

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EXPOSITION ENVIRONNEMENTALE À UN EFFLUENT URBAIN  
PRIMAIRE CHEZ LE GRAND BROCHET  
*(ESOX LUCIUS)* : EFFETS SUR LE PROFIL MÉTABOLIQUE ET  
MÉTABOLISME LIPIDIQUE

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR  
CHRISTINE DÉPATIE

JANVIER 2020

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mes directeurs, Jonathan et Magali, pour leur soutien tout au long de ces deux années de maîtrise. Je les remercie de m'avoir appris à bien gérer ce projet par moi-même et à rédiger un article scientifique de façon professionnelle. Finalement, je les remercie surtout pour leur compréhension et leur soutien moral durant les périodes les plus difficiles de rédaction au cours des derniers mois. Je remercie aussi le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada pour le financement accordé aux travaux de Jonathan Verreault ainsi que pour la bourse de recherche de deuxième cycle qui m'a été accordée pour la première année de cette maîtrise. Je remercie aussi le Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies pour la bourse de recherche de deuxième cycle qui m'a été accordée dans la réalisation de ma deuxième année de maîtrise. Je remercie également Ling pour son travail acharné en laboratoire afin de réaliser toutes les analyses de contaminants tout en restant présente pour nous encourager dans nos divers projets de recherche. Je remercie aussi toute l'équipe de terrain et de laboratoire de l'équipe de Magali Houde à Environnement et Changement Climatique Canada pour leur aide précieuse durant la récolte des poissons sur le terrain et pour les analyses en laboratoire. J'offre un énorme merci tout spécial à Maeva Giraudo pour toutes les connaissances qu'elle m'a transmises concernant les analyses de transcription de gènes et pour sa patience face à mon niveau débutant concernant cet aspect au début du projet. Je remercie également Antoine Simond pour son aide dans les analyses statistiques des données de transcription des gènes ainsi que Julie Reinling pour sa transmission de savoir sur les brochets du fleuve Saint-Laurent lors de mes toutes premières semaines à la maîtrise. J'aimerais finalement remercier du fond du cœur mes collègues de bureau Anaïs

Kerric, Manon Sorais et Alexandre Bernier-Graveline pour leur soutien moral, leur aide et surtout leur amitié précieuse.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	ii
LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....	ix
RÉSUMÉ .....	xi
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE I ÉTATS DES CONNAISSANCES.....	5
1.1.    Problématique des effluents urbains .....	5
1.1.1.    Effluents urbains .....	5
1.1.2.    L'effluent de Montréal : Usine d'épuration .....	6
1.1.3.    La présence de contaminants dans le fleuve Saint-Laurent .....	8
1.1.4.    La signature de contaminants dans les poissons du fleuve Saint-Laurent ....	9
1.2.    Exposition aux effluents : La santé des poissons .....	11
1.2.1.    Effets sur la santé .....	11
1.2.2.    L'intérêt des techniques « omiques » en toxicologie environnementale ....	12
1.3.    Exposition aux effluents : Le métabolisme lipidique des poissons.....	14
1.3.1.    Les lipides du foie et leurs fonctions.....	14
1.3.2.    Le métabolisme des lipides .....	17
1.3.3.    Perturbation du métabolisme lipidique par les contaminants .....	20
1.4.    Objectifs et hypothèses .....	22
1.4.1.    Objectifs spécifiques .....	23

CHAPITRE II ENVIRONMENTAL EXPOSURE OF NORTHERN PIKE ( <i>ESOX LUCIUS</i> ) TO A PRIMARY WASTEWATER EFFLUENT: METABOLOMIC PROFILE AND LIPID METABOLISM .....	25
2.1. Abstract .....	26
2.2. Introduction .....	27
2.3. Materials and Methods .....	31
2.3.1. Field sampling .....	31
2.3.2. Chemical analysis .....	32
2.3.3. Lipid compound analysis .....	33
2.3.4. RNA extraction and reverse transcription .....	34
2.3.5. Primer design .....	35
2.3.6. Real-time quantitative PCR analysis .....	38
2.3.7. Statistical analyses .....	38
2.4. Results .....	39
2.4.1. HFR concentrations .....	39
2.4.2. Lipid compound profiles .....	40
2.4.3. Gene transcription .....	42
2.4.4. Correlation among variables .....	43
2.5. Discussion .....	48
2.5.1. HFR concentrations .....	48
2.5.2. Lipid profiles and gene expression .....	49
2.5.3. Association between HFR concentrations and lipid markers .....	53
2.6. Conclusions .....	56
2.7. Acknowledgments .....	57
2.8. Supporting information .....	57
2.9. References .....	71
CONCLUSION .....	80
BIBLIOGRAPHIE .....	83

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1** Exemple de structure des acides gras A) saturés, B) mono-insaturés et C) polyinsaturés. Un exemple de nomenclature est également indiqué pour chacun de ces trois types d'acides gras ..... 15
- Figure 1.2** Structure d'un phosphatidylcholine et d'un lysophosphatidylcholine. Les groupements fonctionnels qui forment ces deux phospholipides sont indiqués en italique à l'aide de flèches..... 17
- Figure 1.3** Enzymes impliquées dans la synthèse (vert), le catabolisme (rouge), le remodelage (bleu) et le transport (noir) des acides gras, des acylcarnitines et des phospholipides dans un hépatocyte de vertébré. Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs) qui activent certaines de ces enzymes sont également indiqués (violet). ..... 18
- Figure 2.1** Mean ( $\pm$  SEM) relative contributions (%) of individual LPC compounds to  $\Sigma_9$ LPC concentrations (ng/g ww) in the liver of pike collected upstream ( $n = 25$ ) and downstream ( $n = 25$ ) of the Montreal's WWTP effluent discharge point (Mann-Whitney  $U$  test, \*  $p \leq 0.05$ ). The relative percent contributions of each LPC to  $\Sigma_9$ LPC concentrations can be found in Table 2.8..... 41
- Figure 2.2** Liver transcription levels (mean log calibrated normalized relative quantity (cnrq)  $\pm$  SEM) of genes related to enzymes involved in lipid metabolism of pike collected upstream and downstream of the Montreal's WWTP effluent point of discharge (Mann-Whitney  $U$  Test, \*  $p \leq 0.05$ ). ..... 42
- Figure 2.3** Correlations between the relative percent (%) contributions of LPC 14:0 to  $\Sigma_9$ LPC concentrations (ng/g ww) and A)  $\Sigma_{34}$ PBDE concentrations in liver (ng/g ww), B)  $\Sigma_7$ Dec concentrations in liver (ng/g ww) and C) fish girth (mm) of pike collected in the St. Lawrence River upstream and downstream ( $n = 50$ ) of the Montreal's WWTP effluent discharge point. Grey field represents the 95% confidence intervals..... 45
- Figure 2.4** Correlations between the relative percent (%) contributions of LPC 18:2 to  $\Sigma_9$ LPC concentrations (ng/g ww) and A)  $\Sigma_{34}$ PBDE concentrations in liver (ng/g ww), B)  $\Sigma_7$ Dec concentrations in liver (ng/g ww) and C) fish girth (mm) of pike collected in

the St. Lawrence River upstream and downstream ( $n = 50$ ) of the Montreal's WWTP effluent discharge point. Grey field represents the 95% confidence intervals.....47

**Figure 2.5** Correlations between polyunsaturated  $\Sigma_2\text{LPC}/\Sigma_{49}\text{PC}$  concentrations ratios (ng/g ww) and  $\Sigma_{34}\text{PBDE}$  concentrations (ng/g ww) in liver of pike collected in the St. Lawrence River upstream and downstream ( $n = 50$ ) of the Montreal's WWTP effluent discharge point. Grey field represents the 95% confidence intervals. ....47

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Table 2.1</b> Genes, symbols and primers used for RT-qPCR analysis in northern pike liver. ....	36
<b>Table 2.2</b> Mean ( $\pm$ SEM) concentrations of major halogenated flame retardants (ng/g ww) and lipid classes ( $\mu$ g/g ww) in liver of St. Lawrence River pike collected upstream and downstream of the Montreal's WWTP effluent discharge point. Asterisks (*) indicate a significant difference between sites ( $p \leq 0.05$ ). The full list of halogenated flame retardants and lipid compounds can be found in Tables 2.3 and 2.4. ....	40
<b>Table 2.3</b> List of flame retardants analyzed in the liver of northern pike collected upstream ( $n = 25$ ) and downstream ( $n = 25$ ) of Montreal's WWTP effluent discharge point (QC, Canada). ....	57
<b>Table 2.4</b> List of lipid compounds analyzed in the liver of northern pike collected upstream ( $n = 25$ ) and downstream ( $n = 25$ ) of Montreal's WWTP effluent discharge point (QC, Canada). ....	59
<b>Table 2.5</b> List of genes related to fatty acid and phospholipid metabolism analyzed in liver of pike collected upstream ( $n = 25$ ) and downstream ( $n = 25$ ) of Montreal's WWTP effluent discharge point (QC, Canada). Acronyms for genes and their function in hepatocytes are also indicated.....	63
<b>Table 2.6</b> Mean ( $\pm$ SEM) concentrations ( $\mu$ g/g ww) of lipid compounds in liver of female and male pike collected upstream and downstream of Montreal's WWTP effluent discharge point (QC, Canada). Values marked by an asterisk indicate that concentrations were significantly different between sexes (Mann-Whitney $U$ Test, $p \leq 0.05$ ). ....	64
<b>Table 2.7</b> Mean ( $\pm$ SEM) concentrations ( $\mu$ g/g ww) of lipid compounds in liver of pike collected upstream and downstream of Montreal's WWTP effluent discharge point. Values marked by an asterisk indicate that concentrations were significantly different between sites (Mann-Whitney $U$ Test, $p \leq 0.05$ ). ....	65
<b>Table 2.8</b> Mean ( $\pm$ SEM) contribution percentages (%) of lysophosphatidylcholine compounds in liver of pike collected upstream and downstream of Montreal's WWTP	

effluent discharge point (QC, Canada). Values marked by an asterisk indicate that concentrations were significantly different between sites (Mann-Whitney *U* Test,  $p \leq 0.05$ ). ..... 70

**Table 2.9** mRNA levels (mean calibrated normalized relative quantity (cnrq)  $\pm$  SEM) of *lpcat3*, *lpcat4*, *pemt*, *pla2*, *ppara* and *ppard* in the liver of pike collected upstream and downstream of Montreal's WWTP effluent discharge point (QC, Canada). ..... 70

**Table 2.10** Transcription levels (mean log calibrated normalized relative quantity (cnrq)  $\pm$  SEM) of *lpcat3*, *lpcat4*, *pemt*, *pla2*, *ppara* and *ppard* in the liver of female and male pike collected upstream and downstream of Montreal's WWTP effluent discharge point (QC, Canada). Values marked by an asterisk indicate that concentrations were significantly different between sexes (Mann-Whitney *U* Test,  $p \leq 0.05$ ). ..... 71

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

4-NP	4-nonylphenol
ACOX	Acyl-CoA oxidase / Acyl-CoA oxydase
ACYL	Acylcarnitines
BEHTBP	Bis (2-ethylhexyl)-tetrabromophthalate
BPA	Bisphenol A / Bisphénol A
CNRQ	Calibrated normalized relative quantity
COA	Coenzyme A
DEC	Dechloranes
DEHP	bis-(2-ethylhexyl)-phthalate
FAS	Fatty acid synthase / Acides gras synthase
FI-MS/MS	Flow-injection tandem mass spectrometry
GC	Gas chromatograph
HFR	Halogenated flame retardants
HPLC	High performance liquid chromatograph
LPC	Lysophosphatidylcholines
LPCAT	Lysophosphatidylcholine acyltransferase
MS	Mass spectrometer
MUFA	Monounsaturated fatty acids / acides gras mono-insaturés
mufaPC	Monounsaturated phosphatidylcholines
NP	Nonylphenol
PBDE	Polybromodiphenyl ethers / Polybromodiphényléthers
PBEB	Pentabromoéthylbenzène
PC	Phosphatidylcholines
PBC	Polychlorinated biphenyl
PE	Phosphatidylethanolamine
PEMT	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase
PI	Phosphatidylinositol
PLA2	Phospholipase A2
PPAR $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPAR $\delta$	Peroxisome proliferator-activated receptor delta

PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PS	Phosphatidylserine
PUFA	Polyunsaturated fatty acids / acides gras polyinsaturés
pufaPC	Polyunsaturated phosphatidylcholines
RFH	Retardateurs de flamme halogénés
SFA	Saturated fatty acids / acides gras saturés
sfaPC	Saturated phosphatidylcholine
SM	Sphingomyelins
T-OP	4-tert-octylphenol
TBOEP	Tris (2-butoxyethyl) phosphate
TCEP	(2-chloroethyl) phosphate
WWTP	Wastewater treatment plant

## RÉSUMÉ

Les effluents municipaux sont composés d'un mélange complexe de substances biologiques et chimiques et peuvent ainsi représenter une source de contamination importante pour les milieux récepteurs. La ville de Montréal déverse en moyenne 3,5 millions de m<sup>3</sup> d'effluent par jour dans le fleuve Saint-Laurent suite à l'épuration de ses eaux usées municipales. Il reste toutefois une quantité importante de contaminants dans ces eaux qui sont donc rejetées dans le fleuve Saint-Laurent, notamment des retardateurs de flamme halogénés (RFH). Ces contaminants ont la capacité de s'accumuler dans les tissus des poissons et peuvent ainsi avoir un impact à différents niveaux sur leur biologie. De récentes études ont montré que le métabolisme énergétique du grand brochet (*Esox lucius*), un poisson prédateur du fleuve Saint-Laurent, est perturbé par l'exposition à cet effluent. Une réduction des niveaux d'ARN messager reliés aux enzymes hépatiques impliquées dans le métabolisme des acides gras a, entre autres, été mesurée chez les brochets exposés à l'effluent en milieu naturel. L'objectif de la présente étude visait d'une part à évaluer par l'utilisation de la métabolomique les effets d'une exposition à l'effluent de la ville de Montréal sur le profil en acides gras, en acylcarnitines et en phospholipides et, d'autre part, à investiguer la transcription des gènes liés au métabolisme des lipides dans le foie du grand brochet. Les lysophosphatidylcholines (LPC) polyinsaturés représentaient une plus faible proportion des LPC dans le foie des brochets exposés à l'effluent de la ville de Montréal, tandis que les LPC saturés et mono-insaturés en étaient dominants chez ces mêmes poissons. Une réduction de la transcription de *ppara*, gène clé dans le métabolisme des lipides, a également été mesurée chez les brochets exposés à l'effluent. De plus, les abondances relatives de LPC 18:2 et LPC14:0 étaient significativement corrélées aux concentrations en RFH dans le foie des brochets. Cette étude suggère que l'exposition chronique à l'effluent de la ville de Montréal a un impact potentiel sur métabolisme des phospholipides chez les brochets du fleuve Saint-Laurent. Les informations présentées pourraient être utilisées dans un effort d'amélioration de la gestion des eaux usées par les municipalités afin de limiter les impacts néfastes sur la faune aquatique des milieux récepteurs.

*Mots clés :* métabolomique, effluents municipaux, retardateurs de flamme halogénés, brochet, métabolisme lipidique, lysophosphatidylcholines, PPAR $\alpha$

## INTRODUCTION

Les effluents municipaux sont composés d'une variété de substances biologiques et chimiques et représentent ainsi une source de contamination environnementale importante (Marcogliese *et al.*, 2015). La composition en divers contaminants et leurs concentrations varient d'un effluent à l'autre selon le traitement d'épuration appliqué aux eaux usées avant leur rejet dans les écosystèmes aquatiques (Samuelsson *et al.*, 2011). Les organismes aquatiques vivants près des points de rejets et en aval de ces effluents sont ainsi en contact avec l'ensemble des contaminants qu'ils contiennent. La santé de ces organismes peut alors être affectée à différents niveaux biologiques et la gamme d'effets possibles varie selon la composition de l'effluent et le traitement appliqué aux eaux usées (Hébert *et al.*, 2008a; Petala *et al.*, 2009). Une exposition à des effluents municipaux peut, entre autres, moduler la reproduction, la croissance et la réponse immunitaire des poissons (Hébert *et al.*, 2008b; Lister *et al.*, 2009; Smolders *et al.*, 2004; Tetreault *et al.*, 2012). Différents processus cellulaires peuvent également être affectés chez ces organismes, ce qui peut mener à un stress oxydatif et des dommages génétiques (Houde *et al.*, 2014a; Liney *et al.*, 2006). La majorité des études toxicologiques réalisées jusqu'à maintenant ont noté des effets néfastes au niveau de l'individu et en disent peu sur les modes d'action possibles des contaminants menant à ces effets. L'utilisation des techniques « omiques » dans les évaluations de risques environnementaux permet maintenant d'en apprendre davantage sur les événements se produisant au niveau moléculaire en réponse à une exposition aux contaminants dans l'environnement (Bahamonde *et al.*, 2016).

L'effluent de la ville de Montréal contient un mélange de nutriments, de métaux et de composés organiques, dont des retardateurs de flamme halogénés (RFH) (Marcogliese *et al.*, 2015). La station d'épuration de Montréal a d'ailleurs été identifiée comme étant une principale source locale de RFH dans le fleuve Saint-Laurent (Pelletier et Rondeau, 2013). Les polybromodiphényléthers (PBDE) sont une classe de RFH qui sont ajoutés aux plastiques, textiles, produits électroniques ainsi qu'aux mousses et matériaux de rembourrage afin d'en réduire l'inflammabilité (de Wit, 2002). Ils sont associés aux polymères sans y être reliés chimiquement et peuvent donc s'en détacher et se retrouver dans l'environnement. Leurs propriétés physico-chimiques leur confèrent une forte affinité pour les lipides, et ils ont ainsi la capacité d'être bioaccumulés dans les tissus des organismes vivants et d'être bioamplifiés dans la chaîne alimentaire (de Wit, 2002). Les PBDE sont retrouvés en importantes concentrations dans les sédiments et matières en suspension ainsi que dans les tissus des organismes du fleuve Saint-Laurent (Houde *et al.*, 2014b; Pelletier et Rondeau, 2013; Reinling *et al.*, 2017). Il y a toutefois peu de données à ce jour sur la contamination des poissons dans le fleuve Saint-Laurent et sur les effets d'une exposition à l'effluent de la ville de Montréal (Marcogliese *et al.*, 2015). Des PBDE et des RFH émergents ont récemment été mesurés dans les tissus de grands brochets (*Esox lucius*) prélevés en aval du point de rejet de l'effluent de la ville de Montréal (Houde *et al.*, 2014b; Reinling *et al.*, 2017). Le brochet est un poisson prédateur sédentaire retrouvé dans les eaux peu profondes à végétation dense du Saint-Laurent (Bernatchez et Giroux, 2012). Son alimentation diversifiée principalement composée de poissons le place à un haut niveau trophique, et fait en sorte que d'importantes concentrations de contaminants peuvent s'accumuler dans les tissus de ce poisson.

De récentes études ont permis de constater que l'exposition à des effluents municipaux peut entraîner une perturbation du métabolisme lipidique chez plusieurs espèces de poissons. Une réduction de l'expression d'enzymes impliquées dans le métabolisme

des acides gras (acyl-CoA oxydase et acide gras synthase) a été mesurée dans le foie de brochets mâles exposés à l'effluent de la ville de Montréal (Reinling *et al.*, 2017). De plus, un pourcentage plus élevé de lipides a également été noté dans le foie des femelles brochets prélevées en aval du point de rejet du même effluent (Reinling *et al.*, 2017). Une expression différentielle de certains gènes liés au métabolisme des lipides et une modulation de l'activité enzymatique de l'acyl-CoA oxydase impliquée dans l'oxydation des acides gras ont aussi été mesurés chez diverses espèces de poissons telles que des ménés à tête de boule (*Pimephales promelas*) et perchaudes (*Perca flavescens*) exposés *in situ* ou en laboratoire à divers effluents nord-américains (Garcia-Reyero *et al.*, 2011; Houde *et al.*, 2014a; Sellin Jeffries *et al.*, 2012). Une diminution des concentrations en phosphocholine, en sphingosine et en acides gras polyinsaturés ainsi qu'une augmentation en acylcarnitines ont également été mesurées dans les tissus (foie et plasma) de poissons exposés *in situ* ou en laboratoire à des effluents ou à des mélanges de contaminants provenant de milieux naturels aux États-Unis (Al-Salhi *et al.*, 2012; Skelton *et al.*, 2014), menant à un profil lipidomique distinct chez les individus les plus exposés en comparaison aux individus contrôles.

L'objectif global de ce projet était d'évaluer les effets de l'exposition à l'effluent de la ville de Montréal sur le métabolisme lipidique hépatique du grand brochet dans le fleuve Saint-Laurent. Plus précisément, les profils en acides gras, en acylcarnitines et en phospholipides ainsi que la transcription de gènes liés au métabolisme des lipides ont été analysés et mis en relation avec les concentrations de PBDE et RFH émergents dans le foie des brochets. Les RFH étant présents en importantes concentrations dans l'effluent ainsi que dans les tissus de plusieurs espèces de poissons du fleuve Saint-Laurent, ils ont ainsi été utilisés en guise de marqueur d'exposition environnementale à l'effluent.

Ce document est présenté sous forme de mémoire par article, et se divise ainsi en deux chapitres. Le premier chapitre expose l'état des connaissances actuel en lien avec la problématique des effluents municipaux et leurs effets possibles sur la santé et le métabolisme lipidique des poissons, où l'accent sera mis sur le cas de l'effluent de la ville de Montréal. Le deuxième chapitre est rédigé en anglais et porte sur l'étude des effets d'une exposition à l'effluent de la ville de Montréal sur le métabolisme lipidique du grand brochet.

## CHAPITRE I

### ÉTATS DES CONNAISSANCES

#### 1.1. Problématique des effluents urbains

##### 1.1.1. Effluents urbains

Les eaux domestiques et industrielles produites par les municipalités doivent être traitées avant leur rejet dans le milieu aquatique récepteur. Plusieurs niveaux de traitement des eaux usées peuvent être utilisés, débutant par un traitement primaire qui consiste principalement en une sédimentation de la matière organique, du sable et des huiles (Morris *et al.*, 2017). Cette sédimentation peut être complémentée d'un traitement secondaire qui permet de dégrader les nutriments et les composés organiques qui ne sont pas éliminés par le traitement primaire par des procédés biologiques (Morris *et al.*, 2017). Finalement, un dernier traitement plus avancé, par exemple un procédé d'ozonation, peut être réalisé afin de retirer les virus, les composés organiques dissous ainsi que les composés inorganiques des eaux usées (Morris *et al.*, 2017). Qu'ils soient utilisés seuls ou en combinaison, ces traitements ne permettent généralement pas de retirer 100% de tous les composés contenus dans les eaux usées municipales. Ainsi, plusieurs classes de contaminants ont été mesurées dans les eaux traitées provenant de stations d'épuration dans différentes régions du monde (Tran *et al.*, 2018). Évidemment, la composition en contaminants des effluents municipaux varie en

fonction du contexte socio-économique du centre urbain en question et du traitement utilisé (Hébert *et al.*, 2008a; Tran *et al.*, 2018). Des concentrations variant entre 16 et 14 600 ng/L du médicament anti-inflammatoire ibuprofène ont ainsi été mesurées dans différents effluents nord-américains avec des pourcentages de retrait des eaux usées allant de 0 à 98,5% (Tran *et al.*, 2018). D'autres composés pharmaceutiques tels que des médicaments pour le contrôle des lipides sont aussi retrouvés dans les effluents au Canada (Tran *et al.*, 2018). Des concentrations allant jusqu'à 1493 ng/L de Gemfibrozil ont ainsi été mesurées dans les eaux de surface près de stations d'épuration en Ontario (Metcalfe *et al.*, 2003). De plus, des contaminants utilisés comme plastifiants, tel que le bisphénol A (BPA), sont également retrouvés dans plusieurs effluents (Tran *et al.*, 2018). Les pourcentages de retrait du BPA suivant le traitement des eaux usées variant entre 32 et 100%, il est possible de retrouver ce contaminant à des concentrations allant jusqu'à 450 ng/L dans les effluents nord-américains (Tran *et al.*, 2018). Les effluents municipaux contiennent aussi des métaux, dont le cuivre, le plomb, le zinc, le nickel et le mercure (Hargreaves *et al.*, 2018). L'efficacité de retrait de ces métaux n'est généralement pas de 100%, et varie d'un traitement à l'autre, avec des pourcentages de retrait allant de 27 à 84% pour le cuivre, de 21 à 73% pour le plomb et de 54% à 75% pour mercure (Hargreaves *et al.*, 2018).

### 1.1.2. L'effluent de Montréal : Usine d'épuration

La station d'épuration de Montréal a été initiée en 1970 et est pleinement opérationnelle depuis 1996 (Marcogliese *et al.*, 2015). Cette station d'épuration assure le traitement primaire de toutes les eaux usées de l'île de Montréal et de l'île Bizard, comptant ainsi 4 millions d'habitants (Communauté métropolitaine de Montréal, s. d.). Suivant le traitement de l'ensemble des eaux usées, la station d'épuration de Montréal rejette en moyenne 3,5 millions de m<sup>3</sup> d'effluent dans le fleuve Saint-Laurent par jour

(Marcogliese *et al.*, 2015). Ce volume varie entre 2,5 millions de m<sup>3</sup> d'eau par jour par temps sec, et 7,6 millions de m<sup>3</sup> en temps de pluie (Marcogliese *et al.*, 2009; Moreira, 2011).

Les eaux usées de l'ensemble du réseau d'égouts de Montréal s'écoulent jusqu'à la station d'épuration située à l'extrémité est de la ville et sont ensuite pompées au niveau du sol pour être traitées (Marcogliese *et al.*, 2015). Les particules de plus de 25 mm sont d'abord retirées par tamisage. Environ 750 tonnes de ces résidus sont produites annuellement par le traitement des eaux usées, et ensuite séchées par centrifugation puis enterrées après incinération (Marcogliese *et al.*, 2015). Les matières abrasives, particules de sable et autres ayant un diamètre supérieur à 150 µm sont également retirées des eaux usées par des dessableurs dans le but d'éviter les dommages aux équipements mécaniques de traitement des boues (Ville de Montréal, s. d.). Afin de réduire les concentrations en phosphore total et en solides en suspension, les eaux usées subissent également une floculation chimique par ajout de chlorure ferreux (FeCl<sub>2</sub>) combiné avec un polymère anionique (Marcogliese *et al.*, 2015). L'effluent traité est finalement déversé dans le fleuve Saint-Laurent près de la pointe sud-est de l'île de Montréal (Marcogliese *et al.*, 2015). Ce procédé de traitement primaire physico-chimique permet d'éliminer la majeure partie des particules en suspension et de réduire la concentration en phosphore des eaux usées (Marcogliese *et al.*, 2015). Toutefois, il reste dans cet effluent d'importantes quantités de contaminants qui sont rejetées dans le fleuve (Marcogliese *et al.*, 2015). Un projet d'amélioration de la méthode de traitement des eaux usées par ozonation est en développement et sera mis en service au courant des prochaines années. Une désinfection par l'ozone permettra, entre autres, de détruire les virus et la matière organique, d'agir sur les matières non biodégradables et également sur certains produits pharmaceutiques et perturbateurs endocriniens (Ville de Montréal, s. d.).

### 1.1.3. La présence de contaminants dans le fleuve Saint-Laurent

L'effluent de Montréal contient un mélange complexe de nutriments et de contaminants, comprenant des quantités importantes de métaux et de composés organiques (Marcogliese *et al.*, 2015). Les métaux font partie des contaminants les plus abondants dans l'effluent, mais la contribution de l'effluent à la quantité totale de métaux dans le fleuve Saint-Laurent est relativement faible (<1%) pour la majorité d'entre eux (Marcogliese *et al.*, 2015). La plupart sont retrouvés naturellement dans le fleuve ou proviennent de sources anthropiques diffuses (Gobeil *et al.*, 2005). Toutefois, pour des métaux tels que le cadmium, le cuivre et le zinc, 8 à 13% des niveaux retrouvés dans le fleuve Saint-Laurent proviennent directement de l'effluent de la station d'épuration de la ville de Montréal. Cette contribution est encore plus importante pour l'argent, avec 25% de la charge totale qui provient de l'effluent (Gobeil *et al.*, 2005). Les PBDE sont ajoutés aux plastiques, textiles, meubles rembourrés et équipements électroniques et électriques pour en réduire l'inflammabilité et sont également présents dans le fleuve Saint-Laurent (Marcogliese *et al.*, 2015). Malgré leur ajout à la liste des polluants organiques persistants de la Convention de Stockholm (Stockholm Convention, 2009; 2017), les formulations commerciales de PBDE sont encore abondantes dans les produits d'usage courant (matelas, rideaux, ordinateurs, sièges d'auto, etc.) et les produits enfouis dans les dépotoires. Ils constitueront donc des sources de contamination de l'environnement pour les années à venir (Abbasi *et al.*, 2015). Plusieurs congénères de PBDE (BDE-28, -47, -49, -66, -99, -100, -153, -183 et -209) ont ainsi été détectés dans les matières en suspension du fleuve et les sédiments des lacs fluviaux avec les concentrations les plus élevées mesurées pour le BDE-209, confirmant que l'effluent représente une source majeure de PBDE dans le fleuve Saint-Laurent (Marcogliese *et al.*, 2015; Pelletier et Rondeau, 2013). Les pesticides font également partie du cocktail complexe de contaminants retrouvé dans le fleuve Saint-Laurent (Montiel-Léon *et al.*, 2019). Notamment, l'atrazine et un de ses métabolites, la

deséthylatrazine, ont été détectés dans le fleuve à plusieurs sites d'échantillonnage entre Salaberry-de-Valleyfield et Sainte-Anne-de-la-Pérade. Leurs concentrations étaient les plus élevées près du panache de l'effluent de Montréal, avec des sommes variant entre 43 et 106 ng/L dans cette région (Montiel-Léon *et al.*, 2019). Plusieurs composés pharmaceutiques tels que des anti-inflammatoires, des anticonvulsifs, des antibiotiques et des antidépresseurs sont également présents dans les eaux du fleuve Saint-Laurent (Marcogliese *et al.*, 2015). D'importantes concentrations de certains anti-inflammatoires, dont l'acide salicylique (2390 ng/L), l'ibuprofène (840 ng/L) et le napoléon (1060 ng/L) ont ainsi été mesurées dans l'effluent de la ville de Montréal (Gagnon et Lajeunesse, 2012). Lajeunesse *et al.* (2008) ont également mesuré des concentrations de 0,41 à 69 ng/L pour plusieurs antidépresseurs et leurs métabolites dans l'effluent, représentant une réduction de moins de 50% des quantités mesurées dans les eaux usées avant le traitement.

#### 1.1.4. La signature de contaminants dans les poissons du fleuve Saint-Laurent

Les contaminants qui sont présents dans le fleuve dans le secteur du point de rejet de l'effluent de Montréal sont aussi présents dans les tissus de poissons qui vivent dans ces eaux et à plusieurs kilomètres en aval. Laliberté (2011) a ainsi mesuré de plus importantes concentrations de PBDE dans les tissus de dorés jaunes (*Sander vitreus*), de grands brochets et de perchaudes prélevés entre 2002 et 2008 au lac Saint-Pierre situé en aval de l'effluent de Montréal en comparaison aux mêmes espèces prélevées au lac Saint-François situé en amont de l'effluent. Des tendances semblables ont également été observées chez des perchaudes, brochets et maskinongés (*Esox muskellunge*) prélevés en amont et en aval du point de rejet de l'effluent (Houde *et al.*, 2014a, 2014b). Dans l'ensemble des contaminants détectés dans les tissus (carcasse totale de perchaude et foie des brochets et maskinongés) des trois espèces étudiées

prélevées en aval de l'effluent, les PBDE étaient les plus abondants. De tous les congénères analysés (38 étudiés), les BDE-47, -99, -100, -49 et -153 étaient prédominants dans les échantillons de tissus des trois espèces de poissons (Houde *et al.*, 2014b). La somme des PBDE variait entre 94 et 2480 ng/g l.w. (lipid weight; poids en lipides) chez la perchaude, 1068 et 5971 ng/g l.w. chez le brochet et 696 et 24031 ng/g l.w. chez le maskinongé (Houde *et al.*, 2014b). Dans une autre étude, des concentrations 4,5 fois plus importantes en PBDE ont également été mesurées dans le foie de brochets prélevés en aval du point de rejet de l'effluent de Montréal comparativement aux individus prélevés en amont (Reinling *et al.*, 2017). Tout comme dans l'étude de Houde *et al.* (2014b), les congénères les plus abondants dans le foie des brochets étaient les BDE-47, -100 et -99 (Reinling *et al.*, 2017). Ces résultats concordent avec les hautes concentrations de PBDE détectées dans les sédiments et matières en suspension du fleuve Saint-Laurent (Pelletier et Rondeau, 2013). Douze RFH émergents ont aussi été détectés dans le foie des brochets et maskinongés prélevés en aval du point de rejet de l'effluent de la ville de Montréal. Le pentabromoéthylbenzène (PBEB), le Bis (2-ethylhexyl)-tétrabromophthalate (BEHTBP), le Chlordene Plus, les dechloranes Dec 602, Dec 604, Dec 604 CB et le Dechlorane Plus (isomères *anti* et *syn*) ont été quantifiés avec des concentrations moyennes respectives de  $15,1 \pm 4,3$  ng/g l.w. et  $179 \pm 162$  ng/g l.w. pour la somme de ces RFH émergents chez les brochets et les maskinongés (Houde *et al.*, 2014b). Reinling *et al.* (2017) ont également détecté plusieurs RFH émergents dans le foie des brochets prélevés en amont et en aval de l'effluent (*e.g.* Hexabromobenzène, Dec 604, Dec 604-CB, Dechlorane Plus *anti*) avec des concentrations généralement plus élevées dans le foie des brochets prélevés en aval, ainsi que chez les mâles comparativement aux femelles. Ces résultats suggèrent que l'effluent de Montréal représente une source locale importante de RFH et que ces composés pourraient ainsi être utilisés en guise de marqueurs d'exposition à l'effluent chez les poissons du fleuve Saint-Laurent.

## 1.2. Exposition aux effluents : La santé des poissons

### 1.2.1. Effets sur la santé

L'exposition à des effluents municipaux peut altérer le fonctionnement de plusieurs systèmes biologiques et perturber notamment la croissance, la reproduction et la fonction immunitaire des poissons. Une croissance et un indice de condition physique plus élevés ont, entre autres, été mesurés chez des carpes communes (*Cyprinus carpio*) exposées en milieu naturel à des eaux usées industrielles traitées dans une rivière au nord de la Belgique en comparaison aux carpes prélevées à un site de référence (Smolders *et al.*, 2004). Au niveau de la reproduction, une réduction de plus de la moitié du nombre d'œufs produits a été mesurée chez des femelles poissons-zèbres (*Danio rerio*) exposées à une dilution de 50% de l'effluent prélevé à la station de traitement des eaux usées de Woodward Avenue en Ontario (Lister *et al.*, 2009). Chez des mâles ménés à tête de boule prélevés en aval de la station d'épuration de la ville de Regina, des taux cinq fois plus élevés de vitellogénine hépatique, une protéine impliquée dans la synthèse des œufs, ont été mesurés comparativement à ceux chez les poissons prélevés en amont (Tetreault *et al.*, 2012). Relativement au système immunitaire, Hébert *et al.* (2008b) ont mesuré une stimulation de l'activité phagocytaire et de la prolifération des lymphocytes chez les truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) juvéniles exposées en laboratoire à différentes dilutions (0,1 à 10%) d'effluent de la station d'épuration de la ville de Montréal pendant 28 jours.

Des effets génotoxiques et une induction du stress oxydatif peuvent également survenir chez les poissons exposés à des effluents municipaux. Liney *et al.* (2006) ont, entre autres, mesuré un plus grand nombre de dommages à l'ADN dans le sang et les branchies de gardons (*Rutilus rutilus*) exposés pendant près d'un an en laboratoire à

différentes concentrations d'eaux usées domestiques et industrielles traitées diluées dans de l'eau déchlorée. Une activité plus élevée de deux enzymes impliquées dans le combat contre le stress oxydatif dans les cellules a également été mesurée dans le foie (catalase) et dans le muscle (superoxyde dismutase) de perchaudes prélevées à 4 km en aval du point de rejet de l'effluent de la ville de Montréal en comparaison aux perchaudes prélevées à un site de référence en amont de l'effluent (Houde *et al.*, 2014a). Une modification de l'expression de 1300 gènes du foie a aussi été mesurée par micropuce à ARN chez des carlottins meita-gare (*Pleuronichthys cornutus*) adultes exposés un échantillon d'effluent municipal concentré à 20% en laboratoire pendant 21 jours (Arstikaitis *et al.*, 2014). Les gènes sur-régulés étaient impliqués notamment dans les voies de signalisation et d'organisation cellulaire ainsi que dans le développement (Arstikaitis *et al.*, 2014). Les gènes sous-régulés, quant à eux, étaient plutôt impliqués dans l'adhésion cellulaire, l'inflammation, l'activité des kinases et les voies de signalisation des récepteurs aux estrogènes (Arstikaitis *et al.*, 2014).

### 1.2.2. L'intérêt des techniques « omiques » en toxicologie environnementale

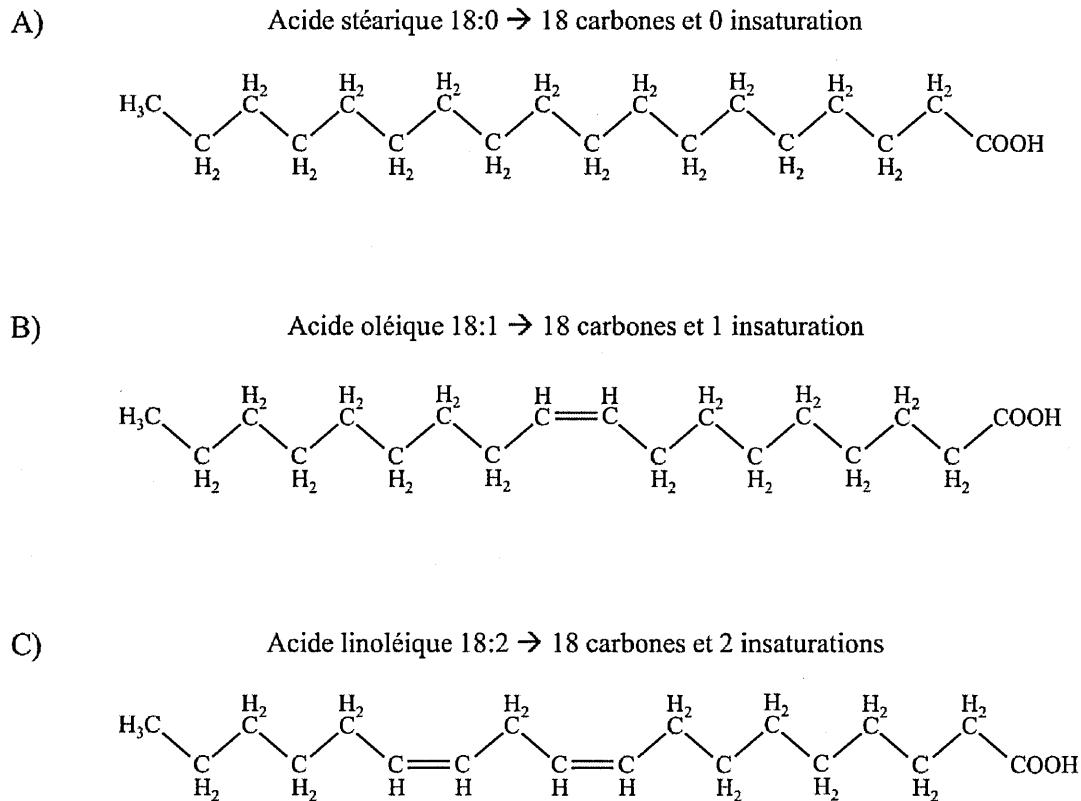
Les techniques « omiques » sont de plus en plus mises en application dans les études écotoxicologiques et permettent d'obtenir un portrait plus global des systèmes biologiques (Lankadurai *et al.*, 2013). La transcriptomique étudie la transcription des gènes alors que la protéomique étudie la présence des protéines dans les cellules. D'autre part, la métabolomique investigue plutôt le profil du métabolome qui représente l'ensemble des produits métaboliques des processus de régulation d'une cellule (Miracle et Ankley, 2005). Le métabolome rassemble ainsi des milliers de petites molécules naturelles (métabolites) qui sont requises pour la maintenance, la croissance et les fonctions normales cellulaires, telles que les sucres, les acides organiques, les acides aminés, les vitamines, les lipides et les nucléotides (Jones *et al.*,

2013). Chacune de ces techniques fournit une partie de l'information au sujet des différents éléments de réponses survenant au niveau moléculaire dans un organisme exposé à un agent stressant. Les changements au niveau du métabolome sont moins régulés par l'homéostasie et les mécanismes de rétroaction que ceux associés à l'expression de gènes et à la production de protéines, ce qui fait de la métabolomique un indicateur plus sensible que les autres techniques « omiques » (Lankadurai *et al.*, 2013). Les analyses métabolomiques peuvent être dite « ciblées » pour analyser un groupe spécifique de métabolites (par exemple les lipides), ou « non ciblées » pour observer les changements du métabolome sans rechercher une classe de composés en particulier (Lankadurai *et al.*, 2013). Elles peuvent être basées sur la spectrométrie de masse pour une plus grande sensibilité et une meilleure détection de métabolites à l'état de traces ou sur la résonance magnétique nucléaire pour une moins grande sélectivité (Lankadurai *et al.*, 2013). Une technique comme la métabolomique est utile pour observer les effets qui provoquent un changement biochimique au niveau cellulaire, mais qui ne modifient pas nécessairement l'état de santé apparent de l'organisme (Jones *et al.*, 2013). L'application d'analyses métabolomiques environnementales pourraient alors permettre de découvrir de nouveaux biomarqueurs d'exposition à divers agents stressants avant que la santé d'un organisme ne soit gravement affectée et que les effets de cette détérioration soient même visibles au niveau de l'apparence extérieure (Jones *et al.*, 2013). L'application des techniques « omiques » dans le cadre d'études de risque environnemental pourrait ainsi aider à prévenir les dommages en permettant de reconnaître une perturbation au niveau de l'organisme avant l'apparition d'effets néfastes irréversibles. L'avènement de ces méthodes donne également la possibilité de caractériser les contaminants selon leurs effets au niveau moléculaire, cellulaire, tissulaire et de l'organisme en entier, et donc d'adopter une approche biologique systémique dans les analyses de risque (Bahamonde *et al.*, 2016).

## 1.3. Exposition aux effluents : Le métabolisme lipidique des poissons

### 1.3.1. Les lipides du foie et leurs fonctions

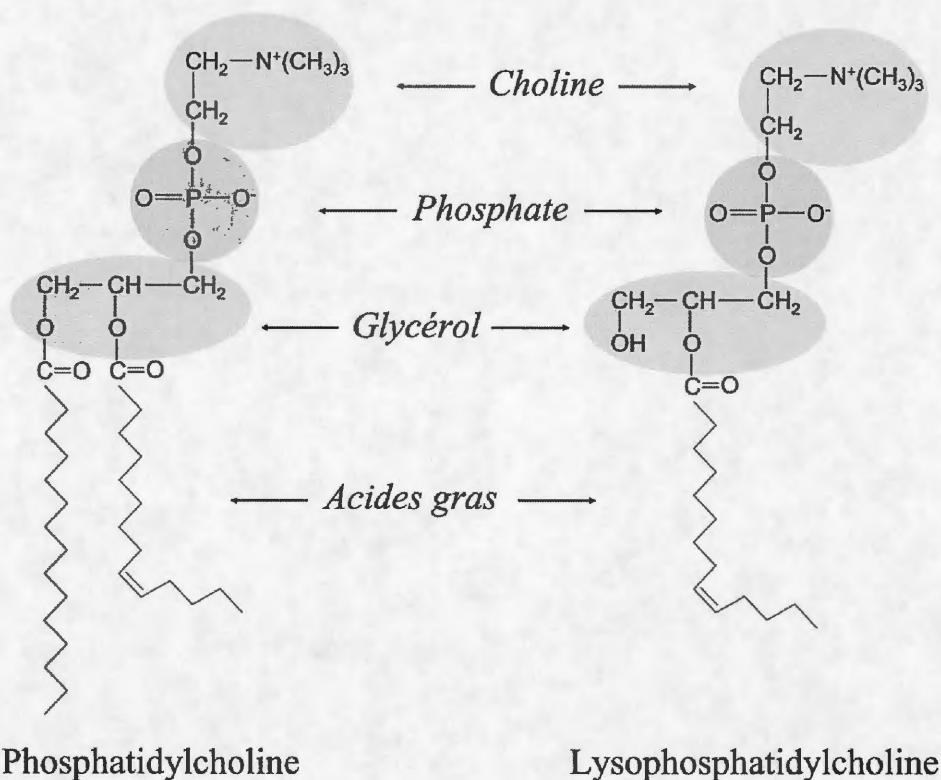
Les lipides font partie de l'ensemble des métabolites (profil métabolomique ou métabolome) retrouvés dans le foie des poissons et ont des rôles importants dans l'histoire de vie et la physiologie de ces organismes, notamment au niveau de la croissance, de la reproduction, du mouvement et de la migration (Tocher, 2003). Les lipides sont un des constituants organiques majeurs des poissons et représentent leur source d'énergie principale (Tocher, 2003). Ils sont divisés en deux grandes classes : les lipides polaires, comprenant principalement les phospholipides, et les lipides neutres, comprenant principalement les triglycérides (Tocher, 2003). Les acides gras sont des chaînes contenant entre 4 à 36 atomes de carbones et ayant un nombre varié d'insaturations (lien double entre atomes de carbone). Les acides gras saturés (SFA) ne contiennent aucune insaturation, tandis que les acides gras mono-insaturés (MUFA) et polyinsaturés (PUFA) en contiennent une seule ou plusieurs respectivement (Fig. 1.1) (Tocher, 2003). Ces lipides servent principalement à produire de l'énergie, et sont également les constituants principaux des phospholipides et des réserves d'énergie entreposées sous forme de triglycérides (Tocher, 2003). Certains acides gras sont également les précurseurs de messagers secondaires, les eicosanoïdes, qui jouent un rôle dans la contraction et la vasodilatation, l'inflammation et la réponse immunitaire d'un tissu (Dennis et Norris, 2015; Tocher, 2003). Les acides gras doivent être associés à un groupement coenzyme A (CoA) et à une molécule de carnitine pour former des acylcarnitines afin de pouvoir traverser les membranes des mitochondries et permettre la production d'énergie (Schulz, 2002).



**Figure 1.1** Exemple de structure des acides gras A) saturés, B) mono-insaturés et C) polyinsaturés. Un exemple de nomenclature est également indiqué pour chacun de ces trois types d'acides gras.

Les phospholipides sont les constituants majeurs des membranes cellulaires, et sont formés d'un groupement L-glycérol-3-phosphate et de deux acides gras (Tocher *et al.*, 2008). Le groupement phosphate peut être estérifié à divers groupements, formant ainsi différents types de phospholipides : phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylserine (PS) et phosphatidylinositol (PI). Les sphingolipides représentent un autre type de phospholipides dans lesquels les acides gras sont estérifiés à des groupements aminés, contrairement à une estérification à des groupements alcools dans les phosphoglycérides (Tocher *et al.*, 2008). La forme

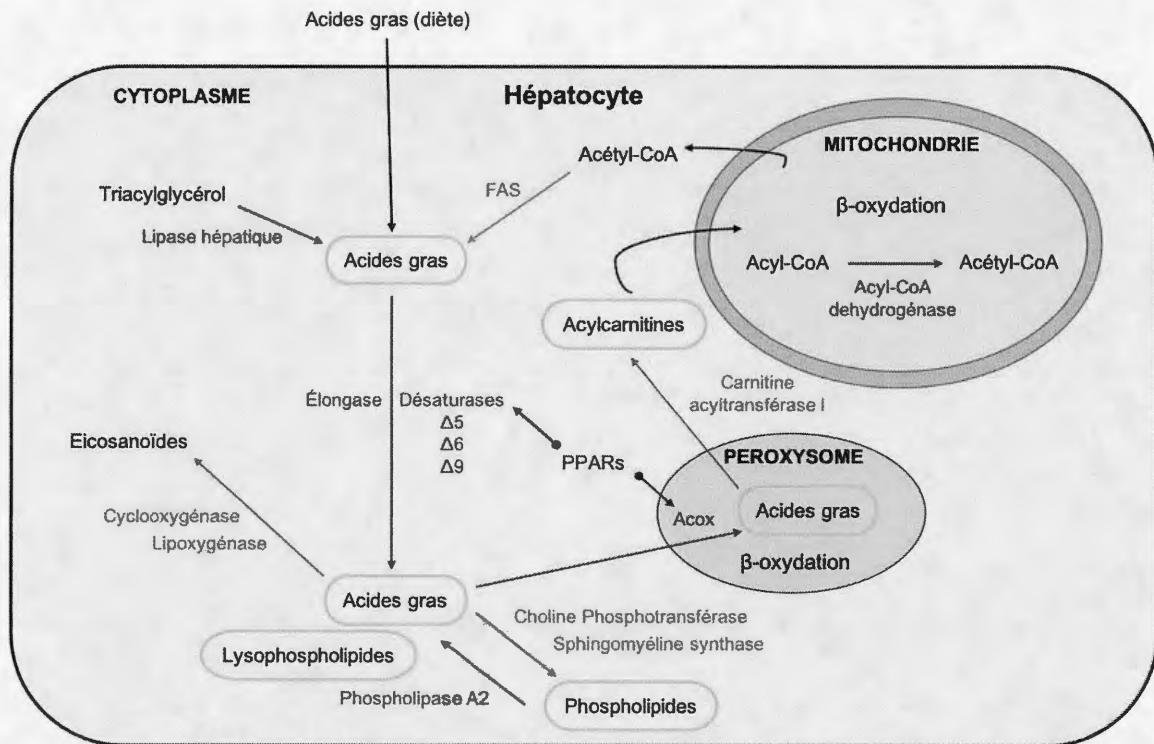
et la structure des phospholipides, définies selon la longueur et le degré d'insaturation des acides gras qu'ils contiennent, permettent de maintenir l'intégrité des membranes en assurant une fluidité et une perméabilité adéquate. En plus de leur rôle structural majeur, les phospholipides sont également les précurseurs de médiateurs biologiquement actifs du métabolisme et de la physiologie des poissons. Les dérivés des phospholipides tels que les phosphoinositides jouent notamment un rôle important dans la signalisation cellulaire. Les lysophosphatidylcholines (LPC), dérivés des PC, font également partie de la classe des phospholipides et sont notamment impliqués dans les processus inflammatoires, jouant ainsi un rôle dans le développement de diverses maladies telle que l'athérosclérose (Fig. 1.2) (Grzelczyk et Gendaszewska-Darmach, 2013).



**Figure 1.2** Structure d'un phosphatidylcholine et d'un lysophosphatidylcholine. Les groupements fonctionnels qui forment ces deux phospholipides sont indiqués en italique à l'aide de flèches.

### 1.3.2. Le métabolisme des lipides

Plusieurs processus interagissent dans la mise en place et la modification du profil lipidique du foie (Fig. 1.3).



**Figure 1.3** Enzymes impliquées dans la synthèse (vert), le catabolisme (rouge), le remodelage (bleu) et le transport (noir) des acides gras, des acylcarnitines et des phospholipides dans un hépatocyte de vertébré. Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs) qui activent certaines de ces enzymes sont également indiqués (violet).

Les acides gras peuvent être dégradés pour produire de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) dans les mitochondries (Schulz, 2002; Tocher, 2003). Les acides gras longs et insaturés doivent d'abord être oxydés par l'acyl-CoA oxydase (ACOX) dans les peroxysomes avant d'être transportés vers les mitochondries pour la suite de la  $\beta$ -oxydation (Schulz, 2002; Tocher, 2003). Afin de pouvoir traverser les membranes externe et interne des mitochondries, les acides gras doivent être transformés en acylcarnitines par l'action de l'acyl-CoA synthétase et de la carnitine acyltransférase I (Schulz, 2002). Une fois à l'intérieur de la mitochondrie, les acylcarnitines sont retransformés en acyl-CoA par la carnitine acyltransférase II et

peuvent alors poursuivre leur  $\beta$ -oxydation (Schulz, 2002). L'acétyl-CoA formée à la fin de la  $\beta$ -oxydation peut être utilisée pour fabriquer de l'ATP et peut également servir à synthétiser de nouveaux acides gras (Schulz, 2002; Tocher, 2003). L'acétyl-CoA est alors transformée en acide palmitique (16:0) au cours d'une suite de réactions réalisées par l'acyl-CoA carboxylase et l'acide gras synthase (FAS) (Tocher, 2003). Les acides gras nouvellement formés peuvent être allongés et/ou modifiés pour y ajouter des insaturations par l'action des élongases et des désaturases (ex. désaturase  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$ ,  $\Delta 9$ ) (Tocher, 2003). Les acides gras ingérés ou nouvellement formés peuvent également être entreposés sous forme de triglycérides servant de réserves lipidiques à court terme dans le foie ou servir à former de nouveaux phospholipides (Tocher, 2003). Les triglycérides entreposés peuvent être hydrolysés par la lipase hépatique pour libérer des acides gras lorsque la cellule manque d'énergie (Tocher, 2003).

Les PC sont les phospholipides les plus communs dans la constitution des membranes cellulaires, et peuvent être formés par l'action de la CDP-Choline phosphotransférase et de la phosphatidyléthanolamine méthyltransférase (PEMT) (Tocher *et al.*, 2008). La sphingomyéline synthase permet de produire la sphingomyéline, un sphingolipide, à partir de PC (Tocher *et al.*, 2008). Les phospholipides contenant des PUFA hautement insaturés sont les plus sensibles à l'action des espèces réactives d'oxygène, et peuvent ainsi subir une peroxydation des lipides (Catalá, 2012). Les phospholipides oxydés peuvent être clivés par la phospholipase A2 (PLA2) afin de retirer le segment atteint (Catalá, 2012). Les acides gras libérés suite à ce clivage peuvent être utilisés dans la formation d'eicosanoïdes par l'action de cyclooxygénases et de lipoxygénases (Dennis et Norris, 2015; Tocher, 2003). Ce clivage libère en même temps des lysophospholipides qui ont également un effet sur l'inflammation, pro- ou anti- selon leur degré de saturation (Grzelczyk et Gendaszewska-Darmach, 2013). Ainsi, les lysophosphatidylcholines saturés sont connus pour être des composés lipidiques pro-

inflammatoires alors que les lysophosphatylcholines polyinsaturés sont plutôt anti-inflammatoires (Grzelczyk et Gendaszewska-Darmach, 2013).

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs) sont des régulateurs transcriptionnels qui maintiennent l'homéostasie des lipides dans l'hépatocyte (Tocher, 2003). Ils peuvent être activés par des métabolites endogènes (par exemple les acides gras) et également par des contaminants (Tocher, 2003). Trois isoformes de PPARs sont présentes chez les poissons ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  et  $\gamma$ ) et occupent différents rôles dans le contrôle du métabolisme des lipides (Varga *et al.*, 2011). Par exemple, PPAR $\alpha$  est exprimé de façon prédominante dans le foie et est un inducteur principal de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysomale (Poulsen *et al.*, 2012; Varga *et al.*, 2011). Les gènes codant pour des enzymes telles que l'ACOX et les désaturases sont ainsi régulés par cette isoforme (Kota *et al.*, 2005; Tocher, 2003).

### 1.3.3. Perturbation du métabolisme lipidique par les contaminants

Le métabolisme lipidique peut être perturbé par l'exposition à des effluents ou à divers contaminants organiques et inorganiques généralement présents dans les effluents. Par exemple, Reinling *et al.* (2017) ont mesuré une sous-expression des gènes *fas* et *acox* ainsi qu'une activité plus faible de l'enzyme ACOX dans le foie de brochets mâles prélevés en aval du point de rejet de l'effluent de la ville de Montréal comparativement aux brochets prélevés en amont. L'activité de l'ACOX ainsi que la transcription du gène codant pour cette enzyme, *acox*, étaient aussi négativement corrélés avec les concentrations en PBDE dans le foie des brochets mâles (Reinling *et al.*, 2017). Un plus grand pourcentage en lipides a aussi été mesuré dans le foie des brochets femelles prélevés en aval du point de rejet de l'effluent (Reinling *et al.*, 2017). Une analyse du foie de perchaudes prélevées à 10 km en amont du point de rejet de l'effluent de la ville

de Montréal, puis à 4 km et 10 km en aval a permis de constater une surexpression de *acox* et une sous-expression des gènes codant pour l'acyl-CoA déhydrogénase et PPAR $\gamma$  chez les poissons exposés à l'effluent en aval (Houde *et al.*, 2014a). De plus, une sous-expression de *pla2* a été mesurée lors d'une exposition de ménés à tête de boule mâles à un effluent provenant de la station métropolitaine de traitement des eaux usées de Saint-Paul au Minnesota durant trois semaines en laboratoire (Garcia-Reyero *et al.*, 2011). Falciani *et al.* (2008) ont récolté des flets d'Europe (*Platichthys flesus*) mâles à six sites d'échantillonnage ayant différents degrés de pollution en Europe du Nord et ont aussi mesuré des différences d'expression pour certains gènes liés au métabolisme des lipides. Dans le foie des poissons provenant des sites pollués en comparaison au site de référence, une surexpression de *pla2* et de *pemt* en plus d'une sous-expression du gène codant pour l'acyl-CoA déhydrogénase ont été mesurées (Falciani *et al.*, 2008).

Des changements dans la composition en acides gras, en acylcarnitines et en phospholipides ont également été déterminés chez plusieurs espèces de poissons exposées à des effluents municipaux ou à des contaminants généralement présents dans les effluents. Par exemple, une exposition de morues de l'Atlantique (*Gadus morhua*) mâles par voie orale à une dose environnementalement réaliste d'un mélange de composés organiques persistants (biphényles polychlorés, acide perfluorooctanesulfonique, PBDE et pesticides chlorés) pendant quatre semaines a permis de mesurer une teneur totale en SFA plus élevée et inversement, une teneur plus faible en certains PUFA dans le foie des poissons exposés (Bratberg *et al.*, 2013). Sakalli *et al.* (2018) ont déterminé des proportions plus élevées de MUFA et des proportions plus faibles de SFA et PUFA dans les muscles de carpes communes exposées à un effluent en République tchèque pendant un an en milieu naturel. Fadhlaoui et Couture (2016) ont quant à eux testé l'influence potentielle de l'exposition au nickel et au cadmium sur le métabolisme des lipides en évaluant la composition en

acides gras des phospholipides dans le muscle de la perchaude. Ces auteurs ont observé des proportions plus élevées en SFA et MUFA et des proportions plus faibles en PUFA dans les phospholipides totaux du muscle des poissons exposés à ces métaux (Fadhlaoui et Couture 2016). De plus, une augmentation de methylbutryolcarnitine (une acylcarnitine) et de lysophospholipides a également été mesurée dans le plasma de truites arc-en-ciel juvéniles exposées à un effluent en laboratoire pour une période de 10 jours (Al-Salhi *et al.*, 2012). Aussi, des concentrations plus faibles de LPC et des concentrations plus élevées de PC ont également été mesurées dans des échantillons d'homogénat de poisson-zèbre exposé à une faible concentration (5 µg/L) de paraffines chlorées à chaîne courte (Ren *et al.*, 2018).

#### 1.4. Objectifs et hypothèses

Cette étude a pour objectif global d'évaluer les effets de l'exposition environnementale à l'effluent de la ville de Montréal sur le métabolisme lipidique hépatique du grand brochet du fleuve Saint-Laurent. Étant donné les quantités importantes de RFH, tels que les PBDE, détectées dans les tissus de poissons situés en aval du point de rejet de l'effluent dans le fleuve Saint-Laurent, les RFH sont utilisés en guise de marqueur d'exposition à l'effluent dans cette étude. Les concentrations en PBDE et en certains RFH émergents, tels que les Dechloranes, sont ainsi utilisées pour investiguer les liens possibles entre l'accumulation de contaminants dans les foies des brochets et plusieurs marqueurs du métabolisme lipidique (gènes et composition en lipides). Ce projet de recherche vise à obtenir un portrait général des perturbations du métabolisme lipidique au niveau moléculaire en utilisant une approche de comparaison des sites témoin et exposé en amont et en aval du point de rejet de l'effluent.

#### 1.4.1. Objectifs spécifiques

1) Évaluer les effets de l'exposition à l'effluent de la ville de Montréal sur la composition en acides gras, en acylcarnitines, en phospholipides (phosphatidylcholines, lysophosphatidylcholines et sphingomyélines) dans le foie des brochets.

**Hypothèse 1 :** Étant donné le rôle de l'ACOX dans le métabolisme des acides gras polyinsaturés et la sous-expression de *acox* mesurée dans le foie des brochets exposés à l'effluent de Montréal lors d'une récente étude de notre groupe de recherche (Reinling *et al.*, 2017), des concentrations plus faibles en acylcarnitines et plus élevées en acides gras polyinsaturés sont attendues dans le foie des brochets capturés en aval de l'effluent de Montréal. De plus, selon les effets généraux mesurés dans les tissus des poissons exposés à des effluents en milieu naturel ou contaminants en laboratoire ainsi que le lien métabolique entre les acides gras et les phospholipides, une composition différente en phosphatidylcholines et en lysophosphatidylcholines est attendue dans le foie des brochets prélevés en aval du point de rejet de l'effluent de Montréal en comparaison aux brochets prélevés en amont. Si des différences de concentrations en lipides sont mesurées entre les brochets des deux sites, des corrélations entre ces concentrations et celles des RFH sont également attendues, puisque ces contaminants sont utilisés en guise de marqueur d'exposition à l'effluent.

2) Évaluer les effets de l'exposition à l'effluent de la ville de Montréal sur la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dans le foie des brochets, tels que les PPAR $\alpha$  et  $\beta/\delta$ , la PLA2, la PEMT et les lysophosphatidylcholine acyltransférases 3 et 4.

**Hypothèse 2 :** Étant donné le lien entre la présence d'une enzyme, qui est en partie déterminée par l'expression d'un gène, et l'abondance du composé produit par cette enzyme, une association entre les concentrations en lipides et les niveaux d'ARN messager des gènes liés au métabolisme de ces composés est attendue dans le foie des brochets. Par exemple, une différence de concentrations en acides gras dans le foie des brochets en aval par rapport à celles dans le foie des brochets en amont pourrait être liée à une différence dans les niveaux d'ARN messager de PPAR $\alpha$  étant donné son rôle dans la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysonomale des acides gras.

## CHAPITRE II

### ENVIRONMENTAL EXPOSURE OF NORTHERN PIKE (*ESOX LUCIUS*) TO A PRIMARY WASTEWATER EFFLUENT: METABOLOMIC PROFILE AND LIPID METABOLISM

Christine Dépatie<sup>a</sup>, Magali Houde<sup>b\*</sup>, Jonathan Verreault<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centre de recherche en toxicologie de l'environnement (TOXEN), Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montreal, QC, H3C 3P8, Canada

<sup>b</sup>Environment and Climate Change Canada, 105 McGill Street, Montreal, QC, H2Y 2E7, Canada

## 2.1. Abstract

Lipids play important roles in growth, reproduction, locomotion, and migration of fish. Municipal effluents, which are complex mixtures of biological and chemical compounds including flame retardants, have been shown to alter lipid metabolism in fish. Down-regulation of genes coding for fatty acid metabolism enzymes has previously been reported in male northern pike (*Esox lucius*) collected in the St. Lawrence River (QC, Canada) downstream of a major primary wastewater treatment plant (WWTP). There is currently a lack of knowledge on the potential effects of exposure to WWTP urban effluents on the hepatic lipid composition of fish from this freshwater ecosystem. The main objective of the present study was to investigate the effects of exposure to the Montreal's WWTP effluent on the metabolomic profile (*i.e.* fatty acids, acylcarnitines and phospholipids) as well as the transcription of genes related to lipid metabolism in the liver of northern pike collected upstream and downstream of this large treatment facility. Halogenated flame retardants concentrations were also analyzed in pike liver and used as markers of exposure to the WWTP effluent. Greater concentrations of saturated and monounsaturated lysophosphatidylcholines (LPCs) and lower concentrations of polyunsaturated LPCs were determined in the liver of pike collected downstream compared to pike collected upstream. Lower levels of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (*ppara*) mRNA, a major regulator of lipid metabolism, were also measured in pike exposed to the Montreal's WWTP effluent. In addition, the relative contributions (%) of LPC 18:2 and LPC14:0, compounds known as markers of obesity and inflammation, were significantly correlated with halogenated flame retardant concentrations and fish girth. Results suggest that chronic environmental exposure to a primary WWTP effluent could modulate transcription of genes related to lipid metabolism and affect the hepatic phospholipid composition of pike from the St. Lawrence River.

*Keywords:* fish; metabolomics; lipids, metabolism; halogenated flame retardants; gene transcription.

## 2.2. Introduction

Lipids are part of the complex metabolomic profile in fish tissues and play important roles in growth, reproduction, locomotion, and migration (Tocher, 2003). Investigating lipid composition in tissues can, therefore, provide valuable information on fish health status. Neutral lipids including fatty acids are an essential source of energy for fish, and part of the constitution of phospholipids and polar lipids that play key roles in maintaining the structure of cell membranes (Tocher, 2003). The association of a fatty acid, coenzyme A (CoA) group and carnitine in fish cells forms acylcarnitines, complexes that allow fatty acids to cross the mitochondrial membranes for energy production in cellular compartments (Schulz, 2002). Additionally, phospholipids are found under different forms in cells, and can then be grouped into phosphatidylcholines (PCs), phosphatidylethanolamines (PEs), phosphatidylinositol (PIs) and phosphatidylserines (PSs) according to their head group. Lysophospholipids found in fish cells are derived from phospholipids and are mainly involved in inflammatory processes (Grzelczyk and Gendaszewska-Darmach, 2013).

Several enzymes and genes are involved in the metabolism of lipids in fish. Fatty acid synthase (FAS) plays an important role in the synthesis of fatty acids in the liver of fish, while acyl-CoA oxidase (ACOX) catalyzes their degradation in order to produce energy in the form of adenosine triphosphate (ATP) (Tocher, 2003). Phospholipids can be transformed from one form to another, for example by the action of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) that catalyzes the transformation of PEs to PCs. The cleavage of phospholipids is catalyzed by

phospholipase A2 (PLA2) and leads to the release of fatty acids and lysophospholipids (Catalá, 2012). Both of these lipid groups can modulate inflammatory processes depending on their degree of saturation (Grzelczyk and Gendaszewska-Darmach, 2013). Saturated lysophosphatidylcholines are known to be pro-inflammatory lipid compounds, whereas polyunsaturated lysophosphatylcholines are rather anti-inflammatory (Grzelczyk and Gendaszewska-Darmach, 2013). Conversely, fatty acids can be added to the lysophospholipids to form new phospholipids by the action of several isoforms of lysophosphatidylcholine acyltransferases (LPCAT) (Jackson *et al.*, 2008). Finally, peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are transcriptional regulators that maintain lipid homeostasis in cells mainly by modulating the activity of enzymes involved in lipid metabolism such as ACOX and LPCAT (Tocher, 2003). These processes must be tightly regulated in order to maintain a stable lipid composition in tissues. Lipid compounds are closely related to pathogenesis such as inflammation, cancer and autoimmune disease (Santos and Preta, 2018). Thus, small changes in their composition within cells can have deleterious impact on fish health.

Municipal wastewater treatment plant (WWTP) effluents are composed of a variety of biological and chemical substances, and thus represent a significant source of environmental contaminants (Marcogliese *et al.*, 2015). These include trace elements (Cantinho *et al.*, 2015), halogenated flame retardants (HFRs) (Houde *et al.*, 2014a, 2014b), and pharmaceutical compounds as well as personal care products (Tran *et al.*, 2018), which are partly eliminated through wastewater treatment processes and discharged into aquatic ecosystems via effluents. Aquatic organisms residing in waters receiving effluents can therefore be exposed to elevated concentrations of environmental contaminants. Among such pollutants, tissue concentrations of polybromodiphenyl ether (PBDE) flame retardants in perch (*Perca flavescens*), collected in the St. Lawrence River downstream of the Montreal's (Quebec, Canada) primary WWTP effluent point of discharge, were found to be significantly greater

compared to individuals collected upstream (Houde *et al.*, 2014a). PBDEs are added to plastics, textiles, upholstered furniture, and electronic and electric equipment to reduce flammability (de Wit, 2002). All commercial mixtures of PBDEs are now listed as Persistent Organic Pollutants (POPs) under the Stockholm Convention (Stockholm Convention, 2009, 2017). However, PBDEs are still abundant in in-use consumer products (*e.g.* mattresses, curtains, computers, car seats, etc.) as well as in disposed products (waste phase) which will represent sources of environmental contamination for years to come (Abbasi *et al.*, 2015). As a result of the growing demand for nonflammable products, alternative (emerging) flame retardants are being marketed or produced in higher volumes to replace PBDE mixtures and other restricted or banned HFRs (*e.g.* hexabromocyclododecane) (Tongue *et al.*, 2019). Among emerging flame retardants, large volumes of Dechlorane Plus (DP) were reported to be annually produced or imported in the USA, reaching up to 450 tons/year (Sverko *et al.*, 2011). Dechlorane (Dec)-602 was measured at elevated concentrations in lake trout (*Salvelinus namaycush*) and whitefish (*Coregonus clupeaformis*) tissues from Lake Ontario, thus suggesting that certain Dechlorane-related compounds are bioaccumulative in the aquatic food web (Shen *et al.*, 2014; Sverko *et al.*, 2011).

There is increasing evidence that chronic exposure to complex mixtures of contaminants found in municipal effluents can alter the lipid metabolism of fish. For example, a recent study from our research group reported a down-regulation of the *acox* gene in liver of male northern pike (*Esox lucius*) collected downstream of the Montreal's WWTP effluent point of discharge that was found to be associated with a lower activity of the related enzyme (Reinling *et al.*, 2017). Moreover, a down-regulation of the gene *fas* was also measured in the same male pike (Reinling *et al.*, 2017). In that study, ACOX activity and *acox* transcription levels were also negatively correlated with PBDE concentrations in the liver of male pike (Reinling *et al.*, 2017). Additionally, greater total lipid percentages were determined in the liver of female pike

collected downstream of Montreal's municipal effluent discharge point (Reinling *et al.*, 2017). Compositional changes in fatty acids and phospholipids have also been found to occur in fish exposed to effluents and individual contaminants in the environment as well as in the laboratory. Sakalli *et al.* (2018) found greater total lipid content and proportions of mono-unsaturated fatty acids (MUFA), and lower proportions of saturated (SFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) in muscle of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed for a year in the field to an urban effluent in Czech Republic. Ren *et al.* (2018) further measured lower concentrations of lysophosphatidylcholines (LPCs) and higher concentrations of PCs in homogenate samples of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to a low concentration (5 µg/L) of short-chain chlorinated paraffins used as flame retardants and plasticizers. Moreover, Du *et al.* (2016) measured lower concentrations of acylcarnitines and linoleic acid and higher concentrations of arachidonic acid in the liver of zebrafish exposed for 7 days to 0.05 mg/L and 0.3 mg/L of the flame retardant triphenyl phosphate.

The Montreal's primary WWTP serves 4 million inhabitants and has been found to be a significant source of HFR exposure for wild fish residing in its plume (Houde *et al.*, 2014a, 2014b; Laliberté, 2011; Reinling *et al.*, 2017). As a result, HFRs were suggested as good markers of effluent exposure for northern pike, muskellunge (*Esox masquinongy*) and yellow perch in this freshwater ecosystem (Houde *et al.*, 2014a, 2014b; Reinling *et al.*, 2017). Northern pike are top predators and high concentrations of PBDEs and other emerging HFRs, including hexabromobenzene (HBB), Dec-604, Dec-604 CB and anti-DP, can accumulate in their tissues (Reinling *et al.*, 2017). The objective of the present study was to examine the effects of a chronic environmental exposure of St. Lawrence River northern pike to the Montreal's WWTP effluent on the hepatic lipid composition and the transcription of genes related to lipid metabolism. Changes in metabolomic profiles are less regulated by homeostasis and feedback mechanisms than those associated with gene expression and protein

synthesis, making metabolomics a more sensitive indicator than other 'omic' techniques (Lankadurai *et al.*, 2013). This technique therefore has great potential for characterizing the reactions of an organism exposed to various stressors in the natural environment (Lankadurai *et al.*, 2013). Targeted metabolomics was used to determine the concentrations of three lipid classes (*i.e.* fatty acid, acylcarnitines, and phospholipids) in pike liver collected upstream and downstream of the effluent point of discharge in the river. The mRNA levels of genes involved in the metabolism of lipids (*i.e.* *pla2*, *lpcat*, *pemt*, *ppara* and *pparδ*) were also measured in pike liver to investigate mechanisms of action. The lipidomic profile and mRNA levels were additionally related to the concentrations of PBDEs and selected emerging HFRs in pike liver. This study provides insight into WWTP effluent exposure-related effects on lipid metabolism of a top predator fish at the molecular level, and could ultimately lead to the development of novel biomarkers of lipid metabolism in fish species exposed to complex environmental contaminant mixtures.

## 2.3. Materials and Methods

### 2.3.1. Field sampling

Northern pike were sampled from late May to early June 2014 and 2015 using a beach seine. Collection was done after spawning to minimize variations in liver lipid content. Pike were collected 4 km upstream (Île de Boucherville; 9 males and 17 females) and 4 km downstream (Îlet Vert; 6 males, 18 females) of the point of discharge of the Montreal's primary WWTP effluent in the St. Lawrence River (QC, Canada). Fish were euthanized in clove oil (250 mg/L), measured (body length and circumference) and weighed ( $\pm 0.01$ g). The Fulton's condition index was determined with the following formula: [body mass (g)/total length (cm<sup>3</sup>)]  $\times$  1000 and used as a proxy of body

condition. Several liver aliquots (15 mg) were collected in tubes and kept in dry ice in the field, and stored subsequently at -80°C in the laboratory for lipid and gene transcription analyses (sections 2.3.3 to 2.3.6). Remaining liver samples were collected in tubes and kept on ice in the field and then stored at -20°C in the laboratory for contaminant analysis (section 2.3.2). Cleithra were collected for age determination at the Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (Trois-Rivières, QC) by counting the number of growth annuli following methods by Le Cren (1947). Gonads were collected and preserved in formalin for sex determination at the University of Montreal (Saint-Hyacinthe, QC) according to methods described by Blazer *et al.* (2002). Protocols for handling and sampling of fish were approved by Environment and Climate Change Canada's Animal Care Committee in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines (Ottawa, ON, Canada). Fish collected during this sampling period were also used by Reinling *et al.* (2017). This previous study had raised questions about the disruption of energy metabolism in pike in the St. Lawrence River. The choice to use the same individuals in this study was therefore made to try to better understand the disturbances of lipid metabolism in pike from the same sub-population.

### 2.3.2. Chemical analysis

HFR concentrations were analyzed in pike liver samples according to methods described by Reinling *et al.* (2017) without modification, as the same pike individuals were used in this study. Briefly, sample aliquots (0.75-1.0 g) were ground with diatomaceous earth, spiked with 100 µL of a 200 ppb internal standard solution (BDE-30, BDE-156, <sup>13</sup>C-BDE-209, and <sup>13</sup>C-syn-DP), and extracted with dichloromethane:*n*-hexanes (50:50 volume ratio). Identification and quantification of analytes were performed using a gas chromatograph (GC) coupled to a single quadrupole mass spectrometer (MS) (Agilent Technologies 5975C Series, Palo Alto, CA) operating in

electron capture negative ionization mode (GC/MS-ECNI). Quality control procedures including blanks, repeated analyses of fish samples and standard reference material (SRM 1947, Lake Michigan Fish Tissue; National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) were analyzed in each batch of ten samples. Concentrations of the six PBDE congeners in SRM 1947 ( $n = 4$ ) showed less than 18.5% variation from the certified values. Method limits of detection (MLODs; defined as signal to noise ratio [S/N] = 3) and method limits of quantification (MLOQs; minimum amount of analyte producing a peak with S/N = 10) were based on replicate analyses ( $n = 8$ ) of matrix samples spiked at a concentration of 3-5 times the estimated detection limit. Mean ( $\pm$  SEM) recoveries for spiked internal standards in pike liver, blank and SRM 1947 samples were as follows: BDE-30 (96  $\pm$  1.0%), BDE-156 (100  $\pm$  1.6%), <sup>13</sup>C-BDE-209 (59  $\pm$  1.5%), and <sup>13</sup>C-syn-DP (96  $\pm$  1.2%). A complete list of all congeners/compounds analyzed can be found in Table 2.3.

### 2.3.3. Lipid compound analysis

Targeted metabolomic analyzes were performed by AXYS Analytical Services Ltd. (Sydney, BC, Canada) according to methods described by Benskin *et al.* (2014) without modification. A total of 112 lipid compounds were analyzed in pike liver (see complete list in Table 2.4). Briefly, liver samples were homogenized and extracted with methanol (6 mL/g tissue). Lipids were analyzed using a high performance liquid chromatograph (HPLC) (Agilent 1100) coupled to a API4000 triple quadrupole MS (Applied Biosystems/Sciex, Concord, ON, Canada). Ten saturated and unsaturated fatty acids were quantified by isotopic dilution and analyzed HPLC-MS/MS. Eight acylcarnitines, 11 sphingomyelins, 74 phosphatidylcholines and 9 lysophosphatidylcholines were analyzed by flow-injection tandem mass spectrometry (FI-MS/MS). Recovery percentage of internal standards varied between 26% and 185% for fatty acids (FA

14:0, FA 20:4, FA 20:5, and FA 22:6), between 89% and 148% for LPC 18:0, and between 69% and 103% for PC 36:2. The variability in the recovery percentages could be explained by the fact that the liver is a complex biological matrix. In order to control for this factor and to ensure the quality of the data, lipid compounds for which the percentages of recovery were too low were not considered in statistical analyses. Moreover, for each of the lipid compounds, the mean values in the blanks were calculated. These blank values were then subtracted from those obtained for each lipid compound in pike liver samples. The contribution percentage of individual compounds was calculated as the concentrations of lipid compound divided by the sum of all lipid compounds related to the same functional family. The relative abundances of individual lipid compound were used in analyses to evaluate the lipid composition/contribution in the liver of pike rather than comparing absolute concentrations in order to correct for individuals whose liver was more or less concentrated in lipid compounds. The ratios between LPC and PC concentrations were also used in the analyses to evaluate the potential effects of Montreal' WWTP effluent exposure on PC remodeling into LPC because of the enzymatic linkages between these two groups of phospholipids.

#### 2.3.4. RNA extraction and reverse transcription

The targeted genes were all related to enzymes that are involved in the synthesis, catabolism and remodeling of lipid compounds (Table 2.5). PPAR $\gamma$  also plays a role in the regulation of lipid metabolism in fish and has been previously analyzed in the same pike (Reinling *et al.*, 2017). Thus, only the other two other isoforms of PPARs (PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ ) were analyzed in the present study. Transcription analyses were conducted using methods described by Reinling *et al.* (2017) without modification. Briefly, RNA extraction was performed using the RNeasy plus mini kit (Qiagen, Toronto, ON,

Canada) following the manufacturer's instructions. The concentration and purity of the RNA was estimated with NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, ON, Canada). The integrity of the RNA was verified with the Experion™ Automated Electrophoresis System (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) using the Experion™ RNA StdSens Analysis Kit (Bio-Rad). Reverse transcription was performed with the QuantiTect® reverse transcription kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions for a total cDNA volume of 20 µl. The cDNA samples were stored at -80°C until real-time PCR analysis (section 2.3.6).

### 2.3.5. Primer design

Expressed gene sequences for *Esox lucius* were selected in the GenBank database (Table 2.1). All primers were designed by the authors using Primer-BLAST from NCBI (Rozen and Skaletsky, 2000). Oligo Analyzer (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) was used to examine the presence of secondary structures. For each gene, two pairs of primers were evaluated, except for the reference genes, which have previously been validated by Reinling *et al.* (2017). Primers were manufactured by Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). A calibration curve was performed for each primer pair (starting cDNA concentration: 2 ng; 8 serial dilutions; 2- or 3-fold) to estimate PCR efficiency (values were between 90% and 114%) and limits of detection. A description of the function of these genes can be found in Table 2.5.

Table 2.1 Genes, symbols and primers used for RT-qPCR analysis in northern pike liver.

Gene names	Symbols	Species	Accession numbers	Primers	Sequences
<b>Target genes</b>					
Peroxisome proliferator activated receptor alpha	<i>ppara</i>	<i>Esox lucius</i>	XM_010883898.2	Forward	CTGAGCCCACGGATTG
Peroxisome proliferator activated receptor delta	<i>pparδ</i>	<i>E. lucius</i>	XM_010893343.2	Forward	GTGAGCTACGGTGATAGTG
Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3	<i>lpcat3</i>	<i>E. lucius</i>	XM_010900842.3	Forward	CACAGGCATAATCAGCCTTAC
Lysophosphatidylcholine acyltransferase 4	<i>lpcat4</i>	<i>E. lucius</i>	XM_010903766.3	Reverse	TATGGCTATCCTCTGGTG
Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	<i>pemt</i>	<i>E. lucius</i>	XM_010863691.2	Forward	GGAGGTACGGCAACATTAG
Phospholipase A2 (group IV)	<i>pla2</i>	<i>E. lucius</i>	XM_020049184.1	Reverse	AGAAAGCCAGAGGTGGAG
<b>Reference genes</b>					
β2 microglobulin precursor	<i>b2mg</i>	<i>E. lucius</i>	BT079123.1	Forward	GTCAGTCAGTCCAGTAGAG
Ribosomal protein S20	<i>rps20</i>	<i>Salmo salar</i>	BT060032.1	Reverse	CAGGACGGACTGTGTTG
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>ppia</i>	<i>E. lucius</i>	BT080015.1	Forward	TGATCCCACCTCCCTTGAC
Tubulin α chain	<i>tba</i>	<i>E. lucius</i>	BT079618.1	Forward	GCTCAGTGTCCCCCTCAC
				Reverse	CCAGGCATCCCCAGTCTC

Ubiquitin-like protein 4A	<i>ubl4a</i>	<i>E. lucius</i>	BT079424.1	Forward Reverse	CAGCAGGCGAAAGGAGTGGAGT TGCCAGGACGGTGGACAAGT
---------------------------	--------------	------------------	------------	--------------------	--

### 2.3.6. Real-time quantitative PCR analysis

The qPCR analyses were conducted on a real-time PCR thermal cycler (CFX96 Touch™ Real-Time PCR Bio-Rad Detection System) according to methods described by Reinling *et al.* (2017). For each pair of primers selected for targeted genes, a calibration curve was established to obtain the PCR efficiency and the limits of detection. For each gene, no amplification was detected in the no template control wells. Data analyses were performed using the CFX Manager™ software (Bio-Rad).

### 2.3.7. Statistical analyses

Shapiro Wilk and NVC tests were used to verify the normality and homoscedasticity of all variables. Student and Mann-Whitney U tests were then performed to investigate differences in northern pike liver for  $\Sigma_{34}\text{PBDE}$  and  $\Sigma_7\text{Dec}$  concentrations between sites and sexes. Student and Mann-Whitney U tests were also performed to investigate differences in northern pike liver for the sum of fatty acids concentrations ( $\Sigma_2\text{SFA}$ ,  $\Sigma_2\text{MUFA}$ ,  $\Sigma_6\text{PUFA}$ ), the sum of acylcarnitines concentrations ( $\Sigma_8\text{ACYL}$ ), the sum of LPCs concentrations ( $\Sigma_9\text{LPC}$ ), the sum of PCs concentrations ( $\Sigma_{12}\text{sfaPC}$ ,  $\Sigma_{13}\text{mufaPC}$ ,  $\Sigma_{49}\text{pufaPC}$ ) and the sum of sphingomyelins concentrations ( $\Sigma_{11}\text{SM}$ ) between sites and sexes. The differences in relative abundance (%) of individual compounds and gene mRNA levels between sexes and sites were also assessed with Student and Mann-Whitney U tests. Spearman correlation coefficients were used to examine the strength of the correlations between  $\Sigma_{34}\text{PBDE}$  and  $\Sigma_7\text{Dec}$  concentrations, relative abundance (%) of individual lipid compounds, gene transcription levels, and fish girth. Statistical analyses were performed using R version 3.2.1 (R Core Team, 2015, Vienna, Austria) with a significance threshold set to 0.05.

## 2.4. Results

### 2.4.1. HFR concentrations

Fish used in the present study were the same individuals as those used by Reinling *et al.* (2017), and thus the contaminant concentrations are only briefly described here.  $\Sigma_{34}$ PBDE concentrations were 4.5-fold greater in liver of pike collected downstream of the WWTP effluent point of discharge compared to those collected upstream (Table 2.2). These differences were also observed when males ( $n = 15$ ) and females ( $n = 25$ ) were tested separately (male:  $t (8.67) = -3.5, p = 0.008$ ; female:  $t (32) = -5.27, p < 0.001$ ), and  $\Sigma_{34}$ PBDE hepatic concentrations were 2-fold greater in male pike ( $209 \pm 59$  ng/g ww) compared to females ( $104 \pm 19$  ng/g ww) ( $t (27.98) = -2.34, p = 0.03$ ). Concentrations of  $\Sigma_7$ Dec were slightly greater in pike collected downstream, although not significantly relative to those measured in pike collected upstream (Table 2.2). The congener/compound concentrations and profiles of HFRs in pike liver in the present study have been comprehensively described in Reinling *et al.* (2017) in which the same individuals were used, and thus will not be further described here.

**Table 2.2** Mean ( $\pm$  SEM) concentrations of major halogenated flame retardants (ng/g ww) and lipid classes ( $\mu$ g/g ww) in liver of St. Lawrence River pike collected upstream and downstream of the Montreal's WWTP effluent discharge point. Asterisks (\*) indicate a significant difference between sites ( $p \leq 0.05$ ). The full list of halogenated flame retardants and lipid compounds can be found in Tables 2.3 and 2.4.

	Upstream ( $n = 25$ )	Downstream ( $n = 25$ )
$\Sigma_{34}$ PBDE	55 $\pm$ 9	218 $\pm$ 38 *
$\Sigma_7$ Dec	1.2 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.5
$\Sigma_2$ SFA	484 $\pm$ 33	415 $\pm$ 31
$\Sigma_2$ MUFA	1,131 $\pm$ 9	1,091 $\pm$ 126
$\Sigma_6$ PUFA	819 $\pm$ 56	778 $\pm$ 97
$\Sigma_8$ ACYL	9 $\pm$ 0.6	8 $\pm$ 0.9
$\Sigma_9$ LPC	269 $\pm$ 20	211 $\pm$ 21 *
$\Sigma_{12}$ sfaPC	7,361 $\pm$ 434	7,521 $\pm$ 619
$\Sigma_{13}$ mufaPC	435 $\pm$ 19	481 $\pm$ 21
$\Sigma_{49}$ pufaPC	2,447 $\pm$ 80	2,488 $\pm$ 95
$\Sigma_{11}$ SM	369 $\pm$ 16	364 $\pm$ 21

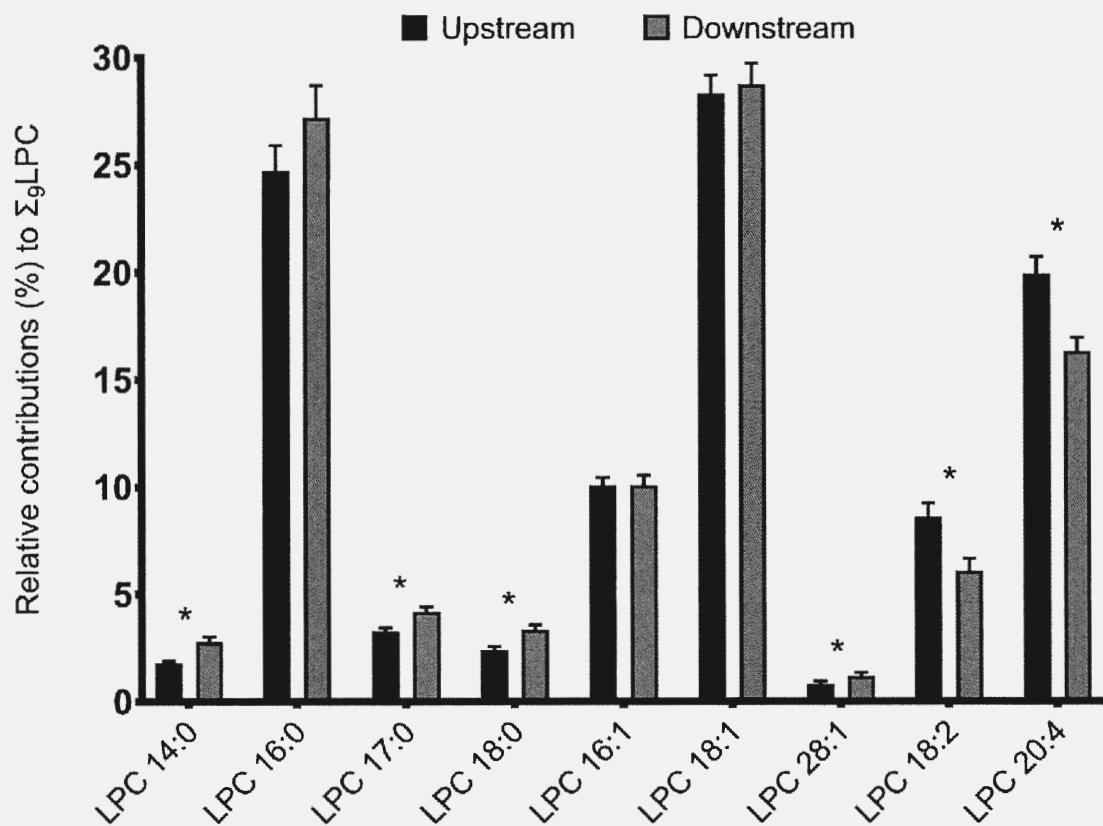
PBDE: polybrominated diphenyl ethers, Dec: dechloranes, SFA: saturated fatty acids, MUFA: mono-unsaturated fatty acids, PUFA: polyunsaturated fatty acids, ACYL: acylcarnitines, LPC: lysophosphatidylcholines, sfaPC: phosphatidylcholine with saturated fatty acids, mufaPC: phosphatidylcholine with mono-unsaturated fatty acids, pufaPC: phosphatidylcholine with polyunsaturated fatty acids, SM: sphingomyelins.

#### 2.4.2. Lipid compound profiles

The liver concentrations of the majority of lipid compounds were found to be similar between male and female pike; sexes were therefore combined in subsequent analyses (Table 2.6). Among all lipid classes analyzed in pike liver, only  $\Sigma_9$ LPC concentrations were significantly different between the two sites, with 1.3-fold lower concentrations determined in individuals collected downstream of the WWTP effluent discharge point ( $t(47.9) = 2.05, p = 0.05$ ; Table 2.2). Concentrations of several individual compounds

within each of these lipid classes were also significantly different between the two sites, and detailed results can be found in Table 2.7.

Three individual saturated and one monounsaturated LPCs showed greater percent contributions to  $\Sigma_9$ LPC concentrations in pike collected at the downstream site compared to those collected up the river (LPC 14:0, W = 119,  $p = 0.001$ ; LPC 17:0, W = 145,  $p = 0.008$ ; LPC 18:0, W = 144,  $p = 0.007$ ; LPC 28:1, W = 164,  $p = 0.03$ ) (Fig. 2.1). In contrast, two polyunsaturated LPCs had lower percent contributions to  $\Sigma_9$ LPC in pike collected downstream the WWTP effluent discharge point (LPC 18:2, W = 364,  $p = 0.03$ ; LPC 20:4, W = 421,  $p < 0.001$ ) (Fig. 2.1).

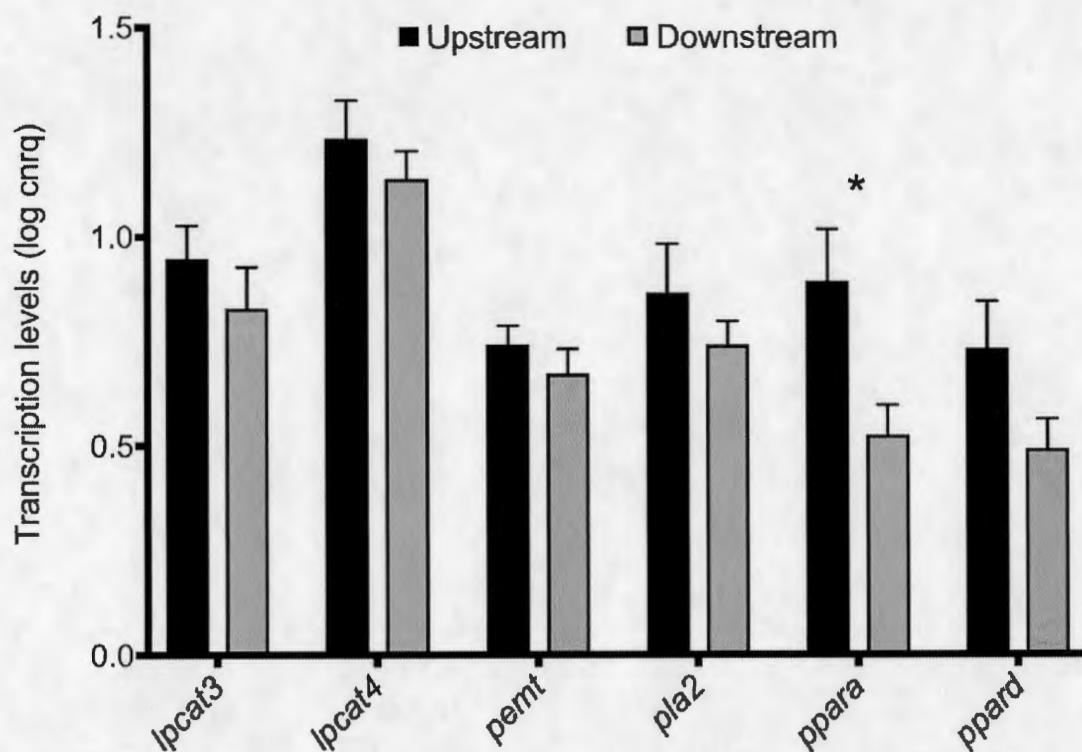


**Figure 2.1** Mean ( $\pm$  SEM) relative contributions (%) of individual LPC compounds to  $\Sigma_9$ LPC concentrations (ng/g ww) in the liver of pike collected upstream ( $n = 25$ ) and downstream ( $n = 25$ ) of the Montreal's WWTP effluent discharge point (Mann-

Whitney *U* test, \*  $p \leq 0.05$ ). The relative percent contributions of each LPC to  $\Sigma_9$ LPC concentrations can be found in Table 2.8.

#### 2.4.3. Gene transcription

Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (*ppara*) mRNA levels were 4-fold lower in liver of pike collected downstream of the WWTP effluent discharge point compared to those collected upstream ( $W = 286$ ,  $p = 0.04$ ) (Fig. 2.2, Table 2.9). No significant differences were found for other genes in pike liver between the two sites (Fig. 2.2). Moreover, mRNA levels of the majority of the genes were found to be similar between male and female pike (Table 2.10).

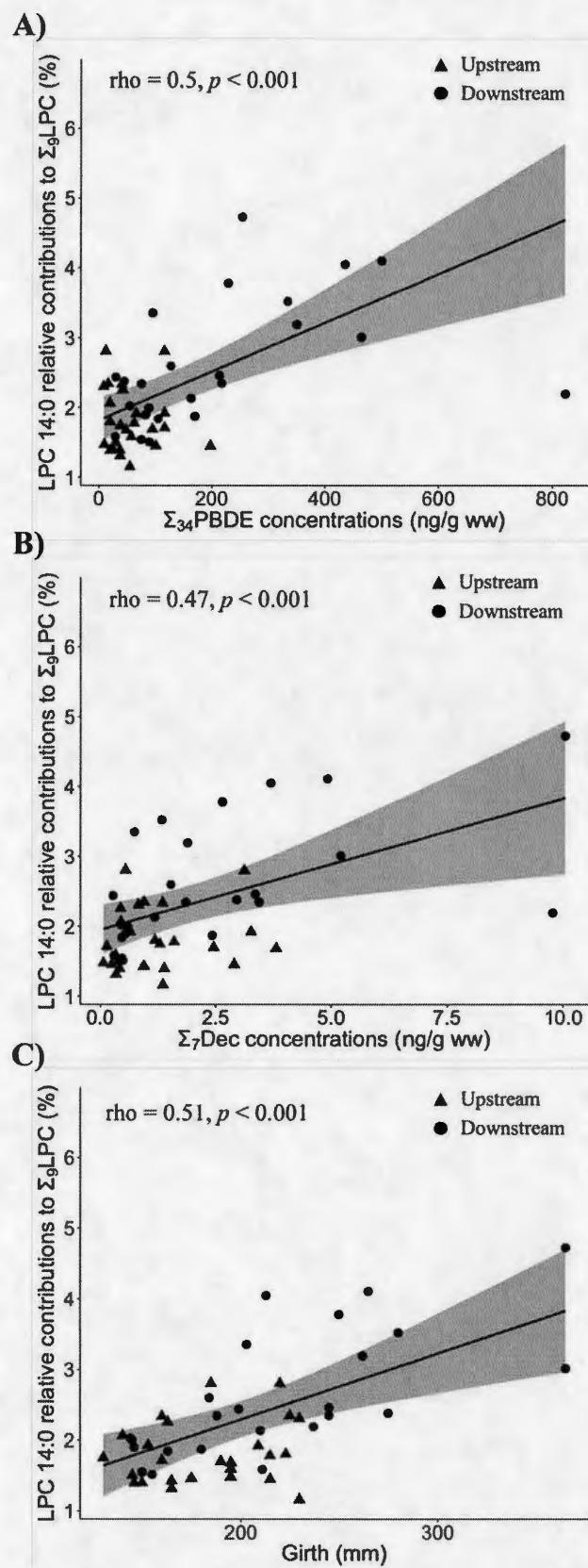


**Figure 2.2** Liver transcription levels (mean log calibrated normalized relative quantity (cnrq)  $\pm$  SEM) of genes related to enzymes involved in lipid metabolism of pike

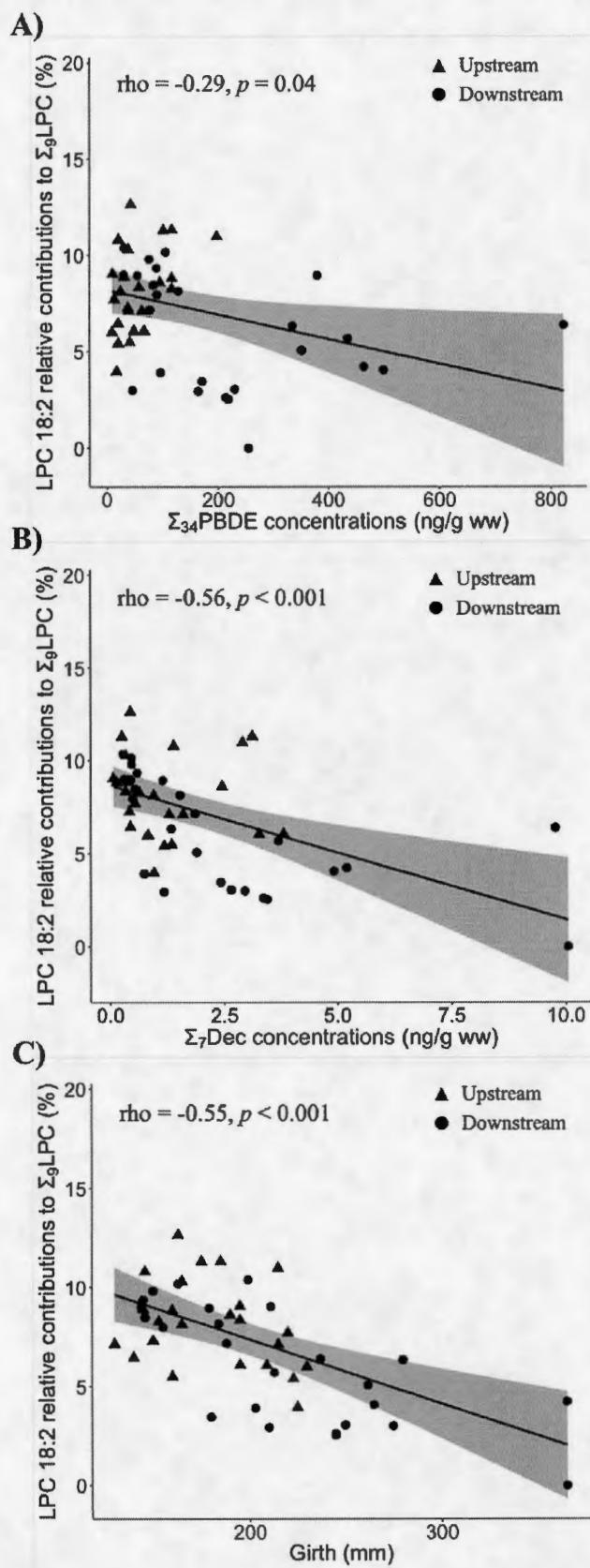
collected upstream and downstream of the Montreal's WWTP effluent point of discharge (Mann-Whitney *U* Test, \*  $p \leq 0.05$ ).

#### 2.4.4. Correlation among variables

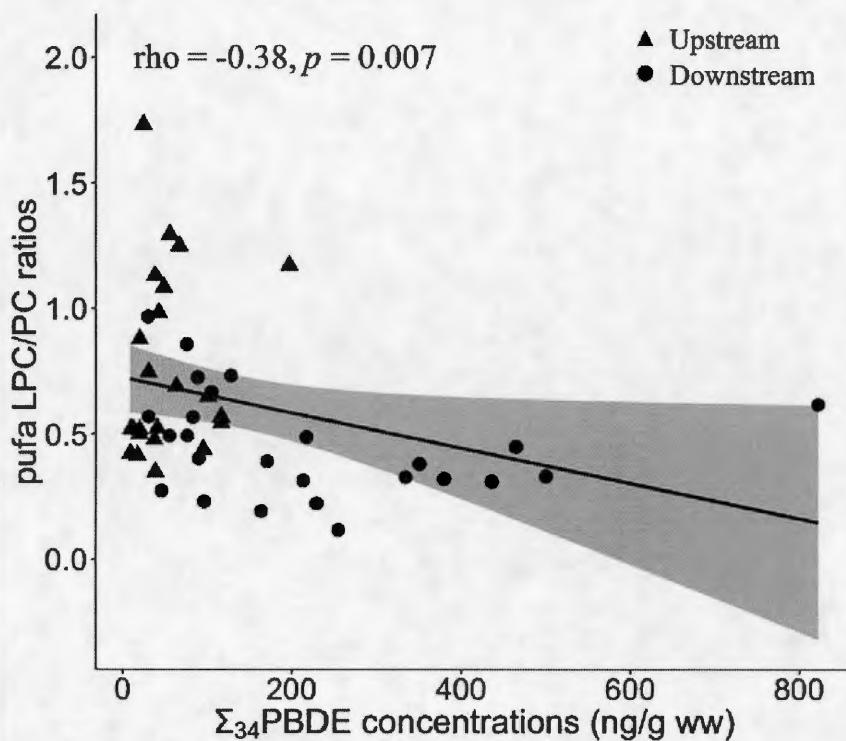
The relative percent contributions of LPC 14:0 were positively correlated with  $\Sigma_{34}\text{PBDE}$  ( $\rho = 0.5, p < 0.001$ ) and  $\Sigma_7\text{Dec}$  ( $\rho = 0.47, p < 0.001$ ) concentrations in the liver of pike as well as with fish girth ( $\rho = 0.51, p < 0.001$ ) (Fig. 2.3). Moreover, the contributions of LPC 18:2 were negatively correlated with  $\Sigma_{34}\text{PBDE}$  concentrations ( $\rho = -0.29, p = 0.04$ ),  $\Sigma_7\text{Dec}$  concentrations ( $\rho = -0.56, p < 0.001$ ), and fish girth ( $\rho = -0.55, p < 0.001$ ) (Fig. 2.4). Pike from both sites had similar condition index (Reinling *et al.*, 2017). Therefore, fish girth was used to characterize the potential links between modulation of lipid profiles and the fish body condition. Also, ratios of pufaLPC concentrations to pufaPC concentrations were negatively correlated with  $\Sigma_{34}\text{PBDE}$  concentrations ( $\rho = -0.38, p = 0.007$ ) (Fig. 2.5).



**Figure 2.3** Correlations between the relative percent (%) contributions of LPC 14:0 to  $\Sigma_9$ LPC concentrations (ng/g ww) and A)  $\Sigma_{34}$ PBDE concentrations in liver (ng/g ww), B)  $\Sigma_7$ Dec concentrations in liver (ng/g ww) and C) fish girth (mm) of pike collected in the St. Lawrence River upstream and downstream ( $n = 50$ ) of the Montreal's WWTP effluent discharge point. Grey field represents the 95% confidence intervals.



**Figure 2.4** Correlations between the relative percent (%) contributions of LPC 18:2 to  $\Sigma_9$ LPC concentrations (ng/g ww) and A)  $\Sigma_{34}$ PBDE concentrations in liver (ng/g ww), B)  $\Sigma_7$ Dec concentrations in liver (ng/g ww) and C) fish girth (mm) of pike collected in the St. Lawrence River upstream and downstream ( $n = 50$ ) of the Montreal's WWTP effluent discharge point. Grey field represents the 95% confidence intervals.



**Figure 2.5** Correlations between polyunsaturated  $\Sigma_2$ LPC/ $\Sigma_{49}$ PC concentrations ratios (ng/g ww) and  $\Sigma_{34}$ PBDE concentrations (ng/g ww) in liver of pike collected in the St. Lawrence River upstream and downstream ( $n = 50$ ) of the Montreal's WWTP effluent discharge point. Grey field represents the 95% confidence intervals.

## 2.5. Discussion

### 2.5.1. HFR concentrations

Concentrations of  $\Sigma_{34}$ PBDE were found to be 4.5-fold greater in liver of pike collected downstream of the Montreal's WWTP effluent point of discharge compared to pike collected upstream. The most abundant PBDE congeners found in pike were BDE-47, -99 and -100 as previously reported by Reinling *et al.* (2017). These three PBDE congeners were also reported as the most abundant in homogenate samples of yellow perch collected in the receiving environment of this same effluent (Houde *et al.*, 2014a) as well as in hornyhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*), common carp, crucian carp (*Carassius auratus*), leather catfish (*Silurus meridionalis*) and java tilapia (*Tilapia nilotica*) collected near major WWTP effluents in southern California, USA (Maruya *et al.*, 2012) and Gaobeidian, China (Wang *et al.*, 2007). In contrast,  $\Sigma_7$ Dec concentrations were only slightly greater (not significantly) in liver of pike collected downstream of the Montreal's WWTP effluent discharge point. As reported by Reinling *et al.* (2017), Dec-604 CB was generally found at greater concentrations than Dec-604 in liver of pike at this site; similar results were also found in lake trout and whitefish collected from Lake Ontario, Canada (Shen *et al.*, 2014). Results in pike indicate that among HFRs, PBDEs can be used as markers of Montreal's WWTP effluent exposure in fish species collected downstream of the point of discharge in the St. Lawrence River.

### 2.5.2. Lipid profiles and gene expression

We had predicted that higher concentrations of PUFA and lower concentrations of acylcarnitines were to be found in pike collected downstream of the Montreal's WWTP as the result of the lower transcription of *acox* determined in a previous study from our research group for pike from the same area (Reinling *et al.*, 2017). ACOX catalyzes the oxidation of long and polyunsaturated fatty acids in the peroxisome prior to their passage through the mitochondria in the form of acylcarnitines to enter in the  $\beta$ -oxidation reaction (Tocher, 2003). The under-transcription of *acox* in the liver of pike sampled downstream of Montreal's WWTP effluent point of discharge could have increased the concentrations of fatty acids including PUFAs, and in turn reduced the formation of acylcarnitines. However, results indicated no significant differences for the sum of SFA, MUFA, PUFA and acylcarnitine concentrations in liver of pike collected from the upstream and downstream sites.

These results differed from other fish studies where exposure to effluent and/or individual contaminants has been shown to impact fatty acid metabolism. For example, lower concentrations of SFAs and PUFAs, and higher concentrations of MUFAs were measured in muscle of common carp exposed for a year to an urban effluent in Vodňany in Czech Republic compared to fish collected from a reference site (Sakalli *et al.*, 2018). Similarly, lower concentrations of PUFAs and higher concentrations of MUFAs were determined in muscle of wild brown trout (*Salmo trutta*) exposed in the field under natural conditions for 30, 90 or 180 days to South Bohemia's effluent (Czech Republic) (Giang *et al.*, 2018). Moreover, lower concentrations of acylcarnitines were measured in the liver of zebrafish exposed to 0.05 mg/L and 0.3 mg/L of the flame retardant triphenyl phosphate for 7 days (Du *et al.*, 2016). This suggests that the very complex and specific compositions of WWTP effluents may

have different effects on fatty acid and acylcarnitine profiles in fish tissues (Samuelsson *et al.*, 2011).

No significant differences were found for the total hepatic concentrations of PCs with saturated (sfaPCs), monounsaturated (mufaPCs), and polyunsaturated fatty acids (pufaPCs) between pike sampled at both sites. Nevertheless, significant site-specific differences in concentrations of several individual PC compounds were observed in these fish. Studies have shown that the tissue composition of PCs can be altered through exposure to a range of individual contaminants and/or their mixtures. For instance, higher concentrations of SFA and MUFA and lower concentrations of PUFA were measured in the total phospholipids in yellow perch muscle exposed to cadmium at different temperatures compared to control fish (Fadhlaoui and Couture 2016). Melvin *et al.* (2019) also reported perturbation of phospholipid composition in fish exposed to metals and metalloid (*e.g.* lead, cadmium, manganese, chromium, arsenic, etc.) in the field. These authors noted higher relative abundance of PCs in homogenate samples of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) collected at a metalloid-contaminated wetland compared to fish collected at a reference site. Dimastrogiovanni *et al.* (2015) finally measured higher concentrations of pufaPC compounds in a rainbow trout liver cell line exposed to two plasticizers for 24 to 72 hours (5 uM of bis-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and 20uM of 4-nonylphenol (4-NP)).

The only lipid class for which the sum concentration in pike differed between sites was LPCs, where lower concentrations were measured in the liver of fish collected downstream the effluent point of discharge in the river. Moreover, significant differences in relative contributions of six individual LPC (*i.e.* LPC 14:0, LPC 17:0, LPC 18:0, LPC28:1, LPC 18:2, LPC 20:4) compounds were determined between the upstream and downstream sites. Results from the present study were not consistent with those reported in plasma of roach (*Rutilus rutilus*) experiment exposed to WWTP

effluent in the laboratory (Al-Salhi *et al.*, 2012). These authors found greater concentrations of LPC 16:1 and LPC 18:2 in roach, whereas results of the present study showed no differences in LPC 16:1 contribution between pike sampled upstream and downstream, and lower contributions of LPC 18:2 in pike collected downstream.

Given the possible impacts of effluent exposure on the transcription of genes related to lipid metabolism in pike liver as suggested by Reinling *et al.* (2017) and the metabolic linkages between fatty acids and phospholipids, a difference in mRNA levels of *ppara*, *pparδ*, *pla2*, *pemt*, *lpcat3* and *lpcat4* was expected. However, only lower *ppara* mRNA levels were measured in the liver of pike collected downstream of the Montreal's WWTP effluent. Previous results indicated lower transcription of *ppara* in liver of juvenile salmon exposed to water concentrations of two flame retardants (2-chloroethyl) phosphate (TCEP) and tris (2-butoxyethyl) phosphate (TBOEP) (Arukwe *et al.*, 2016). In addition to measuring under-transcription of *ppara*, these authors determined under-transcription of *pparδ* in the studied fish (Arukwe *et al.*, 2016). In contrast, present results showed that mRNA levels of *pparδ* did not differ between pike collected upstream and downstream of the WWTP. Furthermore, Maradonna *et al.* (2015) measured higher mRNA levels of *ppara*, *pparδ* and *pla2* in sea bream exposed to three plasticizers (nonylpnenol (NP), 4-tert-octylphenol (t-OP) and bisphenol A (BPA)). Gene transcription only represents a single step in gene expression that allows the mRNA levels of genes to be translated into proteins (Nikinmaa and Rytönen, 2011). Therefore, it is possible that an exposure to the Montreal's effluent did not induce measurable effects on mRNA levels of a gene coding for the enzyme, but might have effects on its activity. Also, it is possible that some effects occurred at the gene transcription level, but that the fish compensated for these changes by activating or inactivating other regulating genes. As such, fish can be tolerant to the harmful effects of contaminants by cellular repairs for example, and may adapt up to a certain concentration beyond which the effects are too important to return to a normal level

(Ankley *et al.*, 2007; Ekman *et al.*, 2008). The under-transcription of hepatic *ppara* in the present study was also consistent with the under-transcribed *acox* previously measured in pike from the same area by Reinling *et al.* (2017). Moreover, PPAR $\alpha$  and ACOX are known to represent good biomarkers of fatty acid metabolism in environmental monitoring of effects elicited in fish species by organic contaminants (Olivares-Rubio and Vega-Lopez, 2016).

The transcription of genes was used in this study to investigate the possible associations between the lipid composition and the transcription levels of genes coding for enzymes implicated in lipid metabolism. For instance, PPAR $\alpha$  is known as a key factor involved in hepatic lipid metabolism in fish and other animals (Olivares-Rubio and Vega-Lopez, 2016; Takahashi *et al.*, 2015) by regulating the transcription of genes involved in the  $\beta$ -oxidation of fatty acids and lipogenesis (Rakhshandehroo *et al.*, 2010). The activation of *ppara* can also mediate changes in the composition of LPC compounds in liver of animals as it was reported in mice hepatocytes (Takahashi *et al.*, 2015). In that study, higher concentrations of LPC 16:0 and LPC 18:2 in liver of mice were associated with an activation of *ppara* following a bezafibrate (*i.e.* drug used for the control of cholesterol and triglyceride levels) treatment (Takahashi *et al.*, 2015). Moreover, Zhao *et al.* (2008) found that LPCAT3, the enzyme catalyzing the transformation of LPCs to PCs, was regulated by PPAR $\alpha$  agonists such as fenofibrate, a drug also used to control cholesterol and triglycerides. Considering the functional links between LPC metabolism and PPAR $\alpha$ , the under-transcription of *ppara* observed in the present study could provide mechanistic insights to help explain changes in LPC composition in liver of pike exposed to the Montreal's primary effluent. Nevertheless, no significant correlation was measured between these biological markers contrary to our prediction.

### 2.5.3. Association between HFR concentrations and lipid markers

As expected, correlations were found between relative lipid percentages and HFR concentrations in pike liver. The relative contributions of LPC 14:0 increased with the  $\Sigma_{34}$ PBDE and  $\Sigma_7$ Dec concentrations in pike, contrary to the relative contributions of LPC 18:2 that decreased with concentrations of both contaminant groups. PBDEs as well as other compounds found in the Montreal's effluent (e.g. pharmaceutical compounds, PCBs, plasticizers, metals, etc.) could have the potential to modulate lipid metabolism. For example, Wen *et al.* (2019) reported that exposure to BDE-99 increased adipogenesis via transcriptional regulation of PPAR $\gamma$ . Liu *et al.* (2014) further observed a disruption of LPC homeostasis mediated by *ppara* action in mice treated with Gemfibrozil, a drug used for the treatment of hypertriglyceridemia. Moreover, negative correlations between *pla2* expression levels and PCB concentrations (PCB-170, -180, and -171) were measured in the liver of largescale suckers (*Catostomus macrocheilus*) collected at three sites with different levels of urbanization and contaminant exposure in the lower Columbia River (Christiansen *et al.*, 2014). Lower abundance of pufaLPCs and higher abundance of sfaLPCs could be explained by the under-transcription of *ppara* in the liver of pike sampled in the urban effluent which could have contributed to a reduction of the abundance of LPC 18:2 and increase of LPC 14:0, mediated by a possible under-regulation of *pla2* (Takahashi *et al.*, 2015). In spite of the fact that no correlations were observed between *ppara* mRNA levels and PBDE/Dec concentrations in northern pike (data not shown), several other contaminants found in WWTP effluent have been shown to modulate *ppara* expression in fish (Olivares-Rubio and Vega-Lopez, 2016). These results could help explain the positive and negative correlations observed between the relative contributions of some LPC compounds and HFR concentrations in pike liver.

Moreover, correlations between the concentration ratios of polyunsaturated LPCs/PCs and PBDE concentrations measured in pike liver was consistent with the initial hypothesis of effluent exposure-related effects on the remodeling of phospholipids by the action of PLA2. Transcription of *pla2* belonging to group IV, a cytosolic form of PLA2, was not different in the liver of pike between the upstream and downstream sites. However, there are multiple groups of PLA2 enzymes, and each of them catalyzes the transformation of PCs to LPCs in different cell compartments and with different specificity for PC compounds according to their degree of saturation (Astudillo *et al.*, 2019; Mouchlis and Dennis, 2019). Thus, it could be suggested that other groups of PLA2 are implicated in the modulation of LPC levels via the action of *ppara*. It would be interesting to measure the transcription of other groups of PLA2 in future studies in order to investigate their potential role in the modulation of LPC profiles in pike exposed to Montreal's WWTP effluent. Only a few targeted genes that were related to lipid compounds were analyzed in this project. Many other genes involved in lipid metabolism would have been of interest to study in fish from both sites. Non-targeted methods of analysis, such as transcriptomics, could help detect more differentially expressed genes related to lipids (Bahamonde *et al.*, 2016). Similarly, the use of proteomics as a complementary technique could also allow to verify whether the protein levels associated with the targeted genes are different between the pike exposed and not exposed to the effluent (Gouveia *et al.*, 2019). These complementary methods could also help to better understand the mechanisms of action leading to the different metabolomic profiles observed in pike.

Additionally, correlations between levels of LPC 14:0 and LPC 18:2, LPCs/PCs ratios and HFR concentrations could also be due to a potential induction of oxidative stress. Contaminants generally found in effluents, such as cadmium, diclofenac and acetaminophen (non-steroidal anti-inflammatory drugs) and BDE-99, have previously been identified as oxidative stress inducers in fish tissues and cell lines as they may

increase the formation of reactive oxygen species (ROS) (Espinosa-Ruiz *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2018; Nava-Álvarez *et al.*, 2014). Phospholipids containing highly unsaturated PUFAs are the most sensitive to the action of ROS, and can thus undergo lipid peroxidation (Catalá, 2012). Oxidized phospholipids can be cleaved by PLA2 to remove the oxidized segment and release fatty acids and lysophospholipids such as LPCs (Catalá, 2012). It is thus possible that the modulation of LPC composition and LPCs/PCs ratios in the liver of pike collected in the Montreal's effluent could be linked to the deleterious effects of ROS in fish tissues resulting from effluent exposure. Moreover, as LPCs are closely linked to inflammatory processes (Grzelczyk and Gendaszewska-Darmach, 2013), it is possible that their abundance in the liver of pike may be affected by inflammatory inducers including cadmium, a metal found in this effluent and in the St. Lawrence River (Gobeil *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2018).

Interestingly, LPC 14:0 and LPC 18:2 are known markers of metabolic disorders such as obesity, insulin resistance and dyslipidemia in other animals (Del Bas *et al.*, 2016; Rauschert *et al.*, 2016; Suárez-García *et al.*, 2017; Wang-Sattler *et al.*, 2012). In the present study the relative abundance of LPC 14:0 and 18:2 were positively and negatively associated, respectively, with pike girth; concentrations of these LPCs were also linked with waist circumferences in humans (Rauschert *et al.*, 2016). Changes in LPC profiles were also linked to obesity in mice, with decreased LPC 18:2 levels measured in serum of obese mice compared to lean mice (Eisinger *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2011). Moreover, HFRs are known as endocrine disrupters and have been associated with obesogenic effects in murine and human adipocytes via the action with PPARs (Darbre *et al.*, 2017; Wen *et al.*, 2019). Given the endocrine disruptive properties and potential obesogenic effects of certain HFRs, and their associations with changes in LPC composition in pike environmentally exposed to the effluent, investigating further links between these lipid compounds, HFR concentrations and

metabolic disorders in fish exposed to urban effluents may be of interest in future studies.

## 2.6. Conclusions

Results from the present study suggested that phospholipid metabolism may be disrupted in northern pike exposed to a major primary WWTP effluent. LPCs containing polyunsaturated fatty acids represented a lower proportion of all LPCs in the liver of pike collected downstream of the point of discharge. In contrast, LPCs containing saturated and mono-unsaturated fatty acids represented a greater proportion of all LPCs in the studied fish. Moreover, lower hepatic levels of *ppara* mRNA was measured in pike collected from the effluent-impacted site. The results also showed that the relative abundances of LPC 14:0 and LPC 18:2 were correlated with the concentrations of PBDEs and Dechlorananes as well as with pike girth. This study allowed a better understanding of the impacts of an environmental exposure to the Montreal's WWTP effluent on the composition of lipids and transcription of lipid-related genes. Evaluating the transcription of several other PLA2 groups in future studies would help to better understand the toxicity mechanisms underlying the alteration of phospholipid metabolism in fish exposed to urban effluents. Moreover, investigating potential linkages between the abundance of LPCs (*e.g.* LPC 14:0 and LPC 18:2) and markers of oxidative stress and inflammatory responses in fish exposed to municipal effluents could also be of interest.

## 2.7. Acknowledgments

This study was funded primarily by Environment and Climate Change Canada and supports the St. Lawrence Action Plan. Supplemental funding was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (to J.V.). The authors would like to thank C. Beauvais, G. Cottin, M. Douville, M. Pilote, M. Lépine and A. Bernier-Graveline for assistance with field sampling, L. Wang for assistance with chemical analyses as well as M. Giraudo for assistance with primer design and RT-qPCR analyses. The authors declare they have no conflicts of interest.

## 2.8. Supporting information

**Table 2.3** List of flame retardants analyzed in the liver of northern pike collected upstream ( $n = 25$ ) and downstream ( $n = 25$ ) of Montreal's WWTP effluent discharge point (QC, Canada).

<b>PBDEs</b>	
BDE-7	2,4-Dibromodiphenyl ether
BDE-10	2,6-Dibromodiphenyl ether
BDE-15	4,4'-Dibromodiphenyl ether
BDE-17	2,2',4-Tribromodiphenyl ether
BDE-28	2,4,4'-Tribromodiphenyl ether
BDE-47	2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether
BDE-49	2,2',4,5'-Tetrabromodiphenyl ether
BDE-66	2,3',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether
BDE-71	2,3',4',6-Tetrabromodiphenyl ether
BDE-77	3,3',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether
BDE-85	2,2',3,4,4'-Pentabromodiphenyl ether
BDE-99	2,2',4,4',5-Pentabromodiphenyl ether
BDE-100	2,2',4,4',6-Pentabromodiphenyl ether
BDE-119	2,3',4,4',6-Pentabromodiphenyl ether

BDE-126	3,3',4,4',5-Pentabromodiphenyl ether
BDE-138	2,2',3,4,4',5'-Hexabromodiphenyl ether
BDE-139	3,3',4,4',5-Pentabromodiphenyl ether
BDE-140	2,2',3,4,4',6'-Hexabromodiphenyl ether
BDE-153/BB-153	2,2',4,4',5,5'-Hexabromodiphenyl Ether/2,2',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl
BDE-154	2,2',4,4',5,6'-Hexabromodiphenyl ether
BDE-171	2,2',3,3',4,4',6-Heptabromodiphenyl ether
BDE-180	2,2',3,4,4',5,5'-Heptabromodiphenyl ether
BDE-183	2,2',3,4,4',5',6-Heptabromodiphenyl ether
BDE-184	2,2',3,4,4',6,6'-Heptabromodiphenyl ether
BDE-191	2,3,3',4,4',5',6-Heptabromodiphenyl ether
BDE-196	2,2',3,3',4,4',5,6'-Octabromodiphenyl ether
BDE-197	2,2',3,3',4,4',6,6'-Octabromodiphenyl ether
BDE-201	2,2',3,3',4,5',6,6'-Octabromodiphenyl ether
BDE-203	2,2',3,4,4',5,5',6-Octabromodiphenyl ether
BDE-204	2,2',3,4,4',5,6,6'-Octabromodiphenyl ether
BDE-205	2,3,3',4,4',5,5',6-Octabromodiphenyl ether
BDE-206	2,2',3,3',4,4',5,5',6-Nonabromodiphenyl ether
BDE-207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'-Nonabromodiphenyl ether
BDE-208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'-Nonabromodiphenyl ether
BDE-209	Decabromodiphenyl ether

#### Emerging flame retardants

PBEB	pentabromoethylbenzene
HBB	hexabromobenzene
PBT	Polybutylene Terephthalate
BEHTBP	bis(2-ethylhexyl)tetrabromophthalate
DBDPE	decabromodiphenylethane
OBIND	octabromotrimethylphenyllindane
Dec-602	Dechlorane 602
Dec-603	Dechlorane 603
Dec-604	Dechlorane 604
Dec-604CB	Dechlorane 604 compound B
syn-DP	Dechlorane Plus isomer syn
anti-DP	Dechlorane Plus isomer anti
Cplus	Chlordene Plus

**Table 2.4** List of lipid compounds analyzed in the liver of northern pike collected upstream ( $n = 25$ ) and downstream ( $n = 25$ ) of Montreal's WWTP effluent discharge point (QC, Canada).

<b>Acylcarnitines</b>
Carnitine
Dodecenoylcarnitine
Acetylcarnitine
Butyrylcarnitine
Valerylcarnitine
Glutarylcarnitine (Hydroxyhexanoylcarnitine)
Hydroxyvalerylcarnitine (Methylmalonylcarnitine)
Hexanoylcarnitine (Fumarylcarbitine)
<b>Glycerophospholipids</b>
lysoPhosphatidylcholine acyl C14:0
lysoPhosphatidylcholine acyl C16:0
lysoPhosphatidylcholine acyl C16:1
lysoPhosphatidylcholine acyl C17:0
lysoPhosphatidylcholine acyl C18:0
lysoPhosphatidylcholine acyl C18:1
lysoPhosphatidylcholine acyl C18:2
lysoPhosphatidylcholine acyl C20:4
lysoPhosphatidylcholine acyl C28:1
Phosphatidylcholine diacyl C26:0
Phosphatidylcholine diacyl C30:0
Phosphatidylcholine diacyl C30:2
Phosphatidylcholine diacyl C32:0
Phosphatidylcholine diacyl C32:1
Phosphatidylcholine diacyl C32:2
Phosphatidylcholine diacyl C32:3
Phosphatidylcholine diacyl C34:1
Phosphatidylcholine diacyl C34:2
Phosphatidylcholine diacyl C34:3
Phosphatidylcholine diacyl C34:4
Phosphatidylcholine diacyl C36:0

---

Phosphatidylcholine diacyl C36:1  
Phosphatidylcholine diacyl C36:2  
Phosphatidylcholine diacyl C36:3  
Phosphatidylcholine diacyl C36:4  
Phosphatidylcholine diacyl C36:5  
Phosphatidylcholine diacyl C36:6  
Phosphatidylcholine diacyl C38:0  
Phosphatidylcholine diacyl C38:1  
Phosphatidylcholine diacyl C38:3  
Phosphatidylcholine diacyl C38:4  
Phosphatidylcholine diacyl C38:5  
Phosphatidylcholine diacyl C38:6  
Phosphatidylcholine diacyl C40:1  
Phosphatidylcholine diacyl C40:2  
Phosphatidylcholine diacyl C40:3  
Phosphatidylcholine diacyl C40:4  
Phosphatidylcholine diacyl C40:5  
Phosphatidylcholine diacyl C40:6  
Phosphatidylcholine diacyl C42:0  
Phosphatidylcholine diacyl C42:1  
Phosphatidylcholine diacyl C42:2  
Phosphatidylcholine diacyl C42:4  
Phosphatidylcholine diacyl C42:5  
Phosphatidylcholine diacyl C42:6  
Phosphatidylcholine diacyl C48:0  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C30:0  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C30:1  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C30:2  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C32:1  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C32:2  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C34:0  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C34:1  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C34:2  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C34:3

---

---

Phosphatidylcholine acyl-alkyl C36:0  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C36:1  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C36:2  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C36:3  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C36:4  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C36:5  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C38:0  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C38:1  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C38:2  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C38:3  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C38:5  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C38:6  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C40:1  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C40:2  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C40:3  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C40:4  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C40:5  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C40:6  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C42:0  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C42:1  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C42:2  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C42:3  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C42:4  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C42:5  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C44:3  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C44:4  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C44:5  
Phosphatidylcholine acyl-alkyl C44:6

---

### Sphingolipids

---

Hydroxysphingomyelin C14:1  
Sphingomyelin C16:0  
Hydroxysphingomyelin C16:1  
Sphingomyelin C18:0  
Sphingomyelin C20:2

---

---

Hydroxysphingomyelin C22:1

Hydroxysphingomyelin C22:2

Sphingomyelin C24:0

Sphingomyelin C24:1

Sphingomyelin C26:0

Sphingomyelin C26:1

---

**Fatty acids**

---

**Saturated fatty acids**

Tetradecanoic acid (myristic acid) C14:0

Hexadecanoic acid (palmitic acid) C16:0

**Unsaturated fatty acids**

Hexadecenoic acid (palmitoleic acid) C16:1

9-Octadecenoic acid (oleic acid) C18:1

Octadecadienoic acid (linoleic acid) C18:2

Octadecatrienoic acid (gamma-linolenic acid) C18:3

11, 14-eicosadienoic acid C20:2

Eicosatetraenoic acid (arachidonic acid) C20:4

Eicosapentaenoic acid (EPA) C20:5

Docosahexaenoic acid (DHA) C22:6

---

**Table 2.5** List of genes related to fatty acid and phospholipid metabolism analyzed in liver of pike collected upstream ( $n = 25$ ) and downstream ( $n = 25$ ) of Montreal's WWTP effluent discharge point (QC, Canada). Acronyms for genes and their function in hepatocytes are also indicated.

Name	Acronym	Function
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	<i>ppara</i>	Principal inducer of mitochondrial and peroxisomal $\beta$ -oxidation
Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta	<i>ppard</i>	Regulator of fatty acid oxidation, glucose storage and lipoprotein uptake
Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3	<i>lpcat3</i>	Catalyzes the conversion of lysophosphatidylcholine to phosphatidylcholine
Lysophosphatidylcholine acyltransferase 4	<i>lpcat4</i>	Catalyzes the conversion of lysophosphatidylcholine to phosphatidylcholine
Phospholipase A2	<i>pla2</i>	Hydrolyzes phosphatidylcholines and releases fatty acids and lysophospholipids
Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	<i>pemt</i>	Catalyzes the conversion of phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine

**Table 2.6** Mean ( $\pm$  SEM) concentrations ( $\mu\text{g/g ww}$ ) of lipid compounds in liver of female and male pike collected upstream and downstream of Montreal's WWTP effluent discharge point (QC, Canada). Values marked by an asterisk indicate that concentrations were significantly different between sexes (Mann-Whitney *U* Test,  $p \leq 0.05$ ).

	Female ( $n = 34$ )	Male ( $n = 15$ )	W	<i>p</i>
$\Sigma_2\text{SFA}$	$456 \pm 29$	$413 \pm 35$	288	0.49
$\Sigma_2\text{MUFA}$	$1,124 \pm 94$	$1,014 \pm 126$	287	0.50
$\Sigma_6\text{PUFA}$	$742 \pm 68$	$846 \pm 60$	177	0.09
$\Sigma_8\text{ACYL}$	$8.1 \pm 0.7$	$10 \pm 1$	190	0.16
$\Sigma_9\text{LPC}$	$227 \pm 18$	$262 \pm 25$	199	0.23
$\Sigma_{12}\text{sfaPC}$	$7,130 \pm 444$	$7,854 \pm 679$	218	0.43
$\Sigma_{13}\text{mufaPC}$	$457 \pm 18$	$454 \pm 28$	259	0.94
$\Sigma_{49}\text{pufaPC}$	$2,458 \pm 80$	$2,477 \pm 98$	238	0.72
$\Sigma_{11}\text{SM}$	$363 \pm 17$	$371 \pm 23$	228	0.57

SFA: saturated fatty acids, MUFA: mono-unsaturated fatty acids, PUFA: polyunsaturated fatty acids, ACYL: acylcarnitines, LPC: lysophosphatidylcholines, sfaPC: phosphatidylcholine with saturated fatty acids, mufaPC: phosphatidylcholine with mono-unsaturated fatty acids, pufaPC: phosphatidylcholine with polyunsaturated fatty acids, SM: sphingomyelins.

**Table 2.7** Mean ( $\pm$  SEM) concentrations ( $\mu\text{g/g ww}$ ) of lipid compounds in liver of pike collected upstream and downstream of Montreal's WWTP effluent discharge point. Values marked by an asterisk indicate that concentrations were significantly different between sites (Mann-Whitney *U* Test,  $p \leq 0.05$ ).

Compound	Complete name	Upstream <i>n</i> = 25	Downstream <i>n</i> = 25
FA C14:0	Tetradecanoic acid	103 $\pm$ 11	93 $\pm$ 8
FA C16:0	Hexadecanoic acid	381 $\pm$ 27	322 $\pm$ 30
FA C16:1	Hexadecenoic acid	369 $\pm$ 27	352 $\pm$ 38
FA C18:1	9-Octadecenoic acid	762 $\pm$ 72	739 $\pm$ 93
FA C18:2	Octadecadienoic acid	244 $\pm$ 26	188 $\pm$ 24
FA C18:3	Octadecatrienoic acid	45 $\pm$ 4	25 $\pm$ 5 *
FA C20:2	11, 14-eicosadienoic acid	20 $\pm$ 2	23 $\pm$ 4
FA C20:4	Eicosatetraenoic acid	147 $\pm$ 9	156 $\pm$ 21
FA C20:5	Eicosapentaenoic acid	149 $\pm$ 13	145 $\pm$ 18
FA C22:6	Docosahexaenoic acid	215 $\pm$ 19	242 $\pm$ 33
AC C0	Carnitine	4.4 $\pm$ 0.3	4.6 $\pm$ 0.7
AC C12:1	Dodecenoylcarnitine	0.6 $\pm$ 0.1	0.55 $\pm$ 0.09
AC C2	Acetylcarnitine	0.8 $\pm$ 0.1	0.61 $\pm$ 0.09
AC C4	Butyrylcarnitine	1.22 $\pm$ 0.09	0.77 $\pm$ 0.07 *
AC C5	Valerylcarnitine	1.5 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1 *
AC C5-DC (C6-OH)	Glutaryl carnitine	0.21 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.02
AC C5-OH (C3-DC-M)	Hydroxyvalerylcarnitine	0.17 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.02
AC C6 (C4:1-DC)	Hexanoylcarnitine	0.31 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.02 *
LPC C14:0	lysophosphatidylcholine acyl C14:0	4.7 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 0.5

LPC C16:0	LysoPhosphatidylcholine acyl C16:0	64 ± 4	53 ± 4
LPC C16:1	LysoPhosphatidylcholine acyl C16:1	28 ± 3	22 ± 3
LPC C17:0	LysoPhosphatidylcholine acyl C17:0	8.3 ± 0.5	8.6 ± 0.9
LPC C18:0	LysoPhosphatidylcholine acyl C18:0	5.9 ± 0.3	6.4 ± 0.5
LPC C18:1	LysoPhosphatidylcholine acyl C18:1	79 ± 8	63 ± 8
LPC C18:2	LysoPhosphatidylcholine acyl C18:2	25 ± 3	15 ± 3 *
LPC C20:4	LysoPhosphatidylcholine acyl C20:4	53 ± 5	35 ± 4 *
LPC C28:1	LysoPhosphatidylcholine acyl C28:1	4.5 ± 0.7	2.0 ± 0.1
PC aa C26:0	Phosphatidylcholine diacyl C26:0	1.7 ± 0.1	6.2 ± 0.5 *
PC aa C30:0	Phosphatidylcholine diacyl C30:0	115 ± 6	154 ± 10 *
PC aa C30:2	Phosphatidylcholine diacyl C30:2	0.54 ± 0.05	0.71 ± 0.05 *
PC aa C32:0	Phosphatidylcholine diacyl C32:0	269 ± 13	290 ± 25
PC aa C32:1	Phosphatidylcholine diacyl C32:1	68 ± 5	75 ± 4
PC aa C32:2	Phosphatidylcholine diacyl C32:2	12 ± 2	11.1 ± 0.7
PC aa C32:3	Phosphatidylcholine diacyl C32:3	2.7 ± 0.3	2.4 ± 0.1
PC aa C34:1	Phosphatidylcholine diacyl C34:1	209 ± 10	232 ± 15
PC aa C34:2	Phosphatidylcholine diacyl C34:2	79 ± 7	68 ± 3
PC aa C34:3	Phosphatidylcholine diacyl C34:3	38 ± 4	25 ± 2 *
PC aa C34:4	Phosphatidylcholine diacyl C34:4	17 ± 1	13.6 ± 0.8 *
PC aa C36:0	Phosphatidylcholine diacyl C36:0	618 ± 54	702 ± 58
PC aa C36:1	Phosphatidylcholine diacyl C36:1	22 ± 1	29 ± 2 *
PC aa C36:2	Phosphatidylcholine diacyl C36:2	53 ± 3	58 ± 3
PC aa C36:3	Phosphatidylcholine diacyl C36:3	45 ± 4	38 ± 3
PC aa C36:4	Phosphatidylcholine diacyl C36:4	187 ± 6	160 ± 6 *
PC aa C36:5	Phosphatidylcholine diacyl C36:5	253 ± 14	228 ± 12

PC aa C36:6	Phosphatidylcholine diacyl C36:6	71 ± 4	88 ± 7
PC aa C38:0	Phosphatidylcholine diacyl C38:0	1,188 ± 73	1,317 ± 127
PC aa C38:1	Phosphatidylcholine diacyl C38:1	5.8 ± 0.3	7.4 ± 0.5 *
PC aa C38:3	Phosphatidylcholine diacyl C38:3	13.4 ± 0.7	13.5 ± 0.7
PC aa C38:4	Phosphatidylcholine diacyl C38:4	43 ± 2	40 ± 2
PC aa C38:5	Phosphatidylcholine diacyl C38:5	192 ± 6	195 ± 10
PC aa C38:6	Phosphatidylcholine diacyl C38:6	831 ± 43	869 ± 52
PC aa C40:1	Phosphatidylcholine diacyl C40:1	6.5 ± 0.8	8 ± 1
PC aa C40:2	Phosphatidylcholine diacyl C40:2	2.3 ± 0.2	3.1 ± 0.2 *
PC aa C40:3	Phosphatidylcholine diacyl C40:3	3.4 ± 0.2	4.2 ± 0.4
PC aa C40:4	Phosphatidylcholine diacyl C40:4	4.4 ± 0.2	4.8 ± 0.2
PC aa C40:5	Phosphatidylcholine diacyl C40:5	12.8 ± 0.8	14.9 ± 0.9
PC aa C40:6	Phosphatidylcholine diacyl C40:6	135 ± 7	148 ± 10
PC aa C42:0	Phosphatidylcholine diacyl C42:0	432 ± 42	328 ± 33
PC aa C42:1	Phosphatidylcholine diacyl C42:1	13 ± 2	14 ± 2
PC aa C42:2	Phosphatidylcholine diacyl C42:2	4.1 ± 0.4	10 ± 1 *
PC aa C42:4	Phosphatidylcholine diacyl C42:4	1.30 ± 0.08	1.5 ± 0.1
PC aa C42:5	Phosphatidylcholine diacyl C42:5	1.5 ± 0.1	1.8 ± 0.1 *
PC aa C42:6	Phosphatidylcholine diacyl C42:6	7.1 ± 0.4	6.8 ± 0.5
PC aa C48:0	Phosphatidylcholine diacyl C48:0	4.5 ± 0.5	5.1 ± 0.6
PC ae C30:0	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C30:0	20 ± 1	33 ± 5 *
PC ae C30:1	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C30:1	0.75 ± 0.07	1.4 ± 0.1 *
PC ae C30:2	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C30:2	0.20 ± 0.02	0.33 ± 0.02 *
PC ae C32:1	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C32:1	6.7 ± 0.5	9.2 ± 0.7 *
PC ae C32:2	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C32:2	3.4 ± 0.2	4.8 ± 0.4 *

PC ae C34:0	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C34:0	73 ± 3	91 ± 6 *	—
PC ae C34:1	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C34:1	19.8 ± 0.8	25 ± 1 *	
PC ae C34:2	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C34:2	9.7 ± 0.4	13 ± 1 *	
PC ae C34:3	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C34:3	4.6 ± 0.2	4.8 ± 0.2	
PC ae C36:0	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C36:0	105 ± 6	122 ± 7	
PC ae C36:1	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C36:1	11.1 ± 0.4	14.1 ± 0.5 *	
PC ae C36:2	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C36:2	11.5 ± 0.6	13.0 ± 0.5 *	
PC ae C36:3	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C36:3	7.0 ± 0.5	6.9 ± 0.4	
PC ae C36:4	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C36:4	19.6 ± 0.4	18.8 ± 0.7	
PC ae C36:5	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C36:5	24.5 ± 0.9	27 ± 1	
PC ae C38:0	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C38:0	4,278 ± 290	4,219 ± 407	
PC ae C38:1	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C38:1	12 ± 1	13.2 ± 0.8	
PC ae C38:2	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C38:2	5.7 ± 0.3	8.0 ± 0.7 *	
PC ae C38:3	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C38:3	10 ± 0.4	10.4 ± 0.5	
PC ae C38:5	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C38:5	35.8 ± 0.7	38 ± 1	
PC ae C38:6	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C38:6	56 ± 3	70 ± 6	
PC ae C40:1	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C40:1	45 ± 5	41 ± 5	
PC ae C40:2	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C40:2	30 ± 3	25 ± 3	
PC ae C40:3	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C40:3	10.5 ± 0.6	10.1 ± 0.9	
PC ae C40:4	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C40:4	9.7 ± 0.5	16 ± 1 *	
PC ae C40:5	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C40:5	13.8 ± 0.6	17.8 ± 0.9 *	
PC ae C40:6	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C40:6	78 ± 4	88 ± 4	
PC ae C42:0	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C42:0	256 ± 22	256 ± 27	
PC ae C42:1	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C42:1	14 ± 1	14 ± 2	
PC ae C42:2	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C42:2	13.1 ± 0.8	11.8 ± 0.9	

PC ae C42:3	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C42:3	26.1 ± 0.9	26 ± 2
PC ae C42:4	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C42:4	20 ± 1	19 ± 1
PC ae C42:5	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C42:5	7.2 ± 0.5	11 ± 1 *
PC ae C44:3	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C44:3	2.7 ± 0.2	2.8 ± 0.2
PC ae C44:4	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C44:4	7.9 ± 0.6	9.2 ± 0.9
PC ae C44:5	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C44:5	16 ± 2	20 ± 3
PC ae C44:6	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C44:6	15 ± 1	11.3 ± 0.9 *
SM (OH) C14:1	Hydroxysphingomyeline C14:1	14 ± 1	13 ± 1
SM (OH) C16:1	Hydroxysphingomyeline C16:1	2.0 ± 0.3	2.4 ± 0.3
SM (OH) C22:1	Hydroxysphingomyeline C22:1	9.6 ± 0.5	11 ± 1
SM (OH) C22:2	Hydroxysphingomyeline C22:2	33 ± 2	30 ± 2
SM C16:0	Sphingomyeline C16:0	12 ± 1	13.4 ± 0.9
SM C18:0	Sphingomyeline C18:0	8 ± 1	7.5 ± 0.8
SM C20:2	Sphingomyeline C20:2	9.0 ± 0.9	8 ± 1
SM C24:0	Sphingomyeline C24:0	44 ± 2	53 ± 4
SM C24:1	Sphingomyeline C24:1	231 ± 12	218 ± 13
SM C26:0	Sphingomyeline C26:0	2.0 ± 0.2	2.4 ± 0.3
SM C26:1	Sphingomyeline C26:1	5.8 ± 0.5	6.0 ± 0.5

**Table 2.8** Mean ( $\pm$  SEM) contribution percentages (%) of lysophosphatidylcholine compounds in liver of pike collected upstream and downstream of Montreal's WWTP effluent discharge point (QC, Canada). Values marked by an asterisk indicate that concentrations were significantly different between sites (Mann-Whitney *U* Test,  $p \leq 0.05$ ).

LPC compound	Upstream ( $n = 25$ )	Downstream ( $n = 25$ )
LPC 14:0	1.82 $\pm$ 0.09	2.79 $\pm$ 0.24 *
LPC 16:0	24.73 $\pm$ 1.19	27.23 $\pm$ 1.49
LPC 17:0	3.26 $\pm$ 0.17	4.19 $\pm$ 0.23 *
LPC 18:0	2.41 $\pm$ 0.16	3.36 $\pm$ 0.23 *
LPC 16:1	10.10 $\pm$ 0.34	10.10 $\pm$ 0.45
LPC 18:1	28.33 $\pm$ 0.87	28.76 $\pm$ 0.97
LPC 28:1	0.80 $\pm$ 0.14	1.20 $\pm$ 0.14 *
LPC 18:2	8.61 $\pm$ 0.62	6.07 $\pm$ 0.59 *
LPC 20:4	19.93 $\pm$ 0.78	16.30 $\pm$ 0.63 *

**Table 2.9** mRNA levels (mean calibrated normalized relative quantity (cnrq)  $\pm$  SEM) of *lpcat3*, *lpcat4*, *pemt*, *pla2*, *ppara* and *ppard* in the liver of pike collected upstream and downstream of Montreal's WWTP effluent discharge point (QC, Canada).

Gene	Upstream ( $n = 25$ )	Downstream ( $n = 25$ )
<i>lpcat3</i>	11.7 $\pm$ 2.2	9.3 $\pm$ 1.8
<i>lpcat4</i>	22.8 $\pm$ 5.4	17.1 $\pm$ 3.7
<i>pemt</i>	6.1 $\pm$ 0.7	5.4 $\pm$ 0.7
<i>pla2</i>	16.1 $\pm$ 5.2	6.5 $\pm$ 1.0
<i>ppara</i>	18.7 $\pm$ 6.3	4.5 $\pm$ 1.0
<i>ppard</i>	11.7 $\pm$ 5.1	3.8 $\pm$ 0.7

**Table 2.10** Transcription levels (mean log calibrated normalized relative quantity (cnrq)  $\pm$  SEM) of *lpcat3*, *lpcat4*, *pemt*, *pla2*, *ppara* and *ppard* in the liver of female and male pike collected upstream and downstream of Montreal's WWTP effluent discharge point (QC, Canada). Values marked by an asterisk indicate that concentrations were significantly different between sexes (Mann-Whitney *U* Test,  $p \leq 0.05$ ).

<b>Gene</b>	<b>Female</b>	<b>Male</b>	<b>W</b>	<b>p</b>
	<b>n = 34</b>	<b>n = 15</b>		
<i>lpcat3</i>	5.95 $\pm$ 0.03	5.95 $\pm$ 0.05	137	0.87
<i>lpcat4</i>	5.73 $\pm$ 0.04	5.92 $\pm$ 0.03 *	45	0.01
<i>pemt</i>	3.81 $\pm$ 0.03	3.93 $\pm$ 0.03	87	0.06
<i>pla2</i>	5.27 $\pm$ 0.03	5.36 $\pm$ 0.05	138	0.18
<i>ppara</i>	6.78 $\pm$ 0.03	6.86 $\pm$ 0.04	137	0.16
<i>ppard</i>	5.65 $\pm$ 0.02	5.65 $\pm$ 0.03	121	0.86

## 2.9. References

- Abbasi, G., Buser, A. M., Soehl, A., Murray, M. W., and Diamond, M. L. (2015). Stocks and Flows of PBDEs in Products from Use to Waste in the U.S. and Canada from 1970 to 2020. *Environmental Science & Technology*, 49, 1521–1528. doi: 10.1021/es504007v
- Al-Salhi, R., Abdul-Sada, A., Lange, A., Tyler, C. R., and Hill, E. M. (2012). The Xenometabolome and Novel Contaminant Markers in Fish Exposed to a Wastewater Treatment Works Effluent. *Environmental Science & Technology*, 46, 9080–9088. doi:10.1021/es3014453
- Ankley, G. T., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Makynen, E. A., Blake, L. S., Greene, K. J., ... Villeneuve, D. L. (2007). Ketoconazole in the fathead minnow (*Pimephales promelas*): Reproductive toxicity and biological compensation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 1214–1223. doi:10.1897/06-428R.1
- Arulkwe, A., Cangialosi, M. V., Letcher, R. J., Rocha, E., and Mortensen, A. S. (2013). Changes in morphometry and association between whole-body fatty acids and steroid hormone profiles in relation to bioaccumulation patterns in salmon larvae

- exposed to perfluorooctane sulfonic or perfluorooctane carboxylic acids. *Aquatic Toxicology*, 130–131, 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.026>
- Astudillo, A. M., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2019). Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A2 enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864, 772–783. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.002>
- Benskin, J. P., Ikonomou, M. G., Liu, J., Veldhoen, N., Dubetz, C., Helbing, C. C., and Cosgrove, J. R. (2014). Distinctive metabolite profiles in in-migrating Sockeye salmon suggest sex-linked endocrine perturbation. *Environmental Science & Technology*, 48, 11670–11678. doi:10.1021/es503266x
- Blazer, VS. (2002). Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26, 85–101. doi:10.1023/A:1023332216713
- Cantinho, P., Matos, M., Trancoso, M., and Santos, M. (2016). Behaviour and fate of metals in urban wastewater treatment plants: a review. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13, 359–386. doi:10.1007/s13762-015-0887-x
- Catalá, A. (2012). Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the “Fluid Mosaic Model” to the “Lipid Whisker Model”. *Biochimie*, 94, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.09.025>
- Christiansen, H. E., Mehinto, A. C., Yu, F., Perry, R. W., Denslow, N. D., Maule, A. G., and Mesa, M. G. (2014). Correlation of gene expression and contaminant concentrations in wild largescale suckers: A field-based study. *Science of the Total Environment*, 484, 379–389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.034>
- Dambre, P. D. (2017). Endocrine Disruptors and Obesity. *Current Obesity Reports*, 6, 18–27. doi:10.1007/s13679-017-0240-4
- De Wit, C. A. (2002). An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere*, 46, 583–624. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00225-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00225-9)

- Del Bas, J. M., Caimari, A., Rodriguez-Naranjo, M. I., Childs, C. E., Chavez, C. P., West, A. L., ... Calder, P. C. (2016). Impairment of lysophospholipid metabolism in obesity: altered plasma profile and desensitization to the modulatory properties of n-3 polyunsaturated fatty acids in a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 104, 266–79. doi:10.3945/ajcn.116.130872.
- Dimastrogiovanni, G., Córdoba, M., Navarro, I., Jáuregui, O., and Porte, C. (2015). Alteration of cellular lipids and lipid metabolism markers in RTL-W1 cells exposed to model endocrine disrupters. *Aquatic Toxicology*, 165, 277–285. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.06.005
- Du, Z., Zhang, Y., Wang, G., Peng, J., Wang, Z., and Gao, S. (2016). TPhP exposure disturbs carbohydrate metabolism, lipid metabolism, and the DNA damage repair system in zebrafish liver. *Science Reports*, 6, 6136. doi:10.1038/srep21827
- Eisinger, K., Liebisch, G., Schmitz, G., Aslanidis, C., Krautbauer, S., and Buechler, C. (2014). Lipidomic analysis of serum from high fat diet induced obese mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 2991-3002. doi:10.3390/ijms15022991
- Ekman, D., Teng, Q., Villeneuve, D., Kahl, M., Jensen, K., Durhan, E., ... Collette, T. (2008). Investigating Compensation and Recovery of Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) Exposed to 17 $\alpha$ -Ethynodiol with Metabolite Profiling. *Environmental Science & Technology*, 42, 4188–4194. doi:10.1021/es8000618
- Espinosa-Ruiz, C., Manuguerra, S., Cuesta, A., Esteban, M. A., Santulli, A., and Messina, C. M. (2019). Sub-lethal doses of polybrominated diphenyl ethers affect some biomarkers involved in energy balance and cell cycle, via oxidative stress in the marine fish cell line SAF-1. *Aquatic Toxicology*, 210, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.014>
- Fadhlaoui, M., and Couture, P. (2016). Combined effects of temperature and metal exposure on the fatty acid composition of cell membranes, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology*, 180, 45–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.09.005>
- Giang, P. T., Sakalli, S., Fedorova, G., Tilami, S. K., Bakal, T., Najmanova, L., ... Burkina, V. (2018). Biomarker response, health indicators, and intestinal

- microbiome composition in wild brown trout (*Salmo trutta m. fario L.*) exposed to a sewage treatment plant effluent-dominated stream. *Science of the Total Environment*, 625, 1494–1509. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.020>
- Gobeil, C., Rondeau, B., et Beaudin, L. (2005). Contribution of municipal effluents to metal fluxes in the St. Lawrence River. *Environmental Science & Technology*, 39, 456–464. doi:10.1021/es049335x
- Gouveia, D., Almunia, C., Cogne, Y., Pible, O., Degli-Esposti, D., Salvador, A., ... Armengaud, J. (2019). Ecotoxicoproteomics: A decade of progress in our understanding of anthropogenic impact on the environment. *Journal of Proteomics*, 198, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.001>
- Grzelczyk, A., and Gendaszewska-Darmach, E. (2013). Novel bioactive glycerol-based lysophospholipids: New data – New insight into their function. *Biochimie*, 95, 667–679. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.10.009>
- Houde, M., Giraudo, M., Douville, M., Bougas, B., Couture, P., De Silva, A. O., ... Gagnon, C. (2014a). A multi-level biological approach to evaluate impacts of a major municipal effluent in wild St. Lawrence River yellow perch (*Perca flavescens*). *Science of the Total Environment*, 497–498, 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.059>
- Houde, M., Berryman, D., de Lafontaine, Y., and Verreault, J. (2014b). Novel brominated flame retardants and dechloranes in three fish species from the St. Lawrence River, Canada. *Science of the Total Environment*, 479–480, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.105>
- Jackson, S. K., Abate, W., and Tonks, A. J. (2008). Lysophospholipid acyltransferases: Novel potential regulators of the inflammatory response and target for new drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics*, 119, 104–114. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.04.001
- Kim, H.-J., Kim, J. H., Noh, S., Hur, H. J., Sung, M. J., Hwang, J.-T., ... Yoon, S. H. (2011). Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. *Journal of Proteome Research*, 10, 722–731. doi:10.1021/pr100892r
- Laliberté, D., Québec (Province), Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs. (2011). *Teneurs en polybromodiphényléthers*

(PBDE) dans les poissons du fleuve Saint-Laurent et des lacs et rivières du Québec (2002-2008). Développement durable, environnement et parcs Québec, Québec.

Lankadurai, B. P., Nagato, E. G., and Simpson, M. J. (2013). Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stressors. *Environmental Reviews*, 21, 180–205. doi.org/10.1139/er-2013-0011

Le Cren, E. D. (1947). The determination of the age and growth of the perch (*Perca fluviatilis*) from opercular bone. *Journal of Animal Ecology*, 16, 188–204. doi: 10.2307/1494

Liu, A., Krausz, K. W., Fang, Z.-Z., Brocker, C., Qu, A., and Gonzalez, F. J. (2014). Gemfibrozil disrupts lysophosphatidylcholine and bile acid homeostasis via PPAR $\alpha$  and its relevance to hepatotoxicity. *Archives of Toxicology*, 88, 983–996. doi:10.1007/s00204-013-1188-0

Lu, K., Qiao, R., An, H., and Zhang, Y. (2018). Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 202, 514–520. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.145

Maradonna, F., Nozzi, V., Santangeli, S., Traversi, I., Gallo, P., Fattore, E., ... Carnevali, O. (2015). Xenobiotic-contaminated diets affect hepatic lipid metabolism: Implications for liver steatosis in *Sparus aurata* juveniles. *Aquatic Toxicology*, 167, 257–264. http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.006

Marcogliese, D. J., Blaise, C., Cyr, D., de Lafontaine, Y., Fournier, M., Gagné, F., ... Hudon, C. (2015). Effects of a major municipal effluent on the St. Lawrence River: A case study. *Ambio*, 44, 257–274. doi:10.1007/s13280-014-0577-9

Maruya, K. A., Vidal-Dorsch, D. E., Bay, S. M., Kwon, J. W., Xia, K., and Armbrust, K. L. (2012). Organic contaminants of emerging concern in sediments and flatfish collected near outfalls discharging treated wastewater effluent to the Southern California Bight. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 2683–2688. doi: 10.1002/etc.2003

- Melvin, S. D., Lanctôt, C. M., Doriean, N. J. C., Bennett, W. W., and Carroll, A. R. (2019). NMR-based lipidomics of fish from a metal(loid) contaminated wetland show differences consistent with effects on cellular membranes and energy storage. *Science of the Total Environment*, 654, 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.113>
- Mouchlis, V. D., and Dennis, E. A. (2019). Phospholipase A2 catalysis and lipid mediator lipidomics. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864, 766–771. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.010>
- Nava-Álvarez, R., Razo-Estrada, A. C., García-Medina, S., Gómez-Oliván, L. M., and Galar-Martínez, M. (2014). Oxidative Stress Induced by Mixture of Diclofenac and Acetaminophen on Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Water, Air & Soil Pollution*, 225, 1–9. doi:10.1007/s11270-014-1873-5
- Nikinmaa, M., and Rytkönen, K. T. (2011). Functional genomics in aquatic toxicology – do not forget the function. *Aquatic Toxicology*, 105, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.05.019>
- Olivares-Rubio, H. F., and Vega-Lopez, A. (2016). Fatty acid metabolism in fish species as a biomarker for environmental monitoring. *Environmental Pollution*, 218, 297–312. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.005>
- Rakhshandehroo, M., Knoch, B., Müller, M., and Kersten, S. (2010). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Target Genes. *PPAR Research*, 2010, 1–20. doi:10.1155/2010/612089
- Rauschert, S., Uhl, O., Koletzko, B., Kirchberg, F., Mori, T. A., Huang, R.-C., ... Oddy, W. H. (2016). Lipidomics Reveals Associations of Phospholipids With Obesity and Insulin Resistance in Young Adults. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101, 871–87. doi:10.1210/jc.2015-3525
- Reinling, J., Houde, M., and Verreault, J. (2017). Environmental exposure to a major urban wastewater effluent: Effects on the energy metabolism of northern pike. *Aquatic Toxicology*, 191, 131–140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.003>
- Ren, X., Zhang, H., Geng, N., Xing, L., Zhao, Y., Wang, F., and Chen, J. (2018). Developmental and metabolic responses of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and

- larvae to short-chain chlorinated paraffins (SCCPs) exposure. *Science of the Total Environment*, 622–623, 214–221. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.304>
- Rozen, S., and Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, 132, 365–386. doi:10.1385/1-59259-192-2:365
- Sakalli, S., Giang, P. T., Burkina, V., Zamaratskaia, G., Rasmussen, M. K., Bakal, T., ... Zlabek, V. (2018). The effects of sewage treatment plant effluents on hepatic and intestinal biomarkers in common carp (*Cyprinus carpio*). *Science of the Total Environment*, 635, 1160–1169. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.188>
- Samuelsson, L. M., Björlenius, B., Förlin, L., and Larsson, D. G. J. (2011). Reproducible <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic responses in fish exposed to different sewage effluents in two separate studies. *Environmental Science & Technology*, 45, 1703–1710. doi: 10.1021/es104111x
- Santos, A. L., and Preta, G. (2018). Lipids in the cell: organisation regulates function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75, 1909–1927. <https://doi.org/10.1007/s0018-018-2765-4>
- Schulz, H. (2002). Oxidation of Fatty acid in eukaryotes. In D. E. Vance and J. E. Vance, *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (p. 127–150), 4th Ed. Elsevier Science B.V.
- Shen, L., Jobst, K. J., Reiner, E. J., Helm, P. A., McCrindle, R., Taguchi, V. Y., ... Brindle, I. D. (2014). Identification and Occurrence of Analogues of Dechlorane 604 in Lake Ontario Sediment and their Accumulation in Fish. *Environmental Science & Technology*, 48, 11170–11177. dx.doi.org/10.1021/es503089c
- Stockholm Convention. (2009). *Report of the conference of the parties of the Stockholm convention on persistent organic pollutants on the work of its fourth meeting*. Conference of the Parties of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants Fourth meeting.
- Stockholm Convention. (2017). *The 16 New POPs - An introduction to the chemicals added to the Stockholm Convention as Persistent Organic Pollutants by the Conference of the Parties*. Geneva, Switzerland.

- Suárez-García, S., Caimari, A., del Bas, J. M., Suárez, M., and Arola, L. (2017). Serum lysophospholipid levels are altered in dyslipidemic hamsters. *Scientific Reports*, 7, 10431. doi:10.1038/s41598-017-10651-0
- Sverko, E., Tomy, G. T., Reiner, E. J., Li, Y.-F., McCarry, B. E., Arnot, J. A., ... Hites, R. A. (2011). Dechlorane Plus and Related Compounds in the Environment: A Review. *Environmental Science & Technology*, 45, 5088–5098. dx.doi.org/10.1021/es2003028
- Takahashi, H., Goto, T., Yamazaki, Y., Kamakari, K., Hirata, M., Suzuki, H., ... Kawada, T. (2015). Metabolomics reveal 1-palmitoyl lysophosphatidylcholine production by peroxisome proliferator-activated receptor. *Journal of Lipid Research*, 56, 254–265. doi:10.1194/jlr.M052464
- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11, 107–184. doi:10.1080/713610925
- Tongue, A. D. W., Reynolds, S. J., Fernie, K. J., and Harrad, S. (2019). Flame retardant concentrations and profiles in wild birds associated with landfill: A critical review. *Environmental Pollution*, 248, 646e658. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.103
- Tran, N. H., Reinhard, M., and Gin, K. Y.-H. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water Research*, 133, 182e207. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.029
- Wang, Y., Li, X., Li, A., and Wang, T. (2007). Effect of Municipal Sewage Treatment Plant Effluent on Bioaccumulation of Polychlorinated Biphenyls and Polybrominated Diphenyl Ethers in the Recipient Water. *Environmental Science & Technology*, 41, 6026–6032. doi:10.1021/es070913u
- Wang-Sattler, R., Yu, Z., Herder, C., Messias, A. C., Floegel, A., He, Y., ... Illig, T. (2012). Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics. *Molecular Systems Biology*, 8, 615. doi:10.1038/msb.2012.43

- Wen, Q., Xie, X., Zhao, C., Ren, Q., Zhang, X., Wei, D., ... Du, Y. (2019). The brominated flame retardant PBDE 99 promotes adipogenesis via regulating mitotic clonal expansion and PPAR $\gamma$  expression. *Science of the Total Environment*, 670, 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.201>
- Zhao, Y., Chen, Y.-Q., Bonacci, T. M., Bredt, D. S., Li, S., Bensch, W. R., ... Cao, G. (2008). Identification and Characterization of a Major Liver Lysophosphatidylcholine Acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 8258–8265. doi: 10.1074/jbc.M710422200

## CONCLUSION

L'objectif de la présente étude était d'évaluer les effets d'une exposition chronique à l'effluent de la ville de Montréal sur le métabolisme lipidique hépatique du grand brochet du fleuve Saint-Laurent. Grâce à l'utilisation de la métabolomique ciblée, les concentrations en acides gras, en acylcarnitines et en phospholipides ont été analysées dans le foie des brochets prélevés en amont et en aval du point de rejet de l'effluent. L'utilisation de l'analyse de la transcription de gènes en complément à ces analyses a permis de mesurer la transcription de gènes codant pour plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides tels que la phospholipase A2, des lysophosphatidylcholines acyltransférases ainsi que PPAR $\alpha$ .

Les résultats de cette étude suggèrent que le métabolisme des phospholipides est affecté chez les brochets prélevés en aval du point de rejet de l'effluent de Montréal. En effet, les LPC contenant des acides gras polyinsaturés représentaient une plus faible proportion de l'ensemble des LPC dans le foie des brochets exposés à l'effluent de Montréal. Les LPC contenant des acides gras saturés et mono-insaturés représentaient au contraire une plus grande proportion de l'ensemble des LPC chez ces mêmes brochets exposés. Les résultats obtenus suggèrent également que les abondances relatives de LPC 14:0, un composé représentant des LPC saturés, et LPC 18:2, un composé représentant des LPC polyinsaturés, sont corrélées avec les concentrations hépatiques en PBDE et Dechlorananes. Des associations entre ces LPC et la circonférence des brochets ont aussi été observées. Ainsi, plus le foie des brochets était concentré en RFH, plus l'abondance relative de LPC14:0 augmentait, et plus l'abondance relative

de LPC18:2 diminuait. De plus, l'abondance relative de LCP14:0 augmentait également avec l'augmentation de la circonférence des brochets, alors que l'abondance de LPC 18:2 diminuait avec l'augmentation de la circonférence. Contrairement à ce qui était attendu, les concentrations en acides gras et en acylcarnitines étaient similaires dans le foie des brochets prélevés en amont et en aval du point de rejet de l'effluent. Les concentrations en acides gras polyinsaturés n'étaient donc pas plus grandes dans le foie des brochets prélevés en aval, et les concentrations en acylcarnitines n'étaient pas plus faibles chez les brochets prélevés en aval tel qu'anticipées.

Les brochets étant exposés aux mélanges complexes de contaminants contenus dans l'effluent, ils accumulent potentiellement une panoplie de contaminants en plus des RFH dans leurs tissus. L'abondance de différents LPC qui variait avec les concentrations en RFH est potentiellement due à une modulation de l'activité ou de l'expression de l'enzyme PLA2 en lien avec la sous-expression de *ppara* mesurée chez les brochets collectés en aval du point de rejet de l'effluent. Les différences dans l'abondance en LPC entre les brochets prélevés en amont et en aval de l'effluent pourraient aussi être dues à une augmentation du stress oxydatif et de la réponse inflammatoire chez les poissons collectés en aval de l'effluent. En effet, le stress oxydatif et l'inflammation peuvent induire des changements dans les profils en phospholipides par un remodelage via l'action de la PLA2. Aucune différence dans la transcription du gène codant pour cette enzyme n'a été mesurée dans le foie des brochets exposés à l'effluent. Toutefois, plusieurs groupes de cette enzyme existent dans la cellule, et elles ont différentes spécificités selon le degré d'insaturation des phospholipides ciblés. Il serait donc intéressant d'évaluer la transcription de plusieurs autres groupes de l'enzyme PLA2 chez les brochets exposés à l'effluent de Montréal dans le cadre de futures études. Cette enzyme joue un rôle clé dans le métabolisme des phospholipides dans le foie des poissons et elle est probablement impliquée dans les mécanismes de toxicité qui expliquent les différences dans la composition en LPC

mesurées dans le foie des brochets en amont et en aval de l'effluent. Cela permettrait également d'en apprendre davantage sur la spécificité de ces différents groupes pour les phospholipides en fonction du degré d'insaturation des acides gras qu'ils contiennent.

Cette étude a permis de corroborer l'hypothèse qu'une exposition à l'effluent de la ville de Montréal a une influence sur le métabolisme lipidique en modifiant la composition des lipides du foie des brochets ainsi que la transcription de gènes clés impliqués dans le métabolisme des lipides. L'exposition chronique à l'effluent de la ville de Montréal semble donc avoir des effets sur la composition en lysophospholipides et sur la transcription de PPAR $\alpha$ , un important régulateur du métabolisme des acides gras et des phospholipides. Étant donné le rôle des LPC dans divers désordres métaboliques tels que l'inflammation chronique, l'obésité et le diabète, il serait intéressant de relier une perturbation dans la composition de ces lysophospholipides avec ce type de maladies chez le brochet ou encore d'autres espèces de poissons exposés à des contaminants environnementaux. Les informations présentées dans cette étude pourraient être utilisées dans un effort d'amélioration des réglementations et politiques de gestion des eaux usées par les municipalités pour limiter les impacts néfastes sur la faune aquatique des milieux récepteurs.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abbasi, G., Buser, A. M., Soehl, A., Murray, M. W., et Diamond, M. L. (2015). Stocks and Flows of PBDEs in Products from Use to Waste in the U.S. and Canada from 1970 to 2020. *Environmental Science & Technology*, *49*, 1521–1528. doi: 10.1021/es504007v
- Al-Salhi, R., Abdul-Sada, A., Lange, A., Tyler, C. R., et Hill, E. M. (2012). The Xenometabolome and Novel Contaminant Markers in Fish Exposed to a Wastewater Treatment Works Effluent. *Environmental Science & Technology*, *46*, 9080–9088. doi:10.1021/es3014453
- Ankley, G. T., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Makynen, E. A., Blake, L. S., Greene, K. J., ... Villeneuve, D. L. (2007). Ketoconazole in the fathead minnow (*Pimephales promelas*): Reproductive toxicity and biological compensation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *26*, 1214–1223. doi:10.1897/06-428R.1
- Arstikaitis, J., Gagné, F., et Cyr, D. G. (2014). Exposure of fathead minnows to municipal wastewater effluent affects intracellular signaling pathways in the liver. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, *164*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.04.002>
- Arukwe, A., Cangialosi, M. V., Letcher, R. J., Rocha, E., et Mortensen, A. S. (2013). Changes in morphometry and association between whole-body fatty acids and steroid hormone profiles in relation to bioaccumulation patterns in salmon larvae exposed to perfluorooctane sulfonic or perfluorooctane carboxylic acids. *Aquatic Toxicology*, *130–131*, 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.026>
- Astudillo, A. M., Balboa, M. A., et Balsinde, J. (2019). Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A2 enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1864*, 772–783. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.002>

- Bahamonde, P. A., Feswick, A., Isaacs, M. A., Munkittrick, K. R., et Martyniuk, C. J. (2016). Defining the role of omics in assessing ecosystem health: Perspectives from the Canadian Environmental Monitoring Program. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35, 20–35. doi:10.1002/etc.3218
- Benskin, J. P., Ikonomou, M. G., Liu, J., Veldhoen, N., Dubetz, C., Helbing, C. C., et Cosgrove, J. R. (2014). Distinctive metabolite profiles in in-migrating Sockeye salmon suggest sex-linked endocrine perturbation. *Environmental Science & Technology*, 48, 11670–11678. doi:10.1021/es503266x
- Bernatchez, L., et Giroux, M. (2012). Les poissons d'eau douce du Québec et leur répartition dans l'est du Canada, Nouvelle édition. ed. Broquet, Saint-Constant, Québec.
- Blazer, VS. (2002). Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26, 85–101. doi:10.1023/A:1023332216713
- Bratberg, M., Olsvik, P. A., Edvardsen, R. B., Brekken, H. K., Vadla, R., et Meier, S. (2013). Effects of oil pollution and persistent organic pollutants (POPs) on glycerophospholipids in liver and brain of male Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Chemosphere*, 90, 2157–2171. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.026>
- Cantinho, P., Matos, M., Trancoso, M., et Santos, M. (2016). Behaviour and fate of metals in urban wastewater treatment plants: a review. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13, 359–386. doi:10.1007/s13762-015-0887-x
- Catalá, A. (2012). Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the “Fluid Mosaic Model” to the “Lipid Whisker Model”. *Biochimie*, 94, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.09.025>
- Christiansen, H. E., Mehinto, A. C., Yu, F., Perry, R. W., Denslow, N. D., Maule, A. G., et Mesa, M. G. (2014). Correlation of gene expression and contaminant concentrations in wild largescale suckers: A field-based study. *Science of the Total Environment*, 484, 379–389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.034>

Communauté métropolitaine de Montréal. (s.d.). *Observatoire Grand Montréal*. Récupéré de <http://cmm.qc.ca/donnees-et-territoire/observatoire-grand-montreal>

Dubre, P. D. (2017). Endocrine Disruptors and Obesity. *Current Obesity Reports*, 6, 18–27. doi:10.1007/s13679-017-0240-4

De Wit, C. A. (2002). An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere*, 46, 583–624. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00225-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00225-9)

Del Bas, J. M., Caimari, A., Rodriguez-Naranjo, M. I., Childs, C. E., Chavez, C. P., West, A. L., ... Calder, P. C. (2016). Impairment of lysophospholipid metabolism in obesity: altered plasma profile and desensitization to the modulatory properties of n-3 polyunsaturated fatty acids in a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 104, 266–79. doi:10.3945/ajcn.116.130872.

Dennis, E. A., et Norris, P. C. (2015). Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15, 511–523. doi:10.1038/nri3859

Dimastrogiovanni, G., Córdoba, M., Navarro, I., Jáuregui, O., et Porte, C. (2015). Alteration of cellular lipids and lipid metabolism markers in RTL-W1 cells exposed to model endocrine disrupters. *Aquatic Toxicology*, 165, 277–285. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.06.005

Du, Z., Zhang, Y., Wang, G., Peng, J., Wang, Z., et Gao, S. (2016). TPhP exposure disturbs carbohydrate metabolism, lipid metabolism, and the DNA damage repair system in zebrafish liver. *Science Reports*, 6, 6136. doi:10.1038/srep21827

Eisinger, K., Liebisch, G., Schmitz, G., Aslanidis, C., Krautbauer, S., et Buechler, C. (2014). Lipidomic analysis of serum from high fat diet induced obese mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 2991-3002. doi:10.3390/ijms15022991

Ekman, D., Teng, Q., Villeneuve, D., Kahl, M., Jensen, K., Durhan, E., ... Collette, T. (2008). Investigating Compensation and Recovery of Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) Exposed to 17 $\alpha$ -Ethynodiol with Metabolite Profiling. *Environmental Science & Technology*, 42, 4188–4194. doi:10.1021/es8000618

- Espinosa-Ruiz, C., Manuguerra, S., Cuesta, A., Esteban, M. A., Santulli, A., et Messina, C. M. (2019). Sub-lethal doses of polybrominated diphenyl ethers affect some biomarkers involved in energy balance and cell cycle, via oxidative stress in the marine fish cell line SAF-1. *Aquatic Toxicology*, 210, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.014>
- Fadhloui, M., et Couture, P. (2016). Combined effects of temperature and metal exposure on the fatty acid composition of cell membranes, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology*, 180, 45–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.09.005>
- Falciani, F., Diab, A. M., Sabine, V., Williams, T. D., Ortega, F., George, S. G., et Chipman J. K. (2008). Hepatic transcriptomic profiles of European flounder (*Platichthys flesus*) from field sites and computational approaches to predict site from stress gene responses following exposure to model toxicants. *Aquatic Toxicology*, 90, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.020>
- Gagnon, C., et Lajeunesse, A. (2012). Low removal of acidic and hydrophilic pharmaceutical products by various types of municipal wastewater treatment plants. *Journal of Xenobiotics*, 2, 13–17. doi:10.4081/xeno.2012.e3
- Garcia-Reyero, N., Lavelle, C. M., Escalon, B. L., Martinović, D., Kroll, K. J., Sorensen, P. W., et Denslow, N. D. (2011). Behavioral and genomic impacts of a wastewater effluent on the fathead minnow. *Aquatic Toxicology*, 101, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.08.014>
- Giang, P. T., Sakalli, S., Fedorova, G., Tilami, S. K., Bakal, T., Najmanova, L., ... Burkina, V. (2018). Biomarker response, health indicators, and intestinal microbiome composition in wild brown trout (*Salmo trutta m. fario* L.) exposed to a sewage treatment plant effluent-dominated stream. *Science of the Total Environment*, 625, 1494–1509. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.020>
- Gobeil, C., Rondeau, B., et Beaudin, L. (2005). Contribution of municipal effluents to metal fluxes in the St. Lawrence River. *Environmental Science & Technology*, 39, 456–464. doi:10.1021/es049335x
- Gouveia, D., Almunia, C., Cogne, Y., Pible, O., Degli-Esposti, D., Salvador, A., ... Armengaud, J. (2019). Ecotoxicoproteomics: A decade of progress in our

- understanding of anthropogenic impact on the environment. *Journal of Proteomics*, 198, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.001>
- Grzelczyk, A., et Gendaszewska-Darmach, E. (2013). Novel bioactive glycerol-based lysophospholipids: New data – New insight into their function. *Biochimie*, 95, 667–679. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.10.009>
- Hargreaves, A. J., Constantino, C., Dotro, G., Cartmell, E., et Campo, P. (2018). Fate and removal of metals in municipal wastewater treatment: a review. *Environmental Technology Reviews*, 7, 1–18, doi:10.1080/21622515.2017.1423398
- Hébert, N., Gagné, F., Cejka, P., Bouchard, B., Hausler, R., Cyr, D. G., ... Fournier, M. (2008a). Effects of ozone, ultraviolet and peracetic acid disinfection of a primary-treated municipal effluent on the Immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 148, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.04.007>
- Hébert, N., Gagné, F., Cejka, P., Cyr, D., Marcogliese, D. J., Blaise, C., ... Fournier, M. (2008b). The effects of a primary-treated municipal effluent on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Exposure duration and contribution of suspended particles. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 148, 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.06.007>
- Houde, M., Giraudo, M., Douville, M., Bougas, B., Couture, P., De Silva, A. O., ... Gagnon, C. (2014a). A multi-level biological approach to evaluate impacts of a major municipal effluent in wild St. Lawrence River yellow perch (*Perca flavescens*). *Science of the Total Environment*, 497–498, 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.059>
- Houde, M., Berryman, D., de Lafontaine, Y., et Verreault, J. (2014b). Novel brominated flame retardants and dechloranes in three fish species from the St. Lawrence River, Canada. *Science of the Total Environment*, 479–480, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.105>
- Jackson, S. K., Abate, W., et Tonks, A. J. (2008). Lysophospholipid acyltransferases: Novel potential regulators of the inflammatory response and target for new drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics*, 119, 104–114. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.04.001

Jones, O. A. H., Maguire, M. L., Griffin, J. L., Dias, D. A., Spurgeon, D. J., et Svendsen, C. (2013). Metabolomics and its use in ecology. *Austral Ecology*, 38, 713–720. doi:10.1111/aec.12019

Kim, H.-J., Kim, J. H., Noh, S., Hur, H. J., Sung, M. J., Hwang, J.-T., ... Yoon, S. H. (2011). Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. *Journal of Proteome Research*, 10, 722–731. doi:10.1021/pr100892r

Kota, B. P., Huang, T. H.-W., et Roufogalis, B. D. (2005). An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*, 51, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2004.07.012>

Lajeunesse, A., Gagnon, C., et Sauvé, S. (2008). Determination of antidepressants and their N-desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 80, 5325–5333. doi:10.1021/ac800162q

Laliberté, D., Québec (Province), Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs. (2011). *Teneurs en polybromodiphénylétthers (PBDE) dans les poissons du fleuve Saint-Laurent et des lacs et rivières du Québec (2002-2008)*. Développement durable, environnement et parcs Québec, Québec.

Lankadurai, B. P., Nagato, E. G., et Simpson, M. J. (2013). Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stressors. *Environmental Reviews*, 21, 180–205. dx.doi.org/10.1139/er-2013-0011

Le Cren, E. D. (1947). The determination of the age and growth of the perch (*Perca fluviatilis*) from opercular bone. *Journal of Animal Ecology*, 16, 188–204. doi: 10.2307/1494

Liney, K. E., Hagger, J. A., Tyler, C. R., Depledge, M. H., Galloway, T. S., et Jobling, S. (2006). Health Effects in Fish of Long-Term Exposure to Effluents from Wastewater Treatment Works. *Environmental Health Perspectives*, 114, 81–89. doi:10.1289/ehp.8058

- Lister, A., Regan, C., Van Zwol, J., et Van Der Kraak, G. (2009). Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: A mechanistic evaluation. *Aquatic Toxicology*, 95, 320–329. doi:10.1016/j.aquatox.2009.04.011
- Liu, A., Krausz, K. W., Fang, Z.-Z., Brocker, C., Qu, A., et Gonzalez, F. J. (2014). Gemfibrozil disrupts lysophosphatidylcholine and bile acid homeostasis via PPAR $\alpha$  and its relevance to hepatotoxicity. *Archives of Toxicology*, 88, 983–996. doi:10.1007/s00204-013-1188-0
- Lu, K., Qiao, R., An, H., et Zhang, Y. (2018). Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 202, 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.145>
- Maradonna, F., Nozzi, V., Santangeli, S., Traversi, I., Gallo, P., Fattore, E., ... Carnevali, O. (2015). Xenobiotic-contaminated diets affect hepatic lipid metabolism: Implications for liver steatosis in *Sparus aurata* juveniles. *Aquatic Toxicology*, 167, 257–264. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.006>
- Marcogliese, D. J., Blaise, C., Cyr, D., de Lafontaine, Y., Fournier, M., Gagné, F., ... Hudon, C. (2015). Effects of a major municipal effluent on the St. Lawrence River: A case study. *Ambio*, 44, 257–274. doi:10.1007/s13280-014-0577-9
- Marcogliese, D. J., Gendron, A. D., et Cone, D. K. (2009). Impact of municipal effluents and hydrological regime on myxozoan parasite communities of fish. *International Journal for Parasitology*, 39, 1345–1351. doi:10.1016/j.ijpara.2009.04.007
- Maruya, K. A., Vidal-Dorsch, D. E., Bay, S. M., Kwon, J. W., Xia, K., et Armbrust, K. L. (2012). Organic contaminants of emerging concern in sediments and flatfish collected near outfalls discharging treated wastewater effluent to the Southern California Bight. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 2683–2688. doi:10.1002/etc.2003
- Melvin, S. D., Lanctôt, C. M., Doriean, N. J. C., Bennett, W. W., et Carroll, A. R. (2019). NMR-based lipidomics of fish from a metal(loid) contaminated wetland show differences consistent with effects on cellular membranes and energy

- storage. *Science of the Total Environment*, 654, 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.113>
- Metcalfe, C. D., Miao, X.-S., Koenig, B. G., et Struger, J. (2003). Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 2881–2889. <https://doi.org/10.1897/02-627>
- Miracle, A. L., et Ankley, G. T. (2005). Ecotoxicogenomics: linkages between exposure and effects in assessing risks of aquatic contaminants to fish. *Reproductive Toxicology*, 19, 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.06.007>
- Montiel-Léon, J. M., Munoz, G., Duy, S. V., Do, D. T., Vaudreuil, M.-A., Goeury, K., ... Sauvé, S. (2019). Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environmental Pollution*, 250, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.125>
- Moreira, J. (2011). *Évaluation de la performance des ouvrages municipaux d'assainissement des eaux pour l'année 2010*. Ouvrages de surverse et stations d'épuration. Rapport du Ministère des Affaires Municipales, Régions et occupation du territoire (MAMROT), Québec.
- Morris, L., Colombo, V., Hassell, K., Kellar, C., Leahy, P., Long, S. M., ... Pettigrove, V. (2017). Municipal wastewater effluent licensing: A global perspective and recommendations for best practice. *Science of the Total Environment*, 580, 1327–1339. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.096>
- Mouchlis, V. D., et Dennis, E. A. (2019). Phospholipase A2 catalysis and lipid mediator lipidomics. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864, 766–771. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.010>
- Nava-Álvarez, R., Razo-Estrada, A. C., García-Medina, S., Gómez-Oliván, L. M., et Galar-Martínez, M. (2014). Oxidative Stress Induced by Mixture of Diclofenac and Acetaminophen on Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Water, Air & Soil Pollution*, 225, 1–9. doi:10.1007/s11270-014-1873-5

- Nikinmaa, M., et Rytkönen, K. T. (2011). Functional genomics in aquatic toxicology – do not forget the function. *Aquatic Toxicology*, 105, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.05.019>
- Olivares-Rubio, H. F., et Vega-Lopez, A. (2016). Fatty acid metabolism in fish species as a biomarker for environmental monitoring. *Environmental Pollution*, 218, 297–312. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.005>
- Pelletier, M. et Rondeau, M. (2013). *Les polybromodiphényléthers (PBDE) dans les matières en suspension et les sédiments du fleuve Saint-Laurent*. Direction des sciences et de la technologie de l'eau, Environnement Canada, Québec.
- Petala, M., Kokokiris, L., Samaras, P., Papadopoulos, A., et Zouboulis, A. (2009). Toxicological and ecotoxic impact of secondary and tertiary treated sewage effluents. *Water Research*, 43, 5063–5074. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.043>
- Poulsen, L. L.-C., Siersbæk, M., et Mandrup, S. (2012). PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23, 631–639. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.003>
- Rakhshandehroo, M., Knoch, B., Müller, M., et Kersten, S. (2010). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Target Genes. *PPAR Research*, 2010, 1–20. doi:10.1155/2010/612089
- Rauschert, S., Uhl, O., Koletzko, B., Kirchberg, F., Mori, T. A., Huang, R.-C., ... Oddy, W. H. (2016). Lipidomics Reveals Associations of Phospholipids With Obesity and Insulin Resistance in Young Adults. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101, 871–87. doi:10.1210/jc.2015-3525
- Reinling, J., Houde, M., et Verreault, J. (2017). Environmental exposure to a major urban wastewater effluent: Effects on the energy metabolism of northern pike. *Aquatic Toxicology*, 191, 131–140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.003>
- Ren, X., Zhang, H., Geng, N., Xing, L., Zhao, Y., Wang, F., et Chen, J. (2018). Developmental and metabolic responses of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae to short-chain chlorinated paraffins (SCCPs) exposure. *Science of the*

*Total Environment*, 622–623, 214–221.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.304>

Rozen, S., et Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, 132, 365–386. doi:10.1385/1-59259-192-2:365

Sakalli, S., Giang, P. T., Burkina, V., Zamaratskaia, G., Rasmussen, M. K., Bakal, T., ... Zlabek, V. (2018). The effects of sewage treatment plant effluents on hepatic and intestinal biomarkers in common carp (*Cyprinus carpio*). *Science of the Total Environment*, 635, 1160–1169. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.188>

Samuelsson, L. M., Björlenius, B., Förlin, L., et Larsson, D. G. J. (2011). Reproducible <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic responses in fish exposed to different sewage effluents in two separate studies. *Environmental Science & Technology*, 45, 1703–1710. doi: 10.1021/es104111x

Santos, A. L., et Preta, G. (2018). Lipids in the cell: organisation regulates function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75, 1909–1927. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2765-4>

Schulz, H. (2002). Oxidation of Fatty acid in eukaryotes. Dans D. E. Vance et J. E. Vance, *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (p. 127–150), 4ième Ed. Elsevier Science B.V.

Sellin Jeffries, M. K., Mehinto, A. C., Carter, B. J., Denslow, N. D., et Kolok, A. S. (2012). Taking microarrays to the field: Differential hepatic gene expression of caged fathead minnows from Nebraska watersheds. *Environmental Science & Technology*, 46, 1877–1885. doi:10.1021/es2039097

Shen, L., Jobst, K. J., Reiner, E. J., Helm, P. A., McCrindle, R., Taguchi, V. Y., ... Brindle, I. D. (2014). Identification and Occurrence of Analogues of Dechlorane 604 in Lake Ontario Sediment and their Accumulation in Fish. *Environmental Science & Technology*, 48, 11170–11177. dx.doi.org/10.1021/es503089c

Skelton, D. M., Ekman, D. R., Martinović-Weigelt, D., Ankley, G. T., Villeneuve, D. L., Teng, Q., et Collette, T. W. (2014). Metabolomics for in Situ Environmental Monitoring of Surface Waters Impacted by Contaminants from Both Point and

- Nonpoint Sources. *Environmental Science & Technology*, 48, 2395–2403. doi: 10.1021/es404021f
- Smolders, R., Bervoets, L., et Blust, R. (2004). In situ and laboratory bioassays to evaluate the impact of effluent discharges on receiving aquatic ecosystems. *Environmental Pollution*, 132, 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.019>
- Stockholm Convention. (2009). *Report of the conference of the parties of the Stockholm convention on persistent organic pollutants on the work of its fourth meeting*. Conference of the Parties of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants Fourth meeting.
- Stockholm Convention. (2017). *The 16 New POPs - An introduction to the chemicals added to the Stockholm Convention as Persistent Organic Pollutants by the Conference of the Parties*. Geneva, Switzerland.
- Suárez-García, S., Caimari, A., Del Bas, J. M., Suárez, M., et Arola, L. (2017). Serum lysophospholipid levels are altered in dyslipidemic hamsters. *Scientific Reports*, 7, 10431. doi:10.1038/s41598-017-10651-0
- Sverko, E., Tomy, G. T., Reiner, E. J., Li, Y.-F., McCarry, B. E., Arnot, J. A., ... Hites, R. A. (2011). Dechlorane Plus and Related Compounds in the Environment: A Review. *Environmental Science & Technology*, 45, 5088–5098. [dx.doi.org/10.1021/es2003028](https://doi.org/10.1021/es2003028)
- Takahashi, H., Goto, T., Yamazaki, Y., Kamakari, K., Hirata, M., Suzuki, H., ... Kawada, T. (2015). Metabolomics reveal 1-palmitoyl lysophosphatidylcholine production by peroxisome proliferator-activated receptor. *Journal of Lipid Research*, 56, 254–265. doi:10.1194/jlr.M052464
- Tetreault, G. R., Bennett, C. J., Cheng, C., Servos, M. R., et McMaster, M. E. (2012). Reproductive and histopathological effects in wild fish inhabiting an effluent-dominated stream, Wascana Creek, SK, Canada. *Aquatic Toxicology*, 110–111, 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.01.004>
- Tocher, D. R., Bendiksen, E. A., Campbell, P. J., et Bell, J. G. (2008). The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, 280, 21–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.034>

- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11, 107–184. doi:10.1080/713610925
- Tongue, A. D. W., Reynolds, S. J., Fernie, K. J., et Harrad, S. (2019). Flame retardant concentrations and profiles in wild birds associated with landfill: A critical review. *Environmental Pollution*, 248, 646e658. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.103>
- Tran, N. H., Reinhard, M., et Gin, K. Y.-H. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water Research*, 133, 182e207. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.029>
- Varga, T., Czimmerer, Z., et Nagy, L. (2011). PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812, 1007–1022. <https://doi.org/10.1016/j.bbadi.2011.02.014>
- Ville de Montréal. (s.d.). *La station d'épuration Jean-R. Marcotte*. Récupéré de [http://ville.montreal.qc.ca/portal/page?\\_pageid=6497,54345571&\\_dad=portal&\\_schema=PORTAL](http://ville.montreal.qc.ca/portal/page?_pageid=6497,54345571&_dad=portal&_schema=PORTAL)
- Wang, Y., Li, X., Li, A., et Wang, T. (2007). Effect of Municipal Sewage Treatment Plant Effluent on Bioaccumulation of Polychlorinated Biphenyls and Polybrominated Diphenyl Ethers in the Recipient Water. *Environmental Science & Technology*, 41, 6026–6032. doi:10.1021/es070913u
- Wang-Sattler, R., Yu, Z., Herder, C., Messias, A. C., Floegel, A., He, Y., ... Illig, T. (2012). Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics. *Molecular Systems Biology*, 8, 615. doi:10.1038/msb.2012.43
- Wen, Q., Xie, X., Zhao, C., Ren, Q., Zhang, X., Wei, D., ... Du, Y. (2019). The brominated flame retardant PBDE 99 promotes adipogenesis via regulating mitotic clonal expansion and PPARY expression. *Science of the Total Environment*, 670, 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.201>

Zhao, Y., Chen, Y.-Q., Bonacci, T. M., Bredt, D. S., Li, S., Bensch, W. R., ... Cao, G. (2008). Identification and Characterization of a Major Liver Lysophosphatidylcholine Acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 8258–8265. doi: 10.1074/jbc.M710422200