

Institut National de la Recherche Scientifique - Centre Armand-Frappier

EFFET DES PESTICIDES D'ORIGINE AGRICOLE PROVENANT DE SOUS
BASSINS DE LA RIVIÈRE YAMASKA SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE ET LES
ANTIOXYDANTS DU OUAOUARON (LITHOBATES CATESBEIANUS)

Présenté par :

Sophie Dussault

Mémoire pour l'obtention du grade de maître en
sciences expérimentales de la santé (M.Sc)

Jury d'évaluation

Président du jury	Dr. Cathy Vaillancourt (INRS-IAF)
Examineur externe	Dr. Catherine Jumari (UQAM)
Examineur interne	Dr. Cathy Vaillancourt (INRS-IAF)
Directeur de recherche	Dr. Michel Fournier (INRS-IAF)
Co-Directeur de recherche	Dr. Monique Boily (UQAM)

RÉSUMÉ

Le sort planétaire des amphibiens s'avère des plus inquiétants depuis quelques années. Afin de mieux comprendre la situation, nous avons choisi d'étudier l'impact des agripesticides sur le système immunitaire, ainsi que les antioxydants de la peau du ouaouaron (*Lithobates catesbeianus*). En effet la pollution de l'eau pourrait affecter ces systèmes et favoriser une baisse de la résistance des amphibiens, les rendant plus vulnérables à diverses maladies, ce qui expliquerait en partie leur déclin. Le système immunitaire est composé de plusieurs cellules dont les macrophages et les lymphocytes, mais aussi de peptides retrouvés au niveau de la peau. Les cellules cutanées sont protégées par des antioxydants qui préviennent l'accumulation de radicaux libres. Parmi ces antioxydants, les rétinoïdes jouent un rôle important dans la régénération cellulaire. Les caroténoïdes et la vitamine E, pour leur part, vont entre autres capter les radicaux libres, ce qui est primordial pour la santé des amphibiens. Le but de cette étude est d'établir si le niveau de pollution agricole affecte ces différents systèmes. Pour débiter, l'échantillonnage de ouaouarons a été effectué dans 6 bassins versants de la rivière Yamaska. Dans un premier temps, À partir des cellules de la rate, les biomarqueurs immunitaires suivis ont été : la viabilité, la phagocytose et la flambée oxydative. Ensuite, l'analyse de la présence de 8 peptides dans la peau (ranatuerine 1, 2, 2Ca, 3, 5, 7 et 8) a été obtenue par HPLC-MS-MS et PCR temps réel. Dans un second temps, la concentration d'antioxydants présente dans la peau a été analysée par CLHP. Les résultats obtenus démontrent que l'ensemble des systèmes de défenses du ouaouaron semble affecté par la présence de polluants.

Sophie Dussault

Michel Fournier

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Michel Fournier pour son soutien et son aide tout au long de mon travail, ainsi que ma co-directrice Monique Boily qui fut d'une grande gentillesse et d'une immense générosité à mon égard. C'est en grande partie grâce à ces deux personnes que j'ai pu accomplir cette recherche.

Un remerciement particulier s'adresse à Pauline Brousseau qui a su me diriger et me soutenir dans mes nombreux doutes. Elle a été pour moi un guide sur qui je pouvais toujours compter durant ces deux années. Merci infiniment.

Merci à Marlène Fortier de m'avoir appris et aidée lors de mes manipulations. Un merci particulier à Émilie Farcy qui m'a dirigée et aidée à acquérir un sens critique face à mon travail. À toutes les collègues de mon laboratoire un gros merci, elles ont su, pour leur part, rendre cette période d'étude agréable, car les côtoyer fut un véritable plaisir et souvent une aide très appréciée.

Merci également à toutes les personnes qui ont participé de proche ou de loin à mon projet. Sans vous, ce travail n'aurait probablement pas pu être accompli. Un merci particulier à Éric Bonneil, pour ses analyses au HPLC-MS-MS et à Myriam, du laboratoire d'Alain Fournier, pour sa générosité lorsque je venais la rencontrer, accompagnée de milliers de questions.

Pour terminer, un énorme remerciement rempli d'amour aux membres de ma famille, Robert, mon conjoint et Marielle, ma mère qui m'ont soutenue dans les périodes les plus intenses où mon caractère s'est avéré quelquefois difficile. Un gros merci bien spécial à ma fille Coralie qui a su, malgré mes absences et mes impatiences, mettre du soleil dans ma vie durant ces deux années.

TABLE DES MATIÈRES

<u>RÉSUMÉ</u> -----	ii
<u>REMERCIEMENTS</u> -----	iii
<u>TABLE DES MATIÈRES</u> -----	iv
<u>Liste des figures et tableaux</u> -----	viii
<u>Liste des appendices</u> -----	xi
<u>ABBREVIATION</u> -----	xii

<u>INTRODUCTION</u> -----	1
---------------------------	---

CHAPITRE 1.

<u>ÉTENDUE DES CONNAISSANCES</u> -----	5
1. Mise en contexte -----	5
1.1. Le sort des amphibiens-----	5
1.2. Les changements climatiques-----	5
1.3. La destruction des habitats-----	5
1.4. L'augmentation des radiations UV-----	6
1.5. L'augmentation des différentes infections-----	7
1.5.1. <i>Le champignon</i> -----	7
1.5.2. <i>Les ranavirus</i> -----	8
1.5.3. <i>Les parasites</i> -----	9
1.6. L'augmentation de la pollution-----	9
1.6.1. <i>La problématique de la Rivière Yamaska</i> -----	10
1.6.2. <i>L'atrazine</i> -----	11
1.6.3. <i>Métolachlore</i> -----	13
2. Le système immunitaire -----	14
2.1. Spécificité de la grenouille et différences entre têtards et adultes-----	14
2.2. Différents systèmes impliqués-----	15
2.2.1. <i>Le système immunitaire inné</i> -----	15
2.2.2. <i>Le système immunitaire spécifique ou adaptatif</i> -----	16

2.2.3. <i>Les peptides</i> -----	16
3. <u>Les antioxydants</u> -----	17
3.1. Les caroténoïdes -----	18
3.2. Les rétinoïdes -----	18
3.2.1. <i>Absorption et transport des caroténoïdes et des rétinoïdes</i> -----	19
3.3. La vitamine E -----	21
3.3.1. <i>Absorption et transport</i> -----	22
<u>AVANT PROPOS</u> -----	23

CHAPITRE 2

EFFET DES PESTICIDES D'ORIGINE AGRICOLE SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE DU OUAOUARON (*LITHOBATES CATESBEIANUS*)-----

<u>Résumé</u> -----	24
1- <u>Introduction</u> -----	24
2. <u>Matériel et méthode</u> -----	27
2.1 Les sites étudiés et les ouaouarons -----	27
2.2. Le ouaouaron -----	27
2.3. Prélèvement des organes -----	28
2.3.1. <i>Rate</i> -----	28
2.3.2. <i>Peau</i> -----	28
2.4. Phagocytose -----	28
2.5 Flambée oxydative -----	28
2.6 Extraction des peptides -----	29
2.7. Analyse par spectroscopie de masse -----	30
2.8. Extraction de l'ARN et la transcription inverse -----	30
2.9. Analyse semi-quantitative des gènes d'ARNm spécifique -----	30
2.10. Statistiques -----	31
3. <u>Résultats</u> -----	31
3.1. Viabilité cellulaire -----	31
3.2. Phagocytose -----	32
3.3. Flambée oxydative -----	32

3.4. Peptides -----	32
3.5. Analyse de PCR en temps réel-----	33
3.6. Relation entre le pourcentage de peptides et d'ARNm présent-----	33
4. <u>Discussion</u> -----	33
4.1. Viabilité cellulaire -----	34
4.2. Phagocytose -----	34
4.3. Flambée oxydative -----	35
4.4 Peptide et ARNm -----	35
5. <u>Conclusion</u> -----	38
RÉFÉRENCES-----	47

CHAPITRE 3.

<u>LES ANTIOXYDANTS</u> -----	55
1. <u>Introduction</u> -----	55
2. <u>Matériel et méthode</u> -----	55
2.1. HPLC analyse -----	56
2.2. Statistiques analyses-----	57
3. <u>Résultats</u> -----	58
4. <u>Discussion</u> -----	62

CHAPITRE 4.

L'IMPACT D'UNE EXPOSITION *IN VITRO* DU XENOPUS (*XENOPUS LAEVIS*) À L'ATRAZINE ET LE MÉTOLACHLORE SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

-----	67
1. <u>Le xénopus</u> -----	67
2. <u>Matériel et méthode</u> -----	67
2.1. Condition des xénopes -----	67
2.2. Les produits chimiques -----	68
2.3. La rate-----	68
2.4. Viabilité-----	68
2.5. Phagocytose -----	68

2.6. Analyses statistiques	69
3. Résultats	70
3.1 Atrazine et métolachlore	71
3.2. Métolachlore	72
4. Discussion	73
<u>DISCUSSION GÉNÉRALE</u>	75
<u>CONCLUSION</u>	76
<u>RÉFÉRENCES</u>	77
<u>APPENDICES</u>	99

TABLEAUX ET FIGURES

CHAPITRE1

Figure 1

Balayage numérique du champignon *Batrachochytrium dendrobatidis* -----7

Figure 2

Cycle du développement du champignon *Batrachochytrium dendrobatidis* -----8

Figure 3

Carte indiquant un indice de la qualité de l'eau du bassin versant de la Yamaska --
----- 11

Figure 4

Structure des différents métabolites de l'atrazine ----- 12

Figure 5

Variation saisonnière des teneurs de l'eau en atrazine de 1996 à 2004 ----- 12

Figure 6

Absorption et transport des caroténoïdes et des rétinoïdes dans le système ----- 20

Figure 7

Métabolisation de l'acide rétinoïque dans la cellule ----- 20

Figure 8

Absorption et transport de la vitamine E dans le système----- 22

TABLEAU

Tableau I

Ensemble des peptides retrouvés sur la peau du ouaouaron ainsi que les séquences
d'acides aminés s'y rattachant ----- 17

CHAPITRE 2

Figure 1

Carte de la Rivière Yamaska, Québec, Canada----- 40

Figure 2

La viabilité des splénocytes pour l'année 2008 et 2009----- 41

Figure 3

Activité phagocytaire des macrophages ----- 42

Figure 4

Production de ROS (flambée oxydative) par les macrophages ----- 43

Figure 5

Présence de peptides antimicrobiens sur la peau des ouaouarons ----- 44

TABLEAU

Tableau I

L'ensemble des peptides recherchés avec leur numéro de gène, la séquence des amorces sens et anti-sens ainsi que les séquences d'acides aminés correspondant ----- 45

Tableau II

Ensemble des peptides retrouvés sur la peau du ouaouaron----- 45

Tableau III

Quantification relative de l'ARNm par PCR en temps réel----- 46

Tableau IV

Relation entre le pourcentage de peptides et d'ARNm présents ----- 46

CHAPITRE 3

Figure 1

La concentration de rétinol et de β -cryptoxanthine ----- 58

Figure 2

La concentration de carotènes ----- 59

Figure 3

La concentration de canthaxanthine----- 60

Figure 4

La concentration de vitamine E----- 61

CHAPITRE 4

Figure 1

La viabilité des macrophages exposés à l'atrazine et au métolachlore----- 70

Figure 2

L'activité phagocytaire des macrophages exposés à l'atrazine et au métolachlore---
----- 71

Figure 3

La viabilité des macrophages exposés au métolachlore ----- 72

Figure 4

L'activité phagocytaire des macrophages exposés au métolachlore ----- 73

LISTE DES APPENDICES

APPENDICE 1

CARTES DES SOUS BASSIN VERSANT DE LA RIVIÈRE YAMASKA ET LES
DIFFÉRENTS SITES ÉCHANTILLONNÉS AINSI QUE LEURS
COORDONNÉES ----- 99

APPENDICE 2

CONCENTRATION ($\mu\text{g/L}$) DES ARYLOXYACIDES ET DES
ORGANOPHOSPHORÉS DANS LES SITES ÉCHANTILLONNÉS LE 7 JUILLET
2008 (ANALYSE EFFECTUÉE PAR LE MDDEP)----- 100

APPENDICE 3

CELLULARITÉ DE LA RATE DU OUAOUARON POUR L'ANNÉE 2008---- 101

APPENDICE 4

MISE AU POINT EFFECTUÉE POUR LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS-----
----- 102

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ARAT:	Acyl CoA retinol acyltransférase
atRA:	Tout- <i>trans</i> acide rétinoïque
CAT :	Catalase
CM :	Chylomicrons
CRABP :	Cellular acid rétinoïc- binding protein
CRBP :	Cellular rétinol-binding protein
EROD :	Éthoxyresorufin- <i>O</i> -deethylase
LRAT :	Lécithine retinol acyltransférase
HER :	Hydrolase des esters de rétinol
MDDEP :	Ministère du Développement Durable et des Parcs
OCs :	Organochlorés
OPs :	Organophosphates
RA :	Rétinoïque acide
RALDH :	Rétinal déshydrogénase
RAR :	Rétinoïde
RARE :	Éléments réponse rétinoïde acide récepteur
RBP :	Rétinol binding protein
ROL :	Rétinol
ROLDH :	Rétinol déshydrogénase
ROS :	Espèce réactive d'oxygène
RXR :	Rétinoïde X récepteur
RXRE :	Éléments réponse rétinoïde X récepteur
SOD :	superoxyde dismutase
TTR :	Transthyrétine
4-OH RA :	4-hydroxylase rétinoïque acide
4-oxo RA :	4-oxo rétinoïque acide

INTRODUCTION

Depuis quelques décennies, la diminution et même l'extinction de plusieurs espèces d'amphibiens ont été remarquées (Houlahan *et al.* 2000). Ce déclin est constaté sur tous les continents. Notamment, au Québec, la population de trois espèces d'amphibiens (rainette faux-grillons de l'ouest (*Pseudacris triseriata*), Salamandre pourpre (*Gyrinophilus porphyriticus*) et la Salamandre sombre des montagnes (*Desmognathus ochrophaeus*)) est considérée comme vulnérable ou menacée. (MRNF, 2010, <http://www3.mrnf.gouv.qc.ca>). Plusieurs facteurs sont pointés du doigt dont : l'augmentation des radiations UV (Blaustein *et al.* 1994, 1997; Kiesecker et Blaustein 1995; Kiesecker *et al.* 2001; Middleton *et al.* 2001), la destruction des habitats (Hecnar et M'Closkey 1996; Davidson *et al.* 2002; Becker *et al.* 2007), l'introduction de nouvelles espèces (Bradford *et al.* 1993; Lawler *et al.* 1999; Knapp *et al.* 2007), les changements climatiques (Carey et Alexander 2003; Araujo *et al.* 2006; Pound *et al.* 2006), l'augmentation de la pollution (Sparling *et al.* 2001; Blaustein *et al.* 2003; Smith *et al.* 2005) et l'augmentation des infections (Berger *et al.* 1998; Daszak *et al.* 1999). Ce sont ces deux derniers points qui captent particulièrement mon attention.

L'activité humaine engendre une augmentation de la pollution. L'agriculture fait partie de ces activités polluantes. En effet, un grand nombre de produits toxiques sont utilisés, tels que les insecticides, les fongicides et les engrais. Au Québec, la rivière de la Yamaska fait l'objet d'une grande inquiétude, car elle est l'une des plus polluées au Canada. Cette pollution est causée par une forte intensité d'activités agricoles (maïs et soya en majorité) qui bordent les rivières et ses bassins versants qui deviennent le milieu récepteur des pesticides (Berryman, 2008). Des analyses régulières d'échantillons d'eau provenant de la rivière Yamaska, effectuées par le Ministère du Développement Durable et des Parcs (MDDEP), nous permettent de bien saisir l'importance de cette pollution. Parmi ces pesticides, quelques-uns s'avèrent plus inquiétants que d'autres. L'atrazine et le métolachlore, pour ne nommer qu'eux, peuvent avoir des effets particulièrement nuisibles pour les organismes aquatiques, incluant les amphibiens (Cooper *et al.* 2000; Sparling *et*

al. 2001; Christin *et al.* 2004; Brodtkin *et al.* 2007; Grigg et Belden 2008; Marcogliese *et al.* 2009).

Depuis quelques années, une augmentation des infections chez les amphibiens a été dénotée, notamment chez la grenouille. Ces infections comprennent, entre autres, les ranavirus, les parasites et les champignons (Miller *et al.* 2007; Cunningham *et al.* 2008). Les ranavirus sont des virus qui s'attaquent aux grenouilles de type *Rana*. Un des virus particulièrement présent, faisant partie de la famille des *Iridoviridae*, est le Frog Virus 3 (FV3) (Hyatt *et al.* 2000). Le FV3 génère des problèmes de santé très graves allant jusqu'à causer la mort (Cunningham *et al.* 1996; Daszak *et al.* 2003). La grenouille est aussi infectée par un parasite, plus particulièrement un trématode, le *Ribeiroia ondatrae*. Ce dernier possède un cycle de vie qui implique comme hôtes divers animaux, dont la grenouille (Ankley *et al.* 2004). Ce trématode semble être un facteur important dans les cas de malformations (Johnson et Sutherland 2003). Enfin, un champignon, le *Batrachochytrium dendrobatidis*, est présent normalement dans les cours d'eau et sur la peau des grenouilles (Berger *et al.* 1999). Cependant, lorsque la résistance immunitaire diminue, il en profite pour infecter la kératine de la peau et ce, souvent de façon mortelle (Rollins-Smith *et al.* 2009).

Toutes ces infections ont un lien direct avec la diminution de la résistance. Cette résistance est associée au système immunitaire ayant comme fonction première de maîtriser les agents pathogènes et infectieux, afin de préserver la santé et la survie de l'animal. Dans le cas des grenouilles, le système immunitaire comprend les cellules du système immunitaire inné (macrophages et neutrophiles) et les cellules du système immunitaire adaptatif (lymphocytes B et T) (Kobel et Tinsley 1996). De plus, une grande particularité des grenouilles est la production de peptides antimicrobiens au niveau de la peau (Carey *et al.* 1999). Ces peptides présentent des propriétés antiseptiques et antifongiques (Conlon *et al.* 1999, 2009; Rollins-Smith *et al.* 2003, 2005a).

Un autre facteur important dans le maintien de la santé des grenouilles, est la présence d'antioxydants. En effet, ceux-ci protègent les cellules contre les radicaux libres qui pourraient les endommager (Di Mascio *et al.* 1991). Il y a un grand nombre de

molécules qui sont considérées comme antioxydantes. Cependant, je m'attarderai en particulier sur les caroténoïdes et les vitamines A et E, car ils sont particulièrement importants pour la peau. Les caroténoïdes sont, pour la plupart, des pro-vitamines A, ce qui signifie qu'ils sont transformés en vitamine A une fois ingérés (Chew et Park 2004). La vitamine A, particulièrement sous forme d'acide rétinoïque, joue plusieurs rôles au niveau cellulaire (Ross *et al.* 2000; Manicassamy et Pulendran 2009). Cette vitamine ne peut être synthétisée *de novo*, elle doit donc être absorbée par le biais de l'alimentation (Boily *et al.* 2004). La vitamine E, pour sa part, est un antioxydant très puissant par sa grande capacité à capter les radicaux libres (Burton, 1994; Singh *et al.* 2008).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux amphibiens, plus particulièrement au ouaouaron (*Lithobates catesbeianus* anciennement *Rana catesbeiana*), car il est une excellente espèce sentinelle : son état de santé fournit une indication pertinente de la qualité de son environnement. Notre projet fait partie d'une vaste étude dans laquelle plusieurs équipes de chercheurs sont impliquées. Il s'agit du «Projet ouaouaron de la Yamaska». Le ouaouaron a été choisi pour plusieurs raisons spécifiques. D'une part, cette espèce n'est pas en danger. Ce facteur s'avère important lorsqu'on veut faire de l'échantillonnage, car il est primordial de s'assurer que l'espèce ne soit pas mise en péril à la suite de la capture. D'autre part, les représentants de cette espèce d'amphibiens sont les plus gros en Amérique du Nord. Dans le cadre d'une vaste étude qui comprend plusieurs chercheurs, cette particularité permet de prélever une bonne quantité de tissus pour les différents tests, ce qui pourrait être l'imitant avec des grenouilles de taille plus petite.

Tous ces éléments nous ont amenés à envisager un lien possible entre le niveau de pollution agricole et le système immunitaire du ouaouaron. Christin *et al.* (2003), ont remarqué que le système immunitaire de grenouilles exposées à un mélange de pesticides a été altéré, notamment au niveau de la phagocytose. Dans ce contexte, une de mes hypothèses de recherche propose que les cellules immunitaires des ouaouarons provenant des sites plus pollués ne réagiront pas d'une manière optimale, ce qui peut empêcher ces grenouilles d'avoir une bonne défense contre les agents infectieux. En ce qui concerne les peptides de la peau, aucune étude n'a encore été effectuée sur les effets possibles des

polluants sur leurs productions ou leurs fonctions. Cependant, l'augmentation des infections cutanées causées par le *Batrachochytrium dendrobatidis* laisse supposer une diminution de la capacité de résistance de la peau des amphibiens. C'est pourquoi je propose que de la production des peptides antimicrobiens sera diminuée chez les ouaouarons provenant des milieux les plus pollués.

En ce qui concerne les rétinoïdes, il a été démontré que la pollution d'origine agricole affectait les concentrations de rétinol dans le foie et dans le plasma (Bérubé *et al.* 2005; Boily *et al.* 2005). Cette diminution dans le plasma laisse à penser une possible interaction avec les protéines de transport, ce qui laisse supposer que la concentration de rétinol au niveau de la peau pourrait être affectée. Pour les autres antioxydants comme les caroténoïdes et la vitamine E, il n'y a pas d'étude effectuée sur l'effet des pesticides sur ces derniers. Toutefois, un grand nombre de chercheurs ont démontré que les antioxydants jouaient un rôle important contre les effets oxydatifs des pesticides. Suite à cela, je suggère que la présence de pesticide va provoquer une augmentation de la concentration des différents antioxydants au niveau de la peau pour les grenouilles vivant dans un milieu à plus forte concentrations de polluants.

Le mémoire comprend cinq chapitres. Le premier rapporte la revue de la littérature, le second est un article (titre : Effet des pesticides d'origine agricole sur le système de défense immunitaire du ouaouaron (*Lithobates catesbeianus*) et le troisième traite des différents antioxydants. Dans les deux derniers chapitres, je décrirai une expérience menée avec des *Xenopus laevis in vitro* suivie d'une conclusion générale.

CHAPITRE 1

ÉTENDUE DES CONNAISSANCES

1- Mise en contexte

1.1 Le sort des amphibiens

Le sort des amphibiens est précaire, et ce, partout sur la planète. Plusieurs raisons sont amenées pour expliquer cette diminution, nous pouvons citer entre autre: les changements climatiques, la destruction des habitats, l'augmentation des radiations UV, l'augmentation de la pollution et l'augmentation des infections. L'interaction de ces différents facteurs peut sans doute être extrêmement nuisible à la survie des amphibiens.

1.2 Les changements climatiques

Les effets des changements climatiques demeurent difficiles à déterminer, car chaque région en est affectée différemment. Dans certaines régions, une diminution des précipitations et une augmentation de la température ont été remarquées. Ces bouleversements atmosphériques limitent la disponibilité de l'eau et engendrent des stress hydriques, ce qui contribue à augmenter les risques d'infections (Pounds et Crump 1994). Ces diverses perturbations peuvent jouer un rôle dans le déclin, voire même l'extinction locale de populations de grenouilles (Pounds et Crump 1994; Pounds *et al.* 1999; Araujo *et al.* 2006). De plus, un faible changement du niveau de l'eau peut affecter la ponte des œufs et la survie des larves des amphibiens lors de la saison de reproduction, ce qui provoque à long terme une diminution importante de la population (Carey et Alexander 2003; Araujo *et al.* 2006).

1.3 La destruction des habitats

Il est reconnu que la destruction des milieux humides contribue au déclin des amphibiens (Semlitsch, 2002; Collins et Storfer 2003). Les marais font partie du cycle de

vie et de lieux privilégiés de reproduction de certains batraciens (Wilbur, 1980). Dans la plupart des villes, les marais sont détruits pour l'implantation d'habitations ou d'autres constructions. Cette urbanisation, en plus de détruire leur habitat, peut engendrer une diminution de la qualité de l'eau (Delis *et al.* 1996).

Le remblai des zones humides engendre également des fragmentations de territoire qui perturbent la vie des grenouilles, nuisant ainsi aux espèces vivant en forêt qui doivent se déplacer vers les cours d'eau pour s'y reproduire (Cushman, 2006; Becker *et al.* 2007). Plusieurs fragmentations sont dues à l'implantation de routes. Dans une étude de Eigenbrod *et al.* (2008), il y aurait une corrélation entre le niveau de trafic routier et la diminution de la richesse des populations. De plus, l'augmentation du trafic peut affecter la distribution d'espèces d'amphibiens (Vos et Chardon 1998; Carr et Fahrig 2001). Cet effet peut sembler banal; cependant, cette modification peut engendrer des isolations et même des extinctions de métapopulations (Sjögren, 1991).

1.4 L'augmentation des radiations UV

Les rayons UV comprennent les UV-A, UV-B et les UV-C. Ces rayons sont essentiels à la vie mais, en trop grande quantité, ils peuvent causer des problèmes de santé. La majorité des rayons sont absorbés par la couche d'ozone située dans la stratosphère (Ricklefs et Miller 2005). De ces trois rayons, les UV-C semblent être les plus nocifs, bien que les UV-B démontraient des effets très dangereux; ils peuvent causer la mort cellulaire, des mutations, une diminution de la croissance, affecter le système immunitaire et causer d'autres dommages mortels (Blaustein *et al.* 1994, 1997; Kiesecker *et al.* 2001; Blaustein et Belden 2003). Pour un grand nombre d'amphibiens, il a été remarqué que l'éclosion des œufs est affectée par les rayons UV-B (Blaustein et Belden 2003). De plus, Hayes *et al.* (1996), ont remarqué chez la rainette du Pacifique (*Hyla regilla*), la grenouille cascade (*Rana cascadea*) et le crapaud de l'Ouest (*Bufo boreas*) une augmentation de malformations lorsqu'ils sont exposés à des radiations UV-A et UV-B.

1.5 L'augmentation des différentes infections

L'ensemble des organismes vivants est infecté régulièrement par divers pathogènes. Chez la grenouille, trois types infections se démarquent des autres, car elles sont impliquées dans un grand nombre de mortalités : le champignon *Batrachochytrium dendrobatidis*, le Frog virus 3 (FV3) du type *Ranavirus* et un trématode le *Ribeiroia ondatrae* (Cunningham *et al.* 1996; Berger *et al.* 1999; Johnson *et al.* 1999).

1.5.1 Le champignon

Le *Batrachochytrium dendrobatidis* est un champignon qui infecte la peau et cause un haut taux de mortalité chez les amphibiens (Berger *et al.* 1998; Daszak *et al.* 1999; Rachowicz *et al.* 2006). Chez la grenouille des montagnes à pattes jaunes (*Rana muscosa*), ce champignon peut infecter le têtard et l'adulte (Berger *et al.* 1998; Rachowick et Vredenburg 2004). Cependant, il semble que le champignon ne soit pas mortel pour les têtards. En effet, bien qu'ils puissent être infectés, ceux-ci n'en meurent pas (Daszak *et al.* 2004; Rachowicz *et al.* 2006). Les symptômes d'un animal infecté sont : l'anorexie, la léthargie, les ulcères, la décoloration de la peau ainsi que la mue excessive de la peau (Berger *et al.* 1999).

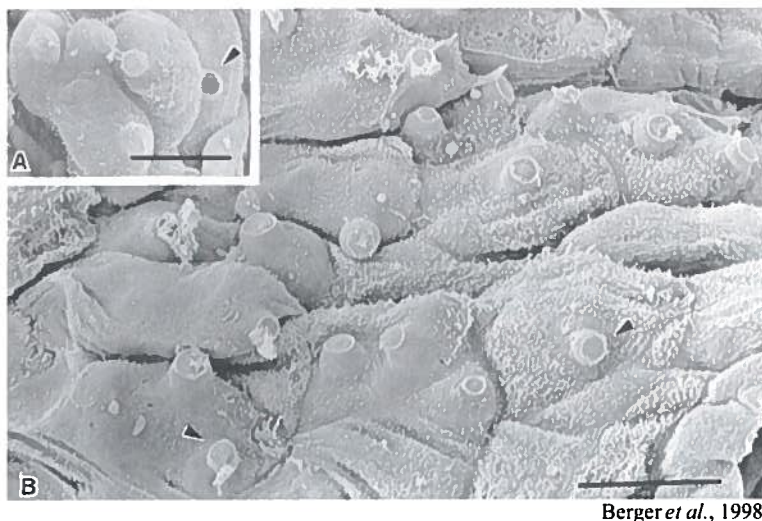


Figure 1 : Balayage numérique par microscopie électronique de la peau d'une grenouille sauvage (*Litoria lesueuri*), morte et infectée par le champignon *Batrachochytrium dendrobatidis*. A) Groupe de sporanges matures dans les cellules de l'épiderme. Les tubes à décharge des sporanges sont visibles vers l'extérieur à la surface de la cellule (indiqué par la flèche). B) La plupart des cellules contiennent des sporanges avec des tubes à décharges non ouverts. (Les barres = 10 μ m et les flèches pointent les sporanges)

Lors de l'infection, le champignon pénètre dans la kératine pour s'y installer et se reproduire (voir Figure 1). Les spores vont ensuite s'enkyster dans l'épiderme grâce aux zoosporanges. Lorsqu'ils atteignent la maturité, ceux-ci traversent la peau et permettent aux zoospores de sortir et d'infecter une autre partie de la peau ou un nouvel hôte (Berger *et al.* 1999) (Voir Figure 2). C'est grâce aux zoospores que le champignon peut se disperser. Une fois les zoospores libérées, elles ne peuvent pas se déplacer sur une longue distance. Cependant, elles possèdent une forte habilité à s'enkyster et ainsi, à infecter (Piotrowski *et al.* 2004). Puisque ce champignon demeure au niveau des cellules de l'épiderme, les cellules lymphocytaires ne sont pas mises à contribution (Pessier *et al.* 1999). C'est la raison pour laquelle les peptides jouent un rôle primordial pour contrer cette infection (Rollins-Smith *et al.* 2002a, 2003).

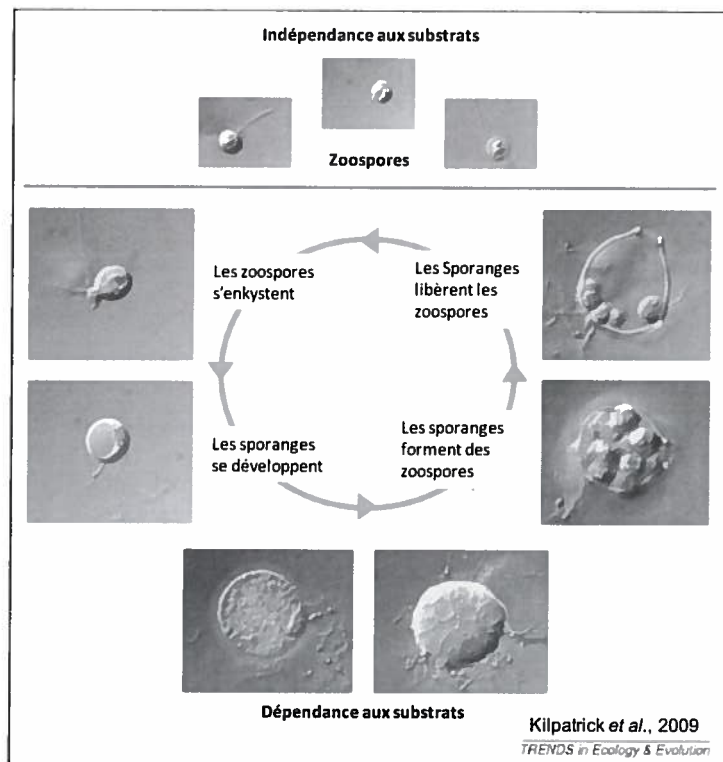


Figure 2 : Cycle du développement du champignon *Batrachochytrium dendrobatidis*.

1.5.2 Les ranavirus

Le ranavirus provoque une infection qui s'attaque aux vertébrés ectodermes et semble être un facteur à considérer dans le déclin des amphibiens (Cunningham *et al.*

1996). Les principaux symptômes sont des ulcères, des hémorragies du système digestif et des muscles squelettiques, des lésions de la peau, un affaiblissement des reins, des malformations oculaires et des nécroses des reins, de la rate et du foie (Cunningham *et al.* 1996, 2008; Daszak *et al.* 1999; Robert *et al.* 2005; Miller *et al.* 2007; Burton *et al.* 2008). Les modes de transmission se fait par la présence du virus dans l'eau, le cannibalisme ou encore par contact direct avec des individus malades (Pearman *et al.* 2004; Harp et Petranka 2006).

1.5.3 Les parasites

L'un des parasites les plus répandus chez les amphibiens est un trématode *Ribeiroia ondatrae*. Son cycle de vie implique trois hôtes: 1) un escargot, 2) un poisson ou une grenouille et 3) un oiseau ou un mammifère (Johnson et Sutherland 2003; Ankley *et al.* 2004; Baker *et al.* 2004). Il est reconnu pour causer des malformations et de la mortalité (Johnson *et al.* 1999, 2002; Stopper *et al.* 2002). Ce parasite a des effets néfastes en fonction du stade de développement de la grenouille. En effet, Schotthoefer *et al.* (2003) ont démontré que le taux de mortalité était très élevé chez les têtards avant l'apparition des membres. De plus, si la contamination se faisait lors de l'apparition des bourgeons des membres, le risque de malformation augmentait de façon significative. Ces mêmes chercheurs ont aussi démontré que chez l'adulte, l'infection s'avérait sans conséquence nocive. Plusieurs facteurs favorisent l'infection, comme l'eutrophisation des cours d'eau ainsi que la présence de contaminants (Baker *et al.* 2004).

1.6 L'augmentation de la pollution

Bien que l'humain ait toujours eu un impact sur son environnement, l'industrialisation et la mondialisation ont augmenté l'utilisation de produits chimiques. Depuis quelques années, les réglementations sont plus sévères, mais une dépendance des agriculteurs face à ces produits incite leur utilisation, bien qu'ils puissent s'avérer souvent nuisibles. Les pesticides en sont un bon exemple. En effet, bien que leurs effets néfastes sur la santé de certains organismes aient été démontrés, leur utilisation est maintenant indispensable à la monoculture, de plus en plus favorisée.

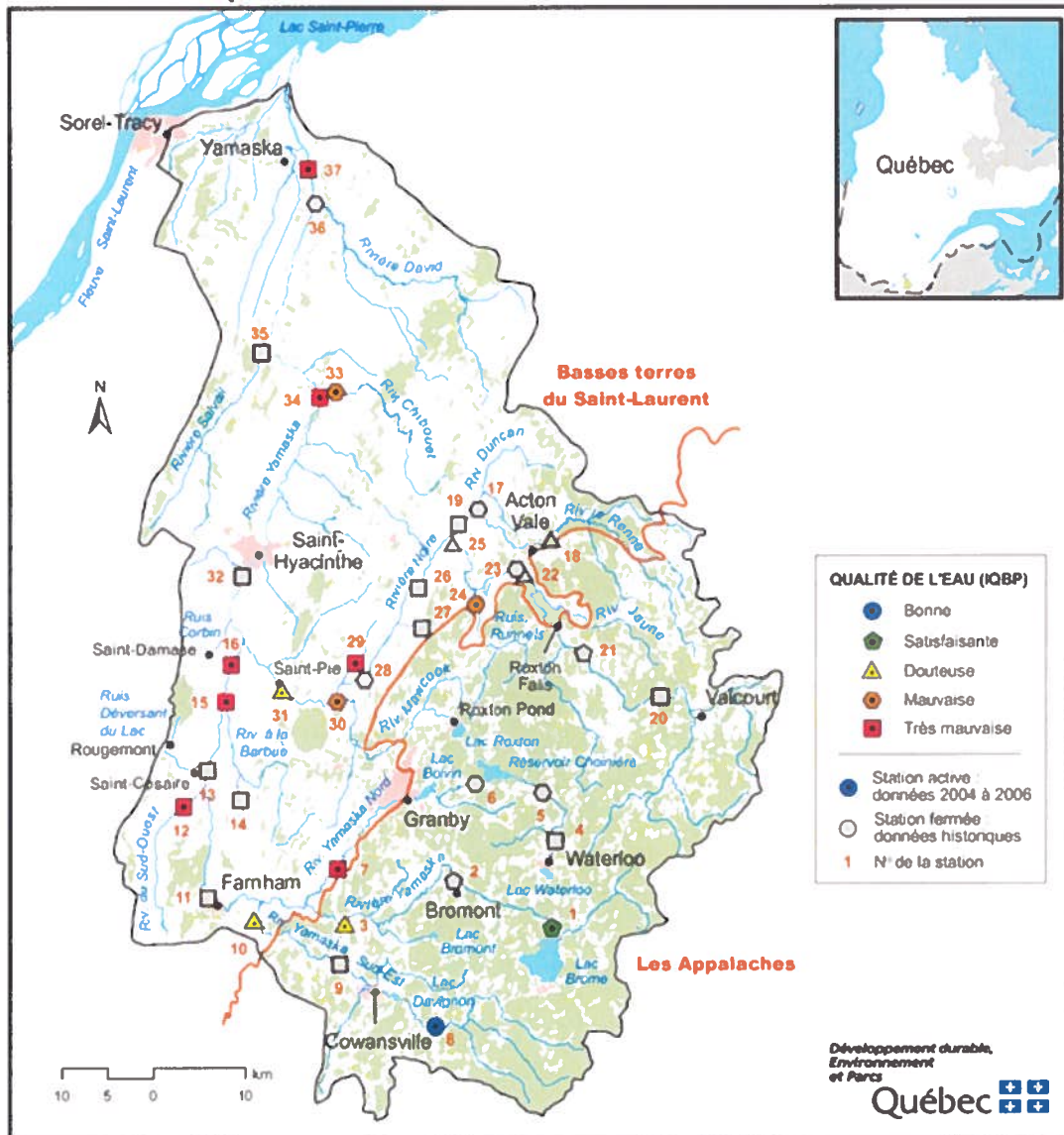
Les sources de pollution sont nombreuses, mais je m'attarderai particulièrement aux agripesticides. Ces pesticides sont utilisés pour l'agriculture et, à la suite de leur épandage, ils se retrouvent dans les eaux environnantes par érosion, percolation et ruissellement. Celles-ci sont les milieux de vie de nombreuses espèces d'êtres vivants, telles les grenouilles. Le fait qu'elles possèdent deux phases de développement et qu'elles aient la capacité d'absorber diverses substances par la peau les grenouilles sont particulièrement sensibles à ces produits (Sparling *et al.* 2000).

Plusieurs études sont effectuées sur l'effet d'un pesticide ou d'un mélange de quelques pesticides. Cependant, dans la nature, le nombre de produits chimiques différents répertoriés est beaucoup plus élevé. En effet, dans les campagnes provinciales d'échantillonnage du MDDEP, 23 à 29 pesticides sont fréquemment détectés (Giroux, 2010). Il est pratiquement impossible de déterminer les effets nocifs d'un tel mélange de produits chimiques sur les organismes aquatiques. En effet, la variation quasi constante des mélanges et des concentrations retrouvées dans l'environnement ne peut être testées en laboratoire.

1.6.1 *La problématique de la Rivière Yamaska*

La Yamaska est la rivière la plus polluée au Québec (<http://www.obv-yamaska.qc.ca>). Cette pollution provient en majorité des terres agricoles qui occupent près de la moitié du bassin versant de la Yamaska (Berryman, 2008). Les cultures sont majoritairement le maïs et le soja, mais on retrouve aussi plusieurs fermes d'élevage de porcs et de bovins (Berryman, 2008). La qualité de l'eau évaluée à partir de l'indice IQPB (indice de qualité bactériologique et physico-chimique de l'eau) des différents emplacements des bassins versants de la rivière Yamaska est représentée dans la figure 3.

LA QUALITÉ DE L'EAU DU BASSIN VERSANT DE LA RIVIÈRE YAMASKA



© Gouvernement du Québec, 2008

Figure 3 : Indice de la qualité de l'eau du bassin versant de la Yamaska. Les paramètres de qualité sont : coliformes fécaux, phosphore total, azote ammoniacal, nitrites et nitrates, matières en suspension, turbidité et chlorophylle *a* totale. Le tout est combiné pour calculer l'Indice de qualité bactériologique et physico-chimique de l'eau (IQBP). La carte de l'indice IQBP du bassin de la rivière Yamaska montre que l'eau de ce bassin est généralement de mauvaise qualité (Berryman, 2008).

1.6.2 L'atrazine

L'atrazine (2-chloro-4-(éthylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine) est un herbicide couramment utilisé pour différentes cultures, comme le maïs (Solomon *et al.* 1996). On la retrouve régulièrement dans les échantillons d'eau prélevés au Québec (Rondeau, 2005). Son cycle de vie dépend des microorganismes et du pH de

l'environnement. Dans le sol, l'atrazine est dégradée par des microorganismes (Behki et Khan 1986). Sa demi-vie dans le sol est en moyenne de 159 jours (Giddings *et al.* 2005) et celle dans le milieu aquatique n'est pas encore connue (Solomon *et al.* 2008). Cependant, quelques métabolites sont détectés dans l'eau de la Yamaska (voir figure 4-5). Le MDDEP a établi à 0,005 ml/L la concentration maximale acceptable pour l'eau potable d'atrazine pour les critères de la qualité de l'eau de surface au Québec (<http://www.mddep.gouv.qc.ca>)

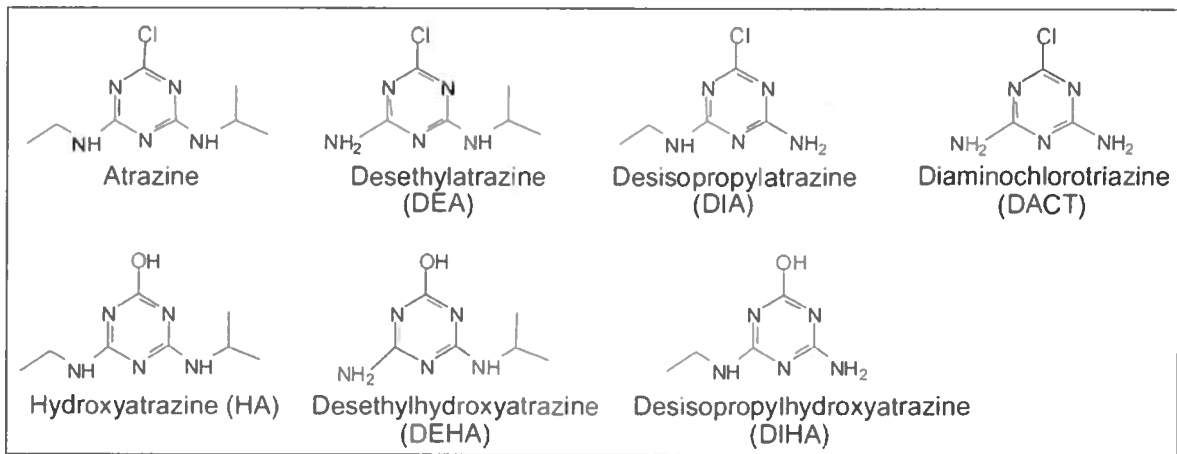


Figure 4 : Structure des différents métabolites de l'atrazine (Solomon *et al.* 2008)

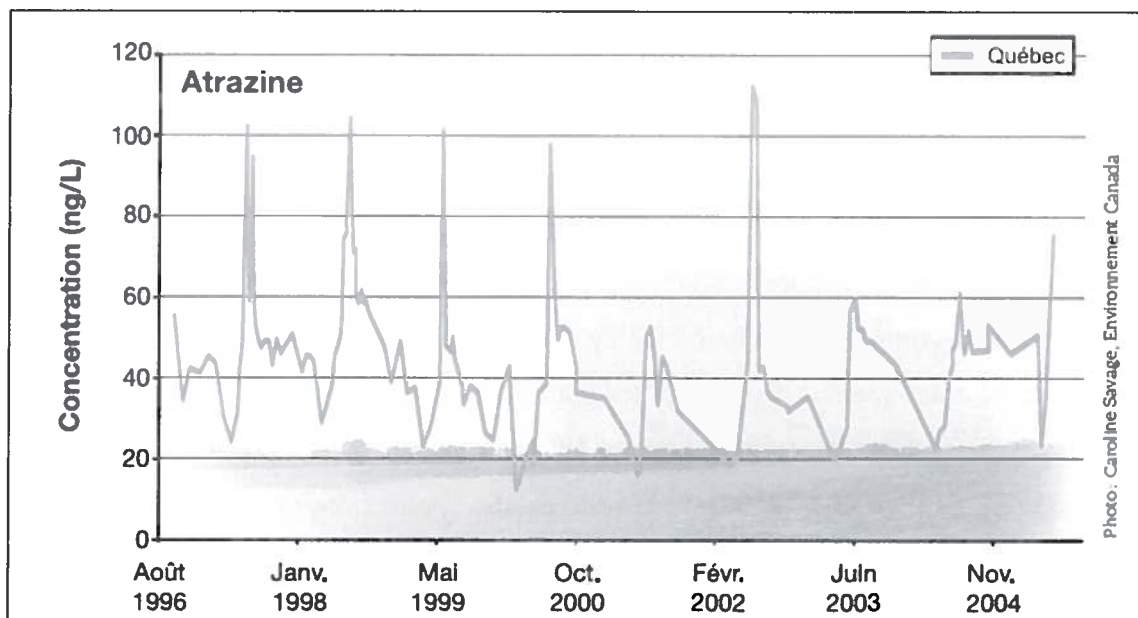


Figure 5 : Variation saisonnière des teneurs de l'eau en atrazine de 1996 à 2004 dans la région de Québec (Rondeau, 2005).

Plusieurs études ont démontré les effets néfastes de l'atrazine sur la santé des amphibiens. En effet, chez les têtards, il a été dénoté une augmentation du nombre de malformations (Allran et Karasov 2001), des perturbations dans l'organogénèse, ainsi qu'une diminution du poids et de la taille lors de la métamorphose (Diana *et al.* 2000; Lenkowski *et al.* 2008). L'atrazine a également des effets au niveau du système reproducteur des têtards tels que, de l'hermaphrodisme, des anomalies des gonades (Hayes *et al.* 2002, 2003) et une diminution du volume des testicules et du nombre de cellules spermatogoniales (Tavera-Mendoza *et al.* 2002). Pour les adultes, on remarque que l'atrazine augmente la vitesse de respiration (ventilation), car elle diminue la concentration en oxygène sanguin en altérant les composants qui transportent l'oxygène du sang (Allran et Karasov 2001).

Les études de Goulet et Hontela (2003) ont démontré une diminution de la viabilité et de la sécrétion de corticostérone chez *Lithobates catesbeianus* en présence d'atrazine. De plus, une diminution du taux de testostérone a été remarquée chez *Xenopus laevis* (Hecker *et al.* 2005). L'un des systèmes les plus affectés par l'atrazine est le système immunitaire. Plusieurs études démontrent que la présence d'atrazine affecte le nombre de cellules retrouvées dans la rate, l'activité phagocytaire, la prolifération des lymphocytes et l'augmentation des risques d'infection (Christin *et al.* 2002, 2004; Gilbertson *et al.* 2003; Forson et Storfer 2006; Brodtkin *et al.* 2007; Marcogliese *et al.* 2009).

1.6.3 Métolachlore

Le métolachlore (2-chloro-*N*-(2-éthyl-6-méthylphényl)-*N*-(2-méthoxy-1-méthyléthyl)-acétamine) est un herbicide également très présent dans les cours d'eau du Québec. Il est notamment utilisé contre les graminées dans les champs de maïs et de soja (Chester *et al.* 1989). Il est absorbé par les racines et agit comme inhibiteur de la photosynthèse (Brown *et al.* 2007). À la suite de son application, on retrouve deux sous-produits : le métolachlore acide oxalique (OA) et le métolachlore acide sulfonique éthane (ESA) (Brown *et al.* 2007). La dose, considérée comme non toxique pour les organismes aquatiques, est de 15 µg/L (Giroux, 2002). Toutefois, les recommandations du MDDEP

pour la qualité des eaux de surface potable au Québec ont été établies à 0,05 ml/L (<http://www.mddep.gouv.qc.ca>). Il arrive fréquemment que les concentrations retrouvées dans certains cours d'eau dépassent de 0,6% ces normes (Giroux, 2004).

Bien que le métolachlore soit fréquemment utilisé comme herbicide, peu de recherches ont été réalisées sur ses effets potentiellement nocifs. Lors d'études toxicologiques, il est généralement jumelé à l'atrazine. Cependant, des travaux sur l'écrevisse ont démontré que le métolachlore affectait les mécanismes sensoriels et neuronaux en diminuant l'agressivité et le comportement dominant chez les mâles (Cook et Moore 2008). D'autres études ont également rapporté une diminution de la survie, de la croissance et de la reproduction chez la grenouille à pattes rouges (*Rana aurora*) (Brown *et al.* 2007).

2- Le système immunitaire

En ce qui concerne cette section, nous devons nous référer en grande partie au système immunitaire du xénope (*Xenopus laevis*), cette espèce étant considérée comme modèle pour l'ensemble des grenouilles. Nous nous baserons donc sur l'hypothèse que le développement du système immunitaire des autres espèces de grenouilles devrait être semblable à celui du xénope.

2.1 Spécificités de la grenouille et différences entre têtards et adultes

Pour les grenouilles adultes, le système immunitaire est très semblable à celui des mammifères. Cependant, celui des têtards s'avère différent à bien des égards.

Le système immunitaire apparaît très tôt dans le développement embryonnaire des xénopes. Contrairement aux mammifères, la moelle osseuse des têtards n'a pas de fonction lymphopoïétique, car les principaux organes qui produisent et stockent les cellules immunitaires sont le foie, la rate et le thymus (Hadji-Azimi *et al.* 1990). Durant la première semaine, le foie et le thymus sont colonisés par des cellules précurseurs lymphopoïétiques (Du Pasquier *et al.* 2000). Chez le têtard, les lymphocytes B se retrouvent dans le foie et la rate, alors que les lymphocytes T se situent principalement au

niveau du thymus (Manning et Horton 1969; Hadji-Azimi *et al.* 1982, 1990; Hansen et Zapata, 1998). Lors de la métamorphose, une diminution importante du nombre de cellules immunitaires produites a été remarquée. Cette période de vulnérabilité s'avère donc une phase critique à cause des risques accrus de maladies (Rollins-Smith, 1998). En effet, des travaux démontrent que la quantité de lymphocytes diminue au début de la métamorphose et augmente légèrement jusqu'à sa maturité (Du Pasquier et Weiss, 1973; Rollin-Smith *et al.* 1984; Hadli-Azimi *et al.* 1990).

Les types d'immunoglobulines (Ig) des grenouilles diffèrent sensiblement de ceux des mammifères. On retrouve les : IgY, IgM, IgG et les IgX (Hsu *et al.* 1985; Du Pasquier *et al.* 2000). Les IgX sont présentes dans le foie chez le têtard tandis que chez l'adulte, elles se situent au niveau des intestins, ce qui lui confère les mêmes propriétés que les IgA des mammifères (Du Pasquier *et al.* 2000). Les IgA forment une barrière contre les pathogènes absorbés par les intestins (Janeway *et al.* 2003).

Une des différences notables entre le têtard et l'adulte se trouve au niveau des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH). En effet, les antigènes de classe I (CMH I), situés à la surface des lymphocytes B et des macrophages, n'apparaissent que chez l'adulte, tandis que ceux de classe II (CMH II) sont présents dans les deux phases de vie (Flajnik *et al.* 1986; Du Pasquier et Flajnik, 1990; Rollins-Smith et Blair, 1990).

2.2 Différents systèmes impliqués

2.2.1 *Le système immunitaire inné*

Le système immunitaire inné a comme caractéristique de répondre rapidement lors d'une infection et ce, de façon non spécifique (Carey *et al.* 1999). Cette première réponse permet de réagir diligemment et de contrôler le mieux possible une infection en attendant la réponse spécifique qui peut prendre plusieurs jours avant de s'installer. Pour *Xenopus*, cette réaction implique le système du complément, les lysozymes et les cellules phagocytaires (macrophages, neutrophiles, Natural Killer). Certaines cellules ont comme rôle de déclencher la réponse spécifique en présentant une partie du pathogène aux lymphocytes T et B : ce sont les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (Janeway *et al.*

2003) qui comprennent, entre autres, les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules de Langerhans et les kératinocytes (Carrillo-Farga *et al.* 1990; Rollins-Smith *et al.* 2009).

2.2.2 Le système immunitaire spécifique ou adaptatif

Lorsque l'infection traverse la protection innée, le système immunitaire spécifique est activé. Ce dernier va s'attaquer au pathogène de façon spécifique et produire des cellules « mémoire » et/ou des anticorps spécifiques. Les cellules mémoire vont réagir immédiatement lors d'une prochaine infection avec le même pathogène. Le système adaptatif comprend les cellules lymphocytaires B et T. Celles-ci doivent être activées par les CPA qui sont les cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée. Cette réponse, étant plus spécifique aux pathogènes, est plus efficace (Janeway *et al.* 2003).

2.2.3 Les peptides

L'une des spécificités des amphibiens est la présence de peptides antimicrobiens sur leur peau. Ces peptides se présentent sous la forme de petites protéines avec moins de 46 acides aminés qui ont comme propriétés d'être antibactériens et antifongiques (Goraya *et al.* 1998; Halverson *et al.* 2000; Gible *et al.* 2008). Ils sont synthétisés dans les muqueuses gastriques ou intestinales et dans les glandes granulaires (aussi appelées glandes à peptides) situées sur la peau (Moore *et al.* 1991; Wang *et al.* 1998; Basir *et al.* 2000; Rollins-Smith *et al.* 2005a). Les peptides produits dans les muqueuses sont transportés vers les glandes de la peau. Ils y sont alors stockés, permettant ainsi une réaction plus rapide lors d'un stress ou d'une infection (Rollins-Smith *et al.* 2005b). Ces glandes, entourées de myocytes, sont contrôlées par le système nerveux sympathique (Simmaco *et al.* 1998; Basir *et al.* 2000). En présence de stress, les récepteurs adrénérgiques sont stimulés, ce qui déclenche le relâchement des peptides dans leur environnement immédiat (Davis et Hadley, 1979).

La propriété antimicrobienne des peptides se réfère à leur capacité de pénétrer dans la membrane des bactéries et ainsi provoquer leur lyse (Chia *et al.* 2000; Shai et

Oren, 2001; Marcotte *et al.* 2003). La température, le pH environnant et même l'humidité de la peau sont des facteurs qui peuvent influencer leur efficacité (Carey *et al.* 1999). Chaque famille de grenouilles produit des peptides qui lui sont spécifiques (Carey *et al.* 1999) . Sur la peau du ouaouaron adulte, huit peptides de la famille des ranatuerines ont été décelés (Tableau 1) (Goraya *et al.* 1998; Conlon *et al.* 2009). Chez le têtard ou les jeunes en post-métamorphose, seulement la ranalexine a été identifiée (Clark *et al.* 1994; Vignal *et al.* 1998; Goraya *et al.* 1998).

Tableau 1 : Ensemble des peptides retrouvés sur la peau du ouaouaron ainsi que les séquences primaires d'acides aminés s'y rattachant.

Peptides	Séquences acides aminés	référence
Ranatuerine-1	SMLSVLKNLGLGKVGfVACKINKQC	Goraya <i>et al.</i> 1999
Ranatuerine-2	GLFLDTLKGAAKDVAGKLEGLKCKITGCKLP	Goraya <i>et al.</i> 1999
Ranatuerine-2Ca	GVFLDTLKGLAGKMLESKCKIAGCKP	Conlon <i>et al.</i> 2009
Ranatuerine-3	GFLDIKNLGKTFAGHMLDKIKCTIGTCPPSP	Goraya <i>et al.</i> 1999
Ranatuerine-5	FLPIASLLGKYL	Goraya <i>et al.</i> 1998
Ranatuerine-6-7	FISAIASMLGKFL or FLSAIASMLGKFL	Rollin-Smith <i>et al.</i> 2003
Ranatuerine-8	FISAIASFLGKFL	Goraya <i>et al.</i> 1998
Ranatuerine-9	FLFPLITSFLSKVL	Conlon <i>et al.</i> 2009
Ranalexine	FLGGLIKIVPAMICAVTKKC	Clark <i>et al.</i> 1994

3- Les antioxydants

Les radicaux libres ou d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont normalement produits par les cellules en présence d'oxygène et ce, dans tous les processus normaux d'un métabolisme. Cependant, d'autres sources comme les radiations du soleil ou des produits toxiques vont augmenter la présence de ces radicaux (Ricklefs et Miller, 2005). Chez les cellules phagocytaires, on dénote également une production ROS (Bendich, 1989). Les radicaux libres peuvent causer beaucoup de dommages aux cellules, qualifiés parfois de stress oxydatif (Sies, 1993) . Celui-ci peut endommager, entre autres, l'ADN, les lipides, les protéines et les glucides (Di Mascio *et al.* 1991; Sies *et al.* 1992). Toutefois, certaines vitamines ou enzymes ont des propriétés antioxydantes qui protègent

les cellules du stress oxydatif, comme les caroténoïdes, les rétinoïdes et la vitamine E (Halliwell et Gutteridge, 1989; Di Mascio *et al.* 1991; Sies et Stahl, 1995; Miller *et al.* 1996). Les caractéristiques de ces trois antioxydants seront abordées ultérieurement. Il est important de noter que l'ensemble de leurs mécanismes a été décrit chez le mammifère et non chez les amphibiens. Cependant, comme il semble que ces systèmes aient été conservés durant l'évolution, je me permettrai d'y référer (Novák *et al.* 2008).

3.1 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes comprennent différentes molécules, telles l' α -carotène, la β -carotène, la β -cryptoxanthine, la lutéine, l'astaxanthine et la canthaxanthine (Schiedt *et al.* 1985; Miller *et al.* 1996) qui sont pour la plupart des provitamines A, c'est-à-dire qu'ils peuvent être convertis en vitamine A par l'organisme (Chew et Park, 2004). Elles sont, entre autres, responsables des colorations rouges, orange et jaunes de la peau des grenouilles, tout comme pour les fruits et les fleurs. Ces caroténoïdes ont, pour la plupart, des effets bénéfiques pour le système immunitaire. En effet, il a été remarqué que la β -carotène et la canthaxanthine accroissent le nombre de cellules lymphocytaires dans le sang lors d'infection (Bendich et Shapiro, 1986; Bendich, 1989; Chew et Park, 2004), alors que la vitamine A augmente la stimulation des cellules NK (Schwartz *et al.* 1986; Shklar et Schwartz, 1988). De plus, Anderson et Theron (1990), ont démontré que les neutrophiles subissaient moins de dommages membranaires reliés à la production de ROS en présence de carotènes. Les molécules α -carotène et β -carotène sont transformées, pour la plupart, lors de l'absorption intestinale en rétinol, un élément essentiel impliqué dans plusieurs mécanismes cellulaires et tissulaires.

3.2 Les rétinoïdes

Les rétinoïdes jouent un rôle primordial dans diverses fonctions cellulaires. Le rétinol, précurseur d'acide rétinoïque (AR), est impliqué dans la différenciation cellulaire, ce qui en fait un des facteurs impliqué dans l'augmentation des malformations chez les amphibiens (Mendelsohn *et al.* 1992; Gudas, 1994). Durant l'embryogénèse, l'acide rétinoïque entre en fonction dans la signalisation cellulaire lors de la formation et le développement des différents organes et des membres (Ross *et al.* 2000; Zile, 2001;

Ankley *et al.* 2004; Sporn *et al.* 2004). D'après Gardiner *et al.* (2003) une déficience en vitamine A peut engendrer des malformations des membres. Toutefois, il est possible de faire une hypervitaminose peut provoquer des problèmes de santé importants, tels le développement anormal des os et des cartilages, l'embryotoxicité et la tératogénèse (Hough *et al.* 1988; Tzimas et Nau, 2001; Zile, 2001).

L'AR contribue à un bon nombre de réactions cellulaires du système immunitaire (Mora *et al.* 2008; Manicassamy et Pulendran, 2009). Il est en effet impliqué dans la prolifération, l'activation, la migration et la cytotoxicité des lymphocytes-T (Dennert et Lotan, 1978; Blomberg *et al.* 1980; Blomhoff, 1994; Ertesvag *et al.* 2002; Benson *et al.* 2007). Il favorise entre autres la production de lymphocytes T (T_{H2}) en induisant la production de gènes de la cytokine IL-4 (Hoag *et al.* 2002; Iwata *et al.* 2003; Dawson *et al.* 2006). Il est aussi un médiateur des processus lors de la prolifération et la migration des lymphocytes B et des cytokines (Blomhoff *et al.* 1992; Ballow *et al.* 1996; Ertesvag *et al.* 2007). L'AR influence la production de cytokines, particulièrement IL-2, ainsi que des immunoglobulines (Ig) (Ballow *et al.* 1996, 1997). Il module aussi la présentation d'antigènes par les CPA, car il exerce des effets directs sur ces dernières en augmentant la migration de cellules dendritiques vers le système lymphatique (Mebius, 2007).

3.2.1 Absorption et transport des caroténoïdes et rétinoïdes

Dans l'alimentation, les sources de caroténoïdes et d'esters de rétinol sont absorbées par les cellules des muqueuses intestinales et transformées en rétinaldéhyde par différentes enzymes. Le rétinaldéhyde est réduit en rétinol par la rétinaldéhyde réductase. Le rétinol forme ensuite un complexe avec le «Cellular retinol-binding protein» CRBP-II qui lui permet d'être estérifié par deux enzymes: la lécithine rétinol acyltransférase (LRAT) et l'acyl CoA: rétinol acyltransférase (ARAT). Une fois estérifié, l'esters de rétinol est ensuite associé à des chylomicrons (CM) pour être transporté jusqu'aux cellules hépatiques par le système lymphatique. Dans le foie, le rétinol peut prendre deux voies : il peut être emmagasiné dans les hépatocytes (cellules étoilées) sous la forme d'esters, ou il peut être hydrolysé en rétinol par l'hydrolase des esters de rétinol (HER) pour être dirigé vers la circulation sanguine. Le rétinol est alors lié à la «rétinol-binding

protein» (RBP) qui assure également le transport de la transthyrétine (TTR). (Roos *et al.* 1998; Boily *et al.* 2004; Novák *et al.* 2008) (Figure 6)

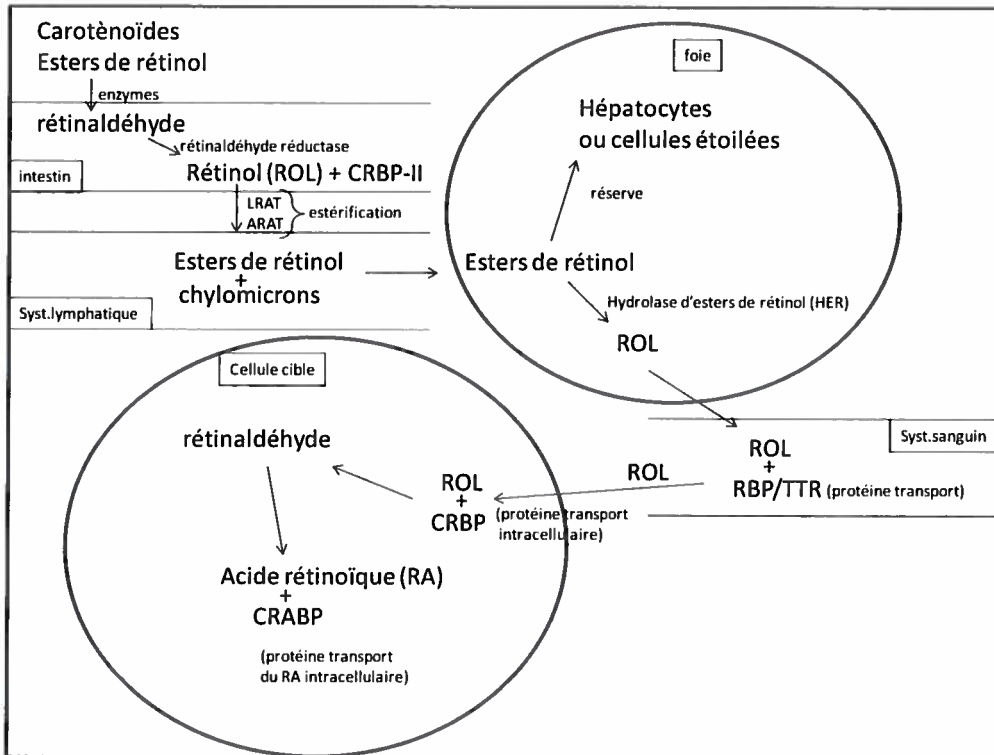


Figure 6 : Absorption et transport des caroténoïdes et des rétinoïdes dans le système. (Boily *et al.* 2004; Novák *et al.* 2008)

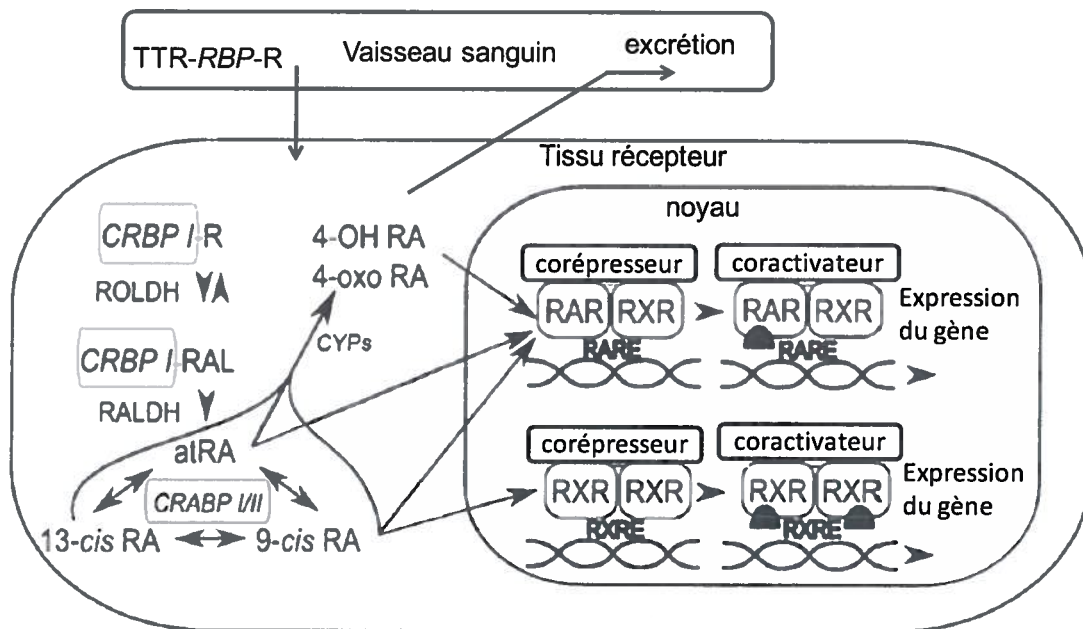


Figure 7 : Métabolisation de l'acide rétinoïque dans la cellule (Novák *et al.* 2008).

Une fois dans la cellule, le rétinol se dissocie du complexe de la protéine de transport pour traverser la membrane cellulaire et être relié à une autre protéine de liaison intracellulaire, «Cellular retinol-binding protein» (CRBP). Le rétinol peut alors être métabolisé en AR par la voie du rétinaldéhyde à l'aide de deux enzymes, la rétinol déshydrogénase (ROLDH) et la rétinal déshydrogénase (RALDH) (Maden, 2000). L'AR va adopter différentes isomérisations, telles tout-*trans* acide rétinoïque (TtAR), 9-*cis* acide rétinoïque (9cisAR) ou 13-*cis* acide rétinoïque (13cisAR) (Marill *et al.* 2003). Ces formes sont ensuite liées à une protéine de liaison intracellulaire, «Cellular acid retinoic-binding protein» (CRABP I ou II). Ce complexe est alors amené au noyau pour se lier aux récepteurs nucléaires spécifiques. Par la suite, l'inactivation de l'AR se fait à l'aide d'enzymes cytochromes (CYP450-P26) qui métabolisent l'AR en 4-OH-RA, 4-oxo-AR, 5,6-epoxy-RA ou 18-OH-AR. Ces métabolites peuvent ensuite retourner dans le système sanguin pour être excrétés (Napoli *et al.* 1999; Novák *et al.* 2008). (Figure 7)

3.3 La vitamine E

La vitamine E est un terme général attribué à huit nutriments constitués de lipides solubles qui sont appelés les tocophérols (Fritsma, 1983). Ceux-ci comprennent le α -, β -, γ -, tocophérol et α -, β -, γ -, tocotrienol (Bjorneboe *et al.* 1990). La forme majeure dans le sang chez l'humain est l' α -tocophérol (Burton *et al.* 1983). La vitamine E agit de façon très efficace en capturant les radicaux libres des membranes lipidiques (Garg *et al.* 2009). Ainsi, elle protège les cellules contre les effets toxiques de différents pesticides (Stevenson *et al.* 1995; Gultekin *et al.* 2001; Altuntas et Delibas, 2002) et diminue la génotoxicité (Sugiyama *et al.* 1992; Lunec *et al.* 2004).

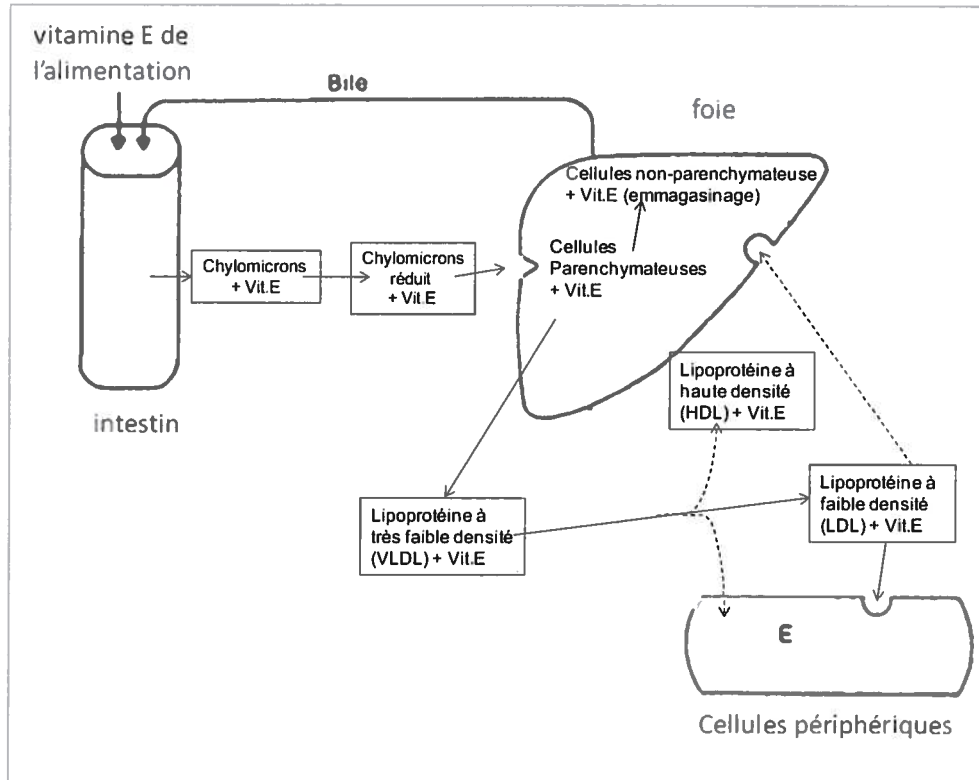


Figure 8 : Absorption et transport de la vitamine E dans le système. (Bjorneboe *et al.* 1990)

3.3.1 Absorption et transport

Comme la vitamine A, la vitamine E n'est pas synthétisée *in vivo* chez les vertébrés. Elle doit être acquise par la nourriture. L'absorption se fait dans l'intestin grêle et la vitamine E est incorporée dans le système lymphatique par des CM. Elle peut alors être amenée directement aux cellules parenchymateuses du foie ou être associée à des protéines de très faible densité (lipoprotéine à très faible densité, VLDL) pour le transport dans la circulation sanguine. Des lipases peuvent ensuite, par hydrolyse, transférer la vitamine E à d'autres types de protéines (lipoprotéine à faible densité, LDL et lipoprotéine à haute densité, HDL) ou cellules périphériques (Bjorneboe *et al.* 1990; Burton, 1994). En ce qui concerne l'excrétion, la vitamine E est transformée en hydroquinone. Celle-ci sera alors conjuguée à l'acide glucuronique pour être excrétée par la vésicule biliaire dans les selles (Bjorneboe *et al.* 1990; Debier et Larondelle, 2005). (Figure 8)

AVANT PROPOS

Sophie Dussault est responsable de la totalité des textes de ce mémoire. La globalité des manipulations réalisées en laboratoire et sur le terrain, pour les données utilisées dans ce manuscrit, a été effectuée par Mme Dussault ou sous sa supervision. De plus, elle est responsable de l'ensemble des expérimentations effectuées ainsi que de la rédaction de l'article (chapitre 2). Les données ont été traitées et analysées statistiquement par Sophie Dussault.

L'article du chapitre 2 va être soumis sous peu au journal : Aquatic Toxicology

CHAPITRE 2

ARTICLE

EFFET DES PESTICIDES D'ORIGINE AGRICOLE SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE DU OUAOUARON (*LITHOBATES CATESBEIANUS*)

Dussault, S.¹, Farcy, É.¹, Brousseau, P. ¹, Fournier, M. ¹, Fortier, M. ¹, Boily, M. ², Bonneil, É.³

1) INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7.

2) Centre Toxen et Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Québec, H3C 3P8.

3) Caprion Pharmaceuticals, Université de Montréal (UdeM), 7150 Alexander Fleming, Montreal, Quebec, Canada H4S 2C8

Mots clés : amphibien, pesticides, système immunitaire, peptide, ARNm

Résumé

La survie d'un grand nombre d'amphibiens est présentement menacée. Afin de mieux comprendre la situation, nous étudions l'impact des agripesticides sur le système de défense immunitaire des amphibiens. La pollution pourrait affecter ce système et favoriser une baisse de la résistance, ce qui rendrait les grenouilles plus vulnérables à diverses maladies et expliquerait, du moins en partie, leur déclin. Le système immunitaire est composé, entre autres, de macrophages et de lymphocytes, mais également de peptides antibactériens et antifongiques retrouvés au niveau de la peau. Le but de cette étude est d'établir si le niveau de pollution agricole affecte les réponses immunitaires, les peptides antimicrobiens ainsi que leur ARNm. Pour débiter, un échantillonnage de ouaouarons a été effectué sur deux années dans six bassins versants de la rivière Yamaska avec des niveaux de pollution variés. Dans un premier temps, à partir des cellules de la rate, les biomarqueurs immunitaires suivis sont : la viabilité cellulaire, la phagocytose et la flambée oxydative. Dans un second temps, l'analyse de la présence de peptides antimicrobiens et de leur ARNm est obtenue par HPLC-MS-MS et PCR temps réel. Les résultats obtenus démontrent que les trois biomarqueurs immunitaires sont modulés par le niveau d'activité agricole. De plus, la présence de peptides est affectée par la pollution agricole.

1 Introduction

Depuis nombres d'années, la diminution et même l'extinction de plusieurs espèces d'amphibiens sont observées (Houlahan *et al.* 2000). Plusieurs facteurs ont été mis de

l'avant pour expliquer ce phénomène. Nous pouvons citer entre autres l'augmentation des radiations UV (Kiesecker et Blaustein, 1995; Kiesecker *et al.* 2001; Blaustein *et al.* 1994, 1997; Middleton *et al.* 2001), la destruction des habitats (Hecnar et M'Closkey 1996; Davidson *et al.* 2002; Becker *et al.* 2007), l'introduction de nouvelles espèces (Bradford *et al.* 1993; Lawler *et al.* 1999; Knapp *et al.* 2007), les changements climatiques (Carey et Alexander, 2003; Araujo *et al.* 2006; Pounds *et al.* 2006), l'augmentation des infections (Berger *et al.* 1998; Daszak *et al.* 1999) et l'augmentation de la pollution (Sparling *et al.* 2001; Blaustein *et al.* 2003; Smith *et al.* 2005).

Plusieurs infections vont affecter les grenouilles. Parmi celles-ci, notons le ranavirus FV3 (Cunningham *et al.* 1996), un trématode (*Ribeiroia ondatrae*) (Johnson *et al.* 1999, 2002; Stopper *et al.* 2002) et un champignon (*Batrachochytrium dendrobatidis*) (Berger *et al.* 1998; Daszak *et al.* 1999; Rachowicz *et al.* 2006). Ces infections augmentent l'incidence de mortalité, ce qui va jouer un rôle important dans le déclin des amphibiens. Pour combattre ces infections, la grenouille possède un système de défense. Celui-ci comprend les cellules du système immunitaire et aussi des peptides antimicrobiens emmagasinés dans les glandes à peptides au niveau de la peau (Goraya *et al.* 1998; Halverson *et al.* 2000; Rollins-Smith *et al.* 2005b; Gible *et al.* 2008). En ce qui concerne les cellules immunitaires, elles vont réagir lorsqu'un pathogène pénètre dans le corps. Certains facteurs peuvent influencer l'efficacité du système immunitaire dont, entre autres, les pesticides (Christin *et al.* 2003, 2004; Gilbertson *et al.* 2003; Forson et Storfer 2006; Marcogliese *et al.* 2009).

Les peptides antimicrobiens de la peau, composés de 20 à 46 acides aminés, jouent un rôle très important dans le système de défense des amphibiens, car ils protègent la peau contre les infections bactériennes et fongiques (Halverson *et al.* 2000; Marcotte *et al.* 2003; Rollins-Smith *et al.* 2002a, 2002b; Sonnevend *et al.* 2004; Rollins-Smith, 2009). Ces peptides sont synthétisés dans les muqueuses gastriques ou intestinales et dans les glandes granulaires situées sur la peau (Moore *et al.* 1991; Wang *et al.* 1998; Basir *et al.* 2000; Rollins-Smith *et al.* 2005a). Ils sont sécrétés lors d'un stress, car les glandes à peptides sont entourées de muscles qui se contractent et libèrent ainsi les peptides sur la peau (Davis et Hadley 1979; Simmaco *et al.* 1998; Basir *et al.* 2000). Une fois libérés, les

peptides pénètrent dans la membrane des pathogènes et ainsi provoquent leur lyse (Chia *et al.* 2000; Shai et Oren, 2001; Marcotte *et al.* 2003). Le *Batrachochytrium dendrobatidis*, un champignon qui provoque une infection qui s'avère très souvent mortelle, cause des infections de la peau (Berger *et al.* 1998; Daszak *et al.* 1999; Rachowick *et al.* 2006). Les peptides jouent un rôle très important dans le contrôle lors d'infection par *Batrachochytrium dendrobatidis*, puisque ce dernier s'attaque aux cellules de la peau (Rollins-Smith *et al.* 2002a, 2003). Il a été démontré que ces peptides antimicrobiens diminuent leur croissance chez *Xenopus laevis* (Gibble *et al.* 2008).

Les pesticides sont une source importante de pollution, puisqu'ils se retrouvent dans l'eau, le milieu de vie des grenouilles. Ces pesticides vont perturber divers systèmes et affecter la survie des grenouilles. En effet, plusieurs études ont mis en évidence des malformations chez le têtard (Allran et Karasov 2001) et l'hermaphrodisme de même que des anomalies des gonades (Hayes *et al.* 2002, 2003). De plus, les pesticides affectent le système immunitaire en modifiant le nombre de cellules retrouvées dans la rate, l'activité phagocytaire et la prolifération des lymphocytes (Christin *et al.* 2002, 2004; Gilbertson *et al.* 2003; Forson et Storfer 2006; Brodtkin *et al.* 2007; Margogliese *et al.* 2009).

Nous avons donc émis l'hypothèse que les pesticides d'origine agricole pourraient influencer les réponses du système de défense du ouaouaron. Dans ce contexte, nous avons choisi pour notre étude l'une des rivières canadiennes les plus fortement touchées par la pollution agricole : la rivière Yamaska. Celle-ci comprend plusieurs sous-bassins versants qui sont entourés de champs agricoles majoritairement pour le maïs et le soya (Giroux, 2010). Cette activité agricole génère une source importante de pesticides qui se retrouve dans l'eau. En ce qui concerne le choix de l'espèce, le ouaouaron s'est avéré des plus pertinents. En premier lieu, cette espèce n'est pas menacée au niveau de sa population. Ensuite, les individus ont une durée de vie d'environ 9 ans, ce qui est un point majeur lorsque l'on veut étudier les effets à long terme des pesticides. Le but de cette étude est de définir les effets des milieux contaminés avec des pesticides d'origine agricole sur le système de défense du ouaouaron. Si une immunosuppression est observée, ceci pourrait suggérer que les ouaouarons deviendraient moins résistants aux infections.

2 Matériel et méthodes

2.1 Les sites étudiés

Les sites étudiés et la capture des ouaouarons sont décrits en détails dans l'article de Spear *et al.* (2009). Brièvement, 6 sous-bassins versants de la rivière Yamaska sont échantillonnés représentant un gradient d'activité agricole (Fig.1). Chaque sous-bassin hydrographique a été classé en fonction de l'intensité d'activité agricole rapportée par Primeau *et al.* (1999) et confirmé par des images satellites. Deux sites (1-Deborah Stairs, 2-Lac Boivin) sont associés à une agriculture de faible intensité, i.e. 0-19% de leur surface est consacré à des terres agricoles. Les sites Réservoir Choinière (3), Rivière Yamaska (Farnham) (4) et Rivière Pot-au-Beurre (5) sont des sous-bassins versants soumis à une influence modérée d'agriculture avec 20-59% de leur surface consacré à des terres agricoles. Le site à forte intensité d'activité agricole, Rivière Noire (6) correspond à 60 % et + de leur surface de terre agricole consacré au maïs et au soya.

2.2 Le ouaouaron

La capture des ouaouarons a été décrite dans l'article de Boily *et al.* (2005). En bref, les collectes sur le terrain et la manipulation des animaux sont conformes au permis délivré par l'Université du Québec à Montréal (CCPA) et la Société de la faune et des parcs du Québec. Sur chaque site, un minimum de 12 ouaouarons sont capturés et 12 sont euthanasiés pour l'analyse des cellules immunitaires et les peptides. Les collectes ont lieu entre 21 h et 2 h. Les ouaouarons sont localisés grâce à leur chant et figés dans le faisceau lumineux d'un puissant projecteur, avant d'être capturés à la main. Les grenouilles ont été conservées dans des grands bacs en plastique épais (40x75x50 cm) contenant de l'eau du lieu d'échantillonnage à environ 8 cm et munis de trous d'aération. La densité maximale par bac est de 6 individus. Les bassins ont été placés à l'ombre dans la végétation pour que la température soit maintenue entre 15 et 25 °C. Un laboratoire de terrain est monté tôt le matin suivant et tous les animaux ont été traités dans les 16 h suite à la capture. L'anesthésie des ouaouarons a été effectuée avec 0,1% méthanesulfonate tricaine (MS222) tamponné avec 0,2% NaHCO₃. Le sexe des animaux a été déterminé et les grenouilles ont été pesées, mesurées et examinées en cas d'anomalie.

2.3 Prélèvement des organes

2.3.1 Rate

Cette méthode est la même que celle employée par Christin *et al.* (2004). La suspension cellulaire a été faite avec du RPMI complet dilué afin d'obtenir la bonne molarité (RPMI-1640 /eau (1:1) enrichie avec 10 mM HEPES, 10 % (v/v) sérum de veau fœtal (BSA) et de 1 % pénicilline et streptomycine) (Sigma, St-Louis, MO, USA) à pH 7.4. Pour chaque suspension, le nombre de cellules et la viabilité ont été évalués par une exclusion au bleu de trypan (Sigma, St-Louis, MO, USA) par microscopie optique.

2.3.2 Peau

La peau du dos (environ 10 mg; superficie 1 cm²) de chaque grenouille a été prélevée, mise dans du RNAlater™ (Ambion inc., Austin, Texas, USA) et ensuite déposée sur de la glace sèche, puis conservée à -80 °C pour l'extraction ultérieure d'ARNm.

2.4 Phagocytose

La méthodologie suivie pour mesurer la phagocytose est basée sur le protocole de Brousseau *et al.* (1999). La concentration cellulaire des splénocytes a été ajustée à 1x10⁶ cellules/ml. Les cellules ont été mises en contact avec des billes fluorescentes ($d = 1.86 \mu\text{m}$; jaune-vert Fluoresbrite; Polysciences, PA, USA,) à un ratio billes:cellules (100 :1) et elles ont été incubées en absence de lumière et à la température de la pièce durant 12 heures. Suite à l'incubation, la suspension cellulaire a été centrifugée, sur un gradient de 3 % de BSA préparé dans du RPMI complet, à 138 x g durant 7 minutes à 20 °C. Le culot a été suspendu dans 300 μL de solution de fixation (0,2 % d'azide de sodium (Fisher Chemical, Fair lawn, New Jersey, USA), 0,5 % de formaldéhyde dans tampon de solution de phosphate (PBS) (Sigma, St-Louis, MO, USA)).

2.5 Flambée oxydative

Le protocole utilisé est celui de Brousseau *et al.* 1999. La concentration des cellules de la rate a été ajustée à 1x10⁶ cellules/ml dans du PBS -glucose (1%). Deux

tubes ont été utilisés pour chaque échantillon. Dans les deux tubes, un volume de 5 µl de dichlorofluorescine diacétate (DCFH-DA) (Sigma, St-Louis, MO, USA) à 5 µM a été ajouté et les cellules ont été incubées durant 30 minutes en absence de lumière et à la température de la pièce. Par la suite, du 4β-Phorbol-12β-myristate-13α-acétate (PMA) (Sigma, St-Louis, MO, USA) a été ajouté à une concentration dans le tube de 400 ng/ml dans seulement un des deux tubes. Les cellules ont été incubées durant 1 heure à la noirceur et à température de la pièce. L'analyse a été effectuée par cytométrie en flux avec un FACScan à une longueur d'onde de 443nm (FL1) (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) avec des acquisitions de 5000 cellules de la population cible qui correspond aux macrophages. Les résultats sont exprimés par la différence entre les moyennes de fluorescence des macrophages en présence du DCFH-DA seul (flambée basale) et les macrophages en présence de DCFH-DA et de la PMA (flambée induite) en fonction des différents sites.

2.6 Extraction des peptides

Pour l'extraction des peptides, le protocole de Goraya *et al.* 2000 a été utilisé. Brièvement, la peau a été mise dans un mélange éthanol 0.7M HCL (3 :1, v/v, 10 ml/g), refroidi à 4 °C, puis a été broyé avec au polytron (polytron-aggregate®, type PTA 7K, Luzernerstrasse, Luzern, Suisse). Le mélange a été laissé sous une agitation douce (80 rpm) durant 2 heures à 4 °C. Ensuite, le tout a été centrifugé à 3700 x g pendant 45 min à 4 °C. Le surnageant a été récupéré et l'éthanol a été évaporé sous pression jusqu'à ce que le volume soit réduit au 2/3 de son volume initial. Le liquide a été centrifugé à 3700 x g durant 45 min à 4 °C. Le surnageant a été récupéré et passé sur 8 filtres (Sep-Pak® plus short; TC18 cartridges; Waters, Milford, Massachusette, USA.) différents à un débit de 2 ml/min. Les filtres ont été élués avec de l'acétonitrile (ACN) à 70 % et de l'acide trifluoroacétique (TFA) à 0.1 %. L'élution a ensuite été filtrée (0,45 µm) et lyophilisée (VirTis, Gardiner, NY, USA). Les échantillons ont par la suite été analysés avec un appareil de type HPLC-MS-MS.

2.7 Analyse par spectroscopie de masse

Les échantillons ont été solubilisés dans un milieu d'ACN 5% et d'acide formique (AF) à 0,2 %. Les échantillons ont été séparés sur une colonne C18 (150 µm × 10 cm) fabriquée au laboratoire en utilisant de l'eau nano- Acquity nanoLC système. Un gradient allant de 10 à 60 % d'acétonitrile (0,2 % AF) appliqué sur 56 minutes a été utilisé pour éluer les peptides à partir d'une colonne maison en phase inversée (150 µm id x 100 mm) avec un débit fixé à 600 µL / min. La colonne est directement branchée à une nanosonde munie d'une interface avec un spectromètre de masse Premier Q-TOF, Waters. Chaque spectre MS a été suivi par trois spectres MS/MS (quatre scan événements) où les trois plus abondants ions multichargés ont été sélectionnés pour MS/MS de séquençage. Des expériences de Tandem MS ont été réalisées en utilisant des collisions de dissociation induites dans le piège à ions linéaire. Les données ont été traitées à l'aide de l'algorithme PEAKS séquençage de novo (BSI) avec les paramètres de tolérance fixés respectivement à 0,1 Da et à 0,05 Da pour les précurseurs et les ions fragments.

2.8 Extraction de l'ARN et la transcription inverse

L'ARN total a été extrait avec la trousse RNeasy (Qiagen) conformément aux instructions du fabricant. Le volume de la solution RLT plus a été ajusté à 1800 µl. La quantité et la pureté de l'ARN ont été estimées en mesurant l'absorbance à 260 et 280 nm avec un spectrophotomètre UV de type Nanodrop. La qualité de l'ARN a été évaluée par l'Experion (BioRad). La transcription inverse a été effectuée avec la trousse Sensiscript RT (Qiagen) selon les instructions du fabricant.

2.9 Analyse semi-quantitative des gènes d'ARNm spécifique

Les amorces ont été déterminées avec le logiciel primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Tableau I) et synthétisées par Invitrogen, Canada. Les caractéristiques d'amorces sont: longueur (18 à 20 pb), température (57 °C à 60 °C) et GC (40 % à 60 %). L'efficacité des amorces a été testée sur un mélange d'ADNc provenant de plusieurs individus. Pour chaque amorce, une courbe standard constituée d'une gamme de concentrations d'ADNc a été utilisée pour

déterminer l'efficacité de chaque couple d'amorces. Seuls les couples présentant une efficacité de $100 \pm 5\%$ ont été sélectionnés pour cette étude. La PCR en temps réel a été réalisée avec Mastercycler ep *realplex*² s (Eppendorf). L'amplification a été réalisée en plaques de 96 puits, dans un volume total de 15 μ l contenant : 7,5 μ l de 2X iQ SYBR® Green Supermix (Biorad laboratory inc., Hercules, CA), les amorces (concentration finale de 500 nM) et les échantillons d'ADNc obtenus à partir de la transcription inverse (5 ng équivalent ARN total). Les conditions d'amplification ont été de 40 cycles de 15s à 95°C et 58s à 68 °C, suivi par le protocole de la courbe de fusion : 80 cycles de 10 s avec une augmentation de 0,5 °C entre chaque cycle avec un écart de température allant de 59 °C à 95 °C. La courbe de fusion a été utilisée pour vérifier si les produits d'amplification étaient bien spécifiques (Farcy *et al.* 2007). L'expression relative des gènes cibles a été exprimée en quantité relative par rapport au gène de référence β -actine selon la méthode du Delta CT : $2^{-(\text{gène cible} - \text{gène référence})}$.

2.10 Statistiques

Un test de normalité Shapiro-Wilk a été effectué pour la viabilité, la phagocytose et la flambée oxydative ont ensuite été comparées entre les sites par une analyse de variance à un critère de classification (ANOVA). En cas d'ANOVA significatif, les données ont été soumises à un test Tukey de comparaisons multiples pour identifier les différences entre les groupes ($p \leq 0.005$). L'ensemble de ces analyses a été effectuée avec le logiciel JMP version 5.

3 Résultats

3.1 Viabilité cellulaire

Le test de viabilité permet d'observer si l'intensité de l'activité agricole affecte la survie des splénocytes. Pour l'année 2008, il n'y a pas de différence significative entre les sites. En 2009, il y a une diminution significative de la viabilité pour le site Farnham comparativement au Lac Boivin. Les résultats sont présentés dans la figure 2.

3.2 Phagocytose

L'activité phagocytaire a été analysée par cytométrie en flux avec une acquisition de 10 000 cellules dans la barrière électronique d'intérêt contenant les macrophages. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules ayant phagocyté une bille et plus (capacité) et trois billes et plus (efficacité) en fonction des différents sites. Nous remarquons qu'il y a une diminution significative d'environ 45% de la capacité ainsi que de l'efficacité phagocytaire pour les sites Farnham et Réservoir Choinière comparativement aux deux autres sites. Les résultats sont présentés dans la figure 3.

3.3 Flambée oxydative

La flambée oxydative détermine la capacité des macrophages à produire des radicaux libres en réponse à un inducteur de la flambée (PMA). Les résultats, présentés dans la figure 4, montrent que les cellules des grenouilles provenant du site Réservoir Choinière produisaient de 3 à 4 fois moins de ROS comparativement aux autres sites.

3.4 Peptides

L'analyse des peptides de la peau a été réalisée par HPLC-MS-MS et cinq peptides ont été détectés; la ranatuerine 1, 2, 2CA, 5 et 7. Douze et 6 peaux de grenouilles ont été analysées par site respectivement en 2008 et en 2009. Afin de faciliter l'interprétation des résultats, nous avons placé à 40% la référence pour le nombre de grenouilles par site sur lesquelles les peptides ont été détectés. Nous remarquons en 2008 que plus le site a une activité agricole importante, moins il y a de peptides retrouvés par grenouille (Fig.5 A). Pour le site Lac Boivin, les 5 peptides sont retrouvés sur plus de 40% des grenouilles. Pour le Réservoir Choinière et la Rivière Noire, respectivement 2 et 1 peptides sont présents chez plus de 40% des ouaouarons. Toutefois en 2009, le niveau d'activité agricole ne semble pas affecter le nombre de peptides décelé (Fig.5 B) puisque l'ensemble des peptides est présent chez plus de 40% des grenouilles. Il y a cependant une exception, pour le site Deborah, un site témoin, aucune grenouille n'avait de ranatuerine 7 sur la peau.

3.5 Analyse de PCR en temps réel

L'analyse par RT-PCR a été effectuée sur la peau de 6 grenouilles par site échantillonné en 2009. L'expression des gènes est exprimée relativement à celle de la β -actine. L'ARNm de l'ensemble des peptides est fortement exprimé. Les ranatuerines 5 et 7 sont les plus exprimés tandis que la ranatuerine 3 a l'expression la plus faible. Due aux écarts type très élevés, il n'y a pas de différences significatives entre les concentrations d'ARNm pour les différents sites (Tableau III).

3.6 Relation entre le pourcentage de peptides et d'ARNm présents

Les résultats sur les peptides antimicrobiens ont été mis dans un même tableau (tableaux IV) afin d'avoir une image plus générale de la relation entre les peptides et leur ARNm. Pour ce faire, le pourcentage de grenouille sur lesquelles nous avons retrouvé les peptides et leur ARNm est regroupé par site. Les sites présentés sont Deborah avec une activité agricole à intensité faible (témoin) et deux autres sites, Farnham et Réservoir Choinière qui ont une activité agricole à intensité moyenne. La présence de peptides et d'ARNm concorde parfaitement pour la ranatuerine 5, qui se retrouve chez 100% des grenouilles. Tandis que pour les ranatuerines 1, 2Ca et 7, il y a de l'ARNm chez toutes les grenouilles cependant, la protéine n'est pas présente partout. L'ARNm de la ranatuerine 3 et 8 est présent chez l'ensemble des grenouilles toutefois, aucun peptide n'a été détecté. L'ARNm de la ranatuerine 2 n'a pas pu être quantifié car son amorce n'avait pas une efficacité acceptable. L'ARNm et la protéine de la Ranatuerine 9 n'ont été retrouvés sur aucune grenouille.

4 Discussion

Plusieurs études démontrent que les pesticides affectent le système immunitaire (Carey *et al.* 1999; Christin *et al.* 2002, 2004; Brodtkin *et al.* 2007). Un dérèglement de ce système peut engendrer une diminution de la résistance face aux divers pathogènes présents dans l'environnement ce qui pourrait les rendre plus susceptibles à développer des infections sans avoir la possibilité de se défendre.

4.1 Viabilité cellulaire

Lorsqu'un pathogène pénètre dans l'organisme, la première ligne de défense réagit. Cette ligne comprend les cellules de la réponse immunitaire innée, dont les macrophages présents entre autre dans la rate. Nous avons observé une diminution significative de 26% de la viabilité des splénocytes sur l'un des sites avec un niveau moyen d'activité agricole comparativement au lac Boivin. Dans les expériences de Christin *et al.* (2003, 2004), la viabilité n'était pas affectée par la présence de pesticides comparativement à notre étude. Cependant, leurs études utilisaient comme espèce *Rana pipiens* qui étaient exposés en laboratoire à un mélange de pesticides dont les concentrations étaient plus élevées que les nôtres. Tandis que nous, nous travaillons avec *Lithobates catesbeianus* exposé *in situ* à un nombre important de pesticides et d'autres composés avec des variations de concentrations. Cette dissemblance peut expliquer que nos résultats ne concordent pas avec les leurs.

4.2 Phagocytose

Nous avons aussi observé une baisse significative de la capacité ainsi que de l'efficacité phagocytaire d'environ 50% pour les sites Farnham et Réservoir Choinière qui sont à plus forte intensité d'activité agricole comparativement aux deux autres sites. Brodtkin *et al.* (2007) ont aussi observé une diminution de l'activité phagocytaire chez *Rana pipiens* exposé à de l'atrazine à 0,1 ppb, qui est l'un des pesticides retrouvés dans les cours d'eau étudiés. Les résultats d'un échantillonnage d'eau fait en juillet 2008 a montré une concentration de 0,15 ppb pour les sites Réservoir Choinière et Farnham (Gouvernement du Canada, publication des résultats d'analyse d'eau à venir), ce qui correspond aux concentrations de Brodtkin *et al.* (2007). Bien que ce ne soit pas le seul pesticide retrouvé dans les cours d'eau, ceci suggère qu'une concentration de 0,15 ppb d'atrazine est suffisante du moins en partie pour engendrer une diminution de l'activité phagocytaire chez *Lithobates catesbeianus* ainsi que chez *Rana pipiens*. Cependant, l'étude de Christin *et al.* (2004) a mis en évidence une augmentation de la phagocytose chez *Xenopus laevis* tandis que pour *Rana pipiens* l'activité phagocytaire n'était pas affectée lorsque les grenouilles étaient exposées en laboratoire à un mélange de pesticides. Cette étude suggère que les cellules phagocytaires peuvent être affectées

différemment en fonction de l'espèce, mais aussi en fonction des pesticides et des concentrations utilisés.

4.3 Flambée oxydative

Lorsque les macrophages phagocytent un pathogène, ils vont produire des ROS afin de le dégrader. Une baisse de cette production implique donc une diminution de la capacité à détruire les pathogènes. Les résultats obtenus lors d'une étude avec *Rana pipiens* en présence d'eau polluée à différents pesticides a démontré une diminution de la flambée oxydative des neutrophiles (Gilbertson *et al.* 2003). Nos travaux concordent avec ces résultats puisque nous avons observé une diminution significative de l'ordre de 167% de la production de radicaux par les macrophages des grenouilles obtenues sur le site du Réservoir Choinière en comparaison à la moyenne des deux sites à faible intensité agricole. Toutefois, le panel de polluants retrouvés dans notre étude ainsi que leurs concentrations diffèrent en partie de ceux de Gilbertson *et al.* (2003). Leurs échantillons d'eau contenaient plutôt du DDT, de la dieldrine et du malathion. Des études ont également été faites sur la production de ROS par les cellules immunitaires chez le poisson. Il a été observé que l'endosulfane engendrait une augmentation de la flambée oxydative chez *Oreochromis niloticus* (Tellez-Bañuelos *et al.* 2009). Cependant, pour *Gadus morhua* c'est une diminution qui a été obtenue (Pérez-Casanova *et al.* 2010). Toutefois, les *Gadus* n'étaient pas exposés aux mêmes polluants (PAHs, phénol...). Ceci permet tout de même d'affirmer que certaines substances environnementales peuvent affecter de façon importante la production de ROS des cellules immunitaires et ainsi nuire au bon fonctionnement du système de défense en présence de pathogènes.

4.4 Peptide et ARNm

La production de peptides est encore un domaine peu connu, mais nous savons toutefois que chez *Xenopus laevis*, les gènes codant pour les peptides antimicrobiens sont principalement exprimés dans les cellules du tractus gastro-intestinal (Reilly *et al.* 1994). Ils sont également synthétisés et emmagasinés dans les glandes à peptides situées dans la peau de la majorité des grenouilles (Rollins-Smith *et al.* 2005a, 2005b; Conlon *et al.* 2009). Puisque nous avons trouvé de l'ARNm pour six peptides

(Ranatuerin 1, 2Ca, 3, 5, 7 et 8) de la peau, ceci confirme qu'il y a bien synthèse de ces protéines par les glandes à peptides de la peau.

En ce qui concerne la présence des peptides, cinq d'entre eux ont été retrouvés sur la peau de *Lithobates catesbeianus* comparativement à neuf attendus (Goraya *et al.* 1998). Pour expliquer cette différence, nous nous permettons d'émettre des hypothèses qui seraient intéressantes d'explorer dans le futur. Premièrement, le taux de stress peut être un facteur important dans la production de protéines. En effet, il a été observé chez le *Sparus aurata* que l'augmentation du stress pouvait moduler la présence de protéines dans le foie (Alves *et al.* 2010). Ceci nous amène à penser que les grenouilles en captivité utilisées pour l'étude de Goraya *et al.* (1998) avaient probablement un niveau de stress plus faible que celles retrouvées dans la nature. Ceci expliquerait du moins en partie la différence observée. Cette différence dans le nombre de peptides retrouvé ne peut pas être expliquée par un protocole d'extraction et d'analyse inadéquat, puisque nous nous sommes basés sur le protocole de Goraya *et al.* (1998) qui a été par la suite régulièrement utilisé avec succès pour l'extraction de tous les peptides (Goraya *et al.* 2000; Kim *et al.* 2000; Rollins-Smith *et al.* 2002a). Toutefois, un autre protocole d'extraction de peptides avec la norépinephrine, une hormone liée au stress, a été régulièrement utilisé depuis le début des années 2000 (Rollins-Smith *et al.* 2005a; Conlon *et al.* 2005, 2007). L'utilisation de la norépinephrine par injection n'était pas envisageable dans le contexte de notre étude puisque le système endocrinien faisait partie des systèmes étudiés. Cette intervention aurait pu biaiser les résultats des expériences effectuées en parallèle avec les mêmes animaux. Deuxièmement, il a déjà été démontré que certains pesticides avaient des effets cytotoxiques sur des cellules de poisson (Saito *et al.* 1991; Li et Zhang, 2002). Si cette cytotoxicité a lieu sur les cellules de la peau des grenouilles cela pourrait diminuer la synthèse des protéines par les cellules des glandes à peptides rendues moins nombreuses suite à l'exposition aux pesticides. Troisièmement, il est possible que les ranatuerines 3 et 8 soient plus sensibles à la dégradation lors de la préparation des échantillons, ce qui expliquerait leur absence. Il est aussi possible que la quantité de peptides retrouvée à partir d'échantillons individuels de peau ne soit pas suffisante pour être mesurée passant en dessous de la limite de détection de nos instruments. En effet, la majorité des études sur les peptides de *Rana catesbeiana* ou d'autres grenouilles sont effectuées sur un pool

de peaux (Clark *et al.* 1994; Goraya *et al.* 1998, 2000; Conlon *et al.* 1999; Rollins-Smith *et al.* 2002a, 2006). Quatrièmement, la présence d'ARNm pour trois peptides n'ayant pas été décelés sous forme protéine, indique qu'il pourrait y avoir d'autres facteurs influençant la production ou encore que la régulation de la concentration en peptides s'effectue au niveau post-transcriptionnel.

En 2008, nous avons constaté que le pourcentage de grenouilles avec présence des peptides sur leur peau avait fortement diminué pour les sites moyennement et fortement pollués. Pris globalement, il y aurait donc une inhibition de la synthèse des protéines. Cette inhibition pourrait engendrer une augmentation importante d'infection de la peau et ainsi diminuer leur chance de survie. McCarthy et Fuiman (2008) ont démontré que la présence d'atrazine pouvait diminuer la synthèse de certaines protéines de croissance et du métabolisme chez une espèce de poisson, le *Sciaenops ocellatus*. Il est donc possible que la présence de pesticides dans l'eau affecte la synthèse des peptides ainsi que leur présence sur la peau. Toutefois, en 2009, les peptides sont présents chez plus de 40% des grenouilles indépendamment des sites. Il est possible que cette différence entre les deux années implique une diminution de la concentration des pesticides dans les eaux, reliée à une abondance de précipitations. En effet, en comparaison avec l'année 2008, il est tombé presque le double de pluie pour la même période (www.climate.weatheroffice.ec.gc.ca). Nous sommes conscients qu'une augmentation de précipitation peut augmenter la concentration en pesticides due au lessivage des terres, cependant nous pensons qu'une très grande quantité d'eau tombée sur plusieurs jours pourrait avoir un effet inverse. En 2009, nous n'avons pas pu capturer de ouaouaron sur deux sites en raison du niveau de l'eau trop élevé. Cette plus grande quantité d'eau a probablement dilué la concentration de polluants, ce qui a diminué leur effet inhibiteur sur la synthèse des peptides dans les glandes. Un échantillonnage d'eau en aval de la Yamaska effectué entre le 28 mai et le 16 juillet (2008 et 2009), a permis de constater qu'il y avait une diminution de 17,37% de la concentration des pesticides retrouvés pour 2009. Cette diminution s'évalue à 9% lorsque nous comparons les deux années de mai à août (Véronique Trudeau, Environnement Canada, Division du monitoring et surveillance de la qualité de l'eau, communication personnelle). Il est à noter que ces données ne fournissent qu'une idée approximative de la concentration des pesticides retrouvés puisque l'échantillonnage

d'eau ne se faisait qu'une fois par semaine. Il est également important de spécifier que la vente des pesticides au Québec est restée stable entre les deux années (Véronique Trudeau, Environnement Canada, Division du monitoring et surveillance de la qualité de l'eau, communication personnelle). Les glandes à peptides étant situées sur la peau, elles sont en contact direct avec l'eau et les polluants. C'est pourquoi nous émettons l'hypothèse qu'il y aurait une corrélation négative entre la concentration de polluants et la présence de peptides. Il serait toutefois nécessaire d'effectuer une étude plus approfondie afin de confirmer cette hypothèse.

De récents travaux ont démontré que l'atrazine affectait l'expression de gènes de peptides chez *Xenopus laevis* (Langerveld *et al.* 2009). Nos résultats ne concordent pas avec cette étude puisque la synthèse de l'ARNm de la plupart des peptides ne semble pas être affectée et ce, même dans les sites avec un niveau d'activité agricole élevé. En effet, la quantité d'ARNm des différents peptides étudiés au niveau transcriptionnel n'est pas significativement différente entre les sites. Cependant, il est important de noter que les concentrations d'atrazine utilisées par Langerveld étaient de 400 ppb, ce qui est nettement supérieur aux concentrations mesurées dans la Rivière Yamaska, ce qui permet de penser que les concentrations retrouvées dans nos sites sont trop faibles pour affecter l'expression des gènes. De plus, l'étude de l'expression des gènes n'a été faite que pour l'année 2009. Comme nous l'avons mentionné un peu plus tôt, nous pensons que les concentrations de pesticides dans les eaux étant moins élevées cette année là en raison du niveau des eaux. Il serait pertinent de refaire l'analyse d'expression des gènes avec des peaux de ouaouarons capturés sur plusieurs années avec des niveaux d'eau différents et des variations de la concentration de pesticides afin d'avoir une image plus globale de l'effet des pesticides sur l'expression des gènes des différents peptides. Afin de compléter cette étude, il serait pertinent de faire des tests en laboratoire avec des ouaouarons maintenus dans des conditions contrôlées. Ceci va faire l'objet d'un travail futur.

5 Conclusion

Dans les milieux entourés de champs agricoles, la santé des ouaouarons s'avère précaire. Nous avons observé une diminution de l'efficacité de leur système de défense.

La phagocytose, la flambée oxydative ainsi que la présence de peptides antimicrobiens cutanés semblent être affectées par la présence de polluants d'origine agricole, ce qui pourrait favoriser l'augmentation de maladies et expliquer du moins en partie le déclin des amphibiens.

Remerciements : Nous remercions particulièrement Éric Bonneil de l'UdeM pour son analyse au HPLC-MS-MS ainsi que tous les membres du Laboratoire de Michel Fournier, Alain Fournier et Daniel Cyr de l'Institut national de recherche scientifique (INRS-IAF) pour leur aide et leur expertise. Nous tenons également à remercier toute l'équipe de terrain de l'Université du Québec à Montréal (UQAM)

FIGURES ET TABLEAUX

Carte Rivière Yamaska

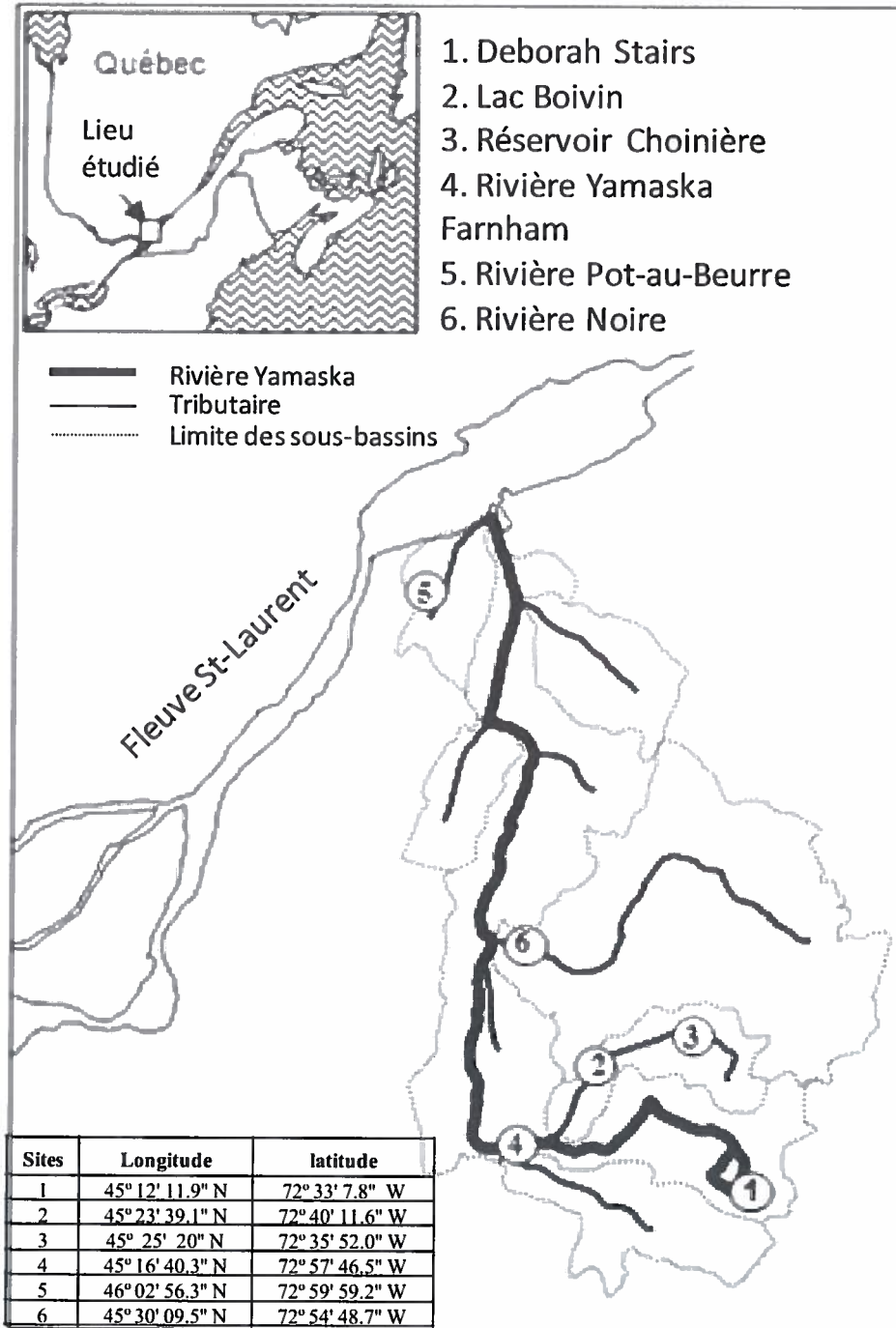


Figure 1 : Carte de la Rivière Yamaska comprenant les différents sites d'échantillonnages ainsi que leur coordonnées géographique, Québec, Canada.

Viabilité des splénocytes pour les années 2008 et 2009

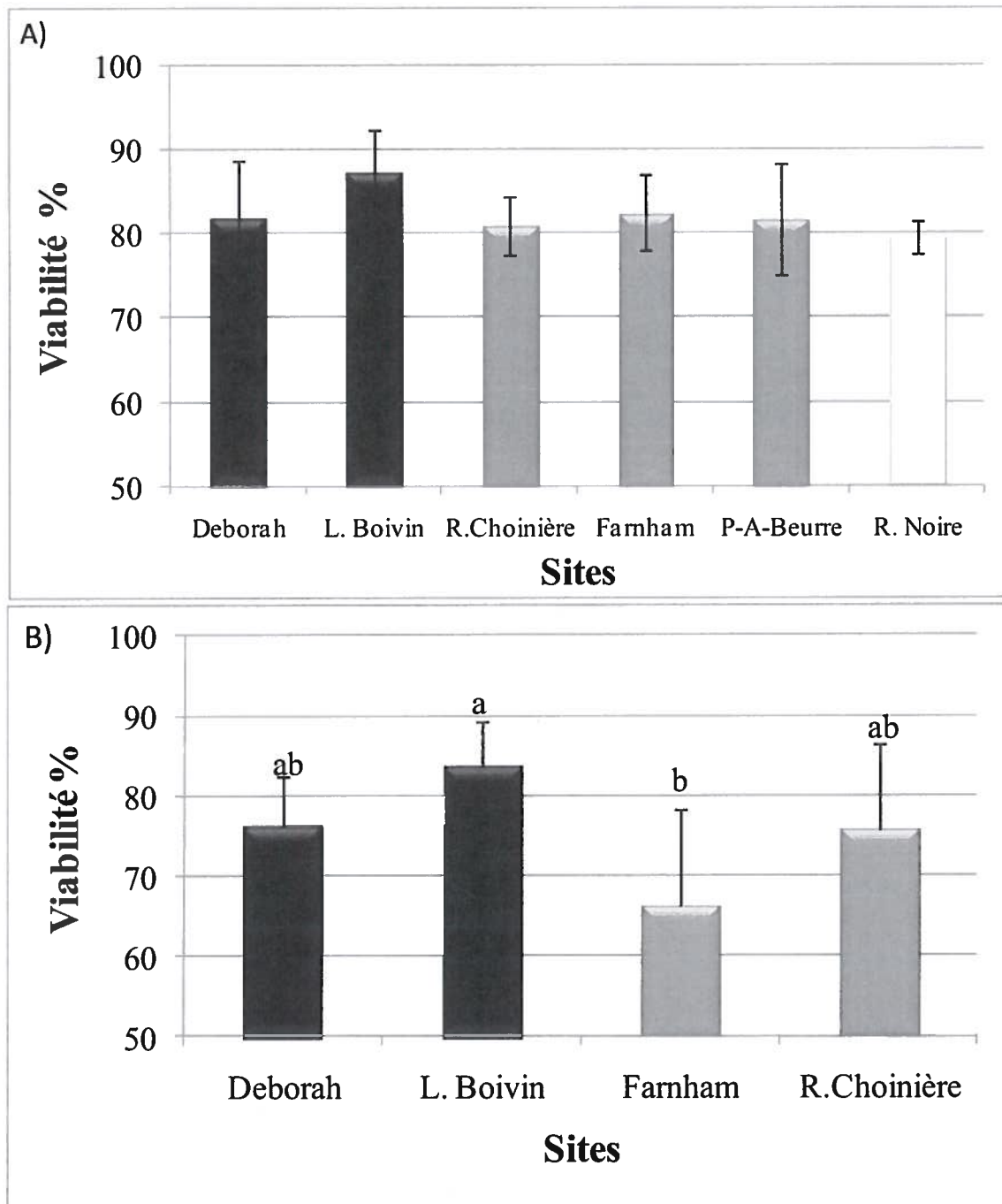


Figure.2: La viabilité des splénocytes est le pourcentage de cellules vivantes en relation avec les différents sites : Deborah et lac Boivin (activité agricole d'intensité faible) en noir, Farnham, Réservoir Choinière et Pot-au-Beurre (activité agricole d'intensité moyenne) en gris et Rivière Noire (activité agricole d'intensité élevée) en blanc. Les lettres différentes indiquent une différence significative ($p \leq 0,05$). En 2008 (A), il n'y a pas de différence significative entre les sites. En 2009 (B), il y a une diminution significative de la viabilité cellulaire pour le site Farnham comparativement au site lac Boivin. $n= 12$ grenouilles pour les deux années.

Activité phagocytaire des macrophages

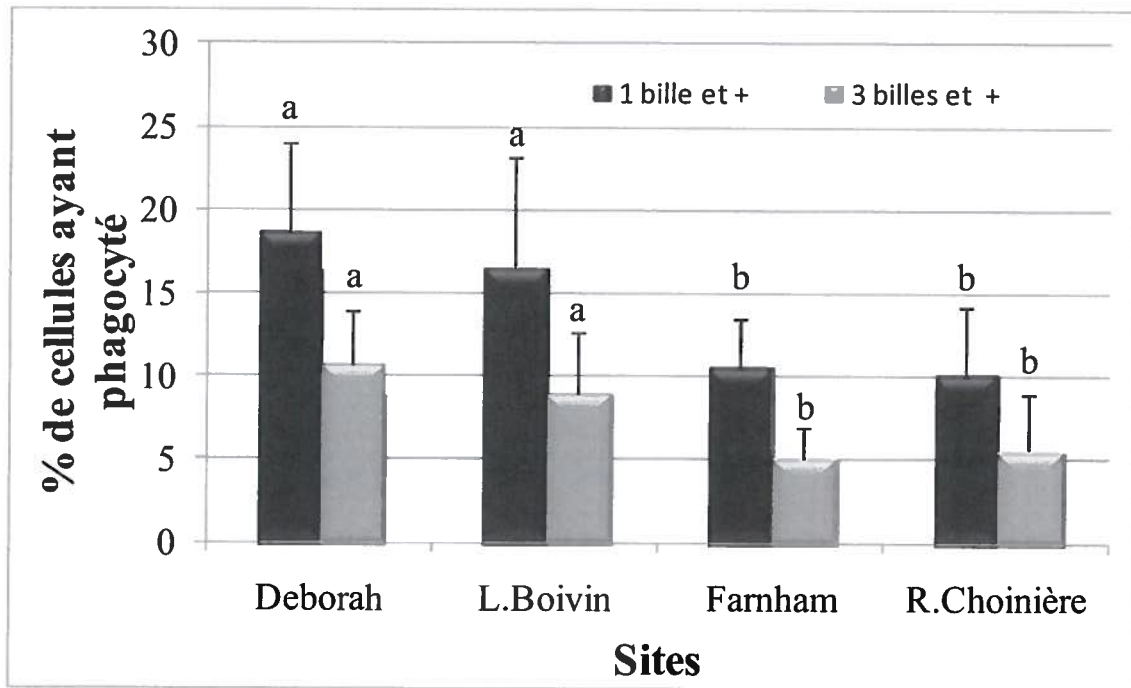


Figure.3: L'activité phagocytaire des macrophages pour l'année 2009 a été étudiée par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en pourcentage de macrophages ayant phagocyté une bille et plus (capacité) et trois billes et plus (efficacité) en fonction des différents sites : Deborah et lac Boivin (activité agricole d'intensité faible), Farnham de même que Réservoir Choinière (activité agricole d'intensité moyenne). Les lettres différentes indiquent une différence significative ($p \leq 0,05$). Dans les milieux à intensité d'activité agricole moyenne, nous avons observé une diminution significative de l'activité phagocytaire. $n = 12$ grenouilles

La flambée oxydative (production de ROS) par les macrophages pour l'année 2009

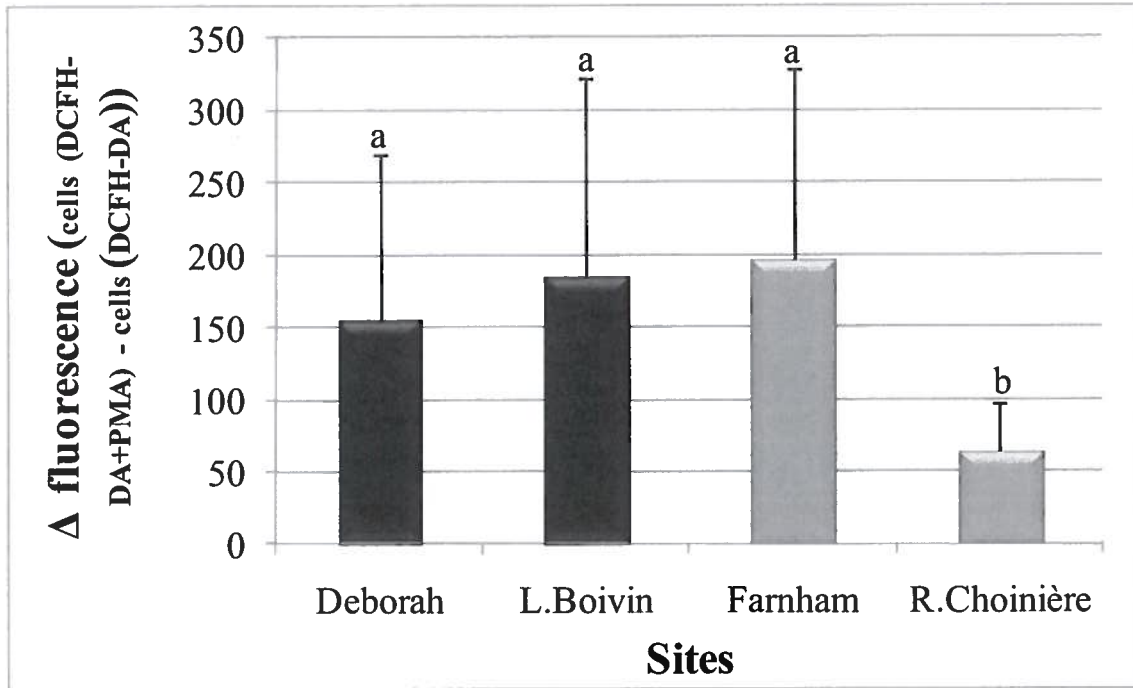


Fig 4: La flambée oxydative est représentée par la différence de la moyenne de fluorescence entre les macrophages DCFH-DA seul et les macrophages DCFH-DA + PMA analysée par cytométrie en flux en relation avec les différents sites : Deborah et lac Boivin (activité agricole d'intensité faible) en noir, Farnham de même que Réservoir Choinière (intensité activité agricole moyenne) en gris. Les lettres différentes indique une différence significative. Au Réservoir Choinière milieu d'activité agricole à intensité moyenne, nous avons observé une diminution significative de la flambée oxydative. $n = 12$ grenouilles par site ($p \leq 0,05$).

Peptides antimicrobiens sur la peau des ouaouarons

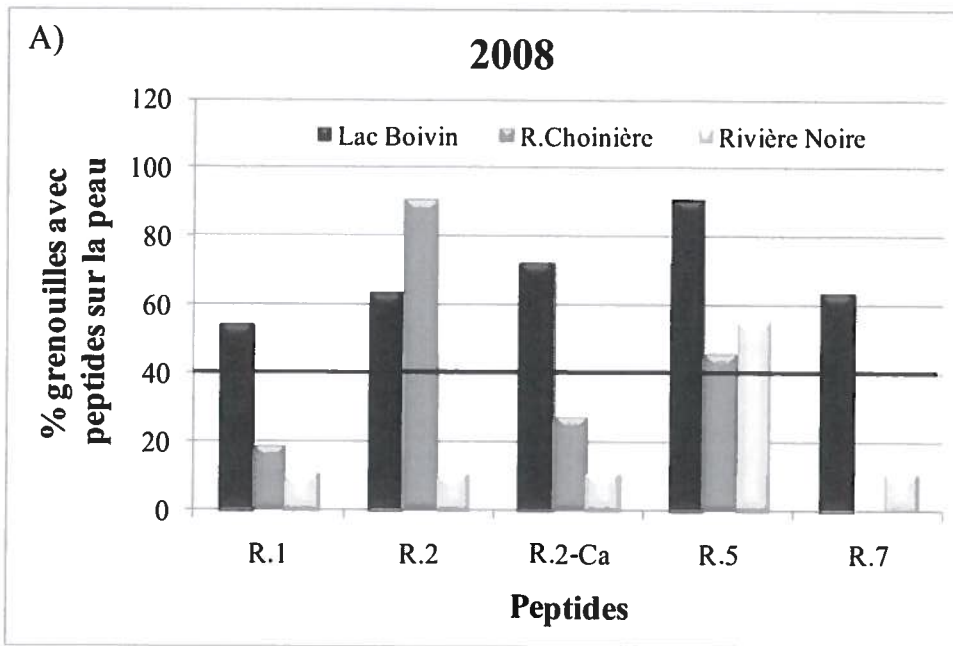


Fig 5A: Les peptides antimicrobiens sont présentés en pourcentage de grenouilles, capturées en 2008, avec présence de peptides sur leur peau en relation avec cinq différents peptides. Les grenouilles proviennent de trois sites échantillonnés avec trois niveaux d'intensité d'activité agricole différents : Lac Boivin (faible) en noir, Réservoir Choinière (moyen) en gris pâle et Rivière Noire (élevé) en gris foncé. Le pourcentage de référence à été placé à 40%. Il y a moins de peptides chez les grenouilles vivants dans des milieux avec une intensité agricole moyenne et forte comparativement aux grenouilles du lac Boivin. $n = 12$

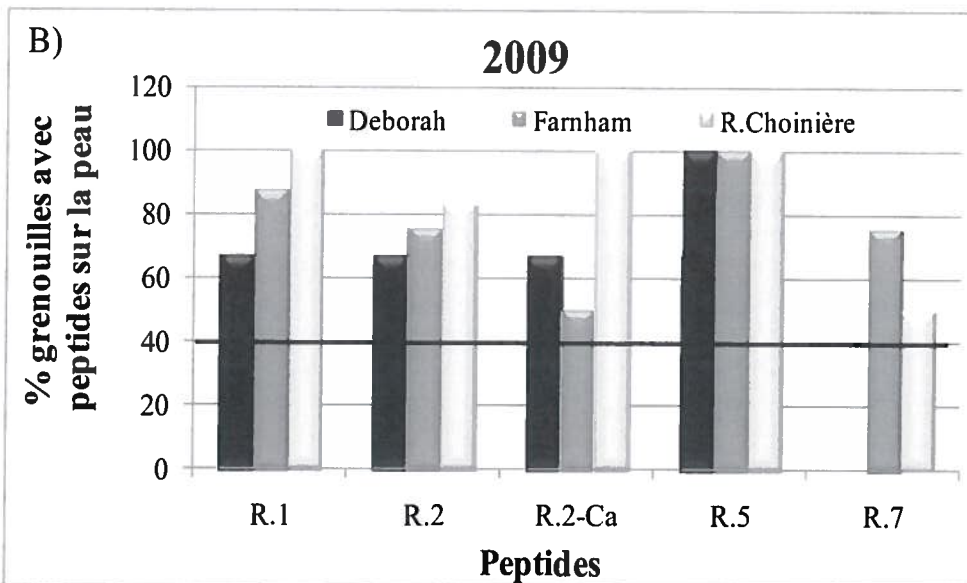


Fig :5B Les peptides antimicrobiens sont présentés en pourcentage de grenouilles, capturées en 2009, avec présence de peptides en relation avec cinq différents peptides. Les grenouilles proviennent de trois sites échantillonnés avec deux niveaux d'intensité d'activité agricole différents : Deborah (faible) en noir, Farnham, Réservoir Choinière (moyen) en gris et blanc. Le pourcentage de référence à été placé à 40%. Il n'y a pas de différence dans la présence de peptides chez les grenouilles en fonction des milieux excepté pour la ranatuerine 7. $n = 6$

Ensemble des peptides recherchés sur la peau du ouaouaron

Gène	No. gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
Ranatuerine 1	FJ842525.1	5' AGAGAGGTGCCGATGAAGAA 3'	5' GCCCAAATTTTGTAGTACCG 3'
Ranatuerine 2Ca	FJ830672	5' GGTGCTGATGAAGACAATGG 3'	5' TTTTCCCGGCTAAACCCTTA 3'
Ranatuerine 3	FJ830656	5' TCTTTCTTGGGACCATCTCC 3'	5' TATCCAACATATGCCAGCA 3'
Ranatuerine 5	FJ842529.1	5' TTCCTGGCACCATCAACTT 3'	5' GAACATCCCTTTCACCTGGA 3'
Ranatuerin 7	FJ842527.1	5' TCTTCCTTGGGACCATCAAC 3'	5' TCCCAAAAATTTACCGAGCA 3'
Ranatuerin 8	FJ842528.1	5' TCTTCCTTGGGACCATCAAC 3'	5' TTTACCGAGAAAACGATGCAA 3'
Beta actine	AB094353.1	5' TGCCTGACATCAAGGAGAAG 3'	5' TTCCGATGGTGTGACTTGA 3'
Ribosomal protein L8	AY452063.1	5' CAGAGCCCATGTAAAGCACA 3'	5' ACAATGCCCTTGATGTAGCC 3'
Alpha-Tibulin	BT081457	5' GGCGGAGATGATTCTTCAA 3'	5' CAGCAGACTCCAGATCCACA 3'

Tableau I : L'ensemble des peptides recherchés avec leur numéro de gène, la séquence des amorces sens et anti-sens ainsi que les séquences d'acides aminés correspondant.

Ensemble des peptides retrouvés sur la peau du ouaouaron

Peptides	Séquences acides aminés	référence
Ranatuerine 1	SMLSVLKLNGLGKVG FVACKINKQC	Goraya <i>et al.</i> 1999
Ranatuerine 2Ca	GVFLDTLKGLAGKMLES LKCKIAGCKP	Conlon <i>et al.</i> 2009
Ranatuerine 3	GFLDIKLN LGKTFAGHMLDKIKCTIGTCPPSP	Goraya <i>et al.</i> 1999
Ranatuerine 5	FLPIASLLGKYL	Goraya <i>et al.</i> 1998
Ranatuerine 7	FISAIASMLGKFL or FLSAIASMLGKFL	Rollin-Smith <i>et al.</i> 2003
Ranatuerine 8	FISAIASFLGKFL	Goraya <i>et al.</i> 1998

Tableau II : Ensemble des peptides retrouvés sur la peau du ouaouaron ainsi que les séquences primaires d'acides aminés s'y rattachant.

Quantification relative de l'ARNm par PCR en temps réel pour l'année 2009

	Ranatuerine 1	Ranatuerine 2Ca	Ranatuerine 3	Ranatuerine 5	Ranatuerine 7	Ranatuerine 8
Deborah	0,239 ± 0,20	0,089 ± 0,06	0,013 ± 0,01	3,695 ± 2,33	14,346 ± 9,03	0,341 ± 0,20
L.Boivin	0,287 ± 0,43	0,095 ± 0,16	0,014 ± 0,01	3,273 ± 1,76	13,628 ± 8,83	1,196 ± 1,31
Farnham	0,251 ± 0,17	0,084 ± 0,04	0,016 ± 0,01	10,962 ± 13,33	22,037 ± 18,61	1,101 ± 1,46
R.Choinière	0,179 ± 0,16	0,040 ± 0,02	0,011 ± 0,01	8,174 ± 7,10	13,078 ± 11,59	1,213 ± 1,15

Tableau III: La Quantification relative par RT-PCR de l'ARNm normalisée avec la β -actine de six peptides retrouvés sur la peau en fonction des différents sites. La quantification est calculée par Delta-CT et l'analyse statistique utilisée est l'ANOVA. Les différents peptides ne sont pas exprimés avec la même intensité, mais il n'y a pas de différence significative entre les sites. $n=6$

Relation entre le pourcentage de peptides et d'ARNm présents pour l'année 2009

	Deborah		Farnham		R.Choinière	
	ARNm	Protéine	ARNm	Protéine	ARNm	Protéine
Ranatuerine 1	100	66,67	100	87,5	100	100
Ranatuerine 2	ND	66,67	ND	75	ND	83,33
Ranatuerine 2CA	100	66,67	100	50	100	100
Ranatuerine 3	100	0	100	0	100	0
Ranatuerine 5	100	100	100	100	100	100
Ranatuerine 7	100	0	100	75	100	50
Ranatuerine 8	100	0	100	0	100	0

Tableau IV : La relation entre les peptides et l'ARNm pour l'année 2009 sont présentés en pourcentage de grenouilles avec présence de peptides sous forme d'ARNm et de protéine en relation avec trois sites avec des niveaux de pollution différents : Deborah (faible), Farnham et le Réservoir Choinière (moyen). L'ARNm et les protéines ne sont pas retrouvés sur le même pourcentage de grenouilles, excepté pour la ranatuerine 5. $n=6$

RÉFÉRENCES

- Allran, J.W., Karasov, W.H. (2001) "Effects of atrazine on embryos, larvae, and adults of anuran amphibians." Environmental toxicology and chemistry, vol.20, no.4, p.769-775
- Alves, R.N., Cordeiro, O., Silva, T.S., Richard, N., De Vareilles, M., Marino, G., Di Marco, P., Rodrigues, P.M., Conceição, L.E.C. (2010) "Metabolic molecular indicators of chronic stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) using comparative proteomics." Aquaculture, vol.299, no.1-4, p.57-66
- Araujo, M.B., Thuiller, W., Pearson, R.G. (2006) "Climate warming and the decline of amphibians and reptiles in Europe." Journal of Biogeography vol.33, p.1712-1728
- Basir, Y.J., Knoop, F.C., Dulka, J., Conlon, J.M. (2000) "Multiple antimicrobial peptides and peptides related to bradykinin and neuromedin N isolated from skin secretions of the pickerel frog, *Rana palustris*." Biochimica and Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology vol.1543, no.1, p.95-105
- Becker, C.G., Fonseca, C.R., Haddad, C.F.B., Batista, R.F., Prado, P.I. (2007) "Habitat Split and the Global Decline of Amphibians." Science vol.318, no.5857, p.1775-1777
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocombe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K.R., Marantelli, G., Parkes, H. (1998) "Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America vol.95, no.15, p.9031-9036
- Blaustein, A.R., Hoffman, P.D., Hokit, D.G., Kiesecker, J.M., Walls, S.C., Hays, J.B. (1994) "UV repair and resistance to solar UV-B in amphibian eggs: a link to population declines?" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America vol.91, no.5, p.1791-1795
- Blaustein, A.R., Kiesecker, J.M., Chivers, D.P., Anthony, R.G. (1997) "Ambient UV-B radiation causes deformities in amphibian embryos." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol.94, no.25, p.13735-13737
- Blaustein, A.R., Romansic, J.M., Kiesecker, J.M., Hatch, A.C. (2003) "Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines." Diversity and Distributions, vol.9, no.2, p.123-140

- Boily, M.H., Bérubé, V.E., Spear, P.A., Deblois, C., Dassylva, N. (2005) "Hepatic retinoids of bullfrogs in relation to Agricultural pesticides." Environmental Toxicology and Chemistry, vol.24, no.5, p.1099-1106
- Bradford, D.F., Tabatabai, F., Graber, D.M. (1993) "Isolation of remaining populations of the native frog, *Rana muscosa*, by introduced fishes in Sequoia and Kings Canyon National Park, California." Conservation Biology, vol.7, no.4, p.882-888
- Brodin, M.A., Madhoun, H., Rameswaran, M., Vatnick, I. (2007) "Atrazine is an immune disruptor in adult Northern leopard frogs (*Rana pipiens*)." Environmental toxicology and chemistry, vol.26, no.1, p.80-84
- Brousseau, P., Payette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boermans, H., Flipo, D., Fournier, M. (1999) Manual of Immunological Method, Washington
- Carey, C., Alexander, M.A. (2003) "Climate change and amphibian declines: is there a link?" Diversity and Distributions, vol.9, no.2, p.111-121
- Carey, C., Cohen, N., Rollins-Smith, L.A. (1999) "Amphibian declines: an immunological perspective." Developmental and Comparative Immunology, vol.23, no.6, p.459-472
- Chia, B.C.S., Lam, Y.H., Dyll-Smith, M., Separovic, F., Bowie, J.H. (2000) "A 31P NMR study of the interaction of amphibian antimicrobial peptides with the membranes of live bacteria." Letters in Peptide Science, vol.7, no.3, p.151-156
- Christin, M-S., Gendron, A.D., Brousseau, P., Ménard, L., Marcogliese, D.J., Cyr, D., Ruby, S., Fournier, M. (2003) "Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection." Environmental toxicology and chemistry, vol.22, no.5, p.1127-1133
- Christin, M-S., Ménard, L., Gendron, A.D., Ruby, S., Cyr, D., Marcogliese, D.J., Rollins-Smith, L.A., Fournier, M. (2004) "Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*." Aquatic Toxicology, vol.67, no.1, p.33-43
- Clark, D., Durell, S., Maloy, W., Zasloff, M. (1994) "Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin." J. Biol. Chem., vol.269, no.14, p.10849-10855
- Conlon, J.M., Al-Dhaheri, A., Al-Mutawa, E., Al-Kharrge, R., Ahmed, E., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Nielsen, P.F., Davidson, C. (2007) "Peptide defenses of the Cascades frog *Rana cascadae*: implications for the evolutionary history of frogs of the Amerana species group." Peptides, vol.28, no.6, p.1268-1274

- Conlon, J.M., Halverson, T., Dulka, J., Platz, J.E., Knoop, F.C.(1999) "Peptides with antimicrobial activity of the brevinin family isolated from skin secretions of the southern leopard frog, *Rana sphenocéphala*." Journal of Peptide Research, vol.54, no.6, p.522-527
- Conlon, J.M., Kolodziejek, J., Nowotny, N. (2009) "Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs." Biochimica and Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, vol.1788, no.8, p.1556-1563
- Conlon, J.M., Sonnevend, A., Davidson, C., Demandt, A., Jouenne, T. (2005) "Host-defense peptides isolated from the skin secretions of the Northern red-legged frog *Rana aurora aurora*." Developmental and Comparative Immunology, vol.29, no.1, p.83-90
- Cunningham, A.A., Langton, T.E.S., Bennett, P.M., Lewin, J.F., Drury, S.E.N., Gough, R.E., Macgregor, S.K. (1996) "Pathological and Microbiological Findings from Incidents of Unusual Mortality of the Common Frog (*Rana temporaria*)." Philosophical Transactions: Biological Sciences, vol.351, no.1347, p.1539-1557
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., Green, D.E., Speare, R. (1999) "Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines." Emerging Infection Diseases, vol.5, no.6, p.735-746
- Davidson, C., Shaffer, H.B., Jennings, M.R. (2002) "Spatial Tests of the Pesticide Drift, Habitat Destruction, UV-B, and Climate-Change Hypotheses for California Amphibian Declines." Conservation Biology, vol.16, no.6, p.1588-1601
- Davis, M.D., Hadley, M.E. (1979) "Central nervous system control of mucous gland secretion from frog skin." Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS), vol.35, no.10, p.1339-1339
- Farcy, E., Serpentine, A., Fiévet, B., Lebel, J-M. (2007) "Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: Transcriptional induction in response to thermal stress in hemocyte primary culture." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, vol.146, no.4, p.540-550
- Forson, D.D., Storfer, A. (2006) "Atrazine increases ranavirus susceptibility in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*." Ecological Applications, vol.16, no.6, p.2325–2332
- Gibble, R.E., Rollins-Smith, L.A, Baer, K.N. (2008) "Development of an assay for testing the antimicrobial activity of skin peptides against the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) using *Xenopus laevis*." Ecotoxicology and Environmental Safety, vol.71, no.2, p.506-513

- Gilbertson, M-K., Haffner, D.G., Drouillard, K.G., Albert, A., Dixon, B. (2003) "Immunosuppression in the Northern leopard frog (*Rana pipiens*) induced by pesticide exposure." Environmental toxicology and chemistry, vol.22, no1, p.101-110
- Giroux I (2010) Présence de pesticides dans l'eau au Québec - Bilan dans quatre cours d'eau de zones en culture de maïs et de soya en 2005, 2006 et 2007 et dans des réseaux de distribution d'eau potable Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'état de l'environnement: 78 pages
- Goraya, J., Knoop, F.C., Conlon, J.M. (1998) "Ranatuerins: Antimicrobial Peptides Isolated from the Skin of the American Bullfrog, *Rana catesbeiana*." Biochemical and Biophysical Research Communications, vol.250, no.3, p.589-592
- Goraya, J., Knoop, F.C., Conlon, J.M. (1999) "Ranatuerin 1T: an antimicrobial peptide isolated from the skin of the frog, *Rana temporaria*." Peptides, vol.20, no.2, p.159-163
- Goraya, J., Wang, Y., Li, Z., O'Flaherty, M., Knoop, F.C., Platz, J.E., Conlon, M.J. (2000) "Peptides with antimicrobial activity from four different families isolated from the skins of the North American frogs *Rana luteiventris*, *Rana berlandieri* and *Rana pipiens*." European Journal of Biochemistry, vol.267, no.3, p.894-900
- Goulet, B.N., Hontela, A. (2003) "Toxicity of cadmium, endosulfan, and atrazine in adrenal steroidogenic cells of two amphibian species, *Xenopus laevis* and *Rana catesbeiana*." Environmental toxicology and chemistry, vol.22, no.9, p.2106-2113
- Halverson, T., Basir, Y.J., Knoop, F.C., Conlon, J.M. (2000) "Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin of the North American green frog *Rana clamitans*." Peptides, vol.21, no.4, p.469-476
- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A. (2003) "Atrazine-Induced Hermaphroditism at 0.1 ppb in American Leopard Frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and Field Evidence." Environmental health perspective, vol.111, no.4, p.568-575
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., Vonk, A. (2002) "Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses." Proceedings of the National Academy of Sciences, vol.99, no.8, p.5476-5480
- Hecnar, S.J., M'Closkey, R.T. (1996) "Regional Dynamics and the Status of Amphibians." Ecology, vol.77, no.7, p.2091-2097
- Houlahan, J.E., Findlay, C.S., Schmidt, B.R., Meyer, A.H., Kuzmin, S.L. (2000) "Quantitative evidence for global amphibian population declines." Nature, vol.404, no.6779, p.752-755

- Johnson, P.T.J., Lunde, K.B., Ritchie, E.G., Launer, A.E. (1999) "The Effect of Trematode Infection on Amphibian Limb Development and Survivorship." Science, vol.284, p.802-804
- Johnson, P.T.J., Lunde, K.B., Thurman, E.M., Ritchie, E.G., Wray, S.N., Sutherland, D.R., Kapfer, J.M., Frest, T.J., Bowerman, J., Blaustein, A.R. (2002) "Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the Western United States." Ecological Monographs, vol.72, no.2, p.151-168
- Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R. (1995) "Synergism between UV-B radiation and a pathogen magnifies amphibian embryo mortality in nature." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol.92, no.24, p.11049-11052
- Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R., Belden, L.K. (2001) "Complex causes of amphibian population declines." Nature, vol.410, no.6829, p.681-684
- Kim, J.B., Halverson, T., Basir, Y.J., Dulka, J., Knoop, F.C., Abel, P.W., Conlon, J.M. (2000) "Purification and characterization of antimicrobial and vasorelaxant peptides from skin extracts and skin secretions of the North American pig frog *Rana grylio*." Regulatory Peptides, vol.90, no.1-3, p.53-60
- Knapp, R.A., Boiano, D.M., Vredenburg, V.T. (2007) "Removal of nonnative fish results in population expansion of a declining amphibian (mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*)." Biological Conservation, vol.35, no.1, p.11-20
- Langerveld, A.J., Celestine, R., Zaya, R., Mihalko, D., Ide, C.F. (2009) "Chronic exposure to high levels of atrazine alters expression of genes that regulate immune and growth-related functions in developing *Xenopus laevis* tadpoles." Environmental Research, vol.109, no.4, p.379-389
- Lawler SP, Dritz D, Strange T, Holyoak M (1999) Effects of Introduced Mosquitofish and Bullfrogs on the Threatened California Red-Legged Frog. Conservation Biology 13: 613-622
- Li, H., Zhang, S. (2002) "*In vitro* cytotoxicity of the organophosphorus insecticide methylparathion to FG-9307, the gill cell line of flounder (*Paralichthys olivaceus*)." Cell Biology and Toxicology, vol.18, no.4, p.235-241
- Marcogliese, D.J., King, K.C., Salo, H.M., Fournier, M., Brousseau, P., Spear, P., Champoux, L., McLaughlin, J.D., Boily, M. (2009) "Combined effects of agricultural activity and parasites on biomarkers in the bullfrog, *Rana catesbeiana*." Aquatic Toxicology, vol.91, no.2, p.126-134
- Marcotte, I., Wegener, K.L., Lam, Y-H., Chia, B.C.S., De Planque, M.R.R., Bowie, J.H., Auger, M., Separovic, F. (2003) "Interaction of antimicrobial peptides from Australian amphibians with lipid membranes." Chemistry and Physics of Lipids vol.122, no.1-2, p.107-120

- McCarthy, I.D., Fuiman, L.A. (2008) "Growth and protein metabolism in red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae exposed to environmental levels of atrazine and malathion." Aquatic Toxicology, vol.88, no.4, p.220-229
- Middleton, E.M., Herman, J.R., Celarier, E.A., Wilkinson, J.W., Carey, C., Rusin, R.J. (2001) "Evaluating Ultraviolet Radiation Exposure with Satellite Data at Sites of Amphibian Declines in Central and South America." Conservation Biology, vol.15, no.4, p.914-929
- Moore, K.S., Bevins, C.L., Brasseur, M.M., Tomassini, N., Turner, H., Eck, M., Zasloff, M. (1991) "Antimicrobial peptides in the stomach of *Xenopus laevis*." J. Biol. Chem, vol.266, p.19851-19857
- Pérez-Casanova, J.C., Hamoutene, D., Samuelson, S., Burt, K., King, T.L., Lee, K. (2010) "The immune response of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) to chronic exposure to produced water." Marine Environmental Research, vol.70, no.1, p.26-34
- Pounds, A.J., Bustamante, M.R., Coloma, L.A., Consuegra, J.A., Fogden, M.P.L., Foster, P.N., La Marca, E., Masters, K.L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S.R., Sanchez-Azofeifa, G.A., Still, C.J., Young, B.E. (2006) "Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming." Nature, vol.439, no.7073, p.161-167
- Primeau, S., La Violette, N., St-Onge, J., Berryman, D. (1999) Le bassin de la Rivière Yamaska: profil géographique, sources de pollution et interventions d'assainissement. In: Ministère de l'Environnement (éd), Le bassin de la Rivière Yamaska: l'état de l'écosystème aquatique, Québec envirodoq no.EN990224
- Rachowicz, L.J., Knapp, R.A., Morgan, J.A.T., Stice, M.J., Vredenburg, V.T., Parker, J.M., Briggs, C.J. (2006) "Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality." Ecology, vol.87, no.7, p.1671-1683
- Reilly, D.S., Tomassini, N., Bevins, C.L., Zasloff, M. (1994) "A Paneth Cell Analogue in *Xenopus* Small Intestine Expresses Antimicrobial Peptides Genes: Conservation of an Intestinal Host-Defense System." The journal of histochemistry and cytochemistry, vol.42, no.6, p.697-704
- Rollins-Smith, L.A. (2009) "The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, vol.1788, no.3, p.1593-1599
- Rollins-Smith, L.A., Carey, C., Conlon, J.M., Reinert, L.K., Doersam, J.K., Bergman, T., Silberring, J., Lankinen, H., Wade, D. (2003) "Activities of Temporin Family Peptides against the Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) Associated with Global Amphibian Declines." Antimicrob. Agents Chemother. vol. 47, no.3, p.1157-1160

- Rollins-Smith, L.A., Carey, C., Longcore, J., Doersam, J.K., Boutte, A., Bruzgal, J.E., Conlon, J.M. (2002a) "Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines." Developmental & Comparative Immunology, vol.26, no.5, p.471-479.
- Rollins-Smith, L.A., Doersam, J.K., Longcore, J.E., Taylor, S.K., Shamblin, J.C., Carey, C., Zasloff, M.A. (2002b) "Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines." Developmental and Comparative Immunology, vol.26, no.1, p.63-72
- Rollins-Smith, L.A., King, J.D., Nielsen, P.F., Sonnevend, A., Conlon, J.M. (2005a) "An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura:Leptodactylidae)." Regulatory Peptides, vol.124, no.1-3, p.173-178.
- Rollins-Smith, L.A., Reinert, L.K., O'Leary, C.J., Houston, L.E., Woodhams, D.C. (2005b) "Antimicrobial Peptide Defenses in Amphibian Skin." Integr. Comp. Biol., Vol.45, no.1, p.137-142
- Rollins-Smith, L.A., Woodhams, D.C., Reinert, L.K., Vredenburg, V.T., Briggs, C.J., Nielsen, P.F., Conlon, M.J. (2006) "Antimicrobial peptide defenses of the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*)." Developmental & Comparative Immunology, vol.30, no.9, p.831-842
- Saito, H., Iwami, S., Shigeoka, T. (1991) "*In vitro* cytotoxicity of 45 pesticides to goldfish GF-scale (GFS) cells." Chemosphere, vol.23, no.4, p.525-537
- Shai, Y., Oren, Z. (2001) "From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides." Peptides, vol.22, no.10, p.1629-1641
- Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D. (1998) "Antimicrobial Peptides from Amphibian Skin: What Do They Tell Us?" Peptide Science, vol.47, no.6, p.435-450
- Smith, G., Temple, K., Vaala, D., Dingfelder, H. (2005) "Effects of Nitrate on the Tadpoles of Two Ranids (*Rana catesbeiana* and *R. clamitans*)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol.49, no.4, p.559-562
- Sonnevend, A., Knoop, F.C., Patel, M., Pál, T., Soto, A.M., Conlon, J.M. (2004) "Antimicrobial properties of the frog skin peptide, ranatuerin-1 and its [Lys-8]-substituted analog." Peptides, vol.25, no.1, p.29-36
- Sparling, D.W., Feller, G.M., McConnell, L.L. (2001) "Pesticides and amphibian population declines in California, USA." Environmental toxicology and chemistry vol.20, no.7, p.1591-1595

- Stopper, G.F., Hecker, L., Franssen, R.A., Sessions, S.K. (2002) "How trematodes cause limb deformities in amphibians." Journal of Experimental Zoology, vol.294, no.3, p.252-263.
- Tellez-Bañuelos, M.C., Santerre, A., Casas-Solis, J., Bravo-Cuellar, A., Zaitseva, G. (2009) "Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan." Fish and Shellfish Immunology, vol.27, no.2, p.105-111.
- Wang, Y., Knoop, F.C., Remy-Jouet, I., Delarue, C., Vaudry, H., Conlon, J.M. (1998) "Antimicrobial peptides of the brevinin-2 family isolate4d from gastric tissue of the frog, *Rana esculenta*". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 253, p.600-603.

CHAPITRE 3

LES ANTIOXYDANTS

1 Introduction

Les radicaux libres sont normalement produits par les cellules des systèmes biologiques. Lorsqu'il y a production en excès de radicaux libres, des dommages aux cellules peuvent être observés, allant jusqu'à causer la mort de certaines d'entre elles. Des produits présents dans l'environnement peuvent causer un stress oxydatif. Les pesticides en sont un bon exemple. L'un des principaux mécanismes de toxicité de ces substances est la peroxydation lipidique (Tuzmen *et al.* 2008; Rastogi *et al.* 2009). Certains pesticides (malathion, lindane et propoxur) possèdent comme particularité d'inhiber l'action d'enzymes (superoxyde dismutase, acétyl-cholinestérase, etc...) donc, la cellule ne pourra plus se protéger (Banerjee *et al.* 1999). D'autres, comme l'atrazine, vont causer des dommages à l'ADN en provoquant des aberrations dans les chromosomes, l'induction de micro-noyaux et des échanges entre les chromatides sœurs chez le têtard de *Rana catesbeiana* à une concentration de 4,8 mg/L, alors que le métolachlore produit ces mêmes dommages à des concentrations de 1 mg/L (Clements *et al.* 1997; Singh *et al.* 2008). Ces modifications à l'ADN peuvent entraîner des problèmes de santé graves chez divers organismes, comme des cancers, qui seront prévenus ou traités par des antioxydants. D'après Miller *et al.* (1996), le β -carotène et la β -cryptoxanthine ont une capacité antioxydante très élevée et elles sont des précurseurs de la vitamine A (rétinol). De plus, les carotènes sont également importantes pour la régulation de la fluidité membranaire (Gruszecki, 2004).

En plus d'avoir des effets antioxydants, ces molécules jouent d'autres rôles importants dans le système. Par exemple, le rétinol est un élément essentiel car, il est métabolisé en acide rétinoïque, qui est impliqué dans un grand nombre de mécanismes cellulaires (Benson *et al.* 2007; Manicassamy et Pulendran 2009). C'est la raison pour

laquelle il est soupçonné de contribuer, entre autres, aux malformations des membres et au dérèglement du système immunitaire (Blomberg *et al.* 1980; Blomhoff 1994; Ertesvag *et al.* 2002; Benson *et al.* 2007; Mora *et al.* 2008; Manicassamy et Pulendran 2009).

Puisque les antioxydants sont essentiels au maintien de la santé, nous nous sommes intéressés à l'effet des pesticides sur des antioxydants. Dans ce contexte, nous avons basé notre étude sur la peau des ouaouarons exposés à des pesticides d'origine agricole, car cet organe est en contact direct avec ces produits. Le but est de comparer la quantité de rétinol, de caroténoïdes et de vitamine E présents, en fonction des niveaux d'activités agricoles et ce, afin d'évaluer un effet potentiel de la pollution sur ces mêmes antioxydants.

2 Matériels et méthodes

L'extraction des carotènes, du rétinol et de la vitamine E a été effectuée selon la méthode de Yan *et al.* 2006. La peau a été prélevée et congelée à -20 °C durant 5 mois. Environ 300 mg de peau ont été coupés et broyés finement sur glace avec 4 ml d'hexane + 1% de butylhydroxytoluène (BHT). L'homogénat a été soniqué sur glace durant 10 minutes et centrifugé à température pièce durant 5 minutes. Un volume de surnageant (2 ml) a été évaporé (Vacufuge plus, Eppendorf, Germany). Le culot a été suspendu dans 300 μ l de MeOH 100 % et filtré (Millipore, FHLC, Ireland) à 0,45 μ M. Un volume de l'homogénat (70 μ L) a été injecté dans une HPLC.

2.1 HPLC analyse

Le système d'HPLC à phase-inverse (Water Corporation, Milford, MA, USA) consiste en un logiciel Millénaire installé sur un ordinateur Pentium II, une pompe modèle 510, un détecteur d'absorbance modèle 486 et un injecteur modèle 7725i (Rheodyne). La phase mobile pour les rétinoïdes et la vitamine E est en gradient et comprend deux solutions ; A) le méthanol à 95 :5 (méthanol : eau distillé) pour temps 0 à 12 minutes à absorbance variable (325 nm de 0 à 4,5 min et 350 nm de 4,5 à 12 min) et B) le méthanol à 100% pour le reste du temps à une absorbance de 250 nm. La phase

mobile pour les carotènes est en isocratique avec une solution de MeOH 57% / THF 38% / H₂O 5% à une absorbance de 450 nm. La vitesse d'écoulement est de 1 ml/min. Les rétinoïdes, les carotènes et la vitamine E ont été séparés sur une colonne analytique C18 Inertsil (chromatographie société des sciences, Brockville, Ont, Canada; 150A-ODS2; 250 mm x 4,6 mm; 5µm).

2.2 Statistiques analyses

Les concentrations cutanées du rétinol, des caroténoïdes (canthaxanthine, carotènes, β-cryptoxanthine) et de la vitamine E (α-tocophérol) ont été comparées entre les sites par une analyse de variance à un critère de classification (ANOVA). En cas d'ANOVA significatif, les données ont été soumises à un test de comparaisons multiples pour identifier les différences entre les groupes. Le Tukey a été utilisé suite à l'ANOVA et le student T pour les comparaisons entre deux sites. Il est à noter que les données ayant été jugées aberrantes selon la valeur « D » de Cook (3 fois l'écart-type) ont été retirées.

3 Les résultats

La concentration de rétinol et de β -cryptoxanthine

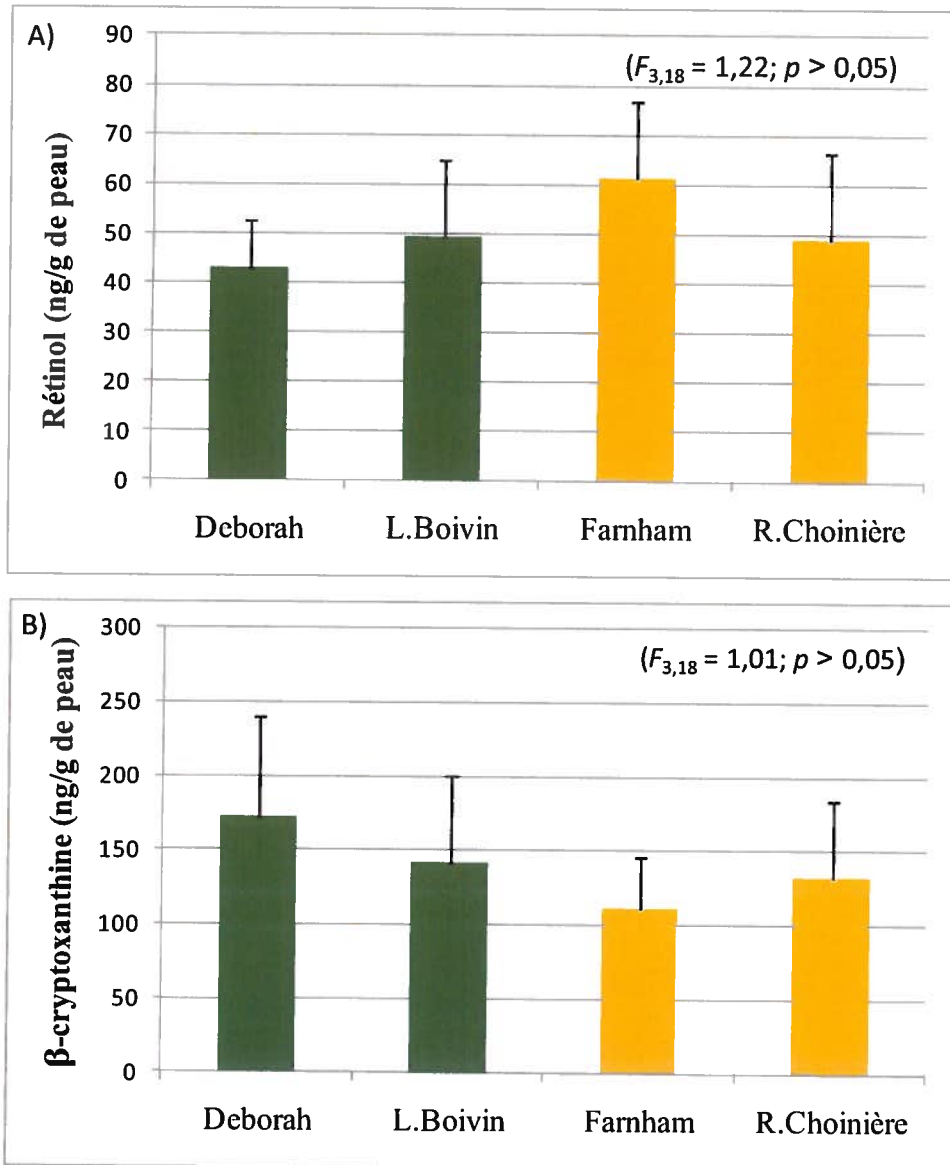


Figure.1: La concentration de rétinol (A) et de β -cryptoxanthine (B) (ng/g de peau) présente dans les extraits de peau des ouaouarons en relation avec différents sites: Deborah et lac Boivin (activité agricole à intensité faible), Farnham et Réservoir Choinière (activité agricole à intensité moyenne). Il n'y a pas de différence significative entre les sites. $n = 6 \rightarrow$ Deborah, L.Boivin, R.Choinière, $n = 4 \rightarrow$ Farnham

La figure 1 représente la concentration de rétinol (A) et de β -cryptoxanthine (B) en ng/g exprimée dans les extraits de peau des ouaouarons provenant de divers sites échantillonnés. Il n'y a aucune différence significative entre les sites.

La concentration de carotènes

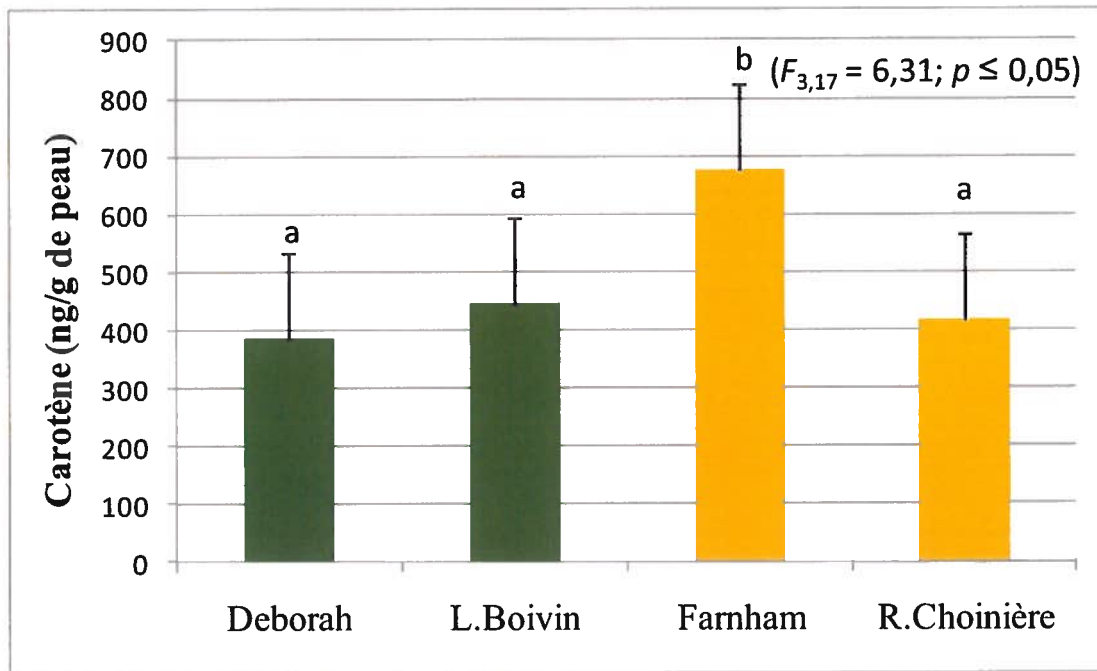


Figure.2: La concentration de carotènes (ng/g de peau) présente dans les extraits de peau des ouaouarons en relation avec différents sites: Deborah et lac Boivin (activité agricole à intensité faible), Farnham et Réservoir Choinière (activité agricole à intensité moyenne). Les lettres différentes démontrent une différence significative de $p \leq 0,05$ entre elles. Il y a une différence significative entre l'ensemble des sites et le site Farnham. $n = 6 \rightarrow$ Deborah, R.Choinière, $n = 5 \rightarrow$ L.Boivin, $n = 4 \rightarrow$ Farnham

La figure 2 représente la concentration de carotènes (ng/g) exprimée dans les extraits de peau des ouaouarons provenant de divers sites échantillonnés. Les résultats démontrent une différence significative ($p < 0,05$) entre Farnham et les autres sites.

La concentration de canthaxanthine

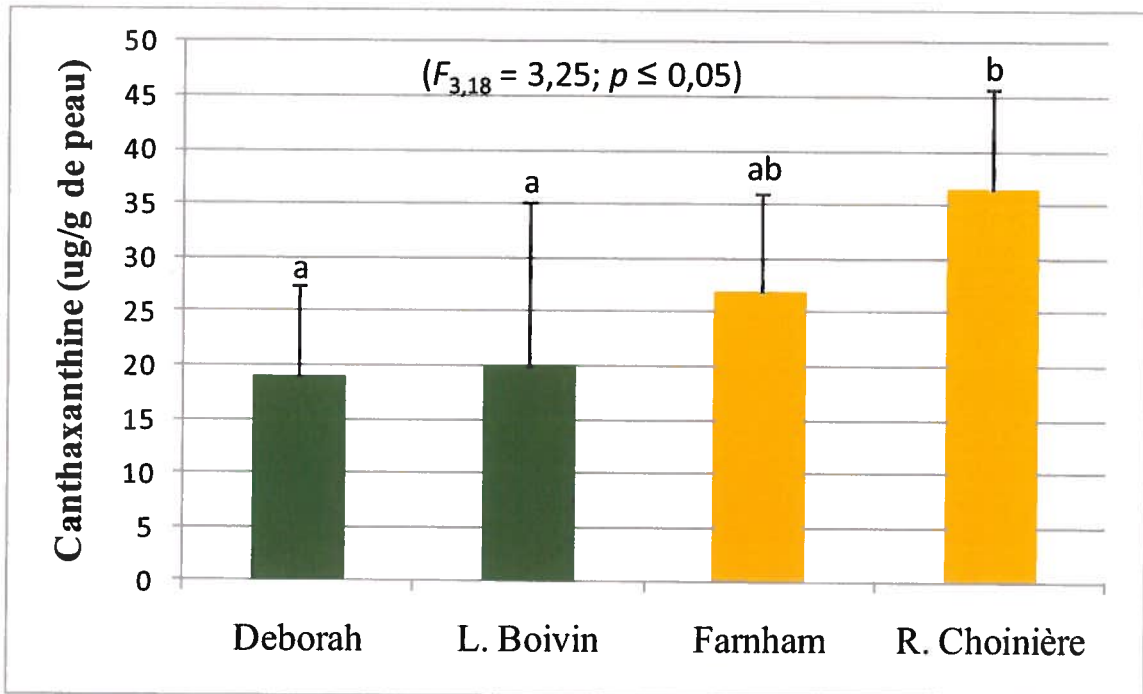


Fig.3: La concentration de canthaxanthine (ng/g de peau) présente dans les extraits de peau des ouaouarons en relation avec différents sites: Deborah et lac Boivin (activité agricole à intensité faible), Farnham et Réservoir Choinière (activité agricole à intensité moyenne). Les lettres différentes démontrent une différence significative de $p \leq 0,05$ entre elles. Il y a une différence significative entre R. Choinière et les sites à faible intensité agricole. $n = 6 \rightarrow$ Deborah, L.Boivin, R.Choinière, $n = 4 \rightarrow$ Farnham

La figure 3 représente la concentration de canthaxanthine (ng/g) exprimée dans les extraits de peau des ouaouarons provenant de divers sites échantillonnés. Les résultats démontrent que la peau des grenouilles provenant du site R.Choinière présente de façon significative ($p < 0,05$) une plus grande concentration de canthaxanthine que les sites à faible intensité agricole.

La concentration de vitamine E

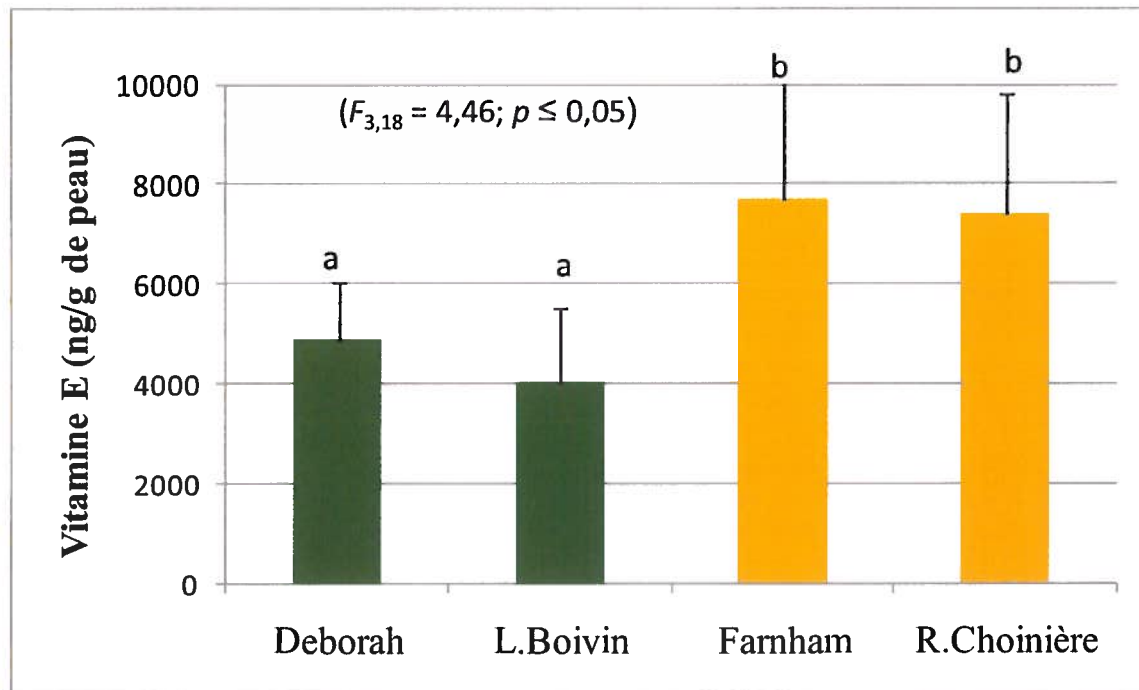


Fig.4: La concentration de vitamine E (ng/g de peau) présente dans les extraits de peau des ouaouarons en relation avec différents sites: Deborah et lac Boivin (intensité activité agricole faible), Farnham et Réservoir Choinière (intensité activité agricole moyenne). Les lettres différentes démontrent une différence significative de $p \leq 0,05$ entre elles. Il y a une différence significative entre les sites à faible intensité agricole et les sites à intensité moyenne. $n = 6 \rightarrow$ Deborah, L.Boivin, R.Choinière, $n = 4 \rightarrow$ Farnham

La figure 4 représente la concentration de vitamine E (ng/g) exprimée dans les extraits de peau des ouaouarons provenant de divers sites échantillonnés. Les résultats démontrent que la peau des grenouilles provenant des sites à soumis à une intensité moyenne d'activité agricole présente de façon significative ($p < 0,05$) une plus grande concentration de vitamine E que les sites à faible intensité agricole.

4 Discussion

Certains pesticides peuvent engendrer un stress oxydatif et provoquer des dommages cellulaires importants (Clements *et al.* 1997; Banerjee *et al.* 1999; Dorval *et al.* 2003; Rastogi *et al.* 2009; Jin *et al.* 2010). Ces dommages affectent le bon fonctionnement cellulaire (Lioi *et al.* 1998). Dans notre étude, nous dénotons une augmentation de la concentration de trois antioxydants étudiés dans des extraits de peau du ouaouaron (carotènes, canthaxanthine et vitamine E) dans les milieux présentant une plus forte intensité d'activité agricole. Nous savons, suite à une analyse effectuée par le MDDEP en 2008, que les sites Farnham et Réservoir Choinière présentent des quantités plus élevées de pesticides que les autres sites (appendice 2).

En sachant que les pesticides peuvent provoquer des stress oxydatifs, il est possible de suggérer que la majorité des antioxydants étaient demandés en plus grande quantité dans la peau des grenouilles en présence de ces contaminants. Il a déjà été démontré que la présence de contaminants (organochlorés (OCs) et organophosphorés (OPs)) augmentait l'activité de certaines enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase (SOD), glutathion, catalase (CAT), ethoxyresorufin O-deethylase (EROD), etc...) (Venturino *et al.* 2003; Melancon *et al.* 2006; Falfushinska *et al.* 2008). Dans ce contexte, il serait intéressant de vérifier si l'activité de ces enzymes antioxydantes est altérée chez les grenouilles capturées dans les milieux avec une plus forte intensité d'activité agricole. Il est important de spécifier que le laboratoire de Thomas Sanderson (l'INRS-IAF) étudie présentement l'enzyme microsomal ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) (induction cytochrome p450).

La concentration de rétinol présente dans les extraits de peau n'est pas affectée par la présence et la quantité de pesticides. Nous pouvons cependant remarquer une tendance à une augmentation de rétinol dans les sites plus pollués. Bérubé *et al.* (2005) ont démontré une diminution significative du rétinol plasmatique dans les sites ayant un niveau d'activité agricole plus élevé. Puisque le rétinol se rend aux cellules de la peau en passant par le plasma, nous nous attendions à une diminution de sa présence au niveau de

la peau au contact de pesticides. Afin d'expliquer ces résultats, nous nous permettons d'émettre des suppositions. Normalement, dans la cellule, le rétinol est transformé en acide rétinoïque par l'action de l'enzyme ROLDH (Novák *et al.* 2008). Il est possible qu'une inhibition de cette enzyme provoque une légère augmentation du rétinol cellulaire. Il a été démontré que la présence de produits toxiques peut affecter l'activité de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme de la vitamine A. En effet, les enzymes ARAT, LRAT et le HER sont affectées par des pesticides (Jensen *et al.* 1987; Nilsson *et al.* 1996, 2000; Ndayibagira et Spear, 1999; Boily *et al.* 2003; Boily *et al.* 2009).

Dans un autre ordre d'idée, une augmentation de la demande en rétinol au niveau de la peau est possible. Les différentes substances avec lesquelles les cellules cutanées sont en contact peuvent augmenter le taux de mortalité cellulaire (Vera-Candiotti *et al.* 2010). Dans ce cas, dans un processus de compensation, il y aura une augmentation de la multiplication cellulaire, ce qui augmenterait le besoin en rétinol et surtout, en acide rétinoïque. Suite à ces dommages, les cellules doivent se régénérer afin d'optimiser les différentes fonctions de la peau. L'acide rétinoïque joue un rôle très important dans cette régénération cellulaire (Thoms et Stocum, 1984). Toutefois, il a déjà été démontré que la pollution pouvait affecter l'emmagasiner dans le foie et le transport du dans le plasma du rétinol (Thunberg *et al.* 1980; Bérubé *et al.* 2005; Boily *et al.* 2005). Il n'y aura alors qu'une faible augmentation de rétinol dans la cellule et la régénération de la peau sera alors limitée, ce qui pourrait mettre en danger la santé des grenouilles. De plus, notons que les connaissances sur le cycle et les lieux de stockage du rétinol pour la grenouille sont encore très limitées. Dans ce contexte, il est possible de penser que le rétinol retrouvé dans les cellules de la peau provient d'un autre organe que le foie. Cette supposition expliquerait, du moins en partie, les résultats obtenus jusqu'à maintenant. Dans un même ordre d'idée, puisque les connaissances concernant le rétinol des cellules de la peau des ouaouarons sont limitées, il est plausible que le rétinol des cellules de la peau et celui du plasma soit de source différente. Ceci amènerait à repenser le lien entre le taux du rétinol plasmatique et celui des cellules dermiques.

La vitamine E se trouve en plus grande quantité dans les milieux plus pollués et ce, de façon significative pour Réservoir Choinière. Bien que ses effets antioxydants font

l'objet de nombreuses études, son mécanisme intracellulaire et son excrétion cellulaire demeurent des domaines encore très peu connus. Il est possible que l'augmentation de cette vitamine, dans les cellules de la peau du ouaouaron, soit due à une inhibition des mécanismes mis en place par le système lors de sa régulation intracellulaire. En effet, ce mécanisme étant encore peu connu et n'ayant fait l'objet d'aucune publication scientifique, il n'est pas impossible que des enzymes soient impliquées. Diverses observations semblent indiquer que des pesticides peuvent avoir des effets inhibiteurs ou stimulants sur certaines enzymes. Plusieurs études relatent l'effet modulateur des pesticides sur les enzymes des grenouilles. En effet, dans une étude de Widder et Bidwell (2008), il y a une inhibition de l'activité de cholinestérase chez les têtards de la rainette criarde (*Hyla chrysoscelis*), de la grenouille léopard du sud (*Rana sphenoccephala*), de la rainette faux-grillon (*Acris crepitans*) et du crapaud de Narrowmouth (*Gastrophryne olivacea*) par le pesticide chlorpyrifos. Toutefois, une activation de l'activité de la catalase au niveau du foie a été observée chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) avec l'atrazine (Salaberria *et al.* 2009). Ceci met de l'avant l'effet possible des pesticides sur l'activité enzymatique, ce qui laisse supposer une action semblable sur des enzymes en lien avec la vitamine E. Cette hypothèse est plausible pour l'ensemble des antioxydants retrouvés en plus forte concentration dans les milieux plus pollués, tels les carotènes et la canthaxanthine.

Nous savons que la vitamine E est transportée à l'aide de lipoprotéines qui se trouvent dans le plasma (Burton, 1994). L'augmentation de cette vitamine au niveau de la peau peut provenir d'un effet indirect, en affectant plutôt ses transporteurs. Il a déjà été démontré que chez le rat exposé au malathion, il y a une augmentation de la concentration de LDL dans le plasma (Lasram *et al.* 2009). Il n'est pas exclu que d'autres pesticides puissent avoir cet effet également chez la grenouille. Une augmentation de la protéine de transport pourrait avoir comme conséquence d'augmenter l'apport de vitamine E dans différentes cellules. Bien sûr, afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de faire une analyse chez le ouaouaron provenant des sites plus pollués, afin de vérifier si le niveau des différentes protéines de transport de type LVDL et VDL dans le plasma est augmenté.

Afin d'obtenir une image plus globale, il serait intéressant de vérifier l'effet des pesticides sur un ensemble de mécanismes touchant la vitamine E, la canthaxanthine et les carotènes. Dans ce sens, il serait pertinent d'estimer leur niveau hépatique sous leurs formes emmagasinées. Si l'apport de ces antioxydants au niveau de la peau provient du foie, ceci pourrait affecter leur quantité mise en réserve. Une diminution de stockage, par exemple de la vitamine E, pourrait affecter à long terme la santé de l'animal sous d'autres aspects.

La présence accrue de certains antioxydants dans les cellules cutanées peut avoir des effets très bénéfiques pour la santé de l'animal. En effet, plusieurs études ont démontré que ces molécules possédaient des propriétés protectrices pour les cellules. Mathews-Roth et Krinsky (1985) ont démontré des suppléments de β -carotène et de canthaxanthine pourraient aider à prévenir ou à retarder l'apparition de cancers de la peau causés par les rayons UVB. De plus, la β -carotène a également des effets antitumoraux sur le cancer des ganglions chez la souris (Tomita *et al.* 1987). La diminution de tumeurs pourrait être due, entre autres, à l'augmentation de l'efficacité des cellules NK à provoquer la lyse cellulaire chez les cellules cancéreuses (Carlos *et al.* 1997). Chez le rat, Singh *et al.*, (2010) ont démontré que la vitamine E atténuait l'effet du stress oxydatif au niveau du foie causé par l'atrazine. Le mélange de vitamine E, 13-*cis*-acide rétinoïque, canthaxanthine et de β -carotène diminuerait également l'apparition de tumeurs au niveau de la bouche de hamsters (Shklar et Schwartz, 1988). Avec ces informations, nous pouvons présumer un effet positif de la présence de ces substances.

Par contre, une trop grande quantité de ces molécules peut s'avérer nocive. Il a été observé que la canthaxanthine interagissait avec les lipides en modifiant la surface membranaire et en favorisant l'agrégation des vésicules lipidiques chez l'humain (Sujak *et al.* 2005). Cette interaction pourrait provoquer des maladies graves, telles la rétinopathie, la dystrophie réticulaire et même l'anémie (Sujak, 2009).

Pour conclure, dans cette étude, la différence entre mâles et femelles n'a pas pu être apportée car le nombre de femelle et de mâle n'était pas suffisant. Il serait intéressant de se pencher sur les concentrations des antioxydants en relation avec le sexe des

individus. En effet, il est possible que le sexe joue un rôle sur le niveau des antioxydants dans les cellules cutanées des ouaouarons.

CHAPITRE 4 :

L'IMPACT D'UNE EXPOSITION *IN VITRO* DE SPLÉNOCYTES DU XENOPUS (*XENOPUS LAEVIS*) À L'ATRAZINE ET LE MÉTOLACHLORE SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE.

1 Le Xenopus

Dans cette étude *in vitro*, le *Xenopus* a été privilégié comme espèce cible et ce, pour plusieurs raisons. Tout d'abord, c'est l'espèce de grenouille la plus étudiée, ce qui permet d'avoir accès à un grand nombre d'informations concernant son métabolisme. D'autre part, cette espèce de grenouille est entièrement aquatique, ce qui facilite grandement son entretien tout au long de la recherche et surtout les expositions.

Un test *in vitro* a été ajouté à mes recherches sur le terrain afin de permettre une image plus exhaustive de l'effet toxique sur le système immunitaire, de deux pesticides présents en plus forte concentration dans les eaux échantillonnées soit l'atrazine et le métolachlore. Cette expérience apporte une vision subsidiaire à mon étude.

2 Matériel et méthode

2.1 Condition des xénopes

Les xénopes post-métamorphose pesant entre ont été gardés dans des aquariums avec un temps d'acclimatation de 14 jours, à raison de 5 grenouilles par 3,78 L d'eau déchlorée et tenue à une température de 21 °C. Ils ont été nourris deux fois par semaine avec de la nourriture spécifique aux amphibiens (Frog brittle chow ®). L'eau a été changée deux fois par semaine, en conservant 10% de l'eau usée. La photopériode a été établie à 12 h de lumière et 12 h de noirceur. Les grenouilles sont euthanasiées par immersion dans de l'eau contenant 0,1% de tricane méthanesulfonate (MS222) (Sigma, St-Louis, MO, USA).

2.2 Les produits chimiques

Les pesticides utilisés sont l'atrazine ($C_8H_{14}C_1N_5$ pure à 99 %) et le métholachlore ($C_{15}H_{22}C_1NO_2$ pure à 98 %), ils proviennent de Sigma, St-Louis, CA.USA. L'atrazine et le métolachlore ont été solubilisés séparément dans du DMSO à une concentration de 1 et de 10 %. Les concentrations d'atrazine variaient de 0.5, 5, 50, 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$, tandis que la concentration de métolachlore restait à 15 $\mu\text{g/ml}$.

2.3 La Rate

La rate a été prélevée et déposée dans du RPMI complet (RPMI-1640/eau (1 :1), enrichie avec 10 mM HEPES, 10 % (v/v) sérum de veau (BSA) et 1 % penicilline et streptomycine, pH 7.4) (Sigma, St-Louis, MO, USA). Elle a été par la suite broyée délicatement à la main à l'aide d'un petit potier. Les rates étant très petites, le nombre de cellules par ml était très faible. La concentration cellulaire a été ajustée entre 60 000 et 300 000 cellules/ml avec du RPMI complet. Celles-ci ont été ensuite pré-incubées en présence de produits toxiques d'exposition aux concentrations voulues durant 5 heures à l'abri de la lumière et à la température de la pièce.

2.4 Viabilité

Après l'incubation, les cellules ont été mises en contact avec de l'iodure de propidium (PI) durant 2 minutes. L'analyse de la viabilité a été faite par cytométrie en flux (FACscan, Becton Dickinson, San Jose, Ca, USA), avec une acquisition de 5 000 cellules par événement. L'émission de la fluorescence a été captée à 527 nm (FL1). L'analyse du nuage cellulaire (Dot Plot) estime deux paramètres : leur taille pour l'axe des X (FSC) et leur complexité pour l'axe des Y (SSC).

2.5 Phagocytose

Des billes fluorescentes ont été ajoutées aux cellules pour atteindre un ratio billes/cellules (100 :1). Ce mélange a été incubé durant 18 heures à l'obscurité. Le tout a ensuite été déposé délicatement sur 4 ml de solution de gradient (RPMI complet et 3 % BSA) et centrifugé à 138 x g durant 7 minutes. Le surnageant a été jeté et les cellules ont

été suspendues dans 300 µl de solution de fixation (0,2 % de sodium azide, 0,5 % de formaldéhyde, PBS). La mesure de la phagocytose a été faite par cytométrie en flux avec une acquisition de 10 000 cellules. Les lectures ont été effectuées à un absorbance de 228 nm (FL1). Les résultats obtenus vont permettre de quantifier le nombre de cellules ayant phagocyté 1 bille et plus (capacité phagocytaire) et 3 billes et plus (efficacité phagocytaire).

2.6 Analyses statistiques

La viabilité cellulaire et l'activité phagocytaire ont été comparées entre les sites par une analyse de variance à un critère de classification (ANOVA). En cas d'ANOVA significatif, les données ont été soumises à un test de comparaisons multiples pour identifier les différences entre les groupes (Tuckey).

3 Résultats

3.1 Atrazine et métolachlore

La viabilité des splénocytes exposés à l'atrazine et au métolachlore

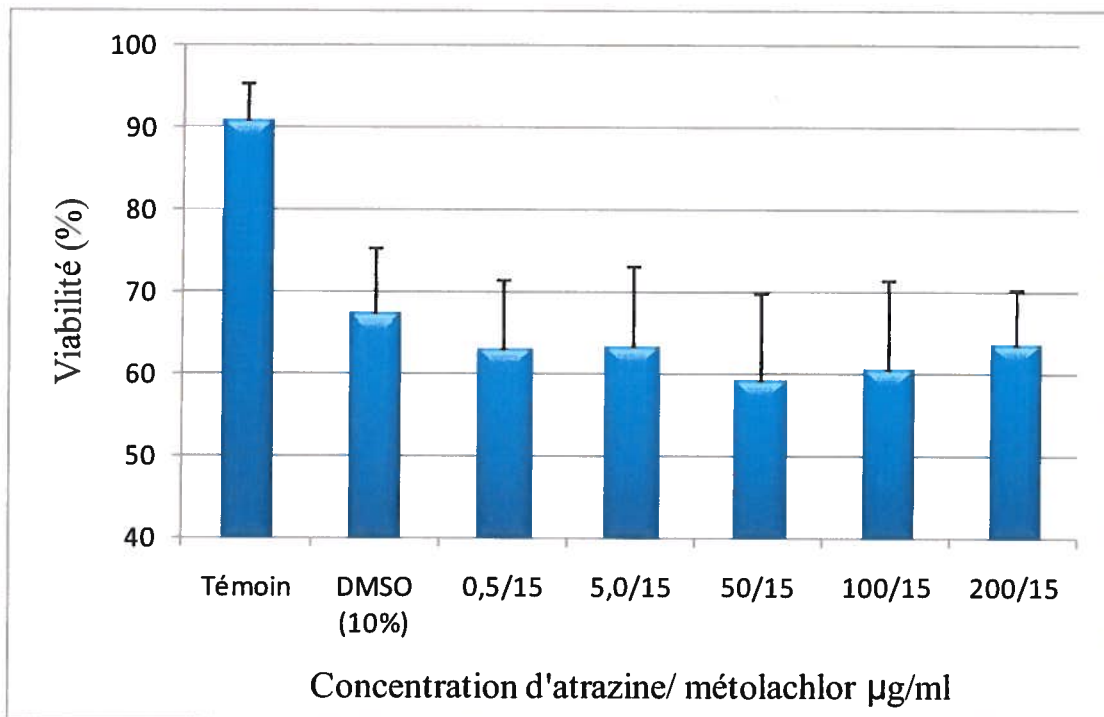


Figure. 1 : Le pourcentage de macrophages vivants en fonction des différentes concentrations d'atrazine allant de 0,5 à 200 µg/ml, ainsi qu'une concentration constante de métolachlore à 15 µg/ml. Il n'y a pas de différence significative. ($n = 10$)

Activité phagocytaire des macrophages exposés à l'atrazine et au métolachlore

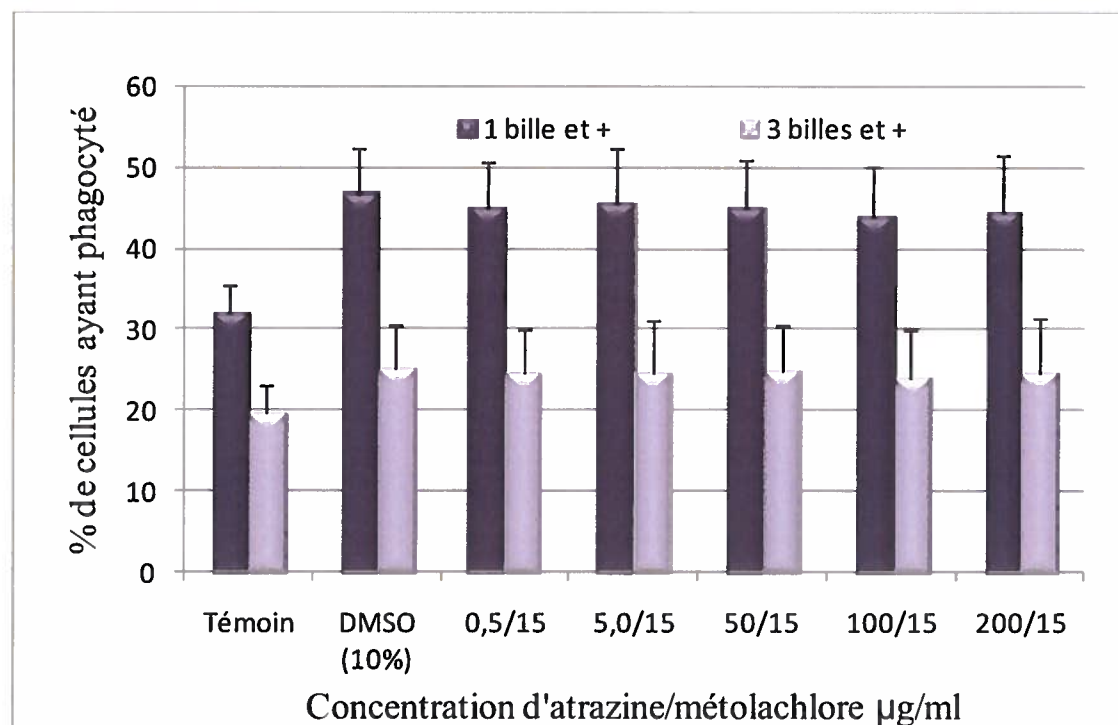


Fig. 2: Le pourcentage de macrophages ayant phagocyté 1 bille et plus ou 3 billes et plus, en fonction des différentes concentrations d'atrazine allant de 0,5 à 200 µg/ml, ainsi qu'une concentration constante de métolachlore à 15 µg/ml. Il n'y a pas de différence significative et le DMSO augmente le taux de phagocytose. ($n = 10$)

Au début, nous voulions faire une courbe dose-réponse avec deux pesticides soit : l'atrazine et le métolachlore. C'est deux pesticides sont ceux retrouvés en forte concentration dans les cours d'eau échantillonnés. Nous avons vite constaté que le DMSO à 10% affectait la viabilité cellulaire ainsi que l'activité phagocytaire. Nous devons donc diminuer la concentration de DMSO. Pour définir cette nouvelle concentration, nous nous sommes basé sur l'étude de Tseng *et al.* (2007) qui ont travaillé avec des pesticides en contact avec l'amphibien *Xenopus laevis*. Nous avons donc diminué la concentration de DMSO à 1%. Suite à cette information, nous avons décidé de refaire l'analyse de l'effet des pesticides sur la viabilité et la phagocytose. Toutefois, nous avons commis l'erreur de diluer au début l'ensemble de l'atrazine, sans faire une solution mère. Par conséquent, il nous était impossible de diminuer la concentration de DMSO pour l'atrazine. C'est pourquoi la courbe dose-réponse finale n'est effectuée qu'avec le métolachlore.

3.2 Métholachlore

La viabilité des macrophages exposés au métholachlore

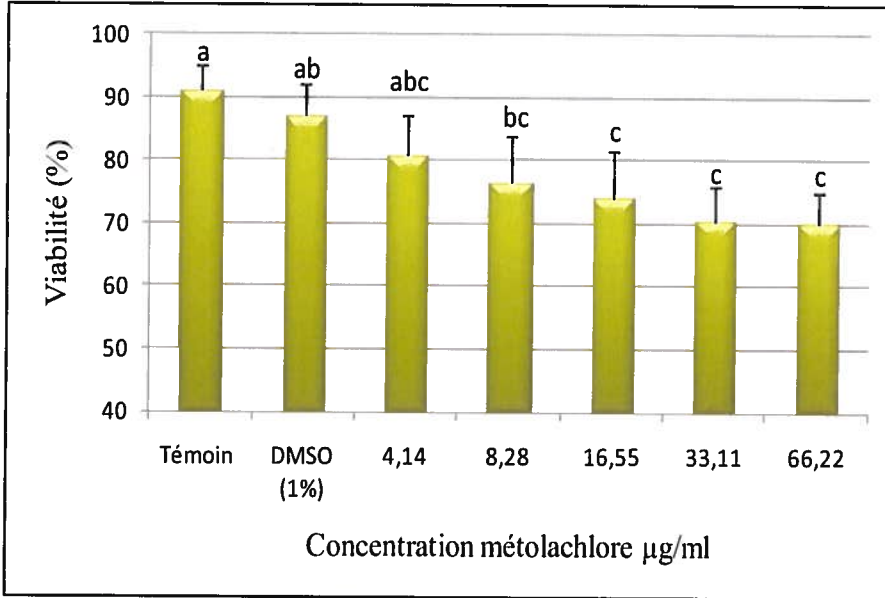


Fig.3 : Le pourcentage de macrophages vivants en fonction des différentes concentrations de métholachlore variant de 4,14 à 66,22 $\mu\text{g/ml}$. Il y a une baisse significative de la viabilité à partir de la concentration de 8,28 $\mu\text{g/ml}$ comparativement au contrôle. ($n = 10$)

L'activité phagocytaire des macrophages exposés au métholachlore

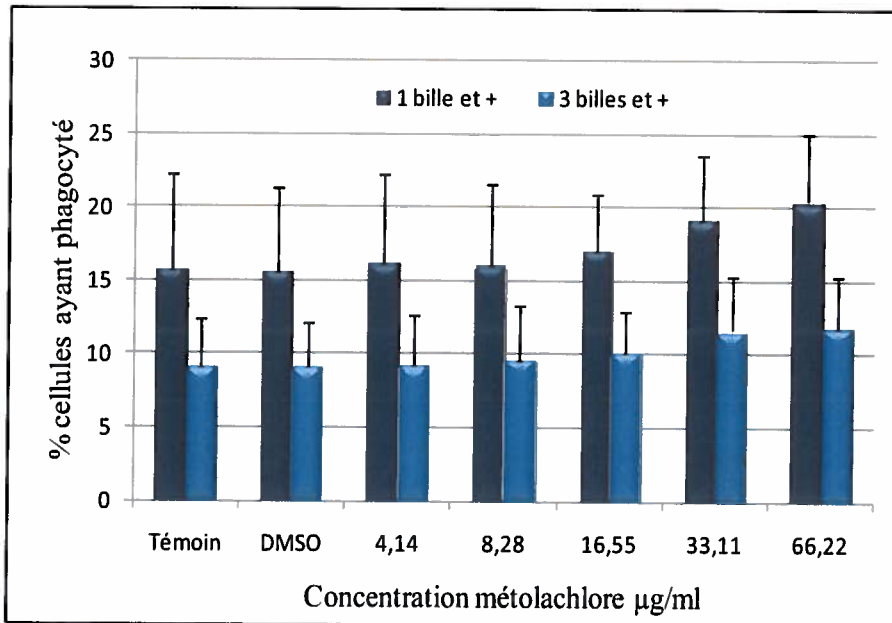


Fig.4 : Le pourcentage de macrophages ayant phagocyté 1 bille et plus ou 3 billes et plus, en fonction des différentes concentrations de métholachlore variant de 4,14 à 66,22 $\mu\text{g/ml}$. Il n'y a pas de différence significative de l'activité phagocytaire. ($n = 10$)

Les concentrations de métolachlore testées sont de : 4,14 µg/ml, 8,28 µg/ml, 16,55 µg/ml, 33,11 µg/ml et 66,22 µg/ml. La concentration de DMSO utilisée pour diluer le métolachlore est de 1 %. On dénote une différence significative de la viabilité cellulaire, comparativement au contrôle à partir d'une concentration de 8,28 µg/ml de métolachlore. Cependant, les différentes concentrations de métolachlore ne semblent pas affecter l'activité phagocytaire des macrophages.

4 Discussion

Nous constatons que le métolachlore présente un effet très limité sur les macrophages des xénopes. Notre étude s'est déroulée dans des conditions *in vitro*. Il semble donc que le métolachlore n'a que peu d'effet sur les macrophages lorsqu'ils sont exposés de cette façon. Dans ce contexte, il serait indiqué de refaire ces analyses, mais en exposition *in vivo* afin de vérifier si le métolachlore exposé ainsi n'influencera pas la réponse immunitaire des xénopes.

Par ailleurs, nous savons que le système immunitaire du ouaouaron, exposé aux métolachlores et à d'autres pesticides de façon chronique, est affecté de façon significative (chapitre 2). Il est probable que les effets du métolachlore sur les cellules immunitaires soient dus à une exposition chronique et non pas aiguë. Ainsi, il serait intéressant de refaire ces tests avec des xénopes dans des conditions plus représentatives du contexte des amphibiens en nature, c'est-à-dire de faire des expositions *in vivo* et chroniques.

L'ensemble des résultats démontre que le métolachlore n'a que peu d'incidence sur les macrophages des xénopes. En effet, le métolachlore influence la viabilité des cellules, mais pas l'activité phagocytaire. Il est toutefois important de mentionner que les xénopes utilisés étaient très jeunes et très petits. Ces caractéristiques font en sorte qu'il y a une insuffisance dans la quantité de cellules disponibles, ce qui a nui au nombre de biomarqueurs utilisés. Malgré que plusieurs aient déjà été testés dans notre laboratoire avec succès, nous avons constaté de grandes variations dans les résultats lors des duplicatas. Il semble que les réponses aient été influencées par des facteurs autres que les

pesticides. Pour expliquer cette différence, nous en sommes venus à la conclusion que la taille et l'âge des grenouilles influencent les résultats. Si nous comparons ceux-ci avec des résultats antérieurs produits dans notre laboratoire avec les xénopes, nous constatons que les spécimens utilisés préalablement étaient des post-métamorphoses comme les nôtres. Cependant, ils étaient de tailles très différentes. En effet, le poids des xénopes de notre étude était d'environ 0,15 mg comparativement à 50 mg pour les études antérieures (communication personnelle). Nous suggérons donc que la taille ainsi que le taux cellulaire des xénopes ont sensiblement influencé nos résultats. Dans ce contexte, il semble préférable de considérer ces tests comme des analyses préliminaires auxquelles il serait intéressant d'ajouter d'autres biomarqueurs tels : la flambée oxydative, les Natural Killer et même la transformation lymphoblastique.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Le déclin des amphibiens est un problème bien réel. Plusieurs raisons sont mises en évidence, telle l'augmentation des infections et la pollution. Les sources de contamination sont nombreuses. Toutefois, nous nous sommes attardés aux pesticides. Ces toxiques sont présents dans les eaux où vivent la majorité des amphibiens. Le but de cette étude consistait à vérifier si la présence de pesticides d'origine agricole affectait les systèmes de défense d'une espèce spécifique de grenouille, le ouaouaron et ainsi augmentait le risque d'infection chez cette espèce. Les systèmes de défenses étudiés étaient : le système immunitaire, en particulier les macrophages et les peptides antimicrobiens, et des antioxydants situés dans la peau. Nous avons ciblé comme lieu d'échantillonnage six bassins versants de la rivière de la Yamaska. Ces bassins ont été classés en relation avec le niveau d'intensité agricole entourant ces lieux (Appendice 1). En 2008, un échantillonnage d'eau, provenant des cours d'eau choisis, a permis de mettre en évidence la présence et la concentration élevées de pesticides, tels l'atrazine et le métolachlore, dans les milieux ayant un niveau d'activité agricole plus élevé (Appendice 2).

Dans un premier temps, les analyses de trois biomarqueurs immunitaires (viabilité, flambée oxydative et activité phagocytaire) suggèrent que le système immunitaire est affecté par les niveaux plus élevés d'activité agricole. De plus, les peptides antimicrobiens, situés dans les glandes cutanées, sont moins présents sur les peaux de grenouilles exposées à plus de pesticides. Ces réactions, face à l'intensité de l'activité agricole, laissent supposer que les grenouilles vivant dans les milieux pollués sont plus susceptibles de faire des infections et/ou auront plus de difficultés à en guérir. Ces réponses sont en accord avec notre hypothèse de départ qui proposait que les cellules des grenouilles capturées dans les milieux plus pollués ne réagiront pas de manière optimale. Dans le futur, il serait intéressant de vérifier si les animaux, exposés à un niveau de pollution agricole élevé, seraient plus susceptibles de développer des maladies comme nous le suggérons. Nous savons que les amphibiens sont touchés par des infections

majeures comme le ranavirus, le parasite trématode et le champignon *Batrachochytrium dendrobatidis*. Nous proposons donc, comme étude complémentaire, la vérification de la présence de ces infections sur des grenouilles provenant des sites échantillonnés dans lesquels le système immunitaire des spécimens semble affecté.

Dans un second temps, nous avons analysé la concentration du rétinol, de la vitamine E, de la canthaxanthine, de la β -cryptoxanthine et du carotène sur la peau des ouaouarons. La concentration de ces antioxydants, à l'exception du rétinol et de la β -cryptoxanthine, est plus élevée sur les grenouilles capturées sur les sites à plus haute teneur en pesticides. Ces résultats suggèrent que le stress oxydatif est plus élevé dans ces milieux, ce qui pourrait affecter à long terme la santé du ouaouaron. Ces résultats concordent avec notre hypothèse de départ, suggérant une augmentation de la présence des antioxydants au niveau de la peau des grenouilles vivant dans un lieu plus pollué. Cette hausse de la concentration de carotène et de vitamine E laisse supposer que les organismes vivant dans des milieux à plus haute teneur en pesticides sont soumis à un taux élevé de stress oxydatif.

Dans une idée plus générale, il semble que la pollution d'origine agricole soit un facteur important dans le déclin des populations d'amphibiens. En effet, la présence de pesticides ainsi que leur concentration influencent le système immunitaire et les antioxydants, ce qui leur confère un rôle nocif sur la santé des grenouilles. Suite à ces conclusions, il serait pertinent de réglementer plus sévèrement l'utilisation des pesticides si nous voulons permettre aux batraciens de garder leur place sur la belle planète bleue.

CONCLUSION

Notre planète est le milieu de vie d'un très grand nombre d'organismes. L'activité humaine a malheureusement des impacts lourds sur la survie de ces formes vivantes. Les amphibiens, particulièrement les grenouilles, font l'objet depuis quelques années d'une grande inquiétude puisqu'on remarque une diminution, voire même des extinctions de populations entières. L'une des activités humaines affectant ces animaux est l'agriculture. Afin d'augmenter la productivité des cultures, nous utilisons des pesticides qui sont des produits toxiques pour la majorité. Dans cette étude, nous voulions mettre en évidence que le niveau de l'intensité de l'activité agricole, entourant les milieux de vie des grenouilles, pouvait affecter leurs systèmes de défense. Nos résultats montrent que les cellules immunitaires de grenouilles, plus précisément les ouaouarons vivant dans les milieux à plus forte intensité agricole, avaient une viabilité, une activité phagocytaire ainsi qu'une flambée oxydative plus faibles comparativement à celles provenant des autres sites échantillonnés. De plus, au niveau de la peau, une diminution significative de la présence de peptides antimicrobiens et une augmentation de la concentration d'antioxydants ont été observées. Les pesticides ont des effets néfastes sur les systèmes de défense des ouaouarons ce qui peut les rendre plus vulnérables à d'éventuelles maladies. À la lumière de tous ces résultats, il semble clair que les humains ont adopté des activités agricoles qui mettent en danger la survie d'organismes qui partagent leur environnement.

« Nous respirons tous le même air, nous buvons tous la même eau, nous vivons tous sur une seule terre. Nous devons la protéger. » Raomi, chef amazonien.

RÉFÉRENCES

- Allran, J.W., Karasov, W.H. (2001) "Effects of atrazine on embryos, larvae, and adults of anuran amphibians." Environmental toxicology and chemistry, vol.20, no.4, p.769-775
- Altuntas, I., Delibas, N. (2002) "The effects of fenthion on lipid peroxidation and some liver enzymes: the possible protective role of vitamine E and C." Turkish Journal of Medical Sciences, vol.32, p.293-297.
- Alves, R.N., Cordeiro, O., Silva, T.S., Richard, N., De Vareilles, M., Marino, G., Di Marco, P., Rodrigues, P.M., Conceição, L.E.C. (2010) "Metabolic molecular indicators of chronic stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) using comparative proteomics." Aquaculture, vol.299, no.1-4, p.57-66
- Anderson, R., Theron, A.J. (1990) "Physiological potential of ascorbate, beta-carotene and alpha-tocopherol individually and in combinaison in the prevention of tissue damage, carcinogenesis and immune dysfunction mediated by phagocyte-derived reactive oxidant." World review of nutrition and dietetics, vol.62, p.27-58
- Ankley, G.T., Degitz, S.J., Diamond, S.A., Tietge, J.E. (2004) "Assessment of environmental stressors potentially responsible for malformations in North American anuran amphibians." Ecotoxicology and Environmental Safety, vol.58, no.1, p.7-16.
- Araujo, M.B., Thuiller, W., Pearson, R.G. (2006) "Climate warming and the decline of amphibians and reptiles in Europe." Journal of Biogeography vol.33, p.1712-1728
- Baker, J.B., Johnson, P.T.J., Sutherland, D.R., Kinsella, J.M., Lunde, K.B. (2004) "Review of the trematode genus Ribeiroia (Psilostomidae): Ecology, life history, and pathogenesis with special emphasis on the amphibian malformation problem" Advances in parasitology, Vol.57, p.191-253.
- Ballow, M., Xiang, S., Greenberg, S., Brodsky, L., Allen, C., Rich, G. (1997) "Retinoic acid-induced modulation of IL-2 mRNA production and IL-2 receptor expression on T cells." Int Arch Allergy Immunol, vol.113, no.3, p.167-169.
- Ballow, M., Xiang, S., Wang, W., Brodsky, L. (1996) "The effects of retinoic acid on immunoglobulin synthesis: Role of interleukin 6." Journal of Clinical Immunology, vol.16, p.171-179.
- Banerjee, B.D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, S.T., Chakraborty, A.K. (1999) "Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers." Toxicology Letters, vol.107, no.1-3, p.33-47.

- Basir, Y.J., Knoop, F.C., Dulka, J., Conlon, J.M. (2000) "Multiple antimicrobial peptides and peptides related to bradykinin and neuromedin N isolated from skin secretions of the pickerel frog, *Rana palustris*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, vol.1543, no.1, p.95-105.
- Becker, C.G., Fonseca, C.R., Haddad, C.F.B., Batista, R.F., Prado, P.I. (2007) "Habitat Split and the Global Decline of Amphibians." Science, vol.318, no.5857, p.1775-1777.
- Behki, R.M., Khan, S.U. (1986) "Degradation of atrazine by *Pseudomonas*: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites." Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol.34, no.4, p.746-749.
- Bendich, A. (1989) "Carotenoids and the Immune Response." J. Nutr., vol. 119, no.1, p.112-115.
- Bendich, A, Shapiro, S.S. (1986) "Effect of beta-Carotene and Canthaxanthin on the Immune Responses of the Rat." J. Nutr., vol.116, no.11, p.2254-2262.
- Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ (2007) All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. J. Exp. Med., vol.204, no.8, p.1765-1774
- Berger, L, Hyatt, A, Speare, Declines and disappearances of Australian frogs, Environment Australia, édition: Alastair Campbell 1999, 234 pages, Australia.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocumbe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K.R., Marantelli, G., Parkes, H. (1998) "Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol.95, no.15, p.9031-9036.
- Berryman, D., 2008. *État de l'écosystème aquatique du bassin versant de la rivière Yamaska : faits saillants 2004-2006*, Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'état de l'environnement, ISBN 978-2-550-53592-8 (PDF), 22 p.
- Bérubé, V.E., Boily, M.H., DeBlois, C., Dassylva, N., Spear, P.A. (2005) "Plasma retinoid profile in bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural intensity of sub-watersheds in the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada." Aquatic Toxicology, vol.71, no.2, p.109-120.
- Bjorneboe, A., Bjorneboe, G-E.A., Drevon, C.A. (1990) "Absorption, Transport and Distribution of Vitamin E." J. Nutr., vol.120, no.3, p.233-242.
- Blaustein, A.R., Belden, L.K. (2003) "Amphibian defenses against ultraviolet-B radiation." Evolution and Development, vol.5, no.1, p.89-97.

- Blaustein, A.R., Hoffman, P.D., Hokit, D.G., Kiesecker, J.M., Walls, S.C., Hays, J.B. (1994) "UV repair and resistance to solar UV-B in amphibian eggs: a link to population declines?" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol.91, no.5, p.1791-1795.
- Blaustein, A.R., Kiesecker, J.M., Chivers, D.P., Anthony, R.G. (1997) "Ambient UV-B radiation causes deformities in amphibian embryos." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol.94, no.25, p.13735-13737.
- Blaustein, A.R., Romansic, J.M., Kiesecker, J.M., Hatch, A.C. (2003) "Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines." Diversity & Distributions, vol.9, no.2, p.123-140.
- Blomberg, B., Bernard, C.C.A., Pasquier, L.D. (1980) "*In vitro* evidence for T-B lymphocyte collaboration in the clawed toad, *Xenopus*." European Journal of Immunology, vol.10, no.2, p.869-876.
- Blomhoff, H.K., Smeland, E.B., Erikstein, B., Rasmussen, A.M., Skrede, B., Skjonsberg, C., Blomhoff, R. (1992) "Vitamin A is a key regulator for cell growth, cytokine production and differentiation in normal B cells." The journal of biological chemistry, vol.267, no.33, p.23988-23992.
- Blomhoff Rune éditeur, Vitamine A in health and disease: Role of retinoids in normal hematopoiesis and the immune system, 1994, Marcel Dekker Inc, 677 pages, New York.
- Boily M, Bisson M, Spear PA (2004) Rétinoïde: biomarqueurs et base moléculaire d'effets de substances toxiques, Campbell, P.C.C., Pelletier, É., Denizeau, F. édition Presses de l'Université du Québec, 2004, 197 pages, Québec
- Boily, M., Thibodeau, J., Bisson, M. (2009) "Retinoid metabolism (LRAT, REH) in the liver and plasma retinoids of bullfrog, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural concentration." Aquatic Toxicology, vol.91, no.2, p.118-125.
- Boily, M.H., Bérubé, V.E., Spear, P.A., Deblois, C., Dassylva, N. (2005) "Hepatic retinoids of bullfrogs in relation to Agricultural pesticides." Environmental Toxicology and Chemistry, vol.24, no.5, p.1099-1106.
- Boily, M.H., Ndayibagira, A., Spear, P.A. (2003) "Retinoids, LRAT and REH Activities in Eggs of Japanese Quail Following Maternal and *in ovo* Exposures to 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl." Ecotoxicology, vol.12, no.1, p.9-21.
- Bradford, D.F., Tabatabai, F., Graber, D.M. (1993) "Isolation of remaining populations of the native frog, *Rana muscosa*, by introduced fishes in Sequoia and Kings Canyon National Park, California." Conservation Biology, vol.7, no.4, p.882-888.

- Brodkin, M.A., Madhoun, H., Rameswaran, M., Vatnick, I. (2007) "Atrazine is an immune disruptor in adult Northern leopard frogs (*Rana pipiens*)." Environmental toxicology and chemistry, vol.26, no.1, p.80-84.
- Brousseau P, Payette Y, Tryphonas H, Blakley B, Boermans H, Flipo D, Fournier M Manual of Immunological Method, Séries editor: Mannfred, A. Hollinger, 1999, 160 pages, CRC press, Washington.
- Brown, P.D., Hetrick, J.A., Odenfirche, E., Andrew, N., Risk of metolachlor use to federally threatened California Red-legged frog (*Rana aurora draytonii*). Environmental Fate and Effects Division Office of Pesticide Programs, 2007, Washington, D.C. 20460
- Burton, E.C., Miller, D.L., Styer, E.L., Gray, M.J. (2008) "Amphibian ocular malformation associated with frog virus 3." The Veterinary Journal, vol.177, no.3, p.442-444.
- Burton, G.W. (1994) "Vitamin E: molecular and biological function": a review. Proceedings of the Nutrition Society, vol.53, no.2, p.251-262.
- Burton, G.W., Joyce, A., Ingold, K.U. (1983) "Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?" Archives of Biochemistry and Biophysics, vol.221, no.1, p.281-290.
- Carey, C., Alexander, M.A. (2003) "Climate change and amphibian declines: is there a link?" Diversity and Distributions, vol.9, no.2, p.111-121.
- Carey, C., Cohen, N., Rollins-Smith, L. (1999) "Amphibian declines: an immunological perspective." Developmental and Comparative Immunology, vol.23, no.6, p.459-472.
- Carlos, T.F., Riondel, J., Mathieu, J., Guiraud, P., Mestries, J.C., Favier, A. (1997) "Beta-carotene enhances natural killer cell activity in athymic mice." In Vivo, vol.11, no.1, p.87-91.
- Carr, L.W., Fahrig, L. (2001) "Effect of Road Traffic on Two Amphibian Species of Differing Vagility." Conservation Biology, vol.15, no.4, p.1071-1078.
- Carrillo-Farga, J., Castell, A., Pérez, A., Rondan, A. (1990) "Langerhans-like cells in amphibian epidermis." Journal of anatomy, vol.172, p.39-45.
- Chester, G., Simsiman, G.V., Levy, J., Alhajjar, B.J., Fathulla, R.N., Harkin, J.M. (1989) "Environmental fate of alachlor and metolachlor." Reviews of environmental contamination and toxicology, vol.110, p.1-74.
- Chew, B.P., Park, J.S. (2004) "Carotenoid Action on the Immune Response. J. Nutr., vol.134, no.1, p.257-261.

- Chia, B.C.S., Lam, Y.H., Dyall-Smith, M., Separovic, F., Bowie, J.H. (2000) "A ^31P NMR study of the interaction of amphibian antimicrobial peptides with the membranes of live bacteria". Letters in Peptide Science, 7, 151-156.
- Christin, M-S., Gendron, A.D., Brousseau, P., Ménard, L., Marcogliese, D.J., Cyr, D., Ruby, S., Fournier, M. (2003) "Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection." Environmental toxicology and chemistry, vol.22, no.5, p.1127-1133.
- Christin, M.S., Ménard, L., Gendron, A.D., Ruby, S., Cyr, D., Marcogliese, D.J., Rollins-Smith, L., Fournier, M. (2004) "Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*." Aquatic Toxicology, vol.67, no.1, p.33-43.
- Clark, D., Durell, S., Maloy, W., Zasloff, M.(1994) "Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin." J. Biol. Chem., vol.269, no.14, p.10849-10855.
- Clements, C., Ralph, S., Petras, M. (1997) "Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay." Environmental and Molecular Mutagenesis, vol.29, no.3, p.277-288.
- Collins, J.P., Storfer, A. (2003) "Global amphibian declines: sorting the hypotheses." Diversity and Distributions vol.9, no.2, p.89-98
- Conlon, J.M., al-Dhaheri, A., al-Mutawa, E., al-Kharrge, R., Ahmed, E., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Nielsen, P.F., Davidson, C. (2007) "Peptide defenses of the Cascades frog *Rana cascadae*: implications for the evolutionary history of frogs of the Amerana species group." Peptides, vol.28, no.6, p.1268-1274.
- Conlon, J.M., Halverson, T., Dulka, J., Platz, J.E., Knoop, F.C. (1999) "Peptides with antimicrobial activity of the brevinin family isolated from skin secretions of the southern leopard frog, *Rana sphenoccephala*." Journal of Peptide Research, vol.54, no.6, p.522-527.
- Conlon, J.M., Kolodziejek, J., Nowotny, N. (2009) "Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs." Biochimica and Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, vol.1788, no.8, p.1556-1563.
- Conlon, J.M., Sonnevend, A., Davidson, C., Demandt, A., Jouenne, T. (2005) "Host-defense peptides isolated from the skin secretions of the Northern red-legged frog *Rana aurora aurora*." Developmental and Comparative Immunology, vol.29, no.1, p.83-90.
- Cook, M., Moore, P. (2008) "The Effects of the Herbicide Metolachlor on Agonistic Behavior in the Crayfish, *Orconectes rusticus*." Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol.55, no.1, p.94-102.

- Cooper, R.L., Stoker, T.E., Tyrey, L., Goldman, J.M., McElroy, W.K. (2000) "Atrazine Disrupts the Hypothalamic Control of Pituitary-Ovarian Function." Toxicol. Sci., vol.53, no.2, p.297-307.
- Coulombe, P., Rodier, G., Bonneil, E., Thibault, P., Meloche, S. (2004) "N-Terminal ubiquitination of extracellular Signal-Regulated Kinase 3 and p21 Directs their Degradation by the Proteasome." Mol.Cell.Biol. vol.24, no.14, p.6140-6150
- Cunningham, A.A., Langton, T.E.S., Bennett, P.M., Lewin, J.F., Drury, S.E.N., Gough, R.E., Macgregor, S.K. (1996) "Pathological and Microbiological Findings from Incidents of Unusual Mortality of the Common Frog (*Rana temporaria*)." Philosophical Transactions: Biological Sciences, vol.351, no.1347, p.1539-1557.
- Cunningham, A.A., Tams, C.A., Russell, P.H. (2008) "Immunohistochemical Demonstration of Ranavirus Antigen in the Tissues of Infected Frogs (*Rana temporaria*) with Systemic Haemorrhagic or Cutaneous Ulcerative Disease." Journal of Comparative Pathology, vol.138, no.1, p.3-11.
- Cushman, S.A. (2006) "Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus." Biological Conservation, vol.128, no.2, p.231-240.
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., Green, D.E., Speare, R. (1999) "Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines." Emerging Infection Diseases, vol.5, no.6, p.735-746.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D. (2003) "Infectious disease and amphibian population declines." Diversity and Distributions, vol.9, no.2, p.141-150.
- Daszak, P., Strieby, A., Cunningham, A.A., Longcore, J.E., Brown, C.C., Porter, D. (2004) "Experimental evidence that the bullfrog (*Rana Catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians". Herpetological journal, vol.14, p.201-207.
- Davidson, C., Shaffer, H.B., Jennings, M.R. (2002) "Spatial Tests of the Pesticide Drift, Habitat Destruction, UV-B, and Climate-Change Hypotheses for California Amphibian Declines." Conservation Biology, vol.16, p.1588-1601.
- Davis, M.D., Hadley, M.E. (1979) "Central nervous system control of mucous gland secretion from frog skin." Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS), vol.35, no.10, p.1339-1339.
- Dawson, H. Collins, G., Pyle, R., Key, M., Weeraratna, A., Deep-Dixit, V., Nadal, C., Taub, D. (2006) "Direct and indirect effects of retinoic acid on human Th2 cytokine and chemokine expression by human T lymphocytes." BMC Immunology, vol.7, no.1, p.27.
- Debier, C., Larondelle, Y. (2005) "Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring": a review. British Journal of Nutrition, vol.93, no.2, p.153-174.

- Delis, P.R., Mushinsky, H.R., McCoy, E.D. (1996) "Decline of some west-central Florida anuran populations in response to habitat degradation." Biodiversity and Conservation, vol.5, no.2, p.1579-1595.
- Dennert, G., Lotan, R. (1978) "Effects of retinoic acid on the immune system: Stimulation of T killer cell induction." European Journal of Immunology, vol.8, no.1, p.23-29.
- Di Mascio, P., Murphy, M., Sies, H. (1991) "Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols." Am J Clin Nutr, vol.53, no.1, p.194-200.
- Diana, S.G., Jr. W.J.R., Schaeffer, D.J., Beckmen, K.B., Beasley, V.R. (2000) "Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities." Environmental toxicology and chemistry, vol.19, no.12, p.2961-2967.
- Dorval, J., Leblond, V.S., Hontela, A. (2003) "Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide." Aquatic Toxicology, vol.63, no.3, p.229-241.
- Du Pasquier, L., Flajnik, M.F. (1990) "Expression of MHC Class II Antigens During *Xenopus* Development." Developmental immunology, vol.1, no.2, p.85-95.
- Du Pasquier, L., Robert, J., Courtet, M., Mußmann, R. (2000) "B-cell development in the amphibian *Xenopus*." Immunological Reviews, vol.175, no.1, p.201-213.
- Du Pasquier, L., Weiss, N. (1973) "The thymus during the ontogeny of the toad *Xenopus laevis*: Growth, membrane-bound immunoglobulins and mixed lymphocyte reaction." European Journal of Immunology, vol.3, no.12, p.773-777.
- Eigenbrod, F., Hecnar, S.J., Fahrig, L. (2008) "The relative effects of road traffic and forest cover on anuran populations." Biological Conservation, vol.141, no.1, p.35-46.
- Ertesvag, A., Aasheim, H-C., Naderi, S., Blomhoff, H.K. (2007) "Vitamin A potentiates CpG-mediated memory B-cell proliferation and differentiation: involvement of early activation of p38MAPK." Blood, vol.109, no.9, p.3865-3872.
- Ertesvag, A., Engedal, N., Naderi, S., Blomhoff, H.K. (2002) "Retinoic Acid Stimulates the Cell Cycle Machinery in Normal T Cells: Involvement of Retinoic Acid Receptor-Mediated IL-2 Secretion." J Immunol, vol.169, no.10, p.5555-5563.
- Falfushinska, H., Loumbourdis, N., Romanchuk, L., Stolyar, O. (2008) "Validation of oxidative stress responses in two populations of frogs from Western Ukraine." Chemosphere, vol.73, no.7, p.1096-1101.
- Farcy, E., Serpentine, A., Fiévet, B., Lebel, J-M. (2007) "Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: Transcriptional

induction in response to thermal stress in hemocyte primary culture.” Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, vol.146, no.4, p.540-550.

Flajnik, M., Kaufman, J., Hsu, E., Manes, M., Parisot, R., Du Pasquier, L. (1986) “Major histocompatibility complex-encoded class I molecules are absent in immunologically competent *Xenopus* before metamorphosis.” J Immunol, vol.137, no.12, p.3891-3899.

Forson, D.D., Storfer, A. (2006) “Atrazine increases ranavirus susceptibility in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*.” Ecological Applications, vol.16, no.6, p.2325–2332.

Fritsma, G.A. (1983) “Vitamine E and Autoxidation.” The American Journal of Medical technology, vol.49, no.6, p.453-456.

Gardiner, D., Ndayibagira, A., Grün, F., Blumberg, B., (2003) “Deformed frogs and Environmental retinoids.” Pure and applied chemistry p.75, p.2263-2273

Garg, D.P., Bhalla, P., Kiran, R., Bansal, A., Dhawan, D.K. (2009) “Vitamin E-mediated protection on methomyl-induced alterations in rat liver.” Toxicological and Environmental Chemistry, vol.91, no.4, p.685 - 698.

Gibble, R.E., Rollins-Smith, L., Baer, K.N. (2008) “Development of an assay for testing the antimicrobial activity of skin peptides against the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) using *Xenopus laevis*.” Ecotoxicology and Environmental Safety, vol.71, no.2, p.506-513.

Giddings, J.M., Anderson, T.A., Hall, L.W., Jr, Kendall, R.J., Richards, R.P., Solomon, K.R., Williams, W.M. A Probabilistic Aquatic Ecological Risk Assessment of Atrazine in North American Surface Waters. Editor press FS, (2005) Pensacola.

Gilbertson, M-K., Haffner, D.G., Drouillard, K.G., Albert, A., Dixon, B. (2003) “Immunosuppression in the Northern leopard frog (*Rana pipiens*) induced by pesticide exposure.” Environmental toxicology and chemistry, vol.22, no.1, p.101-110.

Giroux I (2002) *Contamination de l'eau par les pesticides dans les régions de culture de maïs et de soya au Québec, Campagnes d'échantillonnage de 1999, 2000 et 2001 et évolution temporelle de 1992 à 2001*. Québec, ministère de l'Environnement, Direction du suivi de l'état de l'environnement, Envirodoq no EN/2002/0365, rapport no QE/137, 45 p. + 45 annexes.

Giroux I (2004) *La présence de pesticides dans l'eau en milieu agricole au Québec*. Québec, ministère de l'Environnement, Direction du suivi de l'état de l'environnement, Envirodoq n.ENV/2004/0309, collection n. QE/151, 40 p.

- GIROUX, I., (2010). *Présence de pesticides dans l'eau au Québec – Bilan dans quatre cours d'eau de zones en culture de maïs et de soya en 2005, 2006 et 2007 et dans des réseaux de distribution d'eau potable*, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'état de l'environnement, 78 p.
- Goraya, J., Knoop, F.C., Conlon, J.M. (1998) "Ranatuerins: Antimicrobial Peptides Isolated from the Skin of the American Bullfrog, *Rana catesbeiana*." Biochemical and Biophysical Research Communications, vol.250, no.3, p.589-592.
- Goraya, J., Knoop, F.C., Conlon, J.M. (1999) "Ranatuerin 1T: an antimicrobial peptide isolated from the skin of the frog, *Rana temporaria*." Peptides, vol.20, no.2, p.159-163.
- Goraya, J., Wang, Y., Li, Z., O'Flaherty, M., Knoop, F.C., Platz, J.E., Conlon, M.J. (2000) "Peptides with antimicrobial activity from four different families isolated from the skins of the North American frogs *Rana luteiventris*, *Rana berlandieri* and *Rana pipiens*." European Journal of Biochemistry, vol.267, no.3, p.894-900.
- Goulet, B.N., Hontela, A. (2003) "Toxicity of cadmium, endosulfan, and atrazine in adrenal steroidogenic cells of two amphibian species, *Xenopus laevis* and *Rana catesbeiana*." Environmental toxicology and chemistry, vol.22, no.9, p.2106-2113.
- Griggs, J., Belden, L. (2008) "Effects of Atrazine and Metolachlor on the Survivorship and Infectivity of *Echinostoma trivolvis* Trematode Cercariae." Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol.54, no.2, p.195-202.
- Gruszecki, W.I., Carotenoid orientation: role in membrane stabilization. In: Carotenoids in health and disease. Éditeurs; Krinsky NI, Mayne ST, Sies H, 2004, New York.
- Gudas, L.J. (1994) "Retinoids and vertebrate development." The journal of biological chemistry, vol.269, no.22, p.15399-15402.
- Gultekin, F., Delibas, N., Yasar, S., Kilinc, I. (2001) "*In vivo* changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats." Archives of Toxicology, vol.75, no.2, p.88-96.
- Hadji-Azimi, I., Coosemans, V., Canicatti, C. (1990) "B-lymphocyte populations in *Xenopus laevis*." Developmental & Comparative Immunology, vol.14, no.1, p.69-84.
- Hadji-Azimi, I., Schwager, J., Thiebaud, C. (1982) "B-lymphocyte differentiation in *Xenopus laevis* larvae." Developmental Biology, vol.90, no.2, p.253-258.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Édition N., 1989, Clarendon Press, Oxford.

- Halverson, T., Basir, Y.J., Knoop, F.C., Conlon, J.M. (2000) "Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin of the North American green frog *Rana clamitans*." Peptides, vol.21, no.4, p.469-476.
- Hansen, J.D., Zapata, A.G. (1998) "Lymphocyte development in fish and amphibians". Immunological Reviews, vol.166, no.1, p.199-220.
- Harp, E.M., Petranka, J.W. (2006) "Ranavirus in wood frog (*Rana sylvatica*): potential sources of transmission within and between ponds." Journal of Wildlife Disease, vol.42, no.2, p.307-318.
- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A. (2003) "Atrazine-Induced Hermaphroditism at 0.1 ppb in American Leopard Frogs (*Rana pipiens*):" Laboratory and Field Evidence. Environmental health perspective, vol.111, no.4, p.568-575.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., Vonk, A. (2002) "Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses." Proceedings of the National Academy of Sciences, vol.99, no.8, p.5476-5480
- Hays, J.B., Blaustein, A.R., Kiesecker, J.M., Hoffman, P.D., Pandelova, L., Coyle, D., Richardson, T. (1996) "Developmental Responses of Amphibians to Solar and Artificial UVB Sources: A Comparative Study." Photochemistry and Photobiology, vol.64, no.3, p.449-456.
- Hecker, M., Park, J-W., Murphy, M.B., Jones, P.D., Solomon, K.R., Van Der Kraak, G., Carr, J.A., Smith, E.E., du Preez, L., Kendall, R.J., Giesy, J.P. (2005) "Effects of Atrazine on CYP19 Gene Expression and Aromatase Activity in Testes and on Plasma Sex Steroid Concentrations of Male African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*)." Toxicol. Sci., vol.86, no.2, p.273-280.
- Hecnar, S.J., M'Closkey, R.T. (1996) "Regional Dynamics and the Status of Amphibians." Ecology, vol.77, no.7, p.2091-2097.
- Hoag, K.A., Nashold, F.E., Gorman, J., Hayes, C.E. (2002) "Retinoic Acid Enhances the T Helper 2 Cell Development That Is Essential for Robust Antibody Responses through Its Action on Antigen-Presenting Cells." J. Nutr., vol.132, no.12, p. 3736-3739.
- Hough, S., Avioli, L.V., Muir, H., Gelderblom, D., Jenkins, G., Kurasi, H., Slatopolsky, E., Bergfeld, M.A., Teitelbaum, S.L. (1988) "Effects of Hypervitaminosis A on the Bone and Mineral Metabolism of the Rat." Endocrinology, vol.122, no.6, p.2933-2939.
- Houlahan, J.E., Findlay, C.S., Schmidt, B.R., Meyer, A.H., Kuzmin, S.L. (2000) "Quantitative evidence for global amphibian population declines." Nature, vol.404, no.6779, p.752-755.

- Hsu, E., Flajnik, M., Du Pasquier, L. (1985) "A third immunoglobulin class in amphibians." J Immunol, vol.135, no.3, p.1998-2004.
- Hyatt, A.D., Gould, A.R., Zupanovic, Z., Cunningham, A.A., Hengstberger, S., Whittington, R.J., Kattenbelt, J., Coupar, B.E.H. (2000) "Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses." Archives of Virology, vol.145, no.2, p.301-331.
- Iwata, M., Eshima, Y., Kagechika, H. (2003) "Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors." Int. Immunol., vol.15, no.8, p.1017-1025.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.L. Immunobiologie, Le système immunitaire fondamental et pathologique., 2^{ème} édition française, édition De boeck, 2003, Paris.
- Jensen, R.K., Cullum, M.E., Deyo, J., Zile, M.H. (1987) "Vitamin A metabolism in rats chronically treated with 3,3',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, vol.926, no.3, p.310-320.
- Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., Liu, W., Fu, Z. (2010) "Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*)." Chemosphere, vol.78, no.7, p.846-852.
- Johnson, P.T.J., Lunde, K.B., Ritchie, E.G., Launer, A.E. (1999) "The Effect of Trematode Infection on Amphibian Limb Development and Survivorship." Science, vol.284, p.802-804.
- Johnson, P.T.J., Lunde, K.B., Thurman, E.M., Ritchie, E.G., Wray, S.N., Sutherland, D.R., Kapfer, J.M., Frest, T.J., Bowerman, J., Blaustein, A.R. (2002) "Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the Western United States." Ecological Monographs, vol.72, no.2, p.151-168.
- Johnson, P.T.J., Sutherland, D.R. (2003) "Amphibian deformities and *Ribeiroia* infection: an emerging helminthiasis." Trends in Parasitology, vol.19, no.8, p.332-335.
- Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R. (1995) "Synergism between UV-B radiation and a pathogen magnifies amphibian embryo mortality in nature." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol.92, no.24, p.11049-11052.
- Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R., Belden, L.K. (2001) "Complex causes of amphibian population declines." Nature, vol.410, no.6829, p.681-684.
- Kim, J.B., Halverson, T., Basir, Y.J., Dulka, J., Knoop, F.C., Abel, P.W., Conlon, J.M. (2000) "Purification and characterization of antimicrobial and vasorelaxant peptides from skin extracts and skin secretions of the North American pig frog *Rana grylio*." Regulatory Peptides, vol.90, no.1-3, p.53-60.

- Knapp, R.A., Boiano, D.M., Vredenburg, V.T. (2007) "Removal of nonnative fish results in population expansion of a declining amphibian (mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*)." Biological Conservation, vol.135, no.1, p.11-20.
- Kobeln, H.R., Tinsley, R.C. éditeurs, The biology of xénopes (Symposia of the zoological society of London).Oxford University Press on demand, 1996, USA
- Langerveld, A.J., Celestine, R., Zaya, R., Mihalko, D., Ide, C.F. (2009) "Chronic exposure to high levels of atrazine alters expression of genes that regulate immune and growth-related functions in developing *Xenopus laevis* tadpoles." Environmental Research, vol.109, no.4, p.379-389.
- Lasram, M.M., Annabi, A.B., Elj, N.E., Selmi, S., Kamoun, A., El-Fazaa, S., Gharbi, N. (2009) "Metabolic disorders of acute exposure to malathion in adult Wistar rats." Journal of Hazardous Materials, vol.163, no.2-3, p.1052-1055.
- Lawler, S.P., Dritz, D., Strange, T., Holyoak, M. (1999) "Effects of Introduced Mosquitofish and Bullfrogs on the Threatened California Red-Legged Frog." Conservation Biology, vol.13, p.613-622.
- Lenkowski, J.R., Reed, M.J., Deininger, L., McLaughlin, K.A. (2008) "Perturbation of Organogenesis by the Herbicide Atrazine in the Amphibian *Xenopus laevis*." Environmental health perspective, vol.116, no.2, p.223-230.
- Li, H., Zhang, S. (2002) "*In vitro* cytotoxicity of the organophosphorus insecticide methylparathion to FG-9307, the gill cell line of flounder (*Paralichthys olivaceus*)." Cell Biology and Toxicology, vol.18, no.4, p.235-241.
- Lioi, M.B., Scarfi, M.R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., Di Berardino, D., Ursini, M.V. (1998) "Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures *in vitro*." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, vol.403, no.1-2, p.13-20.
- Lunec, J., Halligan, E., Mistry, N., Karakoula, K. (2004) "Effect of Vitamin E on Gene Expression Changes in Diet-Related Carcinogenesis." Annals of the New York Academy of Sciences, vol.1031, p.169-183.
- Maden, M. (2000) "The role of retinoic acid in embryonic and post-embryonic development." Proceedings of the Nutrition Society, vol.59, no.1, p.65-73.
- Manicassamy, S., Pulendran, B. (2009) "Retinoic acid-dependent regulation of immune responses by dendritic cells and macrophages." Seminars in Immunology, vol.21, no.1, p.22-27.
- Manning, M.J., Horton, J.D. (1969) "Histogenesis of lymphoid organs in larvae of the South African clawed toad, *Xenopus laevis* (Daudin)." Journal embryology and experimental morphology, vol.22, p.265-277.

- Marcogliese, D.J., King, K.C., Salo, H.M., Fournier, M., Brousseau, P., Spear, P., Champoux, L., McLaughlin, J.D., Boily, M. (2009) "Combined effects of agricultural activity and parasites on biomarkers in the bullfrog, *Rana catesbeiana*." Aquatic Toxicology, vol.91, no.2, p.126-134.
- Marcotte, I., Wegener, K.L., Lam, Y-H., Chia, B.C.S., de Planque, M.R.R., Bowie, J.H., Auger, M., Separovic, F. (2003) "Interaction of antimicrobial peptides from Australian amphibians with lipid membranes." Chemistry and Physics of Lipids, vol.122, no.1-2, p.107-120.
- Marill, J., Idres, N., Capron, C.C., Nguyen, E., Chabot, G.G. (2003) "Retinoic acid metabolism and mechanism of action": a review. Current Drug Metabolism, vol.4, p.1-10.
- Mathews-Roth, M.M., Krinsky, N.I. (1985) "Carotenoid dose level and protection against UV-B induced skin tumors." Photochemistry and Photobiology, vol.42, no.1, p.35-38.
- McCarthy, I.D., Fuiman, L.A. (2008) "Growth and protein metabolism in red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae exposed to environmental levels of atrazine and malathion." Aquatic Toxicology, vol.88, no.4, p.220-229.
- Mebius, R.E. (2007) "Vitamins in control of lymphocyte migration." Nat Immunol, vol.8, no.3, p.229-230.
- Melancon, M.J., Kutay, A.L., Woodin, B.R., Stegeman, J.J. (2006) "Evaluating cytochrome P450 in lesser scaup (*Aythya affinis*) and tree swallow (*Tachycineta bicolor*) by monooxygenase activity and immunohistochemistry: Possible nonlethal assessment by skin immunohistochemistry." Environmental toxicology and chemistry, vol.25, no.10, p.2613-2617.
- Mendelsohn, C., Ruberte, E., Chambon, P. (1992) "Retinoid receptors in vertebrate limb development." Developmental Biology, vol.152, no.1, p.50-61.
- Middleton, E.M., Herman, J.R., Celarier, E.A., Wilkinson, J.W., Carey, C., Rusin, R.J. (2001) "Evaluating Ultraviolet Radiation Exposure with Satellite Data at Sites of Amphibian Declines in Central and South America." Conservation Biology, vol.15, no.4, p.914-929.
- Miller, D.L., Rajeev, S., Gray, M.J., Baldwin, C.A. (2007) "Frog Virus 3 Infection, Cultured American Bullfrogs." Emerging Infectious Diseases, vol.13, no.2, p.342-343.
- Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA (1996) "Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls." FEBS Letters, vol.384, no.3, p.240-242.

- Moore, K.S., Bevins, C.L., Brasseur, M.M., Tomassini, N., Turner, H., Eck, M., Zasloff, M. (1991) "Antimicrobial peptides in the stomach of *Xenopus laevis*." J. Biol. Chem., vol.266, p.19851-19857.
- Mora, J.R., Iwata, M., von Andrian, U.H. (2008) "Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage." Nat Rev Immunol, vol.8, no.9, p.685-698.
- Napoli, J.L. (1999) "Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism: a review." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, vol.1440, no.1-3, p.139-162.
- Ndayibagira, A., Spear, P.A. (1999) "Esterification and hydrolysis of vitamin A in the liver of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the influence of a coplanar polychlorinated biphenyl." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, vol.122, no.3, p.317-325.
- Nilsson, C.B., Hanberg, A., Trossvik, C., Håkansson, H. (1996) "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects retinol esterification in rat hepatic stellate cells and kidney." Environmental Toxicology and Pharmacology, vol.2, no.1, p.17-23.
- Nilsson, C.B., Hoegberg, P., Trossvik, C., Azais-Bræsko, V., Blaner, W.S., Fex, G., Harrison, E.H., Nau, H., Schmidt, C.K., van Bennekum, A.M., Håkansson, H. (2000) "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Increases Serum and Kidney Retinoic Acid Levels and Kidney Retinol Esterification in the Rat." Toxicology and Applied Pharmacology, vol.169, no.2, p.121-131.
- Novák, J., Benísek, M., Hilscherová, K. (2008) "Disruption of retinoid transport, metabolism and signaling by environmental pollutants": a review. Environment International, vol.34, no.6, p.898-913.
- Pearman, P.B., Garner, T.W.J., Straub, M., Greber, U.F. (2004) "Response of the italian agile frog (*Rana latastei*) to a ranavirus, frog virus 3: a model for viral emergence in naive populations." J Wildl Dis, vol.40, no.4, p.660-669.
- Pérez-Casanova, J.C., Hamoutene, D., Samuelson, S., Burt, K., King, T.L., Lee, K. (2010) "The immune response of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) to chronic exposure to produced water." Marine Environmental Research, vol.70, no.1, p.26-34.
- Pessier, A., Nichols, D., Longcore, J., Fuller, M. (1999) "Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*)." J Vet Diagn Invest, vol.11, no.2, p.194-199.
- Piotrowski, J.S., Annis, S.L., Longcore, J.E. (2004) "Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians." Mycologia, vol.96, no.1, p.9-15.

- Pounds, A.J., Bustamante, M.R., Coloma, L.A., Consuegra, J.A., Fogden, M.P.L., Foster, P.N., La Marca, E., Masters, K.L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S.R., Sanchez-Azofeifa, G.A., Still, C.J., Young, B.E. (2006) "Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming." Nature, vol.439, no.7073, p.161-167.
- Pounds, A.J., Crump, M.L. (1994) "Amphibian Declines and Climate Disturbance: The Case of the Golden Toad and the Harlequin Frog." Conservation Biology, vol.8, no.1, p.72-85.
- Pounds, J.A., Fogden, M.P.L., Campbell, J.H. (1999) "Biological response to climate change on a tropical mountain." Nature, vol.398, p.611-615.
- Primeau S, La Violette N, St-Onge J, Berryman D (1999) *Le bassin de la Rivière Yamaska: profil géographique, sources de pollution et interventions d'assainissement. In: Ministère de l'Environnement (éd), Le bassin de la Rivière Yamaska: l'état de l'écosystème aquatique, Québec envirodoq no.EN990224.***
- Rachowick, L.J., Vredenburg, V.T. (2004) "Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages." Disease of aquatic organism, vol.61, p.75-83.
- Rachowicz, L.J., Knapp, R.A., Morgan, J.A.T., Stice, M.J., Vredenburg, V.T., Parker, J.M., Briggs, C.J. (2006) "Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality." Ecology, vol.87, no.7, p.1671-1683.
- Rastogi, S.K., Satyanarayan, P.V.V., Ravishankar, D., Tripathi, S. (2009) "A study on oxidative stress and antioxidant status of agricultural workers exposed to organophosphorus insecticides during spraying." Indian journal of occupational and environmental medecin, vol.13, no.3, p.131-134.
- Reilly, D.S., Tomassini, N., Bevins, C.L., Zasloff, M. (1994) "A Paneth Cell Analogue in *Xenopus* Small Intestine Expresses Antimicrobial Peptides Genes: Conservation of an Intestinal Host-Defense System." The journal of hystochemistry and cytochemistry, vol.42, no.6, p.697-704.
- Ricklefs RE, Miller GL (2005) *Écologie. 4th, DeBoek Université, Paris.***
- Robert , J., Morales, H., Buck, W., Cohen, N., Marr, S., Gantress, J. (2005) "Adaptive immunity and histopathology in frog virus 3-infected *Xenopus*." Virology, vol.332, no.2, p.667-675.
- Rollins-Smith, L.A. (1998) "Metamorphosis and the amphibian immune system." Immunological Reviews, vol.166, no.1, p.221-230.
- Rollins-Smith, L.A. (2009) "The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, vol.1788, no.3, p.1593-1599.

- Rollins-Smith, L.A., Blair, P. (1990) "Expression of class II major histocompatibility complex antigen on adult T cells in *Xenopus* is metamorphosis-dependent." Developmental immunology, vol. 1, p.97-104.
- Rollins-Smith, L.A., Carey, C., Conlon, J.M., Reinert, L.K., Doersam, J.K., Bergman, T., Silberring, J., Lankinen, H., Wade, D. (2003) "Activities of Temporin Family Peptides against the Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) Associated with Global Amphibian Declines." Antimicrob. Agents Chemother. vol. 47, no.3, p.1157-1160.
- Rollins-Smith, L.A., Carey, C., Longcore, J., Doersam, J.K., Boutte, A., Bruzgal, J.E., Conlon, J.M. (2002a) "Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines." Developmental & Comparative Immunology, vol.26, no.5, p.471-479.
- Rollins-Smith, L.A., Doersam, J.K., Longcore, J.E., Taylor, S.K., Shamblin, J.C., Carey, C., Zasloff, M.A. (2002b) "Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines." Developmental and Comparative Immunology, vol.26, no.1, p.63-72.
- Rollins-Smith, L.A., King, J.D., Nielsen, P.F., Sonnevend, A., Conlon, J.M. (2005a) "An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura:Leptodactylidae)." Regulatory Peptides, vol.124, no.1-3, p.173-178.
- Rollins-Smith, L.A., Parsons, S.C., Cohen, N. (1984) "During frog ontogeny, PHA and Con A responsiveness of splenocytes precedes that of thymocytes." Immunology, vol.52, p. 491-500.
- Rollins-Smith, L.A., Ramsey, J.P., Reinert, L.K., Woodhams, D.C., Livo, L.J., Carey, C. (2009) "Immune defenses of *Xenopus laevis* against *Batrachochytrium dendrobatidis*." Frontiers in Bioscience S1, p.68-91.
- Rollins-Smith, L.A., Reinert, L.K., O'Leary, C.J., Houston, L.E., Woodhams, D.C. (2005b) "Antimicrobial Peptide Defenses in Amphibian Skin." Integr. Comp. Biol., vol. 45, no.1, p.137-142.
- Rollins-Smith, L.A., Woodhams, D.C., Reinert, L.K., Vredenburg, V.T., Briggs, C.J., Nielsen, P.F., Conlon, M.J. (2006) "Antimicrobial peptide defenses of the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*)." Developmental & Comparative Immunology, vol.30, no.9, p.831-842.
- Rondeau B (2005) État du Saint-Laurent: La qualité de l'eau du secteur fluvial, la contamination par les toxiques. (ed Environnement Canada et ministère du développement durable dleedpdQ). ISBN 0-662-70670-6, Envirodoq: ENV/2005/270, Canada, Québec.

- Roos, Thomas. C., Jugert, Frank. K., Merk, Hans. F., Bibkers, David. R. (1998) "Retinoid metabolism in the skin". Pharmacological Reviews, vol.5, no.2, p.315-333
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., De Luca, L.M. (2000) "Retinoids in Embryonal Development." Physiol. Rev., vol.80, no.3, p.1021-1054.
- Saito, H., Iwami, S., Shigeoka, T. (1991) "*In vitro* cytotoxicity of 45 pesticides to goldfish GF-scale (GFS) cells." Chemosphere, vol.23, no.4, p.525-537.
- Salaberria, I., Hansen, B.H., Asensio, V., Olsvik, P.A., Andersen, R.A., Jenssen, B.M. (2009) "Effects of atrazine on hepatic metabolism and endocrine homeostasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Toxicology and Applied Pharmacology, vol.234, no.1, p.98-106.
- Schiedt, K., Leuenberger, F.J., Vecchi, M., Glinz, E. (1985) "Absorption, retention and metabolic transformations of carotenoids in rainbow trout, salmon and chicken." Pure and Applied Chemistry, vol.57, no.5, p.685-692.
- Schotthoefer, A.M., Koehler, A.V., Meteyer, C.U., Cole, R.A. (2003) "Influence of *Ribeiroia ondatrae* (Trematoda: Digenea) infection on limb development and survival of northern leopard frogs (*Rana pipiens*): effects of host stage and parasite-exposure level." Canadian Journal of Zoology, vol.81, p.1144-1153.
- Schwartz, J., Suda, D., Light, G. (1986) "Beta carotene is associated with the regression of hamster buccal pouch carcinoma and the induction of tumor necrosis factor in macrophages." Biochemical and Biophysical Research Communications, vol.136, no.3, p.1130-1135.
- Semlitsch, R.D. (2002) "Critical elements for biologically based recovery plans of aquatic-breeding amphibians." Conservation biology, vol.16, no.3, p.619-629
- Shai, Y., Oren, Z. (2001) "From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides." Peptides, vol.22, no.10, p.1629-1641.
- Shklar, G., Schwartz, J. (1988) "Tumor necrosis factor in experimental cancer regression with alphatocopherol, beta-carotene, canthaxanthin and algae extract." European Journal of Cancer and Clinical Oncology, vol.24, no.5, p.839-850.
- Sies, H. (1993) "Strategies of antioxidant defense." European Journal of Biochemistry, vol.215, no.3, p.213-219.
- Sies, H., Stahl, W. (1995) "Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants." Am J Clin Nutr, vol.62, no.6, p.1315-1321.
- Sies, H., Stahl, W., Sundquist, A.R. (1992) "Antioxidant Functions of Vitamins." Annals of the New York Academy of Sciences, vol.669, p.7-20.

- Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D. (1998) "Antimicrobial Peptides from Amphibian Skin: What Do They Tell Us?" Peptide Science, vol.47, no.6, p.435-450.
- Singh, M., Kaur, P., Sandhir, R., Kiran, R. (2008) "Protective effects of vitamin E against atrazine-induced genotoxicity in rats." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, vol.654, no.2, p.145-149.
- Sjögren, P. (1991) "Extinction and isolation gradients in metapopulations: the case of the pool frog (*Rana lessonae*)." Biological Journal of the Linnean Society, vol.42, no.1-2, p.135-147.
- Smith, G., Temple, K., Vaala, D., Dingfelder, H. (2005) "Effects of Nitrate on the Tadpoles of Two Ranids (*Rana catesbeiana* and *R. clamitans*)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol.49, no.4, p.559-562.
- Solomon, K.R., Baker, D.B., Richards, P., Dixon, K.R., Klaine, S.J., La Point, T.W., Kendall, R.J., Weisskopf, C.P., Giddings, J.M., Giesy, J.P., Hall Jr., L.W., Williams, M.W. (1996) "Ecological Risk Assessment Of Atrazine In North American Surface Waters." Environmental Toxicology and Chemistry, vol.15, no.1, p.31-76.
- Solomon, K.R., Carr, J.A., Du Preez, L.H., Giesy, J.P., Kendall, R.J., Smith, E.E., Van Der Kraak, G.J. (2008) "Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles: A Critical Review." Critical Reviews in Toxicology, vol.38, no.9, p.721 - 772.
- Sonnevend, A., Knoop, F.C., Patel, M., Pál, T., Soto, A.M., Conlon, J.M. (2004) "Antimicrobial properties of the frog skin peptide, ranatuerin-1 and its [Lys-8]-substituted analog". Peptides, vol.25, no.1, p.29-36.
- Sparling, D.W., Feller, G.M., McConnell, L.L. (2001) "Pesticides and amphibian population declines in California, USA." Environmental toxicology and chemistry, vol.20, no.7, p.1591-1595.
- Sporn, M.B., Robert, A.B., Goodman, D.S. (2004) The retinoids: biology, chemistry and medicine, Lippincott Williams and Wilkins, 2 nd edition, Philadelphia.
- Stevenson, D.E., Kehrer, J.P., Kolaja, K.L., Walborg, E.F., Klaunig, J.E. (1995) "Effect of dietary antioxidants on dieldrin-induced hepatotoxicity in mice." Toxicology Letters, vol.75, no.1-3, p.177-183.
- Stopper, G.F., Hecker, L., Franssen, R.A., Sessions, S.K. (2002) "How trematodes cause limb deformities in amphibians." Journal of Experimental Zoology, vol.294, no.3, p.252-263.
- Sugiyama, M., Tsuzuki, K., Matsumoto, K., Ogura, R. (1992) "Effect of Vitamin E on Cytotoxicity, DNA Single Strand Breaks, Chromosomal Aberrations, and

- Mutation in Chinese Hamster V-79 Cells Exposed to Ultraviolet-B light.” Photochemistry and Photobiology, vol.56, no.1, p.31-34.
- Sujak, A. (2009) “Interactions between canthaxanthin and lipid membranes — possible mechanisms of canthaxanthin toxicity:” a review. Cellular & Molecular Biology Letters, vol.14, no.3, p.395-410.
- Sujak, A., Gabrielska, J., Milanowska, J., Mazurek, P., Strzalka, K., Gruszecki, W.I. (2005) “Studies on canthaxanthin in lipid membranes.” Biochimica and Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, vol.1712, no.1, p.17-28.
- Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M., Cyr, D., Marcogliese, D. (2002) “Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis.” Environmental toxicology and chemistry, vol.21, no.3, p.527-531.
- Tellez-Bañuelos, M.C., Santerre, A., Casas-Solis, J., Bravo-Cuellar, A., Zaitseva, G. (2009) “Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan.” Fish and Shellfish Immunology, vol.27, no.2, p.105-111.
- Thoms, S.D., Stocum, D.L. (1984) “Retinoic acid-induced pattern duplication in regenerating urodele limbs.” Developmental Biology, vol.103,no.2, p.319-328.
- Thunberg, T., Ahlborg, U.G., Håkansson, H., Krantz, C., Monier, M. (1980) “Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the hepatic storage of retinol in rats with different dietary supplies of vitamin A (retinol).” Archives of Toxicology, vol.45, no.4, p.273-285.
- Tomita, Y., Himeno, K., Nomoto, K., Endo, H., Hirohata, T. (1987) “Augmentation of tumor immunity against syngeneic tumors in mice by beta-carotene”. Journal of the national cancer institut, vol.78, no.4, p.679-681.
- Tseng, A-S., Adams, D.S., Qui, D., Koustuban, P., Levin, M.(2007) “Apoptosis is required during early stages of tail regeneration in *Xenopus Laevis*.” Developmental biology, vol.301, no.1, p.62-69
- Tuzmen, N., Candan, N., Kaya, E., Demiryas, N. (2008) “Biochemical effects of chlorpyrifos and deltamethrin on altered antioxidative defense mechanisms and lipid peroxidation in rat liver.” Cell Biochemistry and Function, vol.26, no.1, p.119-124.
- Tzimas, G., Nau, H. (2001) “The role of metabolism and toxicokinetics in retinoid teratogenesis” Current Drug Metabolism, vol.7,no.9, p.803-831.
- Venturino, A.S., Rosenbaum, E., Caballero De Castro, A., Anguiano, O.L., Gauna, L., Fonovich De Schroeder, T., Pechen De D'Angelo, A.M. (2003) “Biomarkers of effect in toads and frogs”: a review. Biomarkers, vol.8, no.3-4, p.167-186.

- Vera Candiotti, J., Natale, G.S., Soloneski, S., Ronco, A.E., Larramendy, M.L. (2010) "Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicard-containing technical formulation insecticide Aficida®" Chemosphere, vol.78, no.3, p.249-255.
- Vignal, E., Chavanieu, A., Roch, P., Chiche, L., Grassy, G., Calas, B., Aumelas, A. (1998) "Solution structure of the antimicrobial peptide ranalexin and a study of its interaction with perdeuterated dodecylphosphocholine micelles". European Journal of Biochemistry, vol.253, no.1, p.221-228.
- Vos, C.C., Chardon, J.P. (1998) "Effects of Habitat Fragmentation and Road Density on the Distribution Pattern of the Moor Frog *Rana arvalis*" Journal of Applied Ecology, vol.35, no.1, p.44-56.
- Wang, Y., Knoop, F.C., Remy-Jouet, I., Delarue, C., Vaudry, H., Conlon, J.M. (1998) "Antimicrobial peptides of the brevinin-2 family isolate4d from gastric tissue of the frog, *Rana esculenta*". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 253, p.600-603.
- Widder, P.D., Bidwell, J.R. (2008) "Tadpole size, cholinesterase activity, and swim speed in four frog species after exposure to sub-lethal concentrations of chlorpyrifos" Aquatic Toxicology, vol. 88, no.1, p.9-18.
- Wilbur, H.M. (1980) "Complex Life Cycles" Annual Review of Ecology and Systematics, vol.11,no.1 p.67-93.
- Yan, J., Xia, Q., Webb, P., Warbritton, A.R., Wamer, W.G., Howard, P.C., Boudreau, M., Fu, P.P. (2006) "Levels of retinyl palmitate and retinol in stratum corneum, epidermis and dermis of SKH-1 mice" Toxicology and Industrial Health, vol.22, no.3, p.103-112.
- Zile, M.H. (2001) "Function of Vitamin A in Vertebrate Embryonic Development": a review. J. Nutr., vol.131, no.3, p.705-708.

SITES INTERNET

Organisme de bassin versant de la Yamaska, 2010

<http://www.obv-yamaska.qc.ca>

MRNF, 2010 : Ministère des ressources naturel et de la faune.

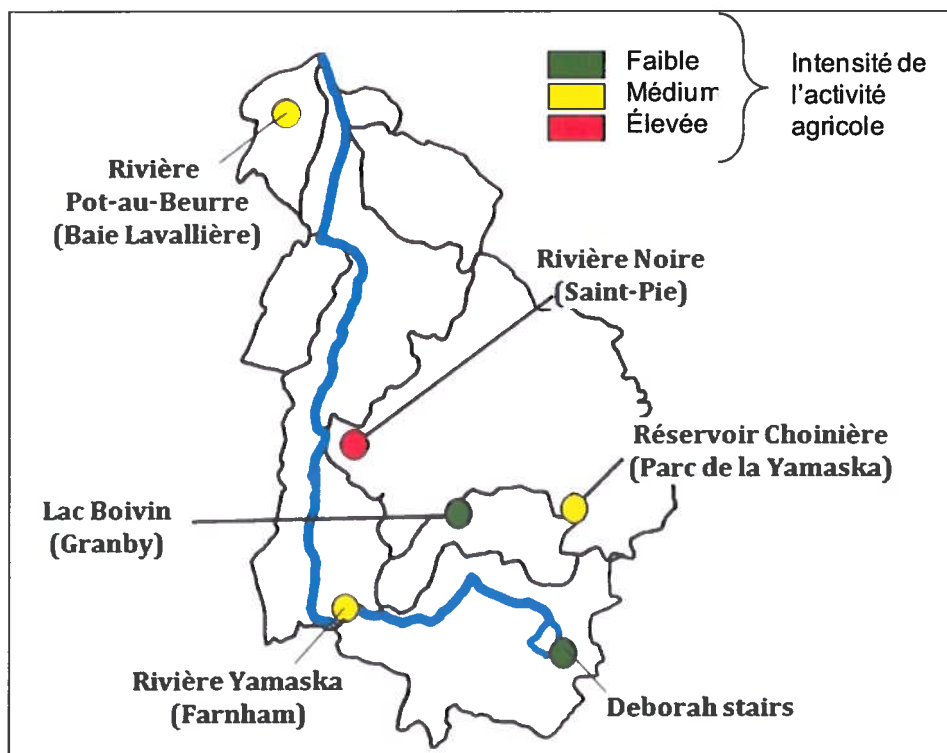
<http://www.mrnf.gouv.qc.ca/faune/especes/menacees/index.jsp>

MDDEP, 2010 : Développement durable, Environnement et Parcs du Québec

<http://www.mddep.gouv.qc.ca>

APPENDICE 1

Cartes des sous bassin versant de la Rivière Yamaska et les différents sites échantillonnés ainsi que leur coordonnées.



Sites	Longitude	latitude
Deborah Stairs (Sud du Lac Brome)	45° 12' 11.9" N	72° 33' 7.8" W
Lac Boivin (Granby)	45° 23' 39.1" N	72° 40' 11.6" W
Rivière Yamaska (Farnham)	45° 16' 40.3" N	72° 57' 46.5" W
Réservoir Choinière (Parc de la Yamaska)	45° 25' 20" N	72° 35' 52.0" W
Rivière Pot-au-Beurre (Baie Lavallière, Sorel)	46° 02' 56.3" N	72° 59' 59.2" W
Rivière Noire (Sainte-Pie)	45° 30' 09.5" N	72° 54' 48.7" W

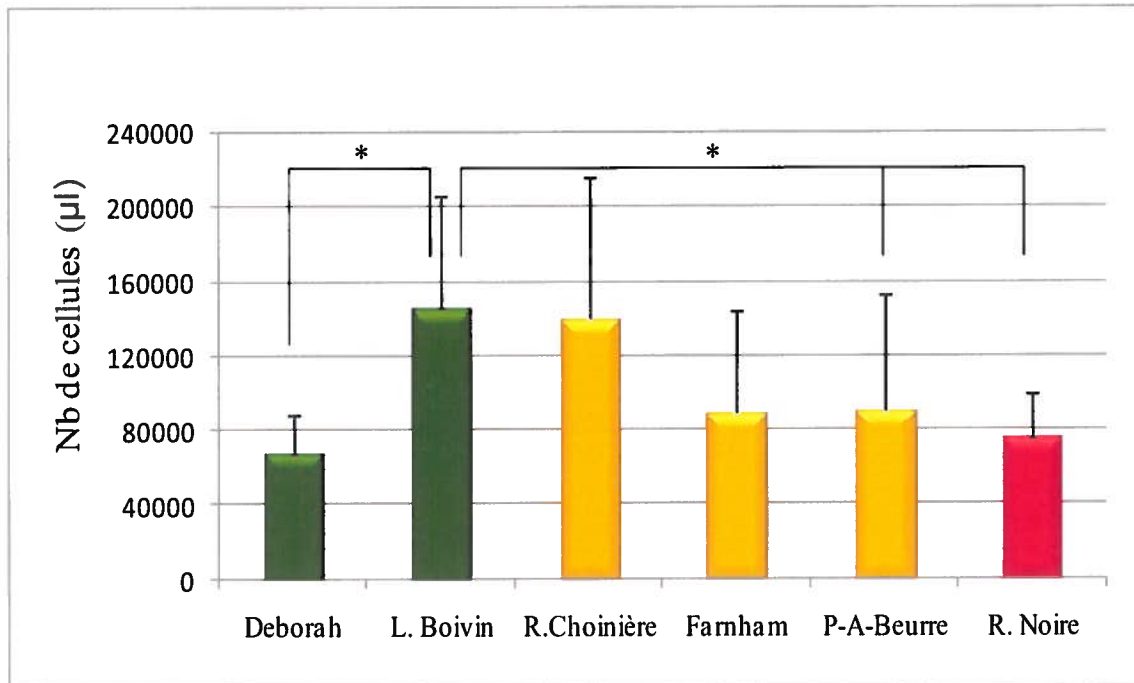
APPENDICE 2

Concentration ($\mu\text{g/L}$) des aryloxyacides et des organophosphorés dans les sites échantillonnés le 7 juillet 2008 analyse effectuée par le MDDEP.

	Deborah	lac Boivin	Yamaska (Farnham)	Réservoir Choinière	Pot-au- beurre	Rivière Noire
Dicamba	0.03	0.03	0.05	0.03	ND	0.04
Bentazone	0.04	0.04	0.04	0.04	ND	0.09
Dééthyl- atrazine	0.04	0.03	0.03	0.03	0.10	0.12
Atrazine	0.02	0.06	0.15	0.15	0.29	0.61
Métolachlore	0.02	0,01	0.05	0.08	0.19	0.11
Glyphosate	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.22

APPENDICE 3

Cellularité de la rate du ouaouaron pour l'année 2008



Le nombre de splénocytes totaux dans la rate du ouaouaron mis en relation avec le poids de la grenouille en fonction des différents sites ayant des niveaux d'activité agricole allant de faibles (vert) à élevés (rouge). Le test statistique utilisé est le Wilcoxon car les données sont non paramétriques. Il y a une différence significative entre les deux sites témoins. Le Lac Boivin a une différence significative avec Pot-Au-Beurre et Rivière Noire. ($p > 0,05$)

APPENDICE 4

Mise au point effectuée pour les peptides antimicrobiens

Lors de la 1^{ière} campagne d'échantillonnage en 2008, le prélèvement des peptides devait se faire par stimulation des glandes à peptides par la norépinephrine. Je m'étais basée sur un article de Louise-Rollins smith (2000) proposant deux techniques : l'injection sous-cutanée de la norépinephrine ou par immersion de la grenouille dans de l'eau contenant de la norépinephrine. Je ne pouvais pas utiliser la technique par injection, car je ne voulais pas risquer d'interférer dans les résultats des autres chercheurs sur différents organes prélevés sur place. Alors, j'ai utilisé la méthode par immersion. Ces protocoles ont l'avantage de ne pas nuire à la santé du ouaouaron et ainsi, il pouvait, suite à sa capture, être libéré dans la nature.

Matériels et méthodes

Les ouaouarons ont été submergés dans une solution (2.92g NaCl et 2,05g Na Acetate / 1L H₂O, pH:7) à 10% de norépinéphrine durant 15 min. Le liquide à immersion a été récolté et du HCl a été ajouté (concentration finale 10% HCl) pour permettre de conserver les peptides. Le liquide à immersion a été filtré à l'aide de filtre Sep-Pak sous pompe à vide à une vitesse de 2 ml par minute. Le filtre a ensuite été élué avec ACN 70% / H₂O TFA 0,06%. L'élué a été lyophilisé pour l'analyse ultérieure par HPLC-MS-MS.

Résultats

Aucun peptide n'a été retrouvé.

Améliorations apportés

Suite à cet échec, je me suis penchée sur la méthodologie. Je me suis aperçue que le protocole par immersion n'était efficace que sur des petites espèces de grenouilles. Les ouaouarons étant de très grosses grenouilles, il aurait fallu les injecter avec la norépinephrine. Le protocole d'extraction des peptides proposé par Goraya *et al*, (1998), utilisait la peau entière (mentionné dans le matériel et méthode de l'article). J'ai donc utilisé ce protocole. Le désavantage de cette technique est la mort inévitable du spécimen. Cependant, elle permet de récupérer une très grande quantité de protéine.

