paramètres mesurés	• Production d'œufs, nombre de frai • Poids • Expression de StAR, P450 arom, 3β-HSD dans les trois stades des follicules ovariens (croissance primaire, follicules pré-vitellogéniques et vitellogéniques) • Chez les mâles : testostérone et vitellogénine dans le corps entier • Chez les femelles: testostérone et estradiol dans le corps entier
pH	7,0 to 8,0
Oxygène dissous, % saturation	81-99
Température, °C	26 à 29

Résultats et discussion

La production cumulative d'œufs des poissons zèbres durant la période de pré-exposition et suivant l'exposition à des concentrations variées d'effluent de La Tuque est illustrée au Diagramme 5.1. L'interprétation des effets des effluents sur la production d'œufs a été compliquée par la grande variation de production d'œufs au cours de la période de pré-exposition. Dans cet essai, la production cumulative d'œufs dans le groupe de contrôle et le groupe exposé à une concentration de 30 % d'effluent a varié de plus du double.

Conséquemment, nous avons déterminé la production d'œufs durant la période d'exposition et illustré les réductions de production d'œufs, comparativement au contrôle dans les groupes à une concentration de 10 et 65 % (Diagramme 5.2). La production d'œufs dans le groupe à une concentration de 30 % d'effluent était similaire aux contrôles.

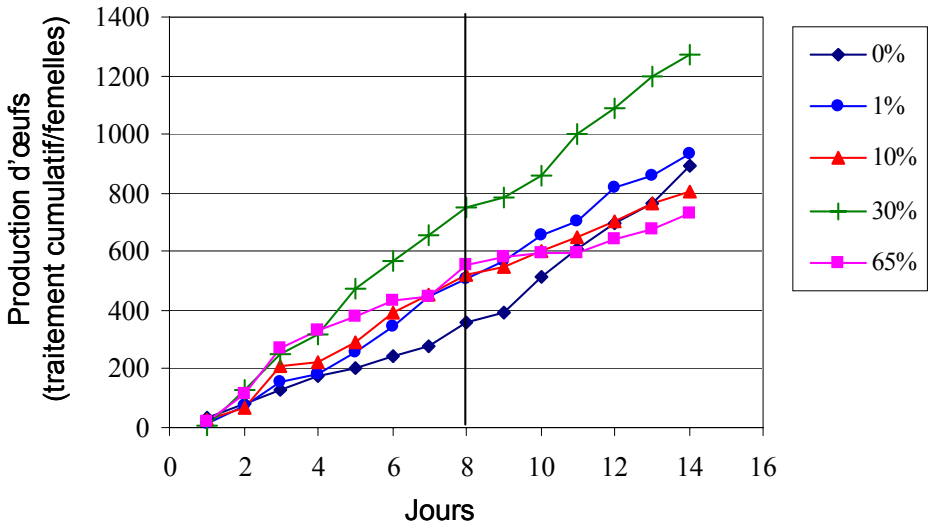

Diagramme 5.1. Production cumulative d'œufs des poissons zèbres femelles durant une période de pré-exposition et les sept jours suivants d'exposition à des concentrations variées des effluents de La Tuque. La ligne verticale au jour 8 indique le début de la période d'exposition.

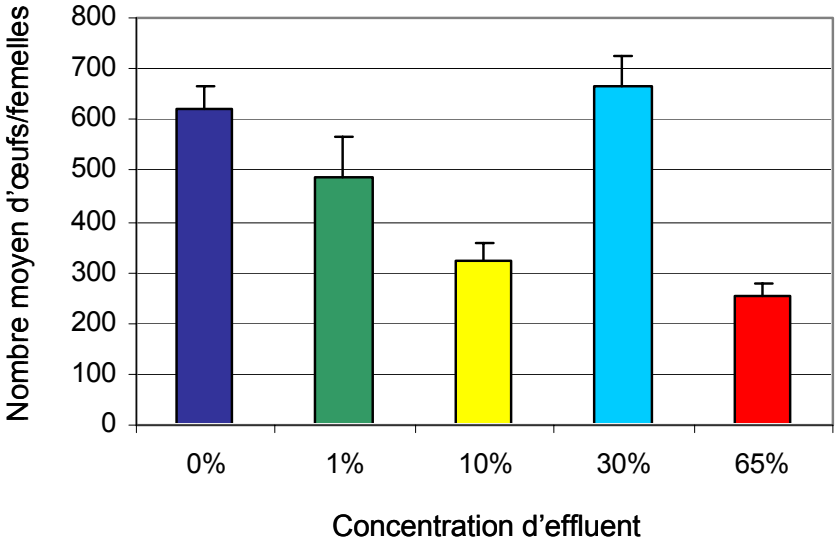

Diagramme 5.2. Production d'œufs (moyenne ±E-T; n=6 cuves) des poissons zèbres femelles suivant sept jours d'exposition à des concentrations variées d'effluents de La Tuque.

Au cours de la période de pré-exposition, la déposition d'œufs s'est effectuée à 71 % dans les cuves sur une période de collecte de sept jours (Diagramme 5.3) Le taux de déposition a été réduit à 53 % dans les cuves en ce qui a trait aux poissons zèbres suivant l'exposition aux effluents de l'usine de pâte. La réduction du taux de déposition a été la plus prononcée en ce qui concerne les poissons exposés à une concentration de 65 % d'effluent où les œufs étaient présents à seulement 33 % (14 sur 42) lors des jours de cueillette, comparativement à 81 % (34 sur 42) lors des jours de cueillette pour ce qui est du groupe de contrôle.

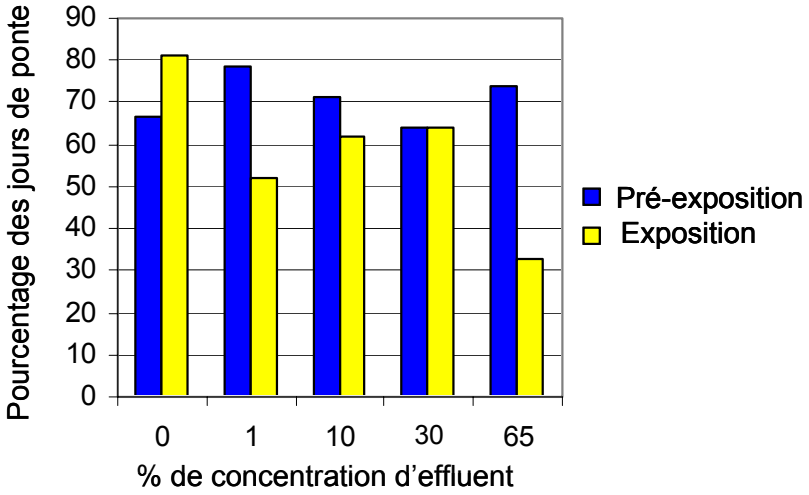

Diagramme 5.3. Événements de frai chez les poissons zèbres adultes durant la période de pré-exposition et suivant l'exposition à des concentrations variées d'effluent d'usine de pâte. Le pourcentage des jours de frai a été déterminé à partir du nombre de jours où les œufs étaient présents dans les cuves, comparativement au nombre total de jours où les cuves ont été échantillonnées.

L'exposition à des concentrations de 10 et 65 % d'effluent n'a pas eu d'effet sur l'expression de 3β-HSD, P450aromA et StAR (Diagramme 5.4). Alors que les données étaient très variables, il y a eu plus de 50 % de réduction dans l'expression moyenne de StAR dans le groupe à concentration élevée. Les analyses des niveaux de stéroïdes et des VTG sont toujours en cours.

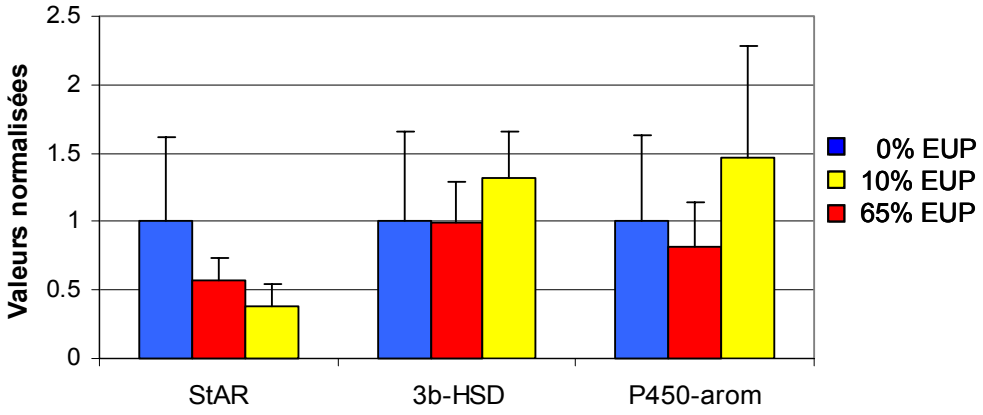

Diagramme 5.4. Expression du StAR, 3β-HSD et P450-aromA dans les follicules ovariens vitellogéniques chez les poissons zébrés exposés à des concentrations de 0, 10 et 65 % d'effluent d'usine de pâte. Expression sur les gènes de la protéine normalisée à β-actin. n=9-10 poissons par traitement.

Conclusions

Ces études ont démontré que les effluents de La Tuque lorsque testés à une concentration finale de 65 % ont causé une réduction significative de la production d'œufs et une diminution marquée du nombre d'événements de frai. Il n'y a pas eu d'effets significatifs de la part des effluents sur l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse stéroïdienne lorsqu'examinée dans les follicules ovariens vitellogéniques.

6. Détermination de la force androgénique des effluents d'usine de pâte en utilisant des épinoches à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*)

L'objectif des études des épinoches était de procurer des paramètres *in vivo* concernant les effets androgéniques en parallèle avec les paramètres oestrogéniques fournis par d'autres méthodes utilisées dans l'étude. Les effets androgéniques chez les poissons ont été documentés après une exposition aux effluents d'usines de pâtes et papiers, comprenant la virilisation des gambusies (Ellis et al., 2003) et l'induction du gène indépendant androgénique pour la spiggin, une protéine semblable à de la colle produite par l'épinoche mâle (Katsiadaki et al., 2002). En plus du paramètre ultime androgénique primaire qui est développé, les mesures de synthèse stéroïdienne et oestrogénique sont incluses dans les mêmes bioessais des épinoches.

Matériels et méthodes

***Conception expérimentale* :** Les poissons ont été exposés aux effluents de La Tuque à des concentrations de 0, 1, 10, et 100 % dans un système à recyclage d'eau (remplacement total de 50 % sur 24 heures) pour sept et 21 jours dans des cuves doubles, en utilisant de l'eau saumâtre (5 ppt) à titre de diluant. La température d'exposition a été maintenue à 15 ± 0,5 °C par le biais d'un contrôle de la température ambiante de la pièce. Les effluents ont également été ajustés à un degré de salinité de 5 ppt avant l'expérience. Les expositions à renouvellement statique pour les contrôles positifs (méthyltestostérone) et négatifs (E2) ont été menées simultanément avec l'expérience sur les effluents. De huit à 10 mâles et femelles ont été échantillonnés par traitement et par période. La conception et l'élaboration d'une méthode quantitative de PCR en temps réel pour la mesure de la spiggin (rein postérieur chez les femelles) et de la VTG (foie chez les mâles) l'ARNm est en cours en vue d'étudier simultanément les paramètres androgéniques et oestrogéniques. Les autres paramètres étudiés comprenaient la production de stéroïdes ovariens *in vitro*, les caractéristiques sexuelles secondaires telles la coloration spécifique des mâles (un paramètre ultime androgénique, la hauteur de la cellule épithéliale du rein et l'examen histologique des glycoprotéines dans le rein, en tant qu'indicateurs alternatifs de la production de spiggin).

***Épinoches* :** Les épinoches à trois épines ont été capturées au moyen de filet seine dans l'estuaire de la rivière Flat, à l'Île-du-Prince-Édouard en décembre 2006. Le bassin de la rivière Flat est relativement peu touché en raison d'une faible utilisation des sols consacrés à l'agriculture. Les épinoches ont été transportées au laboratoire de l'Université de l'Île-du-Prince-Édouard et transférées dans des aquariums maintenus à une température de 5ºC et à une salinité de 15 ppt. L'eau a été graduellement changée pour atteindre 5 ppt de salinité et 15º C sur une période d'une semaine.

***Production de stéroïdes in vitro* :** Pour chaque poisson, en quatre exemplaires, des sections de ~25 mg d'ovaires ont été ajoutées à 1 mL de milieu tamponné 199 dans 24 plaques à cupules. Deux des cupules ont été stimulées avec du forskolin et les deux cupules additionnelles ont été dosées avec un transporteur d'éthanol à titre de mesure de production de stéroïdes basaux. Les milieux ont été retirés et congelés en attente de l'analyse après une incubation de 18 h à 18° C.

Hauteur de la cellule épithéliale du rein: Les reins ont été retirés des poissons et placés dans une solution de 10 % de formaline tamponnées neutre. Ces échantillons ont été déshydratés progressivement dans de l'éthanol, dépouillés dans du xylène et enrobés dans de la cire. Les sections histologiques du rein retirées (4 µm) ont été coupées et imprégnées soit d'hémotoxyline et d'éosine (HE) ou d'acide peroxydique / réactif de Schiff et de bleu d'aniline (PAS).La hauteur des cellules épithéliales a été évaluée numériquement dans des tubules circulaires.

***Androgènes d'effluent*:** Des fractions d'effluent ont été isolées en utilisant des méthodes d'extraction en phase liquide-liquide et en phase solide. Les fractions seront analysées en ce qui a trait aux composantes oestrogéniques et androgéniques, en utilisant les paramètres de liant de récepteur et l'inhibition enzymatique

Résultats

Les essais à partir des effluents de La Tuque ont été achevés, n'enregistrant qu'une seule mortalité dans la concentration d'exposition à 1 %. Il n'y avait pas de signe de coloration typique trouvé chez les mâles reproducteurs et les femelles épinoches au cours, soit des sept ou 21 jours d'exposition. La taille des gonades, du foie et le cœfficient de condition ont été examinés et aucune différence statistique n'a été découverte soit au moment de l'échantillonnage ou dans l'un ou l'autre des sexes (données non illustrées). La taille des reins chez les femelles a été examinée à titre d'indicateur potentiel d'androgénicité (puisque les cellules néphrétiques s'hypertrophient lorsque de la spiggin est produite). Bien que la taille des reins ait été légèrement élevée à 21 jours d'exposition à une concentration de 100 % d'effluent, le changement n'était pas statistiquement significatif (Diagramme 6.1).

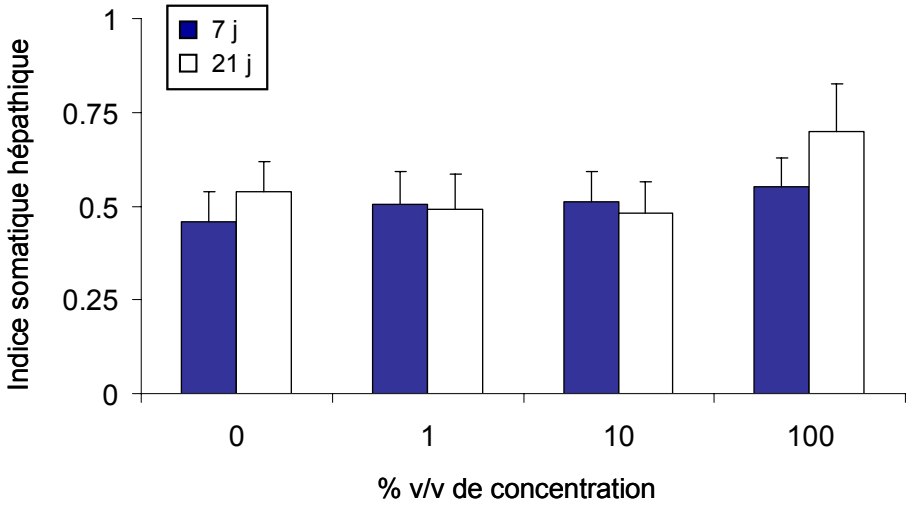

Diagramme 6.1. L'indice somatique néphrétique dans l'exposition des épinoches à trois épines aux effluents de l'usine de pâte de La Tuque pendant sept et 21 jours.

Les sections histologiques des reins sont présentement en préparation et les analyses histologiques sont en cours. Des extraits d'effluent ont été préparés et sont en attente d'analyse. L'analyse ANRm de la spiggin est présentement en cours.

Conclusions

Les données de survie suggèrent que le traitement des effluents de La Tuque est très efficace pour retirer toute létalité aigue. Bien que l'analyse soit toujours en cours, les données concernant la taille des reins suggèrent que l'induction de paramètres androgéniques pourrait se produire à une concentration de 100 % d'effluent.

7. Chimie des effluents et essais *in vitro* ayant trait aux analogues hormonaux

L'objectif d'effectuer la prise de mesures de la chimie des effluents est de procurer une indication de la qualité des effluents pendant les études d'ISC, Cycle 4 des effluents de La Tuque menées pendant plusieurs mois. Ces mesures permettraient alors de faciliter l'interprétation des résultats des bioessais provenant de différents laboratoires réalisés à différentes périodes.

L'objectif des essais *in vitro* ayant trait aux analogues hormonaux est de déterminer le potentiel de ces essais pour l'ISC et l'ISS; ils peuvent être réalisés rapidement et économiquement, mais leur capacité à prédire les réductions de la taille des gonades est inconnue. Les essais *in vitro* relatifs aux analogues hormonaux dans les effluents et les tissus des poissons ont été menés selon des protocoles établis (Hewitt et al., 2000) et les échantillons attendent présentement d'être analysés (oestrogènes et androgènes au Diagramme 7.1)

En ce qui a trait au contrôle de la qualité des effluents, des échantillons d'effluent ont été recueillis hebdomadairement à compter du 30 mai 2006 jusqu'au 24 janvier 2007 inclusivement. Une répartition schématique des échantillons recueillis et les analyses réalisées sont illustrées au Diagramme 7.1

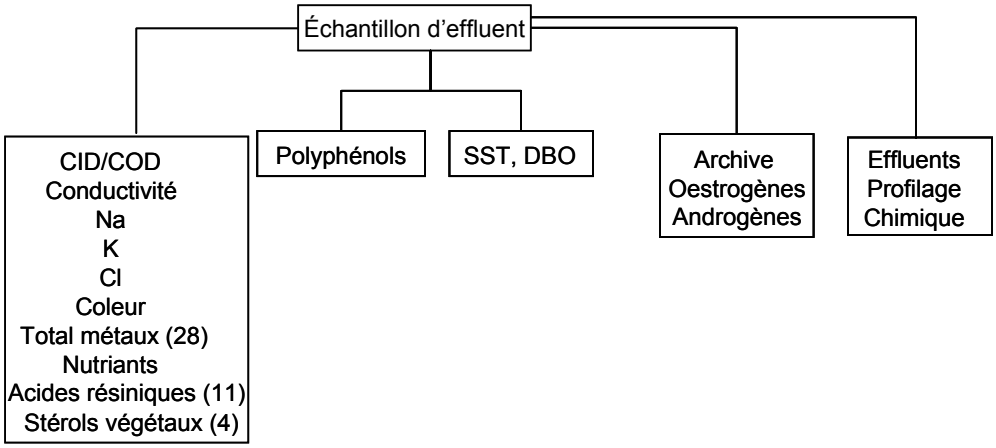

Diagramme 7.1. Schéma de l'échantillonnage des effluents de l'usine de pâte de La Tuque.

Les analyses de carbone inorganique dissous (DIC) / carbone organique dissous (DOC), d'ions majeurs (Na, K, Cl), de couleur, de métaux totaux, de nutriments, d'acides résiniques et de stérols végétaux ont été menées, selon les protocoles, au laboratoire des essais environnementaux du laboratoire national d'Environnement Canada à Burlington, en Ontario (Laboratoire national des essais environnementaux, 2007).

Les analyses des solides en suspension totaux (SST) et de la demande biochimique en oxygène carbonée (DBO) ont été effectuées par le Centre technique des Eaux usées d'Environnement Canada pour établir les protocoles (Méthode INW3 – Détermination de la demande biochimique en oxygène dans l'eau, Méthode 2540D –solides en suspension totaux).

L'analyse polyphénolique a suivi la Méthode Hach 8193 pour le tanin et la lignine et a été réalisée par le Northwest Aquatic Biology Facility du National Council for Air and Stream Improvement Inc. à Ancartes, WA. La méthode implique la réaction du réactif phénolique Folin avec les groupes hydroxyles aromatiques de la lignine et, en conséquence, le terme « polyphénols » est utilisé pour décrire le matériel quantifié.

Profilage chimique des effluents

Les échantillons d'effluent recueillis pour les essais à court et moyen terme concernant la reproduction des ménés tête-de-boule (voir Tableau 3.1) ont été caractérisés qualitativement par microextraction en phase solide (SPME) en utilisant un appareil disponible dans le commerce (Supelco) chez Paprican. Les échantillons (10 mL) de chaque effluent ont été transférés dans des récipients inertes en Teflon et agités à un taux constant avec des micro-barres d'agitation recouvertes de Teflon. La fibre SPME avec un enduit de polydiméthylsiloxane de 100 µm a ensuite été immergée dans l'échantillon d'effluent pendant 60 minutes à température ambiante (environ 22ºC). Les fibres chargées ont été analysées par couplage CG-SM. Les analyses CG-SM des extraits ont été effectuées avec un Agilent 6890 Série CG, jumelé à un discriminateur de masse 5973. Les échantillons ont été désorbés dans la chambre d'injection sans diviseur de flux pendant 1,5 minute à 250ºC. Les composantes chimiques ont été séparées dans une colonne capillaire DB-5MS (J&W Scientific) mesurant 30 m x 0,25 mm (épaisseur de pellicule de 0,25 µm), en utilisant un support d'hélium d'un débit de 1,3 mL/min. Le programme de température du four a débuté à une température de 50ºC pendant 5 minutes, suivi d'une augmentation de 5ºC/min jusqu'à 260ºC et une retenue finale de 13 minutes.

Résultats et discussion

Les paramètres conventionnels d'effluent (ex. BOD, ions majeurs) ont démontré une certaine variation pendant toute la période d'échantillonnage des bioessais. Les fluctuations typiques pour la DBO, les solides en suspension totaux (SST) et les polyphénols sont illustrées aux Diagrammes 7.2 et 7.3. Pour ces trois paramètres, le SST a démontré la plus grande fluctuation.

Les paramètres d'effluent conventionnels restant, indiquant également une variabilité modérée, sont résumés au Tableau 7.1 et les données sur les métaux au Tableau 7.2

Les échantillons recueillis en juin ont démontré des augmentations (dans certains cas dramatiques) de certains métaux, comparativement aux concentrations précédentes. Trois métaux en particulier, l'aluminium, le manganèse et le baryum, ont augmenté à la mi-juin 2006, et ne sont pas retournés à leurs concentrations mesurées précédemment quant aux données obtenues jusqu'à maintenant (Diagramme 7.4). Ces augmentations sont survenues en parallèle avec les profils qualitatifs des substances organiques des effluents obtenus par SPME (voir la section suivante).

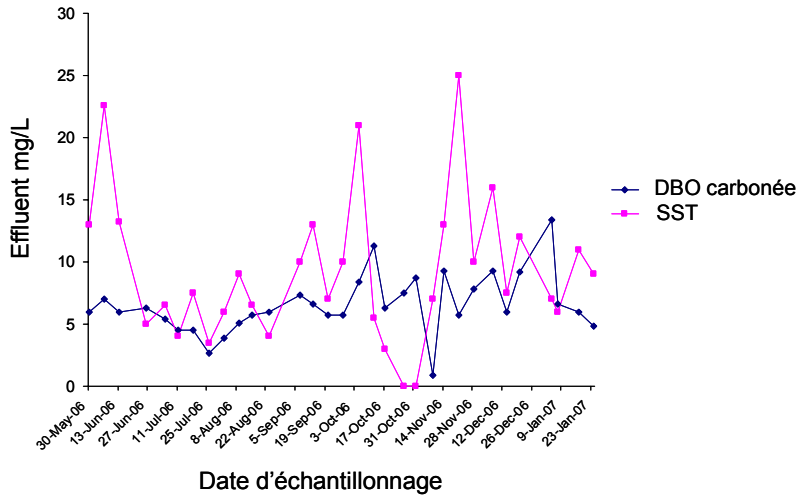

Diagramme 7.2. Les solides en suspension totaux et la demande biochimique en oxygène des effluents de La Tuque, à partir des échantillons recueillis hebdomadairement du 30 mai 2006 jusqu'au 24 janvier 2007 (analyses terminées). Les limites de détection moyennes étaient de 2,48 mg/L (DBO) et de 4,22 mg/L (SST).

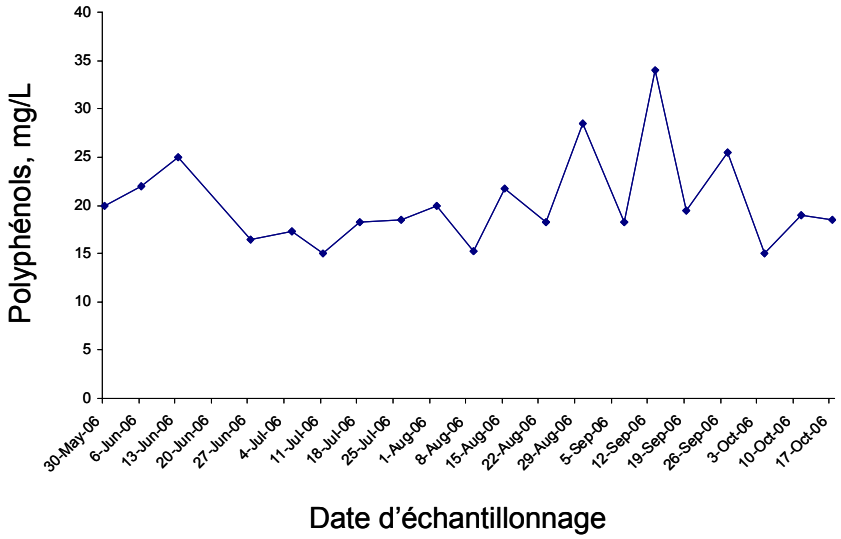

Diagramme 7.3. Le contenu polyphénolique des effluents de La Tuque, à partir des échantillons recueillis hebdomadairement du 30 mai 2006 jusqu'au 17 octobre 2006. Le reste de l'analyse jusqu'au 24 janvier 2007 est en cours.

Tableau 7.1. Résumé des paramètres d'effluent conventionnels mesurés dans les effluents de La Tuque. Sont illustrés les données concernant les échantillons recueillis hebdomadairement du 30 mai 2006 jusqu'au 9 novembre 2006. Le reste de l'analyse jusqu'au 24 janvier 2007 est en cours.

Paramètre (mg/L)	Moyenne ± É-T (n=24 sem.)	Paramètre (mg/L)	Moyenne ± É-T (n=24 sem.)
NO_3/NO_2	0,07 ± 0,06	DIC	64,6 ± 20,5
NH_3	1,25 ± 1,48	Ca	39,5 ± 8,7
Conductivité (µS/cm)	1387 ± 313	Mg	2,8 ± 0,4
pH	7,20 ± 0,25	Na	252 ± 100
Alcalinité	281 ± 67	K	9,9 ± 3,8
Cl	130 ± 14	NO_2	0,03 ± 0,01
SO_4	212 ± 120		
Couleur (PT-CO)	346 ± 60		
Carbone organique dissout	76,9 ± 19,3		

Tableau 7.2. Résumé des concentrations de métaux mesurées dans les effluents de La Tuque. Sont illustrées les données des échantillons recueillis hebdomadairement du 19 mai 2006 jusqu'au 4 octobre 2006. Le reste de l'analyse jusqu'au 24 janvier 2007 est en cours.

Métal	Moyenne ± E-T (n=16 sem.)	Métal	Moyenne ± E-T (n=16 sem.)
Argent	0,059 ± 0,081	Lanthane	0,09 ± 0,04
Arsenic	0,52 ± 0,30	Lithium	1,34 ± 0,24
Bore	38,2 ± 17,9	Molybdène	3,8 ± 2,7
Béryllium	0,026 ± 0,013	Nickel	4,3 ± 1,9
Bismuth	0,003 ± 0,002	Plomb	2,2 ± 2,7
Cadmium	0,30 ± 0,19	Rubidium	28,0 ± 20,0
Cobalt	0,34 ± 0,15	Antimoine	1,8 ± 1,5
Chrome	1,9 ± 1,0	Sélénium	0,08 ± 0,02
Cuivre	19,1 ± 36,9	Strontium	151 ± 68
Fer	574 ± 210	Thallium	0,03 ± 0,01
Gallium	0,19 ± 0,11	Vanadium	28,0 ± 20,3
		Zinc	87,9 ± 34,0

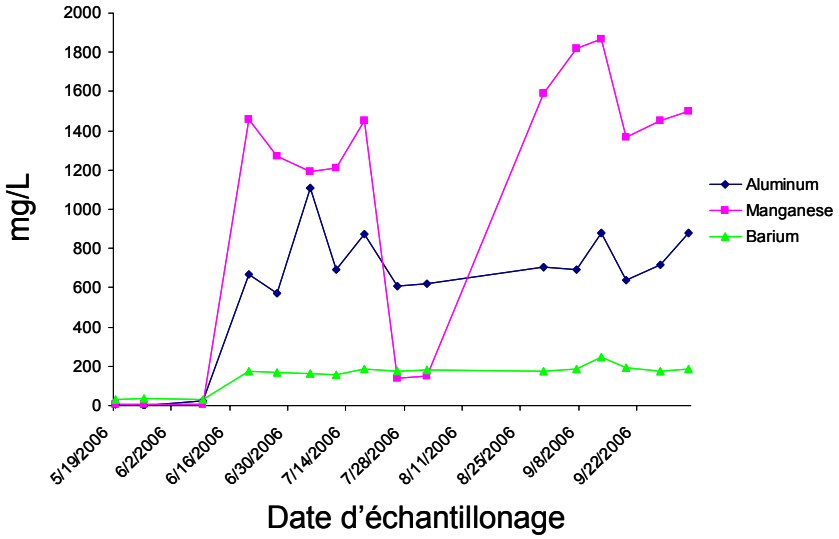

Diagramme 7.4. Métaux sélectionnés démontrant des augmentations de concentrations au cours de juin 2006 dans les effluents recueillis de La Tuque. Le reste de l'analyse jusqu'au 24 janvier 2007 est en cours.

Profilage chimique des effluents

Les profils chimiques illustrés au Diagramme 7.5 illustrent que la qualité de l'effluent final a changé entre les mois de mai et septembre 2006. Essentiellement, la quantité de substances organiques extractibles par la méthode SPME était moindre dans l'échantillon recueilli le 4 septembre 2006 que dans les trois échantillons recueillis au cours de mai et juin 2006. Ceci indique une amélioration générale de la qualité des effluents avec le temps. Les échantillons d'effluent de mai et juin 2006 ont été prélevés environ un mois après une fermeture temporaire de l'usine et les substances organiques extractibles en plus grande quantité à ce moment-là ont pu être associées au redémarrage de l'usine alors que les conditions d'exploitation de l'usine peuvent être variables et atypiques. Ainsi, l'échantillon recueilli en septembre 2006 devrait être plus représentatif des conditions normales d'exploitation de l'usine. Ceci confirmerait la qualité améliorée des effluents, tel qu'indiqué par le profilage chimique plutôt qu'une sensibilité moindre de l'essai à court terme, pourrait le mieux expliquer l'absence d'effet de l'effluent sur la production d'œufs dans l'essai de septembre. L'origine du changement dans le profil n'est pas connu à ce moment-ci.

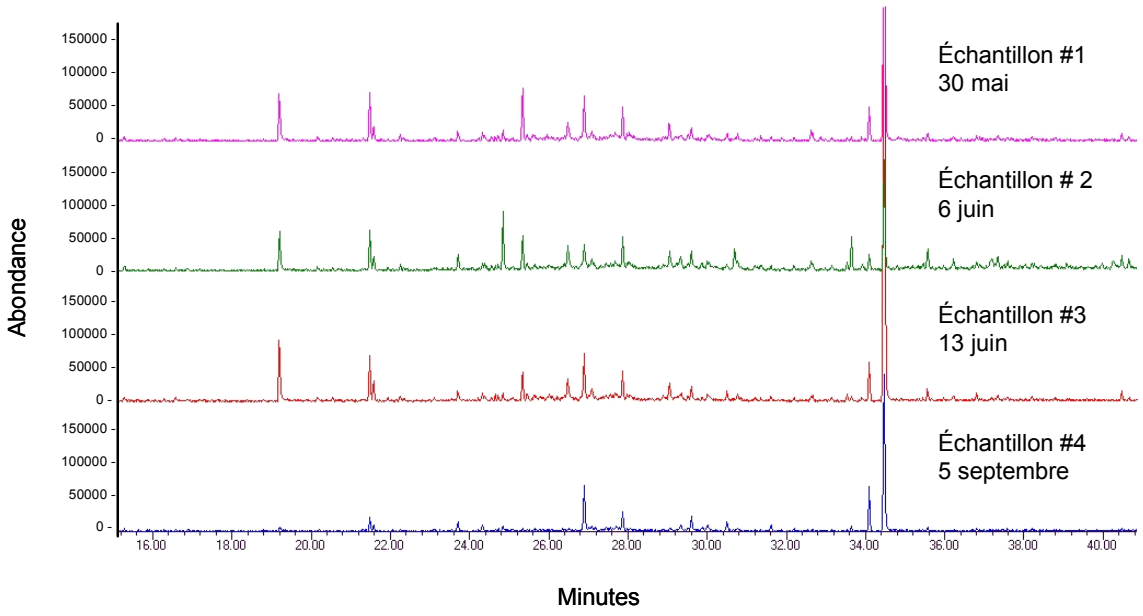

Diagramme 7.5. Profils chimiques obtenus par microextractions en phase solide, suivies d'une dilution par CG-SM. Les échantillons #1, #2 et #3 ont été utilisés dans l'essai à moyen terme et l'échantillon #4 a été utilisé dans l'essai à court terme

Conclusions

- Les données obtenues à ce jour ont indiqué une variabilité mineure et modérée pour la plupart des paramètres d'effluent conventionnels, tel que la DBO et les ions majeurs ainsi que les métaux pendant toute la période d'étude.
- Les augmentations de concentrations d'aluminium, de baryum et de manganèse qui se sont produites après la mi-juin 2006, coïncidant avec une diminution de la quantité de substances organiques extractibles obtenues par échantillonnage passif au cours de l'été 2006, suggèrent un changement de la qualité des effluents qui a également été noté dans les essais à court et moyen termes des ménés tête-de-boule.

Sommaire et Conclusions

Les travaux décrits dans ce rapport constituent la première partie d'un projet visant à sélectionner les essais en laboratoire les plus appropriés pour mener des études d'investigation sur les causes (ISC) et d'investigation sur les solutions (ISS) en vue d'éliminer les effets reliés aux effluents sur la reproduction des poissons. Le projet global nécessite des investigations similaires devant être réalisées à deux autres emplacements d'usine, suivies par l'utilisation des essais en laboratoire sélectionnés avec les effluents provenant de cinq usines, avant et après un biotraitement.

Les études décrites dans ce rapport représentent un volume de travail sans précédent effectué sur les effluents d'une usine (l'usine de pâte kraft blanchie de Smurfit-Stone à La Tuque, au Québec) dans un délai relativement court (mai 2006 à janvier 2007). Les études comprenaient une évaluation des poissons sauvages dans la rivière qui reçoit les effluents ainsi qu'une série d'essais en laboratoire avec quatre espèces de poisson, jumelés à des analyses chimiques poussées des effluents vérifiés. Les essais en laboratoire ont été effectués sur des périodes allant de quelques jours seulement à plus de six mois et ont couvert l'évaluation des indicateurs de reproduction des poissons à partir du niveau biochimique jusqu'à la production d'œufs. Les résultats des études réalisées sur les effluents de l'usine de La Tuque ont permis d'établir les conclusions suivantes :

- Le travail sur le terrain et les données d'études de suivi des effets environnementaux des (ESEE) du Cycle 4 récemment soumises ont démontré que les effluents de l'usine de La Tuque n'ont pas causé la réduction de la taille des gonades des poissons sauvages comme c'était le cas dans les cycles précédents de ESEE.

- Les réactions minimales des poissons dans tous les essais en laboratoire évaluées dans cette étude étaient conformes aux observations effectuées sur les poissons sauvages.
  - L'essai sur le cycle de vie réalisé avec les ménés tête-de-boule a démontré que la condition générale des poissons exposés aux effluents de l'usine de La Tuque était similaire à celle des poissons sauvages vivant en aval de l'usine et les divers essais à moyen et court terme sur trois espèces différentes ont fourni une évaluation précise de l'état de reproduction des poissons exposés aux effluents de l'usine.

- Malgré les réactions minimales observées chez les poissons de laboratoire, les effets sur certains paramètres à de fortes concentrations d'effluent de l'usine de La Tuque ont illustré la valeur potentielle de ces paramètres pour les travaux de ISC et de ISS.

- Basés sur les résultats de cette étude, le paramètre de la production d'œufs dans les essais en laboratoire semble avoir la plus grande capacité pour évaluer le potentiel des effluents à affecter la reproduction des poissons puisque les effets reliés aux effluents se sont avérés similaires (c.-à-d. une légère stimulation dans des effluents à faibles concentrations et à concentrations intermédiaires, et une production d'œufs réduite à des concentrations d'effluent s'établissant à 65 et 100 %) pour trois espèces de poisson.

- Des indications ont démontré que l'effet des effluents d'usine sur la production d'œufs peut être évalué de façon fiable sur une période plus courte que l'on croyait auparavant et, si cela est confirmé par des études futures, ceci ferait des essais utilisant le paramètre de la production d'œufs (possiblement en utilisant différentes espèces de poisson) l'un des outils pour les travaux de ISC et de ISS.

- L'empreinte chimique et les réactions différentielles des ménés tête-de-boule dans des essais effectués au cours du projet ont suggéré que la qualité des effluents provenant d'une usine pourrait varier quelque peu, indiquant la nécessité d'effectuer une caractérisation chimique continue des effluents et la complexité de la tâche d'identifier le(s) agent(s) causal(s).

Travaux Futurs

La sélection des outils appropriés de diagnostique constitue la première étape essentielle pour réussir une étude ISC et de ISS visant à atténuer les effets reliés aux effluents sur la reproduction des poissons. Bien que de l'information très utile qui ait découlé des travaux réalisés à l'usine de La Tuque, il est essentiel de terminer le plan de travail pour le projet global en vue d'achever la sélection des outils. Ceci implique i) la vérification détaillée des outils décrits dans ce rapport à deux sites additionnels d'usine, suivie par ii) une vérification des effluents avant et après le biotraitement à cinq sites d'usine, en utilisant les essais en laboratoire choisis sur la base des travaux provenant de i).

Les sites d'usine pour les prochains travaux comprennent une autre usine de pâte kraft et une usine de papier journal à base de PTM pour l'étude comprenant trois usines et les mêmes trois usines ainsi que deux autres sites additionnels pour l'étude comprenant cinq usines. Il sera important de s'assurer que certains des effluents pour l'étude future seront plus toxiques que les effluents de l'usine de La Tuque et, en raison de ceci, une enquête de dépistage préliminaire des effluents de plusieurs usines pourrait s'avérer nécessaire.

De plus, des raffinements continuels des essais sous évaluation seront requis pour assurer que les essais finaux sélectionnés pour les travaux d' ISC et d'ISS auront la capacité d'identifier des stratégies fructueuses d'atténuation. Enfin, puisque les tâches sont complexes, les démarches continueront de favoriser de nouvelles collaborations avec d'autres experts dans le domaine pour maximiser la probabilité du succès.

Remerciements

Les auteurs tiennent a souligné le soutien du personnel de l'usine Smurfit-Stone de La Tuque, Québec, particulièrement Gérard Desbiens, pour sa bonne volonté de participer au projet, pour nous avoir approvisionner d'effluent selon un horaire exigent et pour avoir fourni les informations sur les conditions d'opération de l'usine. Paul Tessier, autrefois au siège social de Smurfit-Stone à Montréal a contribué à l'initiation du projet. Nous remercions les compagnies Abitibi-Consolidated, Cascades, Smurfit-Stone et AV Nackawic pour leur support financier au moyen de leurs études d'ISC du Cycle 4, sans lequel ce projet n'aurait pas pu être démarré. Finalement, en plus des principaux chercheurs de ce projet, des contributions importantes ont aussi été faites par Suzanne Batchelor, Ruth Vanderveen, Ed Sverko, Jim Bennett, Gerald

Tétreault, Chad Boyko, Bev Blunt, Christine Regan, Melissa Yau et les employés des Opérations techniques qui ont manipulé les effluents au NWRI ; Tatyana Yurchuk, Robert Ross, Sharon Gibbons, Brian O'Connor, Steve Ellis, Kalida Zemri, Valerie Naish and Wendy Paterson qui ont fait le travail technique, les analyses statistiques et les fonctions administratives a Paprican ; Steven Melvin, Melinda Hanson-Lee et Thijs Bosker pour les expositions au laboratoire et Steven Melvin pour l'analyse des paramètres à l'Université du Nouveau-Brunswick; Christina Simpson et Jacquie Matsumoto pour leur assistance technique à l'Université de Guelph; Cheryl Wartman et Natacha Hogan pour leur assistance technique à l'Université de l'Ile du Prince Edouard.

Références

2540D - Total Suspended Solids Dried at 103-105°C. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition, 2006. American Public Health Association.

Alliance Environnement, 2007. Rapport d'interprétation du 4e cycle des ESEE. Smurfit-Stone, Division La Tuque.

Ankley, G.T., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Korte, J.J. and Makynen, E.A. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem*., **6**: 1276–1290.

Dubé, M.G. & MacLatchy, D.L. 2000. Endocrine responses of an estuarine fish *Fundulus heteroclitus* to final effluent from a bleached kraft pulp mill before and after reverse osmosis treatment of clean condensate. *Environ. Toxicol. Chem.* 19:2788-2796.

Dubé, M.G. and MacLatchy, D.L. 2001. Identification and treatment of a waste stream at a bleached kraft pulp mill that depresses a sex steroid in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20:985-995.

Ellis, R.J., van den Heuvel, M.R., Bandelj, E., Smith, M.A., McCarthy, L.H., Stuthridge, T.R., Dietrich, D.R., 2003. In vivo and In vitro assessment of the androgenic potential of a pulp and paper mill effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1448-1456.

Environment Canada. 2005. Guidance document on statistical methods for environmental toxicity tests. Methods Development and Applications Section, Environmental Technology Centre, Environment Canada, EPS 1/RM/46.

Gagnon, M.M., P.V. Hodson, G. Van Der Kraak and J.H. Carey. 1994. Seasonal effects of bleached kraft mill effluent on reproductive parameters of white sucker (*Catastomus commersoni*) populations of the St. Maurice River, Quebec, Canada. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 51: 337-347.

Hewitt, L.M., J.L. Parrott, K.L Wells, M.K. Calp, S. Biddiscombe, M.E. McMaster, K.R. Munkittrick, G.J. Van Der Kraak. 2000. Characteristics of ligands for the Ah receptor and sex steroid receptors in fish exposed to bleached kraft mill effluent. Environ. Sci. Technol. 34: 4327-4334.

Hodson, P.V., M., McWhirter, K. Ralph, B. Gray, D. Thivierge, J.H. Carey, G. Van Der Kraak, D.M. Whittle and M.C. Levesque. 1992. Effects of bleached kraft mill effluent on fish in the St. Maurice River, Quebec. Environ. Toxicol. Chem. 11: 1635-1651.

Ings, J.S and G, Van Der Kraak. 2006. Characterization of the expression of StAR and steroidogenic enzymes in zebrafish ovarian follicles. *Molecular Reproduction and Development* 73: 943-954.

Ings, J.S. 2006. Steroidogenesis in the zebrafish ovary: basic physiology and application to endocrine disruption. M.Sc. Thesis. University of Guelph 104 pp.

INW3 Determination of Biochemical Oxygen Demand (BOD) in Water. Wastewater Technology Centre Analytical Laboratory, 2006.

Katsiadaki, I., Scott, A.P., Hurst, M.R., Matthiessen, P. and Mayer, I. 2002. Detection of environmental androgens: a novel method based on enzyme-linked immunosorbent assay of spiggin, the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:1946-1954.

Kovacs, T., Hewitt, M., Dubé, M., MacLatchy, D., Parrott, J., McMaster, M., Martel P. and Paice M. 2006. Towards the Elimination of the Changes in reproductive Indicators of Fish Associated with Exposure to Pulp and Paper Mill Effluents. 6th International Conference on the Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents, Vitoria, Brazil, April 9-12, 2006.

Kovacs, T., Martel, P. and Ricci, M. 2007. A shortened adult fathead minnow reproduction test developed for investigation of cause and investigation of solution work involving pulp and paper mill effluents. In print, Water Quality Research Journal of Canada.

Kovacs, T., Martel, P., Ricci, M., and Michaud, J. 2005 Further insights into the potential of pulp and paper mill effluents to affect fish reproduction. *J. Toxicol. Environ. Health,* Part A, **68**: 1621–1641.

LeBlanc, J., Couillard, C.M., Brêthes, J.-C.F. 1997. Modifications of the reproductive period in mummichog (*Fundulus heteroclitus*) living downstream from a bleached kraft pulp mill in the Miramichi estuary, New Brunswick, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54:2564-2573.

Lowell, R.B., Ring B., Pastershank, G., Walker, S., Trudel, L. and Hedley K. 2005. National Assessment of Pulp and Paper Environmental Effects Monitoring Data: Findings from Cycles 1 Through 3. National Water Research Institute, Burlington, ON. NWRI Scientific Assessment Report Series No. 5.

MacLatchy, D.L., Courtenay, S.C., Rice, C.D. and Van Der Kraak, G.J. 2003. Development of a short-term reproductive endocrine bioassay with the estuarine mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22:996-1008.

MacLatchy, D.L., Gormley, K.L., Ibey, R.E.M., Sharpe, R.L., Shaughnessy, K.S., Courtenay, S.C., Dubé, M.G. and Van Der Kraak, G.J. 2005. A short-term mummichog (*Fundulus heteroclitus*) bioassay to assess endocrine responses to hormone-active compounds and mixtures. Techniques in Aquatic Toxicology, Vol. 2. (Ed., Ostrander, G.K.). Taylor & Francis Group, Boca Raton. pp. 55-92.

Martel, P., Kovacs, T. and Voss, R. 2004. Survey of pulp and paper mill effluents for their potential to affect fish reproduction. *In* Borton, D.L., Hall, T.J., Fisher, R.S., Thomas, J. (eds). Pulp and Paper Mill Effluent Environmental Fate and Effects. DEStech Publications Lancaster PA., pp. 78–92.

McMaster, M.E., G.J. Van Der Kraak, C.B. Portt, K.R. Munkittrick, P.K. Sibley, I.R. Smith and D.G. Dixon. 1991. Changes in hepatic mixed function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker (Catostomus commersoni) population exposed to bleached kraft pulp mill effluent. Aquat. Toxicol. 21: 199-218

McMaster, M.E., K.R. Munkittrick and G.J. Van Der Kraak. 1992. Protocol for measuring circulating levels of gonadal sex steroids in fish. Can. Tech. Rept. Fish. Aquat. Sci. 1836: 29 p.

McMaster, M.E., K.R. Munkittrick, J.J. Jardine, R.D. Robinson and G.J. Van Der Kraak. 1995. Protocol for measuring in vitro steroid production by fish gonadal tissue. Can. Tech. Rept. Fish Aquat. Sci. 1961: 78 p.

National Laboratory for Environmental Testing, 2007. Schedule of Client Services, Burlington ON. Environment Canada. 109p.

Parrott, J.L. and Blunt, B.R. 2005. Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. Environ Toxicol 20(2):131-141.

Parrott, J.L., R. Chong-Kit and D.A. Rokosh. 1999. EROD induction in fish: A tool to measure environmental exposure. *In* Rao, S. (ed.), Impact assessment of hazardous aquatic contaminants: concepts and approaches. Ann Arbor Press. pg 99-122.

Parrott, J.L., Wood, C.S., Boutot, P. and Dunn S. 2004. Changes in growth, secondary sex characteristics and reproduction of fathead minnows exposed for a lifecycle to bleached sulphite mill effluent. J Toxicol Environ Health, Part A, 67:1755-1764.

Peters, R.E.M. 2005. Effects of 17α-ethynylestradiol on endocrine status, early-life development and sexual differentiation in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). University of New Brunswick. April 2005.

Wilkinson, L. 1990. SYSTAT 9.0: the system for statistics. SYSTAT Inc., Evanson, Ill.