

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Détermination des effets de l'intensité de l'activité agricole
sur le développement et l'intégrité du système reproducteur
des populations de ouaouaron (*Lithobates catesbeianus*)
du bassin versant de la rivière Yamaska**

Par
Mireille Plouffe-Malette

Mémoire présenté pour l'obtention
du grade de: Maître ès science (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé (3825)

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Pr. Daniel Cyr

INRS-Institut Armand-Frappier

Examinateur externe

Louis Martel

MDDEP

Directeur de recherche

Pr. Patrick Devine

INRS-Institut Armand-Frappier

Codirecteur de recherche

Pr. Philip Spear

Département des sciences biologiques, UQAM

Résumé

Les causes du déclin mondial des amphibiens sont présentement incertaines, toutefois, plusieurs études en laboratoire suggèrent que la contamination agricole est l'une des causes probables. Il a été montré que l'exposition à de faibles concentrations des pesticides les plus fréquemment retrouvés dans les eaux de surface cause des effets néfastes au système reproducteur. Dans l'étude présente, des ouaouarons (*Lithobates catesbeianus*) adultes et têtards ont été recueillis à plusieurs sites de reproduction dans le bassin versant de la rivière Yamaska entre 2004 et 2009. Les sites d'échantillonnage présentent une intensité agricole faible, modérée ou élevée selon le pourcentage de terre en culture avoisinant le plan d'eau; $\leq 19\%$, $20-59\%$, $\geq 60\%$. Des têtards ont également été achetés de Boreal Northwest et ont été gardés en captivité à titre de contrôles. Les têtards ont été classés selon leur stade de développement, puis leurs mesures morphométriques ont été prises et le complexe néphrogonadal a été prélevé. Chez les adultes, les mesures morphométriques, un échantillon de sang et les testicules ont été prélevés. L'intégrité et le développement du complexe néphrogonadal des têtards et d'un testicule des mâles adultes ont été évalués en histopathologie. L'autre testicule a été utilisé pour le dosage du niveau de récepteurs à œstrogène alpha (α -ER) par immunobuvardage de type Western. Tant chez les adultes que chez les têtards, les mesures morphométriques observées se sont avérées inférieures aux sites à intensité agricole modérée et élevée, souvent de façon significative, exception faite du site rivière Pot-au-Beurre. Trois niveaux d'intégrité testiculaire ont été déterminés, soit les testicules normaux, à dégénérescence précoce et à dégénérescence avancée. La dégénérescence précoce est caractérisée par l'absence de kystes de spermatogonies le long de la paroi du lobule qui se résulte en espaces vides, tandis que la dégénérescence tardive est caractérisée par l'absence de structure lobulaire et la présence de débris cellulaires. L'incidence de dégénérescence testiculaire précoce a significativement augmenté aux sites à intensité agricole modérée et élevée exception faite du site

rivière Pot-au-Beurre. La dégénérescence testiculaire avancée, quant à elle, a seulement été observée aux sites rivière Yamaska et rivière à la Barbue avec une incidence respective de 6,9 et 26,7 %. L'expression d'α-ER a augmenté significativement chez les animaux des sites à intensité agricole élevée. Chez les têtards des sites à intensité agricole élevée, la différenciation sexuelle s'est avérée différée et les ratios sexuels se sont avérés débalancés plus souvent que chez les têtards en captivité et des sites référence. Chez les têtards mâles, le compte de gamètes montre des tendances inconsistantes et non significatives. Toutefois, plusieurs ovocytes testiculaires ont été observés chez les têtards des sites à intensité agricole élevée, alors qu'aucun n'a été observé chez les têtards des sites référence. Le développement des gamètes avancés a été retardé chez les têtards femelles des sites à intensité agricole modérée et élevée en comparaison à ceux des sites référence et aux têtards en captivité. Globalement, les résultats de l'étude suggèrent que le développement et l'intégrité du système reproducteur est affecté négativement par la contamination agricole du bassin versant de la rivière Yamaska. Aussi, les effets observés suggèrent que la contamination agricole contient des perturbateurs endocriniens importants, l'évaluation plus approfondie des sources de contamination serait toutefois utile pour l'interprétation des résultats.

Mireille Plouffe-Malette

Étudiante

Patrick Devine

Directeur de recherche

Remerciements

En avant-propos à ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui ont contribué à la réalisation de ce projet qui clôt mon parcours universitaire. Je tiens d'abord à remercier mes directeurs de recherche, messieurs Patrick Devine et Philip Spear, qui se sont toujours montré disponibles et à l'écoute durant la réalisation du projet et pour leur patience et leur soutien continu. Mes remerciements vont également à Monique Boily qui coordonne le projet ouaouaron avec brio depuis plusieurs années.

J'exprime toute ma gratitude à mes parents qui m'ont toujours soutenue et encouragée. Papa, maman, je vous adresse mes plus sincères remerciements pour toutes les tapes dans le dos et pour les nombreux dons à la Fondation Plouffe-Malette! Merci à Kri et à mes amis Gen, Louis et Véro ainsi qu'à mon chârri pour vos encouragements, mais pas merci d'avoir rit encore et encore de mon sujet de recherche!!

Merci à toutes et à tous

Table des matières

RÉSUMÉ	II
REMERCIEMENTS	IV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VIII
LISTE DES FIGURES	XII
CHAPITRE 1 – REVUE DE LITTÉRATURE	1
SECTION 1 – INTRODUCTION.....	1
1.1 Le rôle et l'importance écologique des amphibiens et du ouaouaron (<i>Lithobates catesbeianus</i>).....	1
1.2 Le déclin mondial des amphibiens.....	2
1.3 La sensibilité des amphibiens à leur milieu.....	4
SECTION 2 - PHYSIOLOGIE DE LA MÉTAMORPHOSE, DU DÉVELOPPEMENT ET DU SYSTÈME REPRODUCTEUR DES OUAOUARONS.....	6
2.1 Revue de la métamorphose et des hormones thyroïdiennes.....	6
2.2 La différenciation sexuelle	9
2.3 La spermatogénèse	11
2.4 L'ovogénèse et la vitellogénèse.....	14
2.5 Le rôle des gonadotrophines dans la fonction reproductive.....	16
SECTION 3 – LA CONTAMINATION AGRICOLE ET SES CONSÉQUENCES	19
3.1 Le profil de contamination agricole du bassin versant de la rivière Yamaska.....	19
3.2 Effets néfastes potentiels de la contamination agricole	23
SECTION 4 – OBJECTIF ET HYPOTHÈSE DE L'ÉTUDE	29
CHAPITRE 2 – PRÉSENTATION D'UN ARTICLE SCIENTIFIQUE: INFLUENCE OF AGRICULTURAL ACTIVITY ON REPRODUCTIVE SYSTEM OF MALE BULLFROG (<i>LITHOBATES CATESBEIANUS</i>) FROM THE YAMASKA RIVER WATERSHED.	30
RÉSUMÉ	30
CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANTE	31
ABSTRACT	33

1 INTRODUCTION	34
2 MATERIALS AND METHODS.....	36
2.1 Study sites	36
2.2 Animal capture.....	37
2.3 Histology and analyses of gonads and gametes.....	37
2.4 Western blots.....	38
2.5 Statistical analysis	39
3 RESULTS	39
4 DISCUSSION.....	41
5 ACKNOWLEDGEMENTS	44
6 REFERENCES	45
7 TABLES.....	49
8 FIGURES	50

CHAPITRE 3 – PRÉSENTATION D'UN ARTICLE SCIENTIFIQUE: SEXUAL DIFFERENTIATION AND GONAD DEVELOPMENT OF BULLFROGS (*LITHOBATES CATESBEIANUS*) TADPOLES IN AGRICULTURAL ENVIRONMENT..... 55

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS	55
CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT.....	56
ABSTRACT	58
1 INTRODUCTION	60
2 MATERIALS AND METHODS.....	62
2.1 Study sites	62
2.2 Animal capture.....	62
2.3 Tadpoles in captivity	63
2.4 Histological analyses of gonads.....	63
2.5 Statistical analyses	64
3 RESULTS	65
4 DISCUSSION.....	67
5 ACKNOWLEDGEMENTS	71
6 REFERENCES	72

7 TABLES.....	77
8 FIGURES	78
CHAPITRE 4 – DISCUSSION ET PERSPECTIVES	81
BIBLIOGRAPHIE	87
ANNEXE – MÉTHODOLOGIE DÉTAILLÉE	A
A.1 LES SITES D'ÉCHANTILLONNAGE DANS LE BASSIN VERSANT DE LA RIVIÈRE YAMASKA.....	A
A.2 LA CAPTURE ET LE TRAITEMENT DES OUAOUARONS TÊTARDS ET ADULTES	D
A.3 FIXATION DES TISSUS ET DISPOSITION SUR LES LAMES DE MICROSCOPE	G
A.4 COLORATION À L'HÉMATOXYLINE ET ÉOSINE.....	H
A.5 ÉVALUATION DES GAMÈTES DES TÊTARDS	I
A.6 ÉVALUATION DES GONADES CHEZ LES ADULTES MÂLES	J
A.7 IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN	L
A.8 ANALYSES STATISTIQUES	M

Liste des abréviations

\leq	Plus petit ou égal
<	Plus petit
\geq	Plus grand ou égal
>	Plus grand
=	Égal
\neq	N'égal pas
\pm	Plus ou moins
%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
α-ER	Récepteur à œstrogène alpha
$\mu\text{g/L}$	Microgramme par litre
μm	Micromètre
A	Accepteur d'électron
ANOVA	Analyse de variance, de l'anglais <i>analysis of variance</i>
CCME	Conseil canadien des ministres de l'environnement
CEAEQ	Centre d'expertise en analyses environnementales du Québec
CINLB	Centre d'interprétation de la nature du lac Boivin
CIRE	Centre interinstitutionnel de recherche en écotoxicologie du Québec
Cm	Centimètre
CoCl ₂	Chlorure de cobalt
CYP	Cytochrome P450
ED	Perturbateurs endocriniens. De l'anglais <i>endocrine disruptors</i>
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
ER	Récepteurs à œstrogène, de l'anglais <i>estrogen receptor</i>
ES	Espace vide, de l'anglais <i>empty space</i>
FSH	Hormone folliculo stimulante, de l'anglais <i>folliculo stimulating hormone</i>
G	Accélération gravitationnelle

g/Mol	Gramme par mole
GnRH	Gonadolibérine
h	Heure
h_0	Hypothèse nulle
h_1	h_1 hypothèse alternative
h_2	Dihydrogène
H_2O	Eau
ha	Hectare
HRP	Péroxydase de raifort, de l'anglais <i>horseradish peroxidase</i>
IUCN	Union Internationale pour la Conservation de la Nature. De l'anglais <i>International Union for the Conservation of Nature</i>
K	Reins
kDa	KiloDalton
Kg	Kilogramme
KH_2PO_4	Phosphate monopotassium
km	Kilomètre
km^2	Kilomètre carré
LC50	Concentration létale 50
LH	Hormone lutéinisante, de l'anglais <i>luteinizing hormone</i>
LOAEL	Dose minimale causant un effet toxique, de l'anglais <i>lowest observable adverse effect level</i>
LPOg	Ovogonies primaires avancées, de l'anglais <i>late primary oogonia</i>
LW	Paroi du lobule séminifère, de l'anglais <i>lobule wall</i>
m^3/s	Mètre cube par seconde
MAPAQ	Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec
MDDEP	Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs du Québec
mg/L	Milligramme par litre
$MgSO_4$	Sulfate de magnésium

mM	Millimolaire
MS-222	Tricaine méthanesulfonate
N	Nord
NaCO ₃	Bicarbonate de sodium
NOAEL	Dose la plus élevée sans effet toxique, de l'anglais <i>no observable adverse effect level</i>
O ₂	Dioxygène
Ocl	Ovocytes de type I, de l'anglais <i>oocyte type I</i>
OV	Cavité ovarienne, de l'anglais <i>ovarian cavity</i>
pH	Potentiel hydrogène
PMSF	Fluorure de phenylmethanesulfonyl
RECCAR	Réseau Canadien de conservation des amphibiens et des reptiles
RPOg	Ovogonies primaires dormantes, de l'anglais <i>resting primary oogonia</i>
Sc	Kystes de spermatocytes
SC	Spermatocytes
Sg	Sg kystes de spermatogonies (Sg)
SG	Spermatogonia
SOg	Ovogonies secondaires, de l'anglais <i>secondary oogonia</i>
SP	Spermatozoa
ST	Spermatids
SVL	Longueur entre le museau et le cloaque, de l'anglais <i>snout to vent length</i>
TBS-T	Solution saline tamponnée avec du tris, de l'anglais <i>tris buffered saline</i>
TOXEN	Centre de recherche en toxicologie de l'environnement
TR α	Récepteur thyroïdien alpha
TR β	Récepteur thyroïdien beta
u.a.	Unités animals
USEPA	U.S. Environmental protection agency

V Volt
W Ouest
X Grossissement

Liste des figures

Figure 1 : Aire de distribution naturelle (rouge) et actuelle (vert) du ouaouaron..	2
Figure 2 : Cycle de vie classique d'un amphibien de l'ordre des anoures	5
Figure 3 : Stades de développement 17 à 39.....	8
Figure 4 : Différenciation d'une gonade bipotente en ovaire ou en testicule	10
Figure 5 : Appareil urogénital des anoures mâles	12
Figure 6 : Lobule séminifère	13
Figure 7 : Appareil urogénital des anoures femelles	14
Figure 8 : Ovaire contenant des ovogonies et ovocytes	15
Figure 9 : Tributaires principaux et secondaires du fleuve Saint-Laurent.....	19
Figure 10 : Situation géographique du bassin versant de la rivière Yamaska ...	20
Figure 11 : Distribution (A) des types de cultures et (B) de la production animale dans le bassin versant de la rivière Yamaska	21
Figure 12 : Formule développée plane (A) de l'atrazine et (B) du métolachlore	23
Figure 13: Carte de la situation géographique des sites d'échantillonnage.....	C
Figure 14 : Mesures morphométriques chez les têtards.....	E
Figure 15 : Cavité abdominale du têtard de ouaouaron.....	E
Figure 16 : Mesures morphométriques chez les adultes	F
Figure 17 : Différents niveaux d'intérité testiculaire	K

Chapitre 1 – Revue de littérature

Section 1 – Introduction

1.1 Le rôle et l'importance écologique des amphibiens et du ouaouaron (*Lithobates catesbeianus*)

Les quelques 5000 espèces d'amphibiens sont divisées en quatre ordres : (1) les anoures (grenouilles et crapauds), (2) les urodèles (salamandres et tritons), (3) les gymnophiones et (4) les cécilie. Elles sont distribuées dans de nombreux habitats, bien que la plus grande diversité se retrouve dans les milieux tropicaux (Duellman et Trueb, 1986). Le ouaouaron (*Lithobates catesbeianus*) est un représentant de l'ordre des anoures qui était distribué naturellement dans l'est de l'Amérique du Nord. Étant une espèce invasive et grâce à son introduction dans de nouveaux milieux par l'humain, le ouaouaron est maintenant distribué dans tout l'Amérique du Nord, en Amérique du Sud, en Europe et en Asie (Figure 1). L'introduction de l'espèce a été effectuée de façon accidentelle dans de nombreux cas, mais aussi de façon volontaire, pour l'alimentation et le contrôle des insectes considérés nuisibles (Kupferberg, 1993).

Les amphibiens jouent un rôle majeur dans la chaîne trophique et dans l'écosystème où ils résident (Dunson *et al.*, 1992; Drost et Feller, 1996), entre autres grâce à la complexité de leur cycle de vie. Durant la phase larvaire, les anoures typiques d'Amérique du Nord consomment principalement des végétaux aquatiques, puis les adultes vivent dans le compartiment terrestre. Par conséquent, les ouaouarons transfèrent une quantité importante de nutriments entre les deux compartiments environnementaux (Seale, 1980). Les juvéniles et les adultes sont généralement des carnivores opportunistes et représentent un prédateur important pour de nombreuses espèces d'invertébrés et de vertébrés dont des petits mammifères, des poissons, des oiseaux et d'autres amphibiens. À tous les stades de leur cycle de vie, les amphibiens sont également des proies (Toft, 1985).

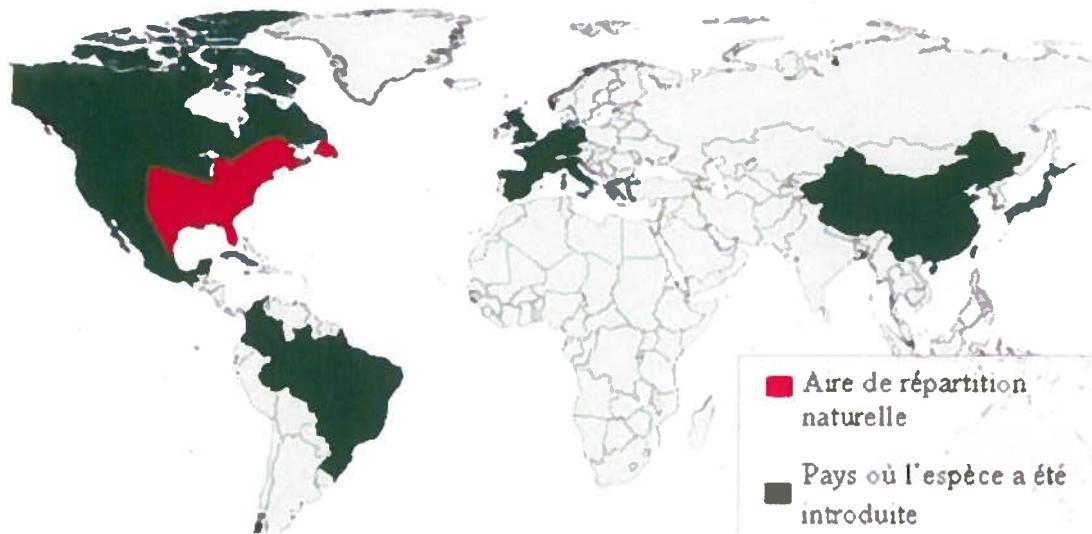


Figure 1 : Aire de distribution naturelle (rouge) et actuelle (vert) du ouaouaron (Cistude Nature, 2005a)

1.2 Le déclin mondial des amphibiens

L'importance écologique des amphibiens est d'autant plus soulignée depuis une vingtaine d'années, car les populations diminuent et les espèces s'éteignent, ce qui affecte l'équilibre des écosystèmes (Wyman, 1990; Wake et Morovitz, 1991; Alford et Richards, 1999). Le déclin des amphibiens a des conséquences variées sur les écosystèmes, selon la nature des relations entre les espèces concernées et leur milieu. Conséquemment au déclin des amphibiens, les populations de proies voient leurs effectifs exploser, tandis que leurs prédateurs subissent la restriction des ressources alimentaires (Stewart et Woolbright, 1996). En effet, la présence de certaines espèces d'amphibiens est essentielle à la survie d'autres espèces. À titre d'exemple, il a été montré par Jennings et collaborateurs (1992) que la couleuvre de l'ouest (*Thamnophis elegans*) de la chaîne de montagne des Sierra Nevada de la Californie ne peut survivre sans la présence d'espèces d'amphibiens.

Aussi, le déclin des amphibiens est-il observé dans tous les écosystèmes, variant selon l'espèce et la région. La liste rouge de l'Union internationale pour la conservation de la nature, qui a pour mission d'évaluer le statut des espèces menacées, suggère qu'au moins 32% des espèces d'amphibiens sont menacées d'extinction dans un futur prévisible, incluant 17 des 45 espèces canadiennes indigènes (Réseau canadien de conservation des amphibiens et des reptiles (RECCAR), 2010). Les données disponibles étant plutôt récentes, l'évaluation de l'effectif des espèces et populations d'amphibiens reste toutefois difficile (Blaustein *et al.*, 1994b; Pechmann et Wilbur, 1994).

Les causes suspectées du déclin des amphibiens sont nombreuses et très variées. Parmi ces causes, la modification et la destruction des habitats par l'activité anthropique est crue comme étant importante (Pechmann et Wilbur, 1994; Coloma, 1995). Aussi, la surexploitation de certaines espèces (Corn et Fogleman, 1984) ainsi que l'introduction de nouvelles espèces plus compétitrices (Hayes et Jennings, 1986; Fisher et Shaffer, 1996) ou tout simplement prédatrices (Fisher et Shaffer, 1996) peuvent influencer à la fois l'abondance et la distribution géographique des espèces et populations. Selon Gamradt et Kats (1996), l'introduction d'écrevisses de Louisiane (*Procambarus clarkii*) et de gambusies (*Gambusia affinis*) empêche la reproduction et la survie du triton de Californie (*Taricha torosa*), car ses larves sont des proies de ces deux espèces prédatrices.

L'amincissement de la couche d'ozone est également suspecté comme étant un facteur du déclin, car les amphibiens et leurs œufs sont très sensibles aux radiations ultraviolettes. Il a été montré que ces radiations entraînent notamment des troubles du développement embryonnaire, la perturbation des sens et l'immunosuppression (Blaustein *et al.*, 1994a, 1995 et 1996). Les différentes et nombreuses sources de stress peuvent diminuer l'efficacité du système immunitaire (Carey et Bryant, 1995; Kiesecker et Blaustein, 1995), ce qui augmente la susceptibilité des amphibiens aux maladies, aux infections et aux

parasites qui peuvent menacer leur survie (Laurance *et al.*, 1996; Kiesecker et Blaustein, 1997).

Les amphibiens sont très sensibles aux conditions de leur milieu et aux facteurs environnementaux, tels les précipitations acides (Dunson *et al.*, 1992; Wyman et Jancola, 1992), les gelées hivernales plus intenses (Heyer *et al.*, 1988) et la sécheresse (Wissinger et Whiteman, 1992; Fellers et Drost, 1993) qui sont des facteurs crus comme étant importants dans le déclin des amphibiens. On compte également la contamination du milieu par la pollution (Kirk, 1988; Carey et Bryant, 1995) et les changements climatiques (Crump *et al.*, 1992; Pounds et Crump, 1994) comme ayant une influence possible sur l'abondance et la distribution des espèces.

1.3 La sensibilité des amphibiens à leur milieu

La grande sensibilité des amphibiens aux conditions de leur milieu et à la contamination environnementale est reliée à deux facteurs principaux, soit (1) la perméabilité des œufs et de la peau et (2) le cycle de vie biphasique. Les œufs des amphibiens sont anamniotiques, c'est-à-dire sans coquille et sans membrane amniotique (Packard et Seymour, 1997), ce qui les rend perméables au milieu et à ses contaminants avant la fécondation. La peau, quant à elle, est très mince, peu kératinisée, et richement vascularisée, ce qui permet aux contaminants absorbés de passer directement dans la circulation. L'absorption est également facilitée grâce au mucus qui recouvre la peau. Ce dernier permet la dissolution des gaz et la protection contre les dommages physiques, mais aussi la dissolution de certains contaminants environnementaux, facilitant leur absorption (McDiarmid, 1992).

Le cycle de vie biphasique (Figure 2) des amphibiens et leur position élevée dans la chaîne trophique permet leur exposition chronique à la contamination de deux compartiments environnementaux principaux, soit terrestre et aquatique

(Fellers et Drost, 1993; Blaustein, 1994). En effet, les œufs, déposés dans le plan d'eau ou à sa surface sont très perméables aux contaminants auxquels ils sont exposés dans l'air et dans l'eau, spécialement avant la fécondation. Après l'éclosion, les larves vivent dans le plan d'eau où elles sont exposées aux contaminants par la respiration branchiale, par l'ingestion et par l'absorption cutanée. Finalement, les juvéniles et les adultes sont exposés aux contaminants présents dans l'air par la respiration cutanée et pulmonaire, à ceux présents dans l'eau par l'ingestion et l'absorption cutanée et dans le compartiment terrestre par l'ingestion de proies (McDiarmid, 1992).

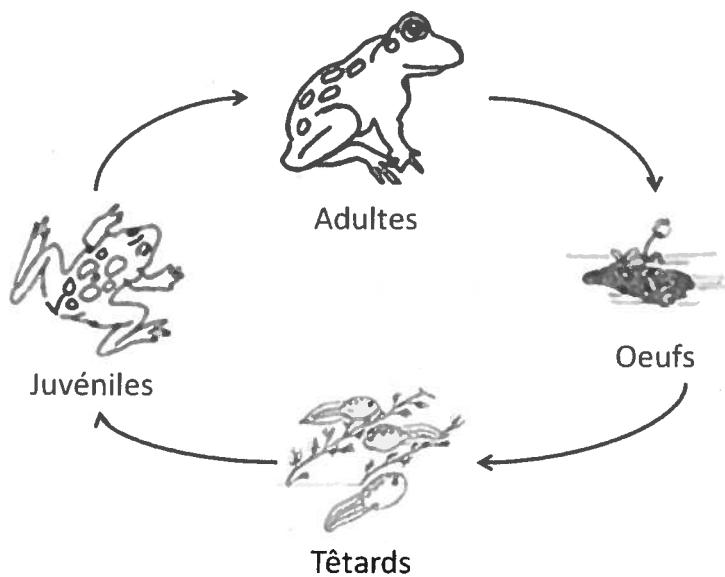


Figure 2 : Cycle de vie classique d'un amphibiens de l'ordre des anoures; les œufs, les têtards, les juvéniles et les adultes. (Cistude Nature, 2005b)

Section 2 - Physiologie de la métamorphose, du développement et du système reproducteur des ouaouarons

2.1 Revue de la métamorphose et des hormones thyroïdiennes

Le cycle de vie des amphibiens (Figure 2) comprend normalement 4 phases, soit (1) les œufs, (2) les larves, (3) les juvéniles et (4) les adultes. Chez le ouaouaron, la phase larvaire est présente sous forme de têtard aquatique et s'étend sur une période de 6 mois à 3 ans selon le climat. Le passage de la phase larvaire à la phase adulte est caractérisé par la métamorphose qui permet aux individus d'atteindre le stade adulte et la maturité sexuelle (Leloup et Buscaglia, 1977). L'initiation de la métamorphose est régulée à la fois par le taux de croissance et de différenciation (Smith-Gill et Berven, 1979) et par la quantité d'énergie stockée par l'individu (Crump, 1981). Le taux de croissance et de différenciation sont habituellement inversement proportionnels à la densité de population, notamment à cause du stress engendré par les contacts physiques (John et Fenster, 1975), les inhibiteurs de croissances sécrétés par les têtards de forte taille (Licht, 1967) et la compétition pour la nourriture (Steinwascher, 1978). La densité de population a aussi un effet sur la taille des têtards au moment de la métamorphose et sur le potentiel d'accumulation d'énergie. Il a effectivement été montré que les têtards vivant dans un milieu à haute densité présentent une plus petite taille corporelle et moins de réserves lipidiques à la métamorphose, ce qui peut diminuer leurs chances de survie (Crump, 1981). Une quantité minimale d'énergie est aussi nécessaire à l'initiation de la métamorphose notamment pour traverser la phase d'anorexie (Griffiths, 1961). C'est d'ailleurs grâce à une étude employant la méthode capture-recapture que Smith (1987) a montré que la taille à la métamorphose a un effet direct sur les chances de survie et sur le potentiel reproducteur de la rainette faux-grillon (*Pseudacris triseriata*).

Les modifications physiques de la métamorphose les plus évidentes sont le remplacement des branchies par des poumons sacculaires, l'apparition et la croissance des membres, ainsi que la résorption de la queue. Certaines modifications sont toutefois moins apparentes, notamment le développement de glandes cutanées empêchant la dessiccation, le développement de paupières et de tympans ainsi que la restructuration du tractus gastro-intestinal (Denver, 1997). Ces changements morphologiques et physiologiques majeurs sont induits et coordonnés par les hormones thyroïdiennes (Dodd et Dodd, 1976). La glande thyroïde apparaît peu après que le têtard ait commencé à s'alimenter (Brown *et al.*, 1996), soit au stade 25 (Figure 3) (Gosner, 1960). Cette glande synthétise les hormones thyroïdiennes de façon croissante au cours du développement (Leloup et Buscaglia, 1977).

Les événements de la métamorphose induits par les hormones thyroïdiennes résultent de l'interaction entre le complexe formé par l'hormone thyroïdienne et son récepteur et l'élément de réponse du gène d'intérêt (Galton, 1992). Les hormones thyroïdiennes exercent donc leur influence sur la métamorphose en modifiant le patron d'expression des gènes d'intérêt (Brown *et al.*, 1996) suite à l'interaction avec leurs propres récepteurs nucléaires qui sont également des facteurs de transcription (Sap *et al.*, 1986; Weingerger *et al.*, 1986). Deux récepteurs des hormones thyroïdiennes ont été trouvés chez le xénope du cap (*Xenopus laevis*) soit (1) TR α et (2) TR β (Yaoita *et al.*, 1990). Le premier est exprimé de façon répandue dans l'organisme et permet la réponse aux substances thyroïdogéniques de l'environnement avant le stade 25, tandis que le deuxième est exprimé en réponse aux hormones thyroïdiennes endogènes (Yaoita et Brown, 1990; Kanamori et Brown, 1992). Puisque les hormones thyroïdiennes sont exprimées de façon croissante au cours du développement (Leloup et Buscaglia, 1977), l'expression de TR β est également croissante (Elicieri et Brown, 1994) ce qui permet d'optimiser l'efficacité physiologique des hormones thyroïdiennes en circulation au fur et à mesure que la métamorphose progresse (Galton, 1992).

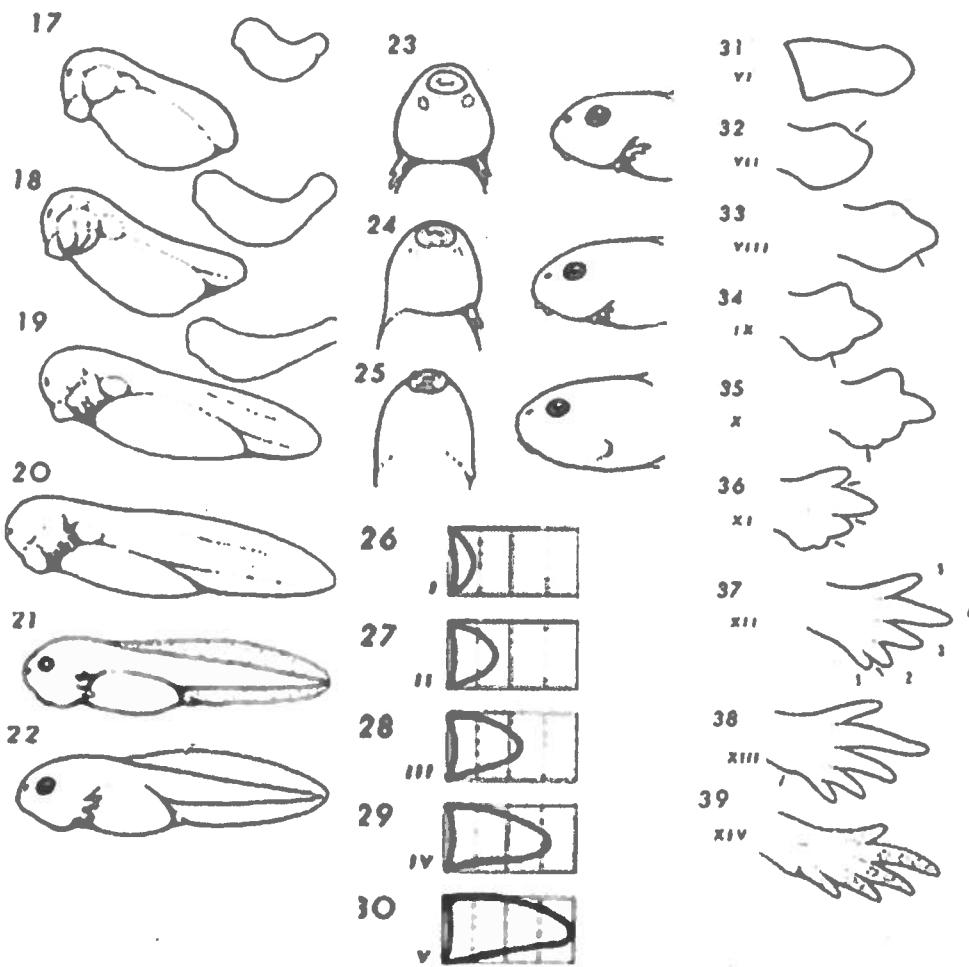


Figure 3 : Stades de développement 17 à 39. Les stades 17, 18 et 19 sont respectivement caractérisés par le développement et la réponse musculaire de la queue, puis le battement cardiaque. La forme contour à la droite des schémas représente la position courbée des têtards lorsqu'ils sont dans l'œuf. La plupart des têtards éclosent durant cet intervalle. Le stade 20, marque le début de la circulation brachiale. Aux stades 21 et 22 la cornée et la nageoire deviennent transparents tour à tour et la circulation sanguine débute dans la nageoire. Les stades 23, 24 et 25 marquent l'élongation graduelle des opercules qui couvrent les branchies. Les stades 26 à 39 sont caractérisés par le développement des membres postérieurs, d'abord les bourgeons des stades 25 à 30, puis les doigts des stades 31 à 37, puis de la cheville aux stades 38 et 39. (Gosner, 1960 tiré d'*Herpetologica* avec la permission de la maison d'édition AllenPress)

Les différents stades de la métamorphose (Figure 3) ont été décrits par Gosner (1960) pour la grenouille léopard (*Rana pipiens*) et sont applicables à la majorité des anoures dont le ouaouaron. Le développement inclut 46 stades entre la fécondation et le stade adulte. Avant l'éclosion (stades > 17 à 20), les stades sont caractérisés par l'évolution morphologique et physiologique des têtards. Après l'éclosion, les stades sont caractérisés par l'évolution morphologique, spécialement la croissance des opercules et des membres postérieurs.

2.2 La différenciation sexuelle

La différenciation sexuelle est le processus par lequel la gonade des individus dits indifférenciés se développe en ovaire ou en testicule. Il a été montré par Mayer et collaborateurs (2002) que la différenciation sexuelle survient entre les stades 33 et 36 (Figure 3) (Gosner, 1960). Avant la différenciation sexuelle, les gonades contiennent des cellules germinales primaires qui ne peuvent pas être identifiées comme ovogonies ou spermatogonies.

Les gonades des têtards indifférenciés se développent durant les stades 19 à 22 (Figure 3) (Gosner, 1960). Les crêtes génitales apparaissent d'abord comme un épaississement de la face ventrale du mésonéphros, le rein primitif. La portion caudale des crêtes génitales se développe éventuellement en gonades, tandis que la portion céphalique forme le corps gras (Lofts, 1974). Les cellules germinales primaires se développent le long du mésentère dorsal (Iwasawa et Yamaguchi, 1984), puis migrent dans les crêtes génitales (Franchi et al., 1962). Durant la formation de la gonade, les cellules germinales primaires sont en activité mitotique intense, puis l'organe développe une portion médullaire et un cortex distincts l'un de l'autre (Kelley, 1996). Deux paires de canaux se développent à partir du mésonéphros durant le développement des gonades, (1) le canal de Wolff et (2) le canal de Müller, chaque canal allant de la gonade au cloaque. Les canaux de Wolff persistent chez les deux genres, étant des canaux urinaires chez les femelles et génito-urinaires chez les mâles. Les canaux de

Müller, pour leur part, se développent en canaux génitaux chez les femelles et régressent chez les mâles (Lofts, 1974).

Lors de la différenciation (Figure 4) de la gonade bipotente en ovaire, il y a développement du cortex de l'organe et résorption de la portion médullaire, résultant en une dépression nommée la cavité ovarienne, tandis que chez les mâles, il y a développement du médulla (Lofts, 1974; Hayes, 1998). Tant chez les mâles que chez les femelles, la portion récessive de l'organe reste au stade indifférencié avant de régresser complètement. Il a été montré que la différenciation sexuelle peut être induite artificiellement vers un genre ou un autre par l'exposition à des hormones xénogènes. À titre d'exemple, les têtards exposés à de l'œstradiol ou à un greffon testiculaire se développent respectivement en femelles (Chang et Witschi, 1956) et en mâles fertiles (Mikamo et Witschi, 1963).

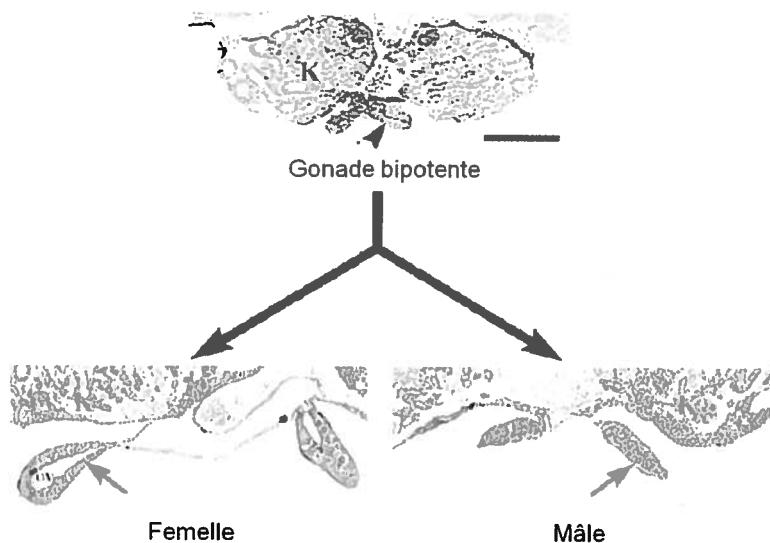


Figure 4 : Différenciation d'une gonade bipotente en ovaire ou en testicule. La gonade bipotente amorce sa différenciation en ovaire ou en testicule au stade 33 et la transformation est habituellement complétée au stade 36. Flèches = gonades; barre = 250 µm; K = reins; OV = cavité ovarienne. (Hayes, 1998 du Journal of experimental zoology avec la permission de la maison d'édition John Wiley and Sons)

2.3 La spermatogénèse

Chez les amphibiens, le système reproducteur mâle (Figure 5) est principalement composé d'une paire de testicules dans la cavité abdominale. Ces organes sont composés de tubes séminifères convolutés et entourés de tissu interstitiel. Les testicules sont attachés à la paroi dorsale de la cavité abdominale par une gaine fibreuse qui contient les canaux efférents. Ces canaux transportent les produits testiculaires vers les segments génitaux des reins, puis vers le cloaque via les canaux de Wolff (Lofts, 1974).

Le cycle de la spermatogénèse des amphibiens peut se dérouler de façon continue ou discontinue (van, 1960). Les espèces des milieux tropicaux présentent généralement un cycle continu de spermatogénèse, c'est-à-dire que la production de spermatozoïdes est constante au courant de l'année, alors que les espèces des milieux tempérés présentent plutôt un cycle discontinue (Lofts, 1964). Chez ces espèces, la spermatogénèse se produit peu après la saison de reproduction de l'été, puis les spermatozoïdes tombent en dormance durant la saison froide pour être évacués à la saison de reproduction suivante (Lofts, 1964 et 1974). La reprise de la spermatogénèse est suspectée d'être stimulée par des repères environnementaux, tels la photopériode et la température (Paniagua et al., 1990). Les populations de ouaouaron de l'étude présente vivent en milieu tempéré et ont une spermatogénèse discontinue, ayant leur saison de reproduction de la mi-juin à la fin juillet.

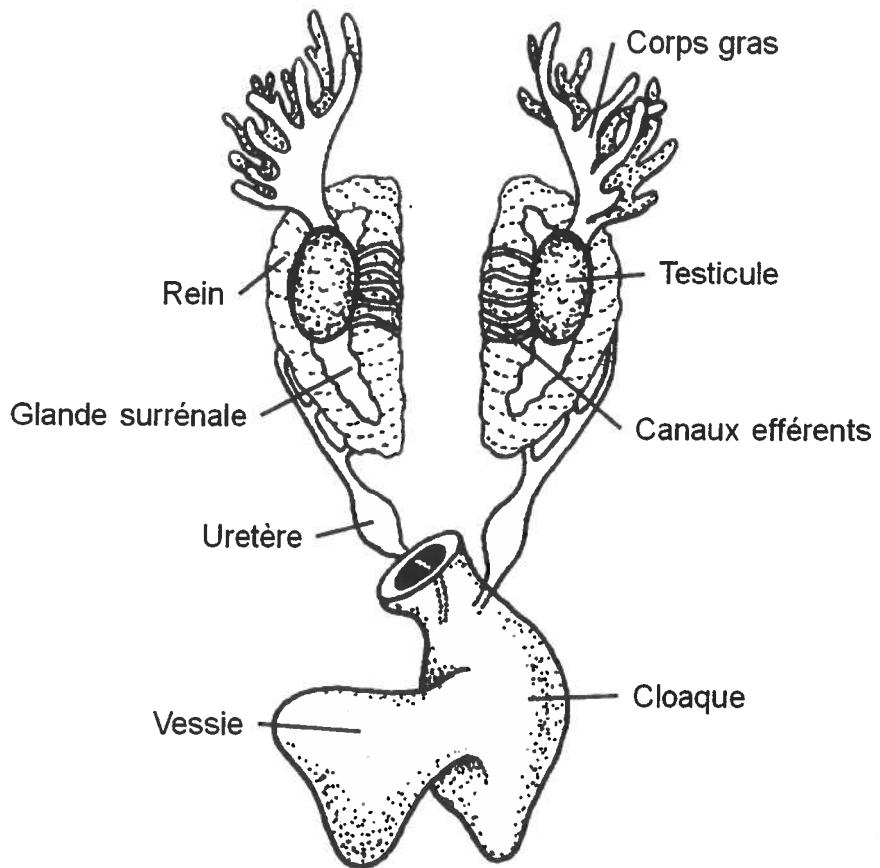


Figure 5 : Appareil urogénital des anoures mâles, montrant le corps gras, les reins, les glandes surrénales, les uretères, la vessie, les testicules, les canaux efférents et le cloaque. (Biodidac, 1999a)

La spermatogénèse des amphibiens (Figure 6) s'effectue de façon kystique (Lofts, 1961), c'est-à-dire que les spermatogonies, les spermatocytes et éventuellement les spermatides se développent de façon synchronisée au sein de kystes cellulaires (Lofts, 1974; Pudney, 1995). La spermatogénèse s'effectue en trois étapes, soit (1) la multiplication, (2) la maturation et (3) la spermiogénèse.

Les cellules germinales primaires sont d'abord contenues dans le kyste germinal, lequel est cerné de cellules folliculaires. Le kyste germinal évolue en kyste

cellulaire lorsque les cellules germinales primaires se différencient en spermatogonies via des divisions mitotiques. Les spermatogonies sont les cellules de plus grande taille observées durant la spermatogénèse, elles contiennent un noyau multilobé de grande taille. Lors de l'étape de multiplication, les spermatogonies subissent plusieurs divisions mitotiques au sein du kyste cellulaire. Puis, durant l'étape de maturation, les spermatogonies évoluent en spermatocytes via la réduction méiotique. Cette étape est aussi caractérisée par l'apparition de nucléoles dans le noyau des spermatocytes et de vacuoles dans les kystes cellulaires. Les spermatocytes entament également le développement de leur fonction stéroïdogénique durant cette étape, puis se différencient ensuite en spermatides. Ces cellules sont de petite taille et se retrouvent souvent le long du kyste cellulaire, cette formation résultant de l'augmentation du volume des vacuoles dans le kyste cellulaire. Finalement, lors de l'étape de spermogénèse, les spermatides s'allongent et évoluent en spermatozoïdes. Lorsque la croissance du flagelle est complétée, les spermatozoïdes quittent le lobule et se retrouvent dans la lumière du lobule séminifère (Lofts, 1974).

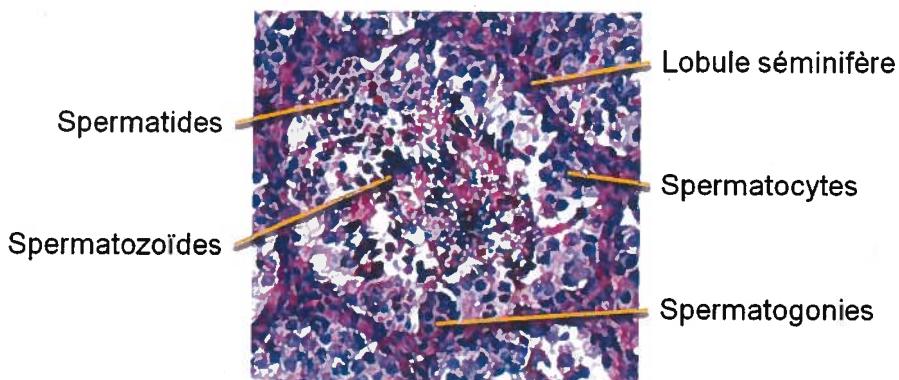


Figure 6 : Lobule séminifère contenant des kystes de spermatogonies, de spermatocytes et de spermatides et des spermatozoïdes dans la lumière du lobule chez un mâle adulte. Coloration à l'hématoxyline et éosine. Grossissement = 400 X.

2.4 L'ovogénèse et la vitellogénèse

Chez les femelles, le système reproducteur (Figure 7) est principalement composé des ovaires, des oviductes et des utérus. Les ovaires sont des organes creux attachés à la face médiale des reins par un mésentère. Ils sont recouverts d'un épithélium germinal qui est caractérisé par la présence d'ovogonies, résultant des divisions mitotiques des cellules germinales primaires (Lofts, 1974).

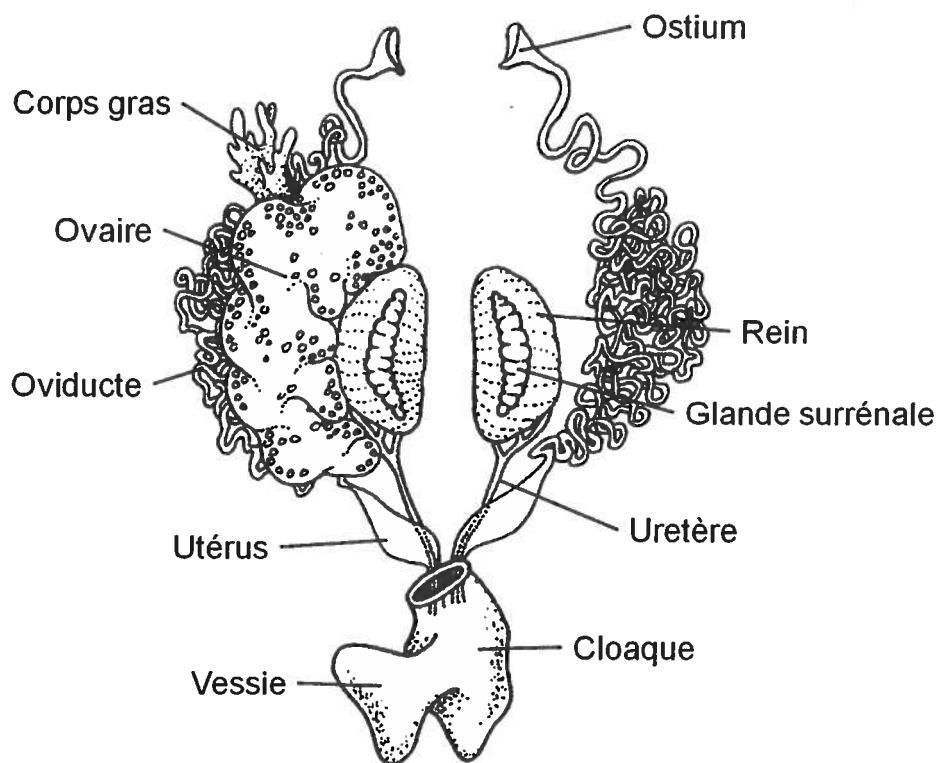


Figure 7 : Appareil urogénital des canines femelles, montrant l'ostium, le corps gras, les reins, les glandes surrénales, les uretères, la vessie, les ovaires, les oviductes, l'utérus et le cloaque. (Biodidac, 1999b)

Lors de l'ovogénèse (Figure 8), les ovogonies se multiplient dans l'ovaire par des divisions mitotiques de façon continue, les cellules filles étant des ovocytes primaires. Ces dernières sont entourées d'une couche de cellules folliculaires,

leur noyau occupe une proportion importante de la cellule et contient de nombreux nucléoles. Puis les ovocytes primaires évoluent en ovocytes secondaires via la division méiotique, produisant le premier corps polaire. L'ovocyte secondaire est caractérisé par l'augmentation considérable de la taille de la cellule, par l'accumulation de vitellogénine dans le vitellus, soit le jaune de l'œuf, et par sa migration de la surface de l'ovaire vers la cavité ovarienne. L'ovocyte secondaire est entouré de deux couches de cellules folliculaires, créant le complexe nommé follicule ovarien. Ces cellules folliculaires sont requises pour l'incorporation de vitellogénine dans le vitellus (Lofts, 1974).

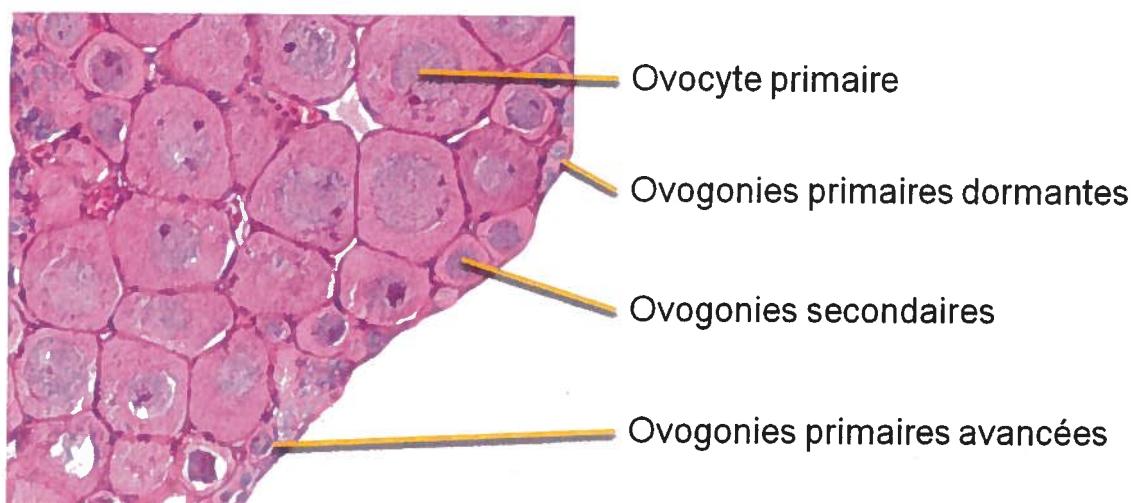


Figure 8 : Ovaire contenant des ovogonies et ovocytes chez une femelle adulte. Coloration à l'hématoxyline et éosine. Grossissement = 200 X.

La vitellogénèse est stimulée par l'œstradiol sécrété par les ovaires durant l'ovogénèse. L'œstradiol entre dans le foie par diffusion, puis se fixe aux récepteurs à œstrogène, ce qui entraîne la transcription du gène de la vitellogénine (Tata et Smith, 1979, xénope du cap). Cette dernière est une glycolipoprotéine couplée au calcium et à la biliverdine (Clements *et al.*, 1975, xénope du cap) et est précurseure du vitellus chez la plupart des ovipares et ovovivipares (Tata et Smith, 1979, xénope du cap). Il s'agit d'une protéine sérique spécifique aux femelles, mais qui peut également être induite chez les

mâles avec des substances oestrogéniques. Tenniswood et collaborateurs (1983, xénope du cap) ont montré que la vitellogénèse peut être stimulée *in vivo* et *in vitro* par un traitement à l'œstradiol tant chez les mâles que chez les femelles. La maturation du précurseur de la vitellogénine est effectuée dans le réticulum endoplasmique rugueux et l'appareil de Golgi qui prolifèrent dans les cellules hépatiques sous l'effet de l'œstradiol (Perlman *et al.*, 1984). La vitellogénine est ensuite transportée du foie aux ovaires via la circulation sanguine, puis atteint la surface de l'ovocyte via les cellules folliculaires. Les gonadotrophines stimulent l'endocytose de la vitellogénine dans le vitellus où elle est clivée en lipovitelline et en phosvitine, les protéines du vitellus (Tata et Smith, 1979, xénope du cap).

Après la phase vitellogénique, l'ovocyte secondaire subit la réduction méiotique et évolue en ovule, produisant le second corps polaire. Puis la matrice intercellulaire du follicule ovarien mature s'amincie et permet la rupture folliculaire, se résultant en l'extrusion de l'ovule du follicule ovarien (Lofts, 1974, amphibiens).

2.5 Le rôle des gonadotrophines dans la fonction reproductive

Les gonadotrophines sont des hormones glycoprotéiques synthétisées et sécrétées par l'adénohypophyse et agissant sur les gonades. Les deux gonadotrophines sont l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo stimulante (FSH, Hirshfield et Midgley, 1978; Browder *et al.*, 1991). La synthèse et la sécrétion des gonadotrophines sont orchestrées par la gonadolibérine, une neurohormone synthétisée par les neurones de l'hypothalamus. La gonadolibérine et conséquemment les gonadotrophines sont sécrétées de manière pulsatile (Licht et Papkoff, 1974) et sont soumises à un rétrocontrôle négatif des hormones stéroïdiennes, soit l'œstradiol et la testostérone.

La LH et la FSH sont composées de deux sous unités, soit α et β . La sous-unité α est commune aux deux gonadotrophines et à la thyrotropine, tandis que la sous-unité β est unique à chaque hormone. Hayashi et collaborateurs ont identifié et caractérisé la séquence d'acides aminés des sous-unités α (1992b) et β (FSH: 1992a; LH: 1992c) des gonadotrophines du ouaouaron. Le caractère unique de la sous-unité β lui confère ses propriétés spécifiques, notamment la capacité d'interaction avec son récepteur.

Tant chez les mâles que chez les femelles, les gonadotrophines sont essentielles pour la reproduction. La FSH présente d'ailleurs des rôles communs aux mâles et aux femelles ouaourons en orchestrant la croissance et le développement, la maturation sexuelle et la maturation des cellules germinales primaires (Licht et Papkoff, 1974). Chez les mâles de la grenouille rousse (*Rana temporaria*), une relation étroite est établie entre les variations saisonnières de l'épithélium germinal des mâles et les gonadotrophines (van Oordt et al., 1968). Ces dernières sont d'ailleurs assujetties à un rétrocontrôle négatif des androgènes (van Oordt, 1961). La spermatogénèse de la grenouille verte (*Rana esculenta*) est induite par la FSH, tandis que la LH entraîne la production d'androgènes et la spermiation, soit la maturation des spermatozoïdes (Lofts, 1964). Barr (1968) a montré que la spermiation peut également être induite par la FSH chez plusieurs espèces.

L'hypophysectomie mène inévitablement à l'atrophie des organes reproducteurs tant chez les mâles (Lofts, 1961) que chez les femelles (Gallien, 1940) de la grenouille verte. Chez ces dernières, l'hypophysectomie entraîne l'inhibition du développement des ovocytes et de la vitellogénèse. Chez les femelles, la FSH induit la croissance ovarienne tandis que la LH induit l'ovulation (Lofts, 1974).

Le cycle des gonadotrophines chez les anoures à spermatogénèse discontinue a été caractérisé par Polzonetti-Magni et collaborateurs (1998) en utilisant la grenouille verte. Selon cette étude, le niveau plasmatique de LH est

particulièrement élevé durant la saison froide et est corrélé à un haut niveau d'androgènes plasmatiques durant la saison de reproduction. La LH stimule les cellules de Leydig à produire des androgènes qui, à leur tour, stimulent le comportement reproducteur et le développement (Licht *et al.*, 1983). Toujours selon Polzonetti-Magni et collaborateurs (1998), les taux plasmatiques de FSH et d'œstradiol montrent une similarité, chacune présentant un pic au printemps. Le printemps est la période de l'année caractérisée par la reprise de la spermatogénèse et de la prolifération des spermatogonies primaires chez les amphibiens selon Rastogi et Iela (1980). La FSH est d'ailleurs connue pour initier la spermatogénèse et stimuler la croissance des tubes séminifère.

Section 3 – La contamination agricole et ses conséquences

3.1 Le profil de contamination agricole du bassin versant de la rivière Yamaska

La rivière Yamaska est la septième des treize principales rivières tributaires du fleuve Saint-Laurent (Figure 9). Elle coule du lac Brome au lac Saint-Pierre, soit sur plus de 160 km avec un débit moyen annuel de $87 \text{ m}^3/\text{s}$. Le bassin versant de la rivière Yamaska couvre une superficie de 4784 km^2 (478400 ha), s'étendant des régions naturelles des Appalaches en amont aux basses-terres du Saint-Laurent en aval. Au niveau administratif, le bassin versant de la rivière Yamaska est situé dans les régions de la Montérégie et de l'Estrie (Figure 10) qui regroupent ensemble près du tiers des exploitations agricoles québécoises (Berryman, 2008).

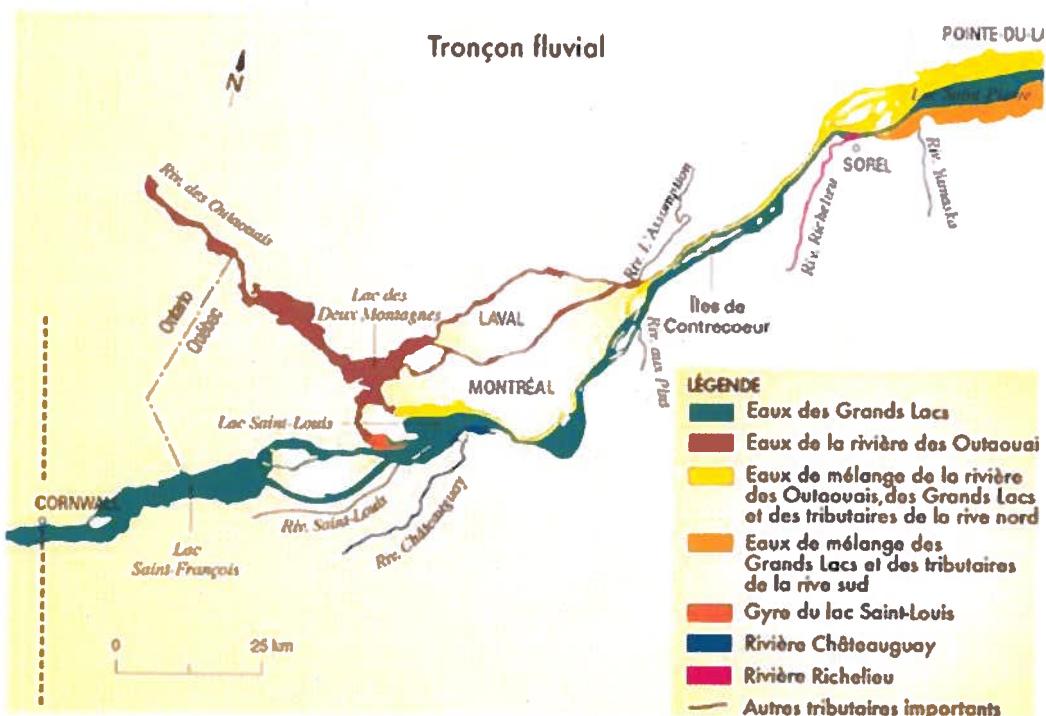


Figure 9 : Tributaires principaux et secondaires du fleuve Saint-Laurent, Environnement Canada, 2010

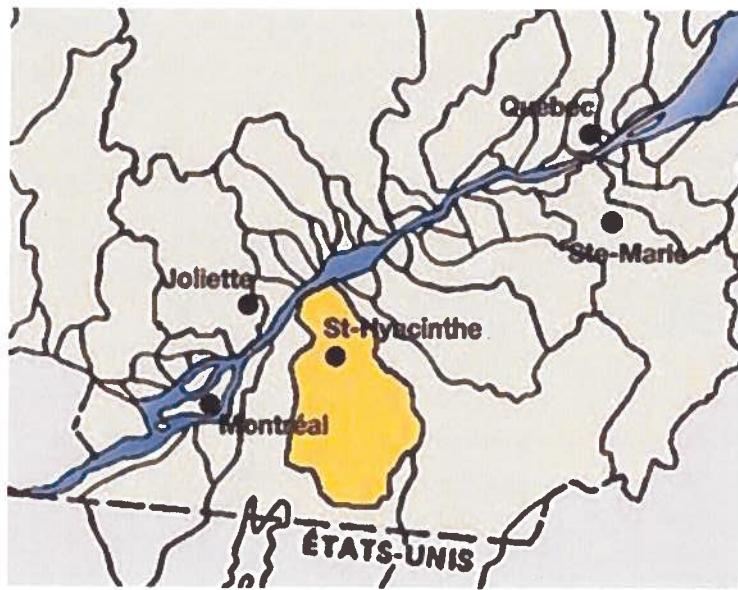


Figure 10 : Situation géographique du bassin versant de la rivière Yamaska par rapport aux États-Unis, au Québec, à la ville de Québec, de Ste-Marie, de Joliette, de St-Hyacinthe et de Montréal. Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs du Québec (MDDEP), 1997

En 2007, il y avait plus de 2200 km² (220000 ha) de terres en cultures dans le bassin versant, soit un peu moins de la moitié de sa superficie totale (Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec (MAPAQ), données non publiées). Le profil de l'activité agricole du bassin versant n'a que très légèrement changé depuis une vingtaine d'années et est composé généralement à 43 % de grandes cultures (Figure 11), lesquelles sont plus spécifiquement des monocultures de maïs et de soya (MDDEP, 1997). Aussi, le bassin versant de la rivière Yamaska regroupe une proportion importante de la production animale québécoise; on y comptait plus de 290 000 animaux d'élevage bovins et porcins en 2007 (MAPAQ, données non publiées).

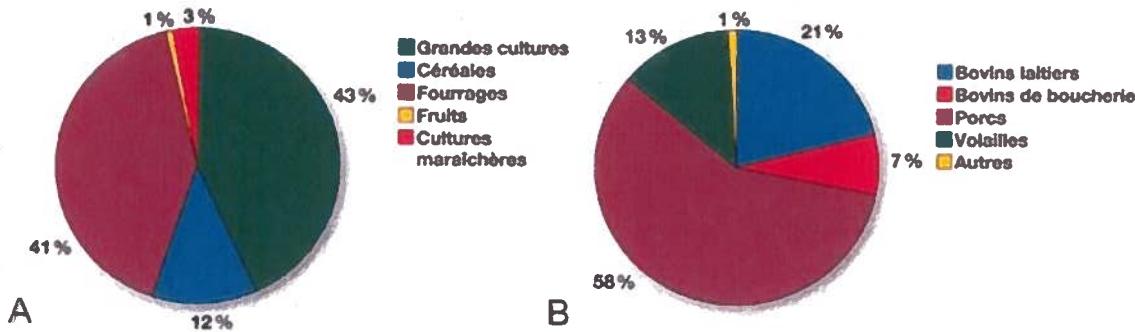


Figure 11 : Distribution (A) des types de cultures et (B) de la production animale dans le bassin versant de la rivière Yamaska MDDEP, 1997

La pollution agricole peut être divisée en deux catégories distinctes, soit (1) la pollution ponctuelle et (2) la pollution diffuse. La pollution est dite ponctuelle lorsque sa source est localisée et identifiée. Dans cette catégorie, on compte notamment le lisier et le fumier qui peuvent être entreposés, traités et dont on peut disposer de façon adéquate. La pollution diffuse, quant à elle, est caractérisée par la distribution de la contamination dans les grands compartiments environnementaux, soit l'air, le sol ou l'eau. Les engrains et pesticides se retrouvent évidemment dans la seconde catégorie de pollution, et leur distribution dans les compartiments environnementaux s'effectue principalement par ruissellement des eaux de surface vers les plans d'eau avoisinants (MDDEP, 1997).

Au fil de l'évolution des besoins humains en matière de production agricole, les exploitations se sont modifiées en grandes monocultures, ces dernières étant plus faciles à gérer avec de la machinerie lourde. Toutefois, il est bien connu et il a été montré par Risch (1963) que les monocultures créent un milieu plus propice à la prolifération des herbes et des insectes considérés comme étant nuisibles. Ainsi, en plus des engrains naturels et artificiels, les agriculteurs doivent utiliser des pesticides. Dans le bassin versant de la rivière Yamaska, il s'épandait 1,83 kg d'ingrédients actifs/ha cultivé en 1994 (MDDEP, 1997).

Parmi les pesticides retrouvés dans les eaux du bassin versant de la rivière Yamaska, les plus fréquents et les plus concentrés sont l'atrazine et le métolachlore. Une étude de Maguire et Tkacz (1993) a montré que déjà en 1986 et 1987, les concentrations d'atrazine et de métolachlore dépassaient le critère établie par le MDDEP (2009) et le Conseil canadien des ministres de l'environnement (CCME) (2002). En effet, les concentrations maximales enregistrées à 6 sites d'échantillonnage dans le bassin versant de la rivière Yamaska en 1986 et 1987 étaient de 37,8 µg/L pour l'atrazine et 13,4 µg/L pour le métolachlore. Or la norme de qualité d'eau pour la protection de la vie aquatique établie par Environnement Canada est de 2 µg/L pour l'atrazine (Trotter *et al.*, 1990) et 8 µg/L pour le métolachlore (Kent *et al.*, 1991). Maguire et Tkacz (1993) ont suggéré que la diminution occasionnelle des concentrations de pesticides est expliquée par des précipitations abondantes et non par une plus faible quantité de pesticides épandus.

Une étude plus récente menée par le MDDEP a montré que les concentrations retrouvées dans les eaux de surface semblent diminuer. En effet, l'atrazine et le métolachlore ont été détectés dans plus de 97 % des eaux de surface des régions agricoles du Québec. Toutefois, le critère canadien de 2 µg/L d'atrazine a été dépassé dans seulement 30 % des échantillons de la rivière Yamaska en 1994, dans 11 % de ceux-ci en 1999 et dans aucun en 2001 (Giroux, 2002). Comparativement à l'étude de Maguire et Tkacz (1993), les résultats de l'étude de Giroux (2002) ont été attribués à une utilisation moindre de pesticides. Cette hypothèse est soutenue par Spear et collaborateurs (2009) qui ont observé des concentrations maximales d'atrazine et de métolachlore de 2,42 µg/L et de 0,70 µg/L en 2004 et 2005.

Bien que les concentrations de pesticides ne dépassent plus systématiquement les normes canadiennes, les pesticides sont toujours présents dans les eaux de surface. Aussi, les espèces aquatiques sont exposées à plusieurs pesticides à des concentrations respectant plus ou moins les normes selon les saisons. À cet

effet, il est intéressant de se questionner sur l'effet de la co-exposition à tous ces produits.

3.2 Effets néfastes potentiels de la contamination agricole

L'atrazine (Figure 12A), 2-chloro-4-(éthylamine)-6-(isopropylamine)-s-triazine (215,7 g/Mol), est un herbicide polaire basique de la famille chimique des triazines, lesquels sont caractérisés par la présence d'un cycle s-triazine. Le mode d'action de l'atrazine consiste à inhiber la réaction de Hill et les phosphorylations non-cycliques qui lui sont associées dans la photosynthèse (Shimabukuro et Swanson, 1969). La réaction de Hill (1937) est expliquée comme suit : $2 \text{ H}_2\text{O} + 2 \text{ A} + (\text{lumière et chloroplaste}) \rightarrow 2 \text{ AH}_2 + \text{O}_2$, où A est l'accepteur d'électron, tel la plastoquinone (CYP B6).

Le métolachlore (Figure 12B), 2-chloro-N-(2-éthyl-6-méthylphényl)-N-(1-méthoxypropan-2-yl)-acétamide, (294,9 g/Mol) est un herbicide très soluble dans l'eau et très mobile en milieu basique. Deux énantiomères existent, le R-métolachlore et le S-métolachlore. C'est le second qui présente des propriétés désherbantes par l'inhibition des élongases et des granyl-phosphate cyclases, empêchant ainsi la division et la croissance cellulaire (Deal et Hess, 1980).

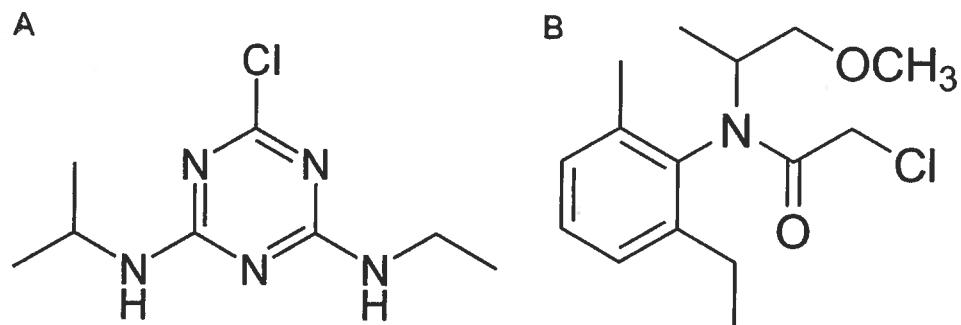


Figure 12 : Formule développée plane (A) de l'atrazine et (B) du métolachlore.

L'atrazine et le métolachlore ont été développés et brevetés en Suisse par la Geigy Chemical Company (Knuesli, 1970), puis ont été commercialisés aux États-Unis (USEPA, 1994) et dans de nombreux pays. Depuis, ils sont utilisés comme herbicides principaux dans les cultures de maïs, soya, sorgho, canne à sucre et de nombreuses autres cultures à travers le monde afin de détruire les herbes considérées nuisibles.

De nombreuses études ont tenté de déterminer les effets des pesticides sur les espèces non-cible et les résultats sont très variés selon les espèces, les organes et systèmes étudiés et selon les patrons d'exposition. Wiegand et collaborateurs (2000) ont montré que la LC50 48 h (concentration létale 50 48 h) de l'atrazine est de 36,8 mg/L chez les embryons de poisson zèbre (*Danio rerio*). Chez la truite arc-en-ciel, la LC50 (24 h) est de 31,6 mg/L et la LC50 (96 h) de 20,5 mg/L (Howe *et al.*, 1998).

Chez les amphibiens, Wan et collaborateurs (2006) ont suggéré une LC50 (24, 48, 72 et 96 h) supérieure à 16 mg/L pour les têtards de ouaouaron. Ce résultat concorde avec ceux de Howe et collaborateurs (1998) qui ont trouvé une LC50 (24 h) de 45,3 à 69,7 mg/L et une LC50 (96 h) de 14,5 à 47,6 mg/L selon le stade de développement des têtards de grenouille léopard. Selon cette étude, il semble que les têtards sont moins sensibles avec la progression de leur développement.

Allran et Karasov (2001) ont réalisé une étude des effets sous-létaux de l'atrazine chez la grenouille léopard, la grenouille des bois (*Rana sylvatica*) et le crapaud d'Amérique (*Bufo americanus*). Cette étude a notamment montré que les amphibiens peuvent souffrir d'œdème généralisé lors d'une exposition à l'atrazine (jusqu'à 20 mg/L). Ce résultat est soutenu par Howe et collaborateurs (1998) qui ont observé l'œdème abdominal chez la grenouille léopard et le crapaud d'Amérique dès l'exposition à 2,8 mg/L d'atrazine. Allran et Karasov ont expliqué cet œdème par la dysfonction rénale qui empêche l'élimination des

fluides superflus. Les adultes exposés à 20 mg/L d'atrazine, ont également souffert d'anorexie complète pour toute la durée de l'expérience (14 jours). Aucun changement dans la masse corporelle n'a été observé chez ces animaux, suggérant que l'œdème ait compensé la chute de poids.

En plus de l'œdème, Allran et Karasov (2001) ont observé une proportion importante de têtards présentant des malformations lors de l'exposition à l'atrazine et ils ont établi une NOAEL (dose la plus élevée sans effet toxique de l'anglais *no observable adverse effect level*) de 2,59 mg/L et une LOAEL (dose minimale causant un effet toxique de l'anglais *lowest observable adverse effect level*) de 4,32 mg/L. Les malformations rencontrées dans cette étude incluent la déviation de la queue, incluant la flexion dorsale ou latérale, le raccourcissement de l'axe corporel et les malformations cutanées. Ces résultats concordent avec ceux de Ouellet et collaborateurs (1997) qui a observé une incidence de 12 % de grenouilles malformées dans des régions agricoles par rapport à 0,7 % dans des régions sans pesticides. Les malformations observées dans cette étude sont l'ectrodactylie, l'ectromélie, la polydactylie et la polymélie qui sont caractérisées respectivement par l'absence congénitale d'un ou plusieurs doigts ou membres ou la présence de doigts et membres surnuméraires. Les autres malformations fréquentes sont la syndactylie qui est caractérisée par l'accolement de deux ou plusieurs doigts et la dysmérie qui est le développement anormal d'un ou plusieurs membres (Burkhart *et al.*, 1998). Howe et collaborateurs (1998) ont également observé des troubles de locomotion et d'orientation chez les têtards exposés.

Chez les adultes, un autre effet sous-létal est l'augmentation du rythme respiratoire. En conditions normales, la respiration est surtout effectuée par des oscillations buccales, lesquelles sont interrompues par des respirations thoraciques (Shoemaker *et al.*, 1992). En réponse à des conditions hypoxiques, les respirations thoraciques se voient plus nombreuses (Rice *et al.*, 1999). Allran et Karasov (2001) ont montré une augmentation dose-dépendante du rythme des

respirations buccales jusqu'à la concentration 7,2 mg/L d'atrazine. À partir de cette concentration, le rythme des respirations buccales s'est vu diminué. Les respirations thoraciques, quant à elles, ont augmenté de façon discontinue. Il a été montré que l'atrazine diminue la quantité d'érythrocytes en circulation chez les poissons (Hussein et al., 1996; Prasad et al., 1991), ce qui peut expliquer le besoin d'un plus grand rythme respiratoire.

Les effets sous-létaux discutés ci-haut peuvent avoir un effet indirect néfaste sur le système reproducteur des individus. En effet, les malformations aux membres, la défaillance rénale, l'anorexie et les troubles de la respiration ont toutes les chances de compromettre la reproduction des individus, voire leur survie. À titre d'exemple, Marian et collaborateurs (1983) ont observé que la réduction de la croissance du ouaouaron indien (*Rana tigrina*) causée par le carbaryl pourrait retarder la première fraie, affectant ainsi indirectement le potentiel reproducteur. Aussi, les malformations aux membres nuisent nécessairement à la capacité des animaux à se déplacer ou à fuir les prédateurs. L'atrazine et les autres contaminants agricoles sont également suspectés d'avoir des effets néfastes directs sur la reproduction. De nombreuses études se contredisent quant aux effets découlant de certaines concentrations d'atrazine sur le potentiel reproducteur.

Solomon et collaborateurs (1996) ont décrit 21 µg/L d'atrazine comme n'ayant pas d'effets écologiques néfastes, alors qu'Hayes et collaborateurs (2003) ont trouvé qu'aussi peu que 0,1 µg/L entraîne l'hermaphrodisme et le retard de développement des gonades chez la grenouille léopard. Une autre étude de Hayes et collaborateurs (2002) a montré que l'exposition de têtards de xénope du cap à des concentrations d'atrazine supérieures à 0,1 µg/L entraîne l'hermaphrodisme et la production de multiples gonades. À une concentration de 1 µg/L d'atrazine, cette même étude a montré la démasculinisation du larynx des mâles et dès 25 µg/L, la diminution des niveaux de testostérone de 10 fois par rapport au contrôle. Sanderson et collaborateurs (2000) ont suggéré que les

herbicides de la famille des triazines induisent l'aromatase (CYP19), l'enzyme responsable de la transformation des androgènes en œstrogènes. Parallèlement, Crain et collaborateurs (1997) ont montré l'induction d'aromatase dans le complexe gonade-surrénale-mésonéphros par l'exposition *in ovo* à l'atrazine chez l'alligator (*Alligator mississippiensis*). L'induction d'une telle enzyme pourrait expliquer la perturbation de la stéroïdogenèse chez les mâles exposés à l'atrazine.

Les études de Hayes et collaborateurs (2002 et 2003) concordent avec celles de Tavera-Mendoza et collaborateurs (2002a et 2002b) qui ont montré les effets de l'atrazine sur la différenciation sexuelle des têtards de xénope du cap. Chez les mâles, Tavera-Mendoza et collaborateurs (2002a) ont trouvé qu'à 21 µg/L, le volume testiculaire est diminué de 57 % par rapport au contrôle, le nombre de kystes de spermatogonies est diminué de 70 % et le nombre de cellules de support est diminué de 74 %. Aussi 70 % des mâles ont montré de la résorption testiculaire et 10 % ont montré de l'aplasie, lesquelles sont caractérisées respectivement par la perte de la composition normale du testicule et l'échec de développement du testicule. Chez les femelles exposées à 21 µg/L d'atrazine, Tavera-Mendoza et collaborateurs (2002b) ont observé une diminution de 43 % du nombre d'ovogonies primaires, une augmentation de la proportion d'ovogonies secondaires et une augmentation de 20 % d'ovogonies atrésiques. Rappelons que 21 µg/L est la concentration décrite comme sans effets écologiques néfastes par Solomon et collaborateurs (1996).

Plusieurs contaminants agricoles sont des perturbateurs endocriniens c'est-à-dire des composés chimiques exogènes agissant comme des agonistes ou antagonistes des hormones et de leurs récepteurs ou altérant la production, la sécrétion, la biotransformation ou la concentration plasmatique des hormones. Parmi les effets néfastes des perturbateurs endocriniens chez l'humain, on suspecte la promotion du cancer du sein (Davis *et al.*, 1993), l'altération du développement fœtal (Bern, 1992) l'augmentation de l'incidence du cancer

testiculaire (Safe, 2005) et d'autres troubles endocriniens. De nombreux composés chimiques sont des perturbateurs endocriniens, notamment des composés de l'industrie du plastique, des engrais et des pesticides. Il n'est donc pas surprenant que la présence d'une importante pollution industrielle et agricole, dont les pesticides, herbicides et fongicides soit corrélée à certains effets néfastes observés chez des mammifères, des oiseaux, des reptiles et des poissons (Facemire *et al.*, 1995; Colborn *et al.*, 1996; Semenza *et al.*, 1997; Kime, 1998).

Mosconi et collaborateurs (2002) ont montré les effets des xéno-oestrogènes sur différents aspects de la reproduction des amphibiens par l'exemple du 4-nonylphénol. En effet, la production de vitellogénine a été induite de façon dose dépendante chez des spécimens mâles exposés au xéno-oestrogène dont le nonylphénol. Les résultats ont aussi montré une inhibition de la sécrétion de gonadotrophines et une altération du ratio naturel des genres vers le genre femelle. Aussi, certaines espèces se sont vues féminisées par l'augmentation du pourcentage d'individus qui développent le phénotype femelle. Dans cette même étude, il a été observé que le xéno-oestrogène cause une augmentation des niveaux d'androgènes, une diminution du taux plasmatique de gonadotrophines et aucun changement dans les niveaux d'oestradiol- 17β . Des résultats oestrogéniques similaires ont été obtenus chez des spécimens mâles de plusieurs espèces d'anoures et d'urodèles (Kloas *et al.*, 1999; Lutz et Kloas, 1999).

Section 4 – Objectif et hypothèse de l'étude

La littérature montre exhaustivement les effets néfastes potentiels de la contamination agricole sur différents systèmes de nombreuses espèces. Le bassin versant de la rivière Yamaska est représentatif des cours d'eau en milieu agricole et l'objectif de la présente étude est d'identifier et de caractériser les effets de cette contamination sur le développement et l'intégrité du système reproducteur de la rivière Yamaska. À partir des études publiées, il est possible d'émettre l'hypothèse que l'intensité agricole aura un effet de perturbateur endocrinien sur les développement et l'intégrité du système reproducteur des ouaouarons.

Chapitre 2 – Présentation d'un article scientifique: Influence of agricultural activity on reproductive system of male bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) from the Yamaska River watershed.

Résumé

Plusieurs études en laboratoire ont montré que l'exposition à de faibles doses de certains pesticides cause la dégénérescence testiculaire chez les mammifères et les amphibiens. Dans la présente étude, des ouaouarons mâles (*Lithobates catesbeianus*) ont été capturés à des sites de reproduction dans différents sous-bassins versants de la rivière Yamaska au Québec, et leurs testicules ont été analysés en histopathologie et pour les niveaux de récepteurs à œstrogène (α -ER) par immunobuvardage de type Western. Les sites d'échantillonnage présentent une intensité agricole faible, modérée ou élevée qui sont respectivement entourés par $\leq 19\%$, 20-50 % ou $\geq 60\%$ de terre en culture. Les mesures morphométriques des animaux ont été prises, incluant la masse, la taille corporelle, des membres, de la queue. Les gonades des ouaouarons ont été caractérisées comme étant normaux ou avec dégénérescence précoce ou avancée. La dégénérescence précoce est caractérisée par l'absence de kystes de spermatogonies le long de la paroi du lobule séminifère, alors que la dégénérescence avancée est caractérisée par l'absence de structure lobulaire et la présence de cellules germinales dégénérées. Au site référence Deborah Stairs, l'incidence de ouaouarons montrant la dégénérescence précoce est de 9,0 % et aucun n'a montré de la dégénérescence avancée. L'incidence de dégénérescence précoce s'est vue significativement augmenter chez les ouaouarons des sites à intensité agricole élevée, soit le réservoir Choinière (24,2 %), la rivière Yamaska (48,3 %), la rivière Noire (38,2 %) et la rivière à la Barbue (40 %), mais pas au site rivière Pot-au-Beurre 15,6 % qui est entouré d'activité agricole modérée. La dégénérescence avancée a été observée uniquement à la rivière Yamaska (6,9 %) et à la rivière à la Barbue (26,7 %). Il y a une augmentation de l'expression d' α -ER, dans les testicules des ouaouarons

provenant des sites à intensité agricole élevée. Les résultats de l'étude suggèrent que le système reproducteur des ouaouarons mâles est affecté négativement, spécialement dans les régions où l'activité agricole est intense.

Contribution de l'étudiante

Tous les travaux de laboratoire effectués sur les échantillons recueillis de 2007 à 2009 ont été réalisés par l'étudiante, de même que l'établissement du plan d'expérience. La majorité des conclusions et la rédaction de l'article sont le fruit du travail d'équipe entre l'étudiante, le directeur et le co-directeur de recherche. Les travaux ont démontré pour la première fois les effets spécifiques de la contamination agricole du bassin versant de la rivière Yamaska sur l'intégrité du système reproducteur des ouaouarons. Les travaux de laboratoire effectués sur les échantillons recueillis en 2004 ont été analysés par les étudiants du laboratoire de Sylvia Ruby à l'Université Concordia. L'analyse des pesticides dans les échantillons d'eau ont été réalisés par le Centre d'expertise en analyses environnemental du Québec. L'article sera publié sous peu.

**Influence of agricultural activity on reproductive system of male bullfrog
(*Lithobates catesbeianus*) from the Yamaska River watershed.**

Mireille Plouffe-Malette ^{a, c}, Catherine Dimacacos ^{b, d}, Pamela Giancola ^b,
Monique Boily ^{c, d}, Philip Spear ^{c, d}, Sylvia Ruby ^{b, d}, Patrick Devine ^a

^a Institut National de la Recherche Scientifique – Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada. ^b Biology Department, Concordia University, 7141 Sherbrooke Street West, Montreal, Québec, H4B 1R6, Canada. ^c Centre TOXEN, Département des Sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada. ^d Centre interinstitutionnel de recherche en écotoxicologie (CIRÉ) 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada.

M. Plouffe-Malette : mireille.plouffe-malette@iaf.inrs.ca

M. Boily: boily.monique@uqam.ca

P. Spear: spear.philip@uqam.ca

S. Ruby: sruby@alcor.concordia.ca

P. Devine: patrick.devine@novartis.com

Corresponding authors

P Devine; Telephone: 011-617-871-4833; Fax: 011-617-871-4931

Key words: *Lithobates catesbeianus*, reproductive system development, agricultural pollution, cysts of spermatogonia, cysts of spermatocytes

Abstract

Previous laboratory studies have demonstrated that low-level exposures to certain pesticides cause testicular degeneration in mammals and amphibians. In the present study spanning a six-year period, adult male bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) were collected from breeding sites in different sub-watersheds of the Yamaska River drainage basin in Québec, and the testes were evaluated for histopathology and estrogen receptor (α -ER) levels by Western blotting. Sampling sites range from low, moderate, to high agricultural intensity, which are respectively surrounded by $\leq 19\%$, 20-59 % and $\geq 60\%$ wide-row crops. Morphometric measures were taken, including body weight, body, legs and eardrum length. Bullfrogs were classified as having gonads that were either normal or showing slight or severe degeneration. Slight degeneration was marked by a lack of spermatogonial cysts at the periphery of the lobule wall, whereas severe degeneration was identified as a lack of lobular structure and the presence of degenerating germ cells. At the non-agricultural reference site, Deborah Stairs, the incidence of frogs with slight degeneration was 9.0 % and none demonstrated severe degeneration. Slight testicular degeneration was increased significantly in bullfrogs from sites associated with agriculture, namely Choinière reservoir 24.2 %; Yamaska River 48.3 %; Noire River 38.2 %; Barbue River 40 %, but not at Pot-au-Beurre River (15.6 %), which is surrounded by moderate agricultural activity. Severe testicular degeneration was observed only at Yamaska River (6.9 %) and Barbue River (26.7 %). There was also an increase in α -ER in testes of bullfrogs from contaminated sites, as determined by Western blotting. These results suggest that the male reproductive system of bullfrogs is detrimentally affected in sub-watersheds associated with moderate and intensive agriculture.

1 Introduction

Since the 1980s, amphibian declines in population have been frequently reported (17 of the 45 indigenous Canadian amphibian species) (Weller *et al.*, 1997). Intensive agricultural practices have been shown to contaminate water systems with fertilizers, manure, soil particles, antibiotics (Sarman *et al.*, 2006), hormones (Lee *et al.*, 2007), metals, microorganisms and pesticides (MDDEP, 1997; Jjemba, 2002). In addition, soil drainage and modification of stream beds affect local hydrology and habitat suitability. In agricultural areas of southern Québec, limb deformities were reported in many amphibian species including bullfrogs, (*Lithobates catesbeianus*) (Ouellet *et al.*, 1997). Increased genomic aneuploidy and chromosomal fragmentation of erythrocytes in tree frogs (*Rana clamitans*) were observed in the same geographic region and have been attributed to agricultural sources (Lowcock *et al.*, 1997). Recent field studies measuring retinoid (vitamin A) in male bullfrogs within the Yamaska River drainage basin suggest that bullfrogs in areas associated with intensive agricultural practices are exposed to factors that affect body weight and retinoid stores in male bullfrogs (Boily *et al.*, 2005; Bérubé *et al.*, 2005).

Laboratory exposures to pesticides like atrazine were reported to alter gonadal function (Allran and Karasov, 2001; Tavera-Mendoza *et al.*, 2002a, 2002b; Hayes *et al.*, 2002, 2003). These studies have demonstrated that low-level exposure to the most-frequently detected pesticides causes adverse effects to the endocrine and reproductive system. Among those adverse effects, Hayes *et al.* (2002, 2003) showed that low concentrations of atrazine caused feminized males and hermaphroditism in the clawed frog (*Xenopus laevis*). Also, herbicides in the triazine family were shown to induce aromatase (CYP19), the rate-limiting enzyme responsible for the transformation of androgens to estrogens (Sanderson *et al.*, 2000). This may be a mechanism by which exposure to triazine herbicides during critical developmental periods can result in feminization of males. Also, induction of oestrogen receptor isoforms, a possible biomarker for

exposure to xenoestrogens, was shown to be induced by estrogen in both liver (Yadetie *et al.*, 1999) and brain (Meucci and Arukwe, 2006) of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Mosconi *et al.* (2002) also showed that exposure of males of various amphibian species to xenoestrogens causes a decrease in gonadotropin levels, an increase in androgen levels and their feminization.

The process of spermatogenesis in amphibians occurs in cysts located within seminiferous lobules (Pudney, 1995). This differs from the seminiferous tubule of the mammalian testis since there is no permanent germinal epithelium containing primary germ cells lining the lobule of amphibians. Reproductive cycles in amphibians are categorized as continuous or discontinuous (van Oordt, 1960). Species which inhabit tropical and subtropical regions have continuous cycles of spermatogenesis occurring throughout the year. In temperate climates, amphibians are discontinuous breeders and sperm production ceases during the winter months (Lofts, 1964). This is the case in southern Québec where bullfrogs have an extended breeding season compared with other indigenous ranids, usually reproducing from mid-June to severe July.

Seven study sites, considered to be independent, were chosen in the Yamaska River drainage basin, representing areas of various types and intensity of agriculture. Agricultural intensity is defined here as the percentage of cultured area surrounding the waterway and is divided into low (0-19 %), moderate (20-59 %) and high (≥ 60 %) (Primeau *et al.*, 1999; Bérubé *et al.*, 2005). The Yamaska River drainage basin is highly agricultural and each sub-watershed has different patterns of agriculture, including wide-row crops of corn, soy, pigs and poultry. Water quality and chemical contaminants in sub-watersheds of the Yamaska River system were described by Spear *et al.* (2009), showing increasing concentrations of the most-frequently detected pesticides in the sites tested, as follows: Deborah Stairs < Choinière reservoir < Yamaska River < Pot-au-Beurre River < Noire River < Barbue River. Boivin Lake is a relatively unpolluted site that was added to the study in 2007 and that shows a level of

contamination equivalent to the reference site, Deborah Stairs (unpublished data). The quality of surface water was established according to the physico-chemical parameters, floating residues and debris and the excessive production of aquatic plants, fungi and bacteria (MDDEP, 1997).

The studies presented here examined the health and reproductive status of bullfrogs over several years at multiple sites with differing agricultural activity associated with each site. Morphometric measurements, histopathology of gonads, and protein levels of oestrogen receptor were determined in individuals.

2 Materials and methods

2.1 Study sites

The reference site Deborah Stairs is a 2.5 ha pond in a protected forested wetland surrounded by an area of low agricultural intensity ($\leq 19\%$) and has satisfactory water quality (MDDEP, 1997). Choinière reservoir and Boivin Lake (downstream) are man-made enlargements of the Yamaska-North River. They are located in an area of moderate agricultural intensity (Boivin lake $\leq 19\%$, Choinière reservoir 20-59 %), but both sites have very different water quality. Boivin Lake is deemed to have satisfactory water quality and serves as the principal source of tap water of the nearby town of Granby while water quality of the Choinière reservoir is rated poor (MDDEP, 1997). The upstream Choinière reservoir acts as a decantation basin while numerous wetlands between both sites were designed to help improve the water quality (Groison, 2000), so Boivin Lake is a second reference site of the study. The Pot-au-Beurre River is located in a 1400 ha protected wetland in an area of moderate agricultural intensity (20-59 %). The Yamaska River site is located at the confluence of the Yamaska, Yamaska North and Yamaska Southeast Rivers in an area of moderate agricultural intensity (20-59 %). Finally, Noire and Barbeue Rivers are located in

areas of high agricultural activity ($\geq 60\%$) and show very poor water quality (MDDEP, 1997).

2.2 Animal capture

During July and August of 2004 and 2007 to 2009, up to 35 adult male bullfrogs were localized by mating calls and captured from 7 study sites as described by Spear *et al.* (2009). Bullfrogs were given a unique alphanumeric ID and were anaesthetized individually in water containing 0.1 % tricaine methanesulphonate (MS-222) buffered with 0.2 % NaHCO₃. A blood sample and morphometric measurements were taken for each individual, including body weight, body length, snout to vent length (SVL), tibia length, tympanum diameter and nuptial pad thickness. Twelve bullfrogs were euthanized by cutting the neural chord. A longitudinal incision was made along the peritoneal cavity and both testes were excised, weighed and immediately fixed in Bouin's solution (Sigma-Aldrich St-Louis, MO, USA) or buffered formaldehyde (3.7 %, Bioshop Canada Burlington, ON, Canada) or were frozen in liquid nitrogen. Testes length and width along with nuptial pad thickness were measured with a calliper and throat color was identified as described by Spear *et al.* (2009). Other organs, including heart, liver, kidneys, muscle and brain were also collected for different studies. Collections were approved by the Société de la faune et des parcs du Québec, and all manipulations of animals were approved by the animal care committee of the Institut national de la recherche scientifique and the University of Québec at Montréal.

2.3 Histology and analyses of gonads and gametes

Following a minimum of 24 h of fixation, excess fixative was removed using several changes of 70 % ethanol. Tissues were dehydrated and cleared with a gradient of alcohols and solvent and were embedded in paraffin (Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada). Serial sectioning was performed using a rotary

microtome set to yield 9 (2004) or 5 (2007 to 2009) µm sections that were stained using haematoxylin and eosin (Sigma Diagnostics, St. Louis MO, USA). Sections were viewed using a Leitz binocular microscope. Photographs were taken using a SPOT Insight Digital Camera through a Zeiss Axioplan fluorescence microscope and photographed at 200 X magnification.

Five histological sections were chosen at random for each animal (i.e. 1 section per slide, 5 slides from the pair of testes) and all lobules within each section were examined. Testes were examined for continuity and number of spermatogonial cysts along the lobule wall, testicular degeneration (normal, slight or severe) and lobule diameter.

Normal testes (Figure 1A) were characterised by the presence of lobules enclosing developing germ cells within cysts of spermatogonia (SG), spermatocytes (SC), spermatids (ST) and spermatozoa (SP). Slight testicular degeneration (Figure 1B) was marked by empty spaces (ES) formed when new spermatogonial cysts failed to develop along the periphery of the lobule wall (LW) and by loss of both nuclear and cytoplasmic detail among the remaining germ cells. Testes in the severe stage of degeneration (Figure 1C) lacked a lobular structure and the tissue was composed of degenerating germ cells with the absence of nuclear and cytoplasmic detail.

2.4 Western blots

Frozen testes were homogenized on ice in lysate buffer (100 mM KH₂PO₄ pH 7.8, 1 mM EDTA, 10 % glycerol, 1 % Triton X-100 and 7 mM β-mercaptoethanol) and protease inhibitor cocktail (1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride). The lysates were centrifuged at 16,000 × G for 5 min at 4 °C. The supernatants were collected, diluted 1:25 in sample buffer, loaded on a 7 % polyacrylamide gel and migrated at 120 V for 1 h. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane at 100 V for 1 h. Membranes were incubated overnight at 4 °C with a polyclonal

rabbit antibody against α -ER (1:5,000) followed by 1 h incubation at room temperature with horse anti-rabbit peroxidase-labelled secondary antibody (1:2,000). Membranes were then incubated in HRP substrate (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Results were revealed on X-ray films and digitalized for densitometry analysis. The membrane was then stripped and incubated with a polyclonal mouse antibody against β -actin (1:20,000) followed by a peroxidise-labelled secondary antibody (1:20,000) as a loading control. Bands were then detected as above.

2.5 Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using Prism 5.01 (GraphPad, La Jolla, CA). Normality of distributions was verified with a Shapiro-Wilk normality test and homogeneity of variance was verified with a Bartlett's test. For each contaminated site, the number of frogs with normal, slight and severe degenerating testes was compared with the equivalent developmental stages at Deborah Stairs, the reference site, using a Fisher's exact test (2x2 contingency table for each comparison with reference site). The morphometric measurements of gamete weight, lobule measurements, spermatogenic stages and counts of spermatogonial cysts were subjected either to a one-way ANOVA followed by a Tukey's multiple means comparison post-hoc test or to a nonparametric Krustal-Wallis test followed by a Dunn's multiple means comparison post-hoc test, depending on whether or not the distributions were normal or not.

3 Results

Body weight, body length and eardrum diameter (Figure 2) of bullfrogs collected at Barbe River were all significantly smaller than those from the reference site Deborah Stairs. Animals from the moderately contaminated site Pot-au-Beurre River were significantly larger for both body weight and length compared to bullfrogs from Deborah Stairs (36.3 and 8.2 % increase above control,

respectively). In contrast, there were no significant differences among sites for SVL or tibia length.

Gonads from all bullfrogs were examined for testicular degeneration and integrity of spermatogonial cysts along the lobule wall. The percentage of individuals with normal testes decreased significantly at Choinière reservoir, Yamaska, Noire and Barbe River in comparison to bullfrogs from Deborah Stairs and Pot-au-Beurre River (93.8 % and 81.8 %, Figure 3A). The percentage of slight testicular degeneration at the same contaminated sites increased significantly compared to animals from Deborah Stairs and Pot-au-Beurre River (6.3 % and 18.2 %, Figure 3B). Significant increases in severe testicular degeneration were also observed in bullfrogs from Yamaska (18.2 %) and Barbe Rivers (26.7 %) relative to the animals at the reference study sites (Figure 3C). Also, integrity of spermatogonial cysts along the periphery of the lobule wall declined significantly in animals from Choinière reservoir, Yamaska, Noire and Barbe Rivers, relative to bullfrogs from Deborah Stairs (81.3 %) and Pot-au-Beurre River (63.6 %). Several ovotestes were observed in males from Noire and Barbe Rivers (Figure 1D), though the occurrence was not sufficient to perform statistical analysis.

Normalized gonad weights were significantly larger in animals from Pot-au-Beurre River compared to those from either reference site. In contrast, testicular weights were significantly smaller in bullfrogs from Choinière reservoir and Barbe River, compared to animals from Boivin Lake and Deborah Stairs, respectively (Figure 4A). The same tendency is observed for the number of spermatogonial cysts along the lobule wall with animals from Pot-au-Beurre River showing an increase of 12.5 % compared to Boivin Lake and bullfrogs from the contaminated sites Choinière reservoir and Noire River showing a decrease compared to those from Deborah Stairs (Figure 4B). Finally, animals from Choinière reservoir show significantly smaller lobule diameter (Figure 4C) compared to those from Boivin Lake, but all other sites show no differences compared to reference sites. Severe testicular degeneration was highly prevalent

in animals from Barbe River. There was not a sufficient amount of animals with normal or slightly degenerated testes and with enough cellular definition to include in figure 4B and 4C. There was no significant difference in testis length or width between any contaminated and reference sites.

Nuptial pad thickness and throat color were assessed as secondary sexual characteristics. Bullfrogs from Pot-au-Beurre River show significantly larger nuptial pad thickness (44 % increase) compared to animals from Boivin Lake, but no other significant differences were observed for these endpoints (data not shown).

The expression of α -ER was determined by Western blotting and was quantified by densitometry analysis relative to β -actin expression. Western blots were conducted using testes of bullfrogs from reference sites and sites of moderate agricultural intensity. Results show a distinct band at 65 kDa (Figure 5A) which is similar to the molecular weight of α -ER in the African clawed frog (61 and 66 kDa, Claret *et al.*, 1994). There is an increase in expression of α -ER (Figure 5B) in bullfrogs from sites of moderate agricultural intensity compared to those from reference sites, although it is significant only for bullfrogs from Choinière reservoir. This test was made with testes collected in 2009 and there are no results for this test at sites of high agricultural intensity, since the precipitations made the capture impossible at these sites.

4 Discussion

Intensive agricultural practices are suspected to be one of the factors responsible for the decline in amphibian populations and the abnormal development that has been observed (Lowcock *et al.*, 1997; Ouellet *et al.*, 1997). Results demonstrate that bullfrogs from sites of high agricultural intensity have smaller morphometric measures than those from sites of low agricultural intensity, suggesting that their growth is impaired. Furthermore, in this study, we observed detrimental changes

in the reproductive system of male bullfrogs depending on the intensity of agriculture in the sub-watresheds. An increased percentage of animals from sites of high agricultural intensity demonstrated slight and severe testicular degeneration compared to bullfrogs from reference sites. Also, multiple ovocytes were observed in testes of frogs from sites of high agricultural intensity. Finally, Western blotting showed an increase in α -ER relative expression in testes of bullfrogs from sites of moderate agricultural intensity. Taken together, these findings suggest that factors associated with agricultural intensity at the different sites have detrimental effects on the health of bullfrogs at those sites.

Several uncontrolled variables might have impacted the studies, including the weather and water levels. Such changes could have affected both water quality and the success of captures. Furthermore, food resources availability and inter-species competition could have affected the development and survival of animals. The agricultural pattern or other potential sources of pollution may have changed over the years of the study. Also, relatively small numbers of animals were assessed, because the bullfrogs being sampled were from limited, wild populations. Oversampling could have adverse impacts on the populations under study.

Captures at the Barbee River were unsuccessful in 2007 to 2009 and animals captured in 2004 at this site showed smaller morphometric measurements compared to other study sites. Spear *et al.* (2009) suggested several hypotheses to explain these results at Barbee River, among which three could apply to the present study; (1) departure of larger males from the Barbee River, (2) instability of the population because it is maintained by smaller males, (3) poor survival rate of large animals. No animals were seen or heard during the sampling seasons of 2007 to 2009, thus bullfrog populations in the Barbee River appear to be declining. This trend is also supported by the almost complete failure of tadpole sampling at the Barbee River in 2008 and 2009 (unpublished data). It was also

suggested that the small size of frogs could be the result of poor growth of tadpoles and poor energy storage during the larval stage (Crump, 1981).

Sites of high agricultural intensity showed significant slight and severe testicular degeneration. Male bulls (*Bos taurus*) (Cook *et al.*, 2000), rats (*Rattus norvegicus*) (McLachlan *et al.*, 1995) or stallions (*Equus caballus*) (Turkstra *et al.*, 2005) immunized against GnRH show decreased testosterone levels, testicular degeneration and loss of reproductive function. The presence of lobules containing cysts of germ cells surrounding the entire wall indicates that new cysts of spermatogonia are entering the cycle of spermatogenesis. Thus, the decrease in spermatogonial cysts along the lobule wall in the contaminated sites Choinière reservoir and Noire River suggest that the regulation of androgens is impaired. Slight stages of spermatogenesis were shown to be androgen-dependent in the skipper frog (*Rana cyanophlyctis*) by Saidapur *et al.* (1981). The histopathology of the gonads also revealed several ovotestes in adults from sites of high agricultural intensity. This suggests that agricultural contamination at the Noire and Barbe Rivers causes males to have increased oestrogen levels. That increase could be caused by either xenoestrogens or by induction of aromatase (CYP19) in agricultural run-off. It was shown by Aravindakshan *et al.* (2004) that exposure to estrogenic contamination causes intersex males, or ovotestes, in the spottail shiner (*Notropis hudsonius*).

More detailed study of water quality and contaminants at these sites would be necessary to further differentiate possible factors that might be causing site-specific changes in bullfrog development, health or populations. In a field study, it is very difficult to identify the specific causes of adverse effects observed. The evidence available suggests an association with the level of agricultural intensity around each capture site. The continued characterization of water quality and follow-up at each site should help in correlating the presence of specific contaminants or conditions with bullfrog population changes. Unfortunately,

expense and manpower requirements make thorough water monitoring over the course of a year very difficult.

In conclusion, this study identified effects on bullfrog size and the reproductive system associated with agricultural intensity. A significant increase in testicular degeneration and disruption of spermatogenesis were observed in sites of high agricultural intensity. However, a specific mechanism of action and a specific factor cannot be determined due to the possible co-exposure to numerous agricultural contaminants or other unknown differences among sites. Whether or not bullfrogs can be considered a sentinel species for the ecosystems in which they inhabit is uncertain, but their potential decline at certain study sites may be a sign of declining health of the surrounding environment. Continued monitoring will improve our understanding of the trends in bullfrog populations, as well as what they might mean for their ecosystems.

5 Acknowledgements

This research was funded by the Québec government program Valorisation Recherche-Québec, the Environmental Fund of Mountain Equipment Co-op and an Environmental Research Grant of the EJLB Foundation. We thank Érik Gendreault-Berthiaume, Sébastien Fillion, Marjolaine Bisson, Stéphanie Petrillo, Caroline Thouin and Catherine Ferland for in-field collaboration.

6 References

- Allran, J.W., Karasov, W.H., 2001. Effects of atrazine on embryos, larvae, and adults of anuran amphibians. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 769-775
- Aravindakshan, J., Paquet, P., Gregory, M., Dufresne, J., Fournier, M., Marcogliese, D.J., Cyr, D.G., 2004. Consequences of xenoestrogen exposure on male reproductive function in spottail shiners (*Notropis hudsonius*). *Toxicol. Sci.* 78, 156-165
- Bérubé, V., 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. *Aquat. Toxicol.* 71, 109-120
- Boily, M.H., Bérubé, V.E., Spear, P.A., DeBlois, C., Dassylva, N., 2005. Hepatic retinoids of bullfrogs in relation to agricultural pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1099-1106
- Claret, F.X., Chapel, S., Garcés, J., Tsai-Pflugfelder, M., Bertholet, C., Shapiro, D.J., Wittek, R., Whali, W., 1994. Two functional forms of the *Xenopus laevis* estrogen receptor translated from a single mRNA species. *J. Biol. Chem.* 269, 14047-14055
- Cook, R.B., Popp, J.P., Kastelic, J.P., Robbins, S., Harland, R., 2000. The effects of active immunization against gnRH on testicular development, feedlot performance, and carcass characteristics of beef bulls. *J. Anim. Sci.* 78, 2778-2783
- Crump, M.L., 1981. Energy accumulation and amphibian metamorphosis. *Oecologia*. 49, 167-169
- Groison, V., 2000. Profil du bassin versant de la rivière Yamaska. Conseil de gestion du bassin versant de la Yamaska (COGEBY)
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5476-5480

- 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. *Environ. Health Perspect.* 111, 568-575
- Jjemba, P.K., 2002. The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 93, 267-278
- Lee, L.S., Carmosini, N., Sassman, S.A., Dion, H.M., Sepulveda, M.S., 2007. Agricultural contributions of antimicrobials and hormones on soil and water quality. *Advances in agronomy.* 93, 1-68
- Lofts, B., 1964. Seasonal changes in the functional activity of the interstitial and spermatogenetic tissues of the green frog, *Rana esculenta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 4, 550-562
- Lowcock, L.A., Sharbel, T.F., Bonin, J., Ouellet, M., Rodrigue, J., DesGRanges, J.L., 1997. Flow cytometric assay for in vivo genotoxic effects of pesticides in green frogs (*Rana clamitans*). *Aquat. Toxicol.* 38, 241-255
- McLachlan, R.O., Wreford, N.G., Krester, D.M. de, Robertson, D.M., 1995. The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized adult rat. *Endocrinology.* 136, 4035-4043
- MDDEP – Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs.
Last accessed September 9th 2010. Bassin versant de la rivière Yamaska (1997). URL : http://www.mddep.gouv.qc.ca/milieu_agri/pratiques-agri/yamaska/pollution.htm
- Meucci, V., Arukwe, A., 2006. The environmental estrogen, 4-nonylphenol modulates brain estrogen-receptor- and aromatase (CYP19) isoforms gene expression patterns in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mar. Environ. Res.* 62, S195-S199

- Mosconi, G., Carnevali, O., Franzoni, M.F., Cottone, E., Lutz, I., Kloas, W., Yamamoto, K., Kikuyama, S., Polzonetti-Magni, A.M., 2002. Environmental estrogens and reproductive biology in amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.* 126, 125-129
- Ouellet, M., Bonin, M., Rodrigue, J., DesGRanges, J.L., Lair, S., 1997. Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *J. Wild. Distrib.* 33, 95-104
- Primeau, S., LaViolette, N., St-Onge, J., Berryman, D., 1999. Le bassin versant de la rivière Yamaska : profil géographique, sources de pollution et interventions d'assainissement section 1. Dans : Le bassin de la rivière Yamaska : l'état de l'écosystème aquatique. Ministère de l'environnement du Québec. Envirodoq # EN990224. Rapport # EA-14
- Pudney, J., 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc. Res. Tech.* 32, 459-497
- Saidapur, S.K., Yajurvedi, H.N., Hooli, M.A., 1981. The effect of cyproterone acetate on spermatogenesis and thumb pads of the skipper frog, *Rana cyanophlyctis* (Schn.). *Experientia*. 37, 1162-1163
- Sanderson, J.T., Seinen, W., Giesy, J.P., Berg, M. van der, 2000. 2-chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295 human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? *Toxicol. Sci.* 54, 121-127
- Sarman, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere*. 65, 725-759
- Spear, P.A., Boily, M., Giroux, I., DeBlois, C., Leclair, M.H., Levasseur, M., Leclair, R., 2009. Study design, water quality, morphometric and age of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in sub-watershed of the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada. *Aquat. Toxicol.* 91, 110-117

- Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M., Cyr, D., Marcogliese, D., 2002a. Response of the amphibian tadpoles (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. Environ. Toxicol. Chem. 21, 527-531
- Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M., Cyr, D., Marcogliese, D., 2002b. Response of the amphibian tadpoles (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the ovary. Environ. Toxicol. Chem. 21, 1264-1267
- Trukstra, J.A., Meer, F.J.U.M. van der, Knaap, J., Rottier, P.J.M., Teerds, K.J., Colenbrander, B., Meloen, R.H., 2005. Effects of GnRH immunization in sexually mature pony stallions. Anim. Reprod. Sci. 86, 247-259
- van Oordt, P.G.W.J., 1960. The influence of the internal and external factors in the regulation of the spermatogenic cycle in amphibian. Zool. Soc. London Symp. 2, 29-52
- Weller, W.F., Green, D.M., 1997. Checklist and current status of Canadian amphibians. Herpetol. Conserv. 1, 309-328
- Yadetie, F., Arukwe, A., Goksoyr, A., Male, R., 1999. Induction of hepatic estrogen receptor in juvenile Atlantic salmon *in vivo* by the environmental estrogen, 4-nonylphenol. Sci. Total. Environ. 233, 201-210

7 Tables

Table 1: Water quality and location of study sites.

Study sites	Water quality (MDDEP 1997)	Agricultural intensity	Latitude/Longitude
Deb. Stairs	Satisfactory	Low	45°12'11,9"N/72°33'7,8"W
Boivin Lake	Satisfactory	Low	46°02'56,3"N/72°59'59,2"W
Pot-au-Beurre Riv.	Poor	Moderate	45°42'00,8"N/72°61'45,4"W
Choinière res.	Questionable	Moderate	45°16'40,3"N/72°57'46,5"W
Yamaska Riv.	Questionable	Moderate	45°30'09,5"N/72°54'48,7"W
Noire Riv.	Poor	High	45°47'86,7"N/72°98'32,1"W
Barbue Riv.	Poor	High	45°40'71,9"N/72°69'87,4"W

8 Figures

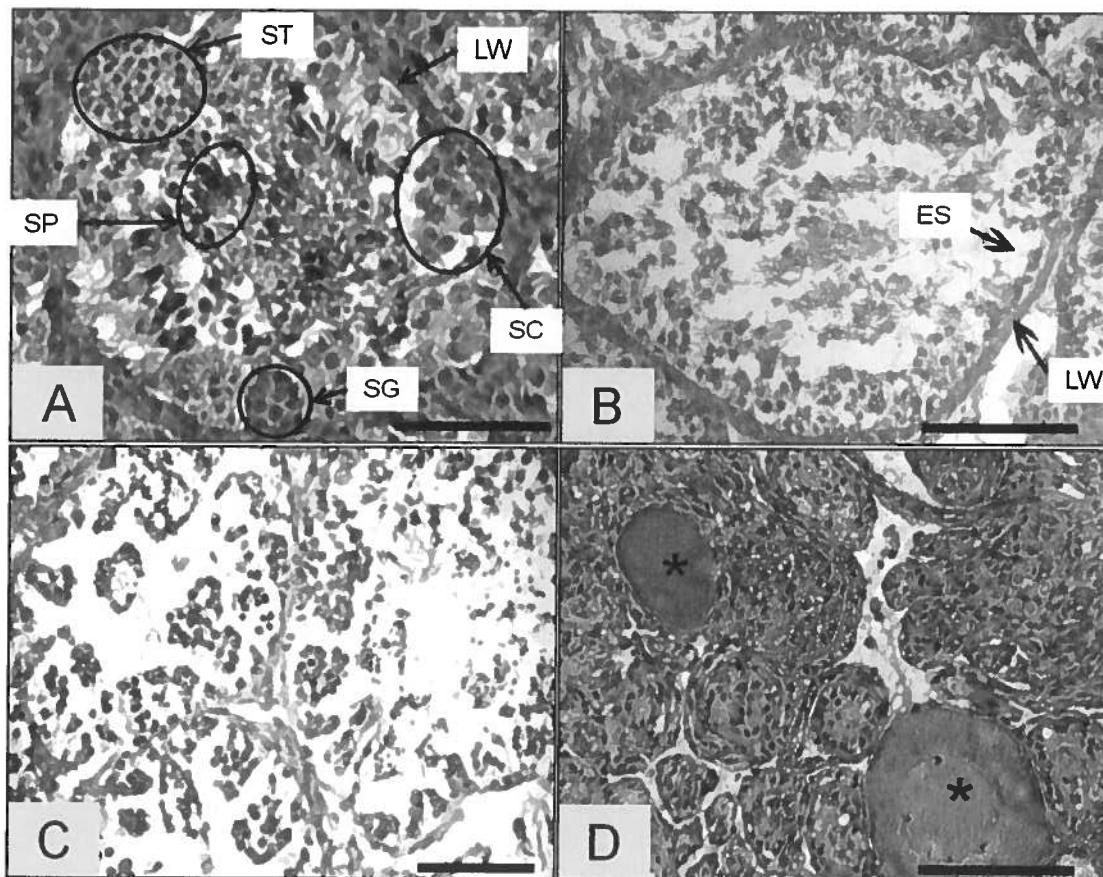


Figure 1: (A) normal testis, (B) slight testicular degeneration, (C) severe testicular degeneration and (D) ovocytes in an ovotestis of male bullfrogs. Normal testis (A) shows active spermatogenesis; spermatogonia (SG), spermatocytes (SC), spermatids (ST), spermatozoa (SP) and lobules (LW). Slight testicular degeneration (B) is characterized by empty spaces (ES) at the periphery of the lobule wall (LW) and severe testicular degeneration (C) is characterized by lack of a lobular structure, degenerating germ cells and the absence of nuclear and cytoplasmic detail. Asterisk shows ovocytes in ovotestis of a feminized male from contaminated site Barbee River. Magnification = 300 X (D) 400 X (A, B and C). Bars = 100 µm

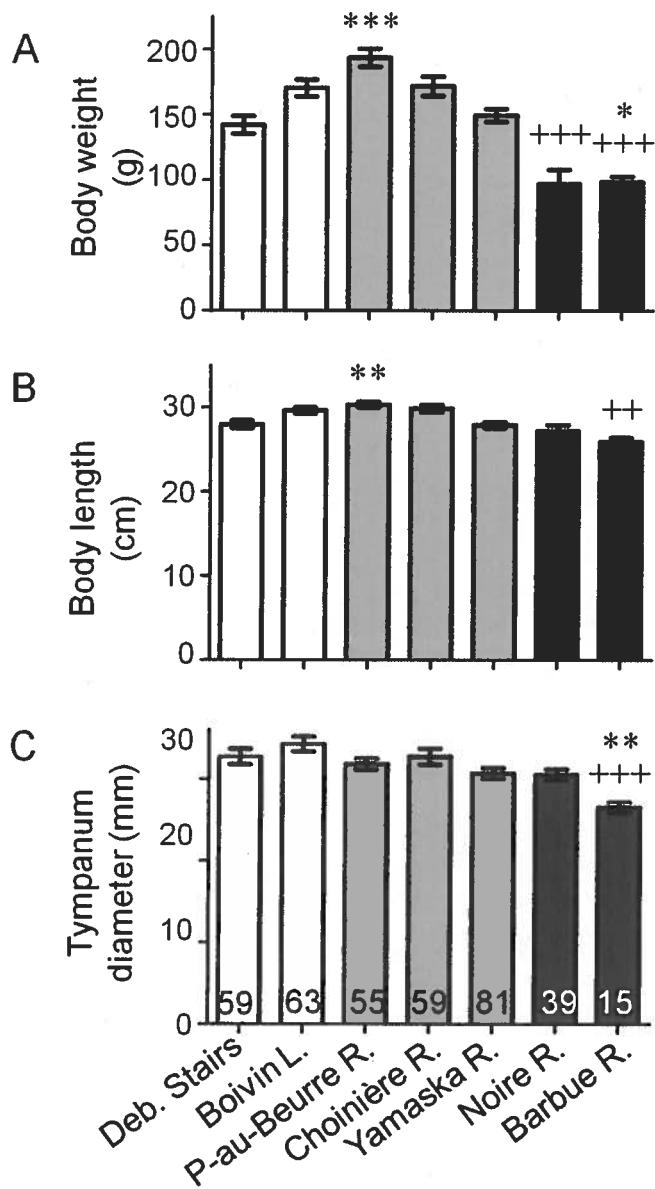


Figure 2: Mean (A) body weight, (B) body length and (C) tympanum diameter \pm standard error (SE) in male bullfrogs that were collected in sites of low (white), moderate (light grey) or high (dark grey) agricultural intensity in 2004 and 2007 to 2009. Numbers in figure C are sample numbers (applicable for A, B and C). Columns labelled with an asterisk are different from Deborah Stairs and columns labelled with + are different from Boivin Lake. One, 2 or 3 symbols represents $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, or $p \leq 0.001$, respectively

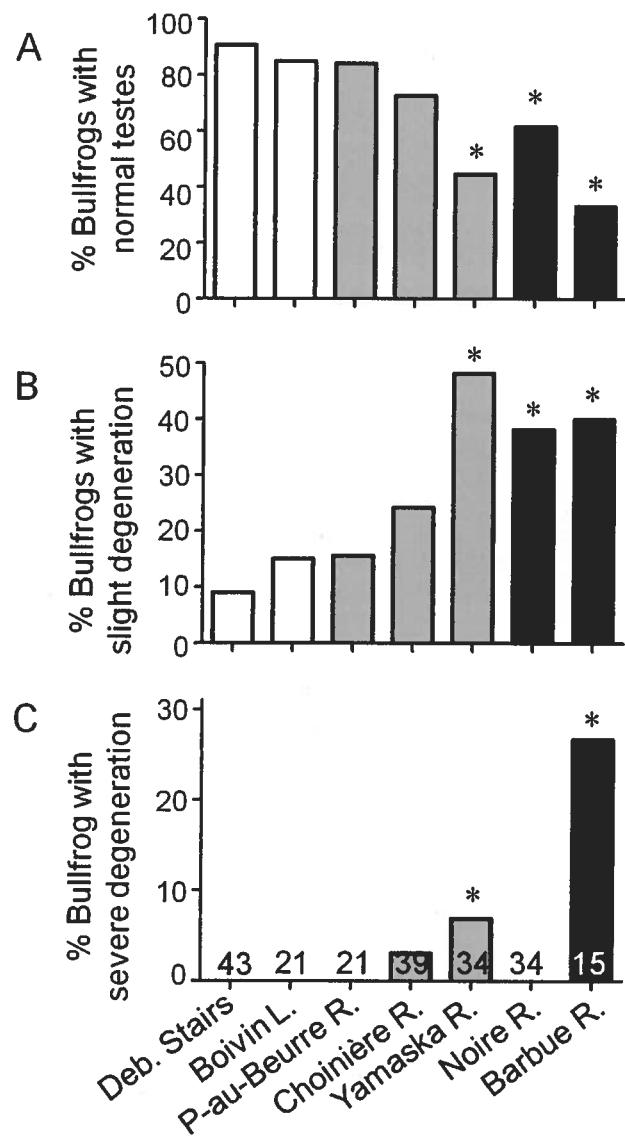


Figure 3: Percentage of frogs showing (A) normal testes, (B) slight and (C) severe testicular degeneration in male bullfrog collected in sites of low (white), moderate (light grey) or high (dark grey) agricultural intensity in 2004 and 2007 to 2009. Numbers in figure C are sample numbers (applicable for A, B and C). Columns labelled with an asterisk are different from Deborah Stairs and columns labelled with + are different from Boivin Lake. One, 2 or 3 symbols represents $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, or $p \leq 0.001$, respectively

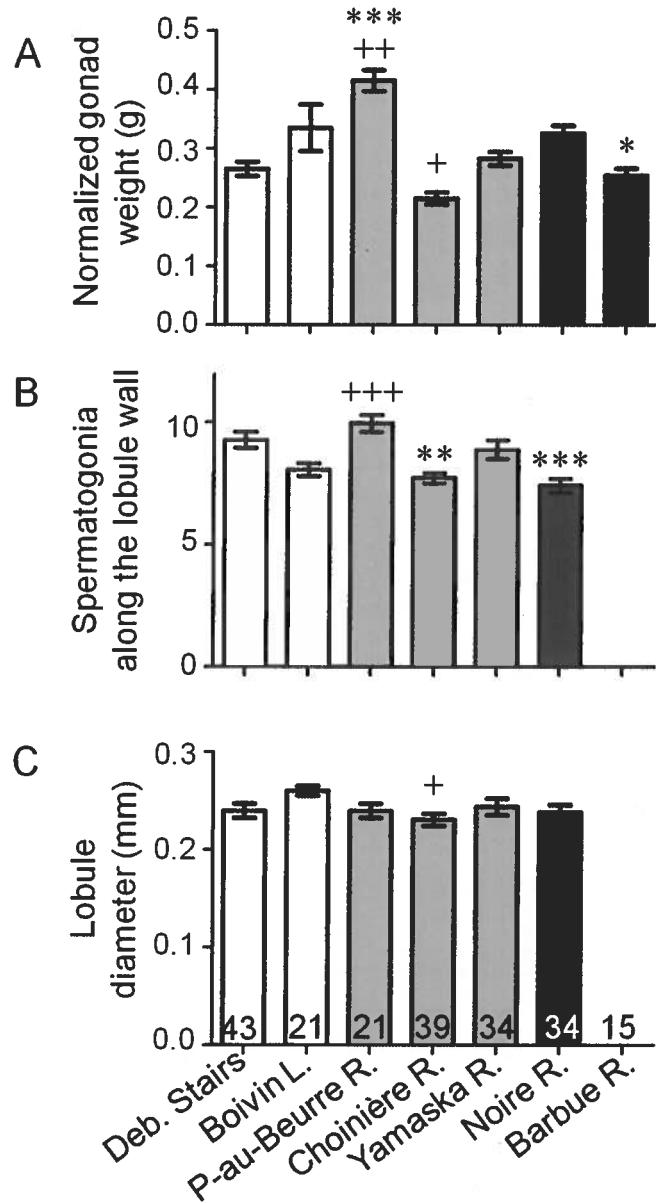


Figure 4: Normalized gonad weight (A), number of spermatogonial cysts along the lobule wall (B) and lobule diameter (C) in male bullfrog collected in sites of low (white), moderate (light grey) or high (dark grey) agricultural intensity in 2004 and 2007 to 2009. Numbers in figure C are sample numbers (applicable for A, B and C). Columns labelled with an asterisk are different from Deborah Stairs and columns labelled with + are different from Boivin Lake. One, 2 or 3 symbols represents $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, or $p \leq 0.001$, respectively

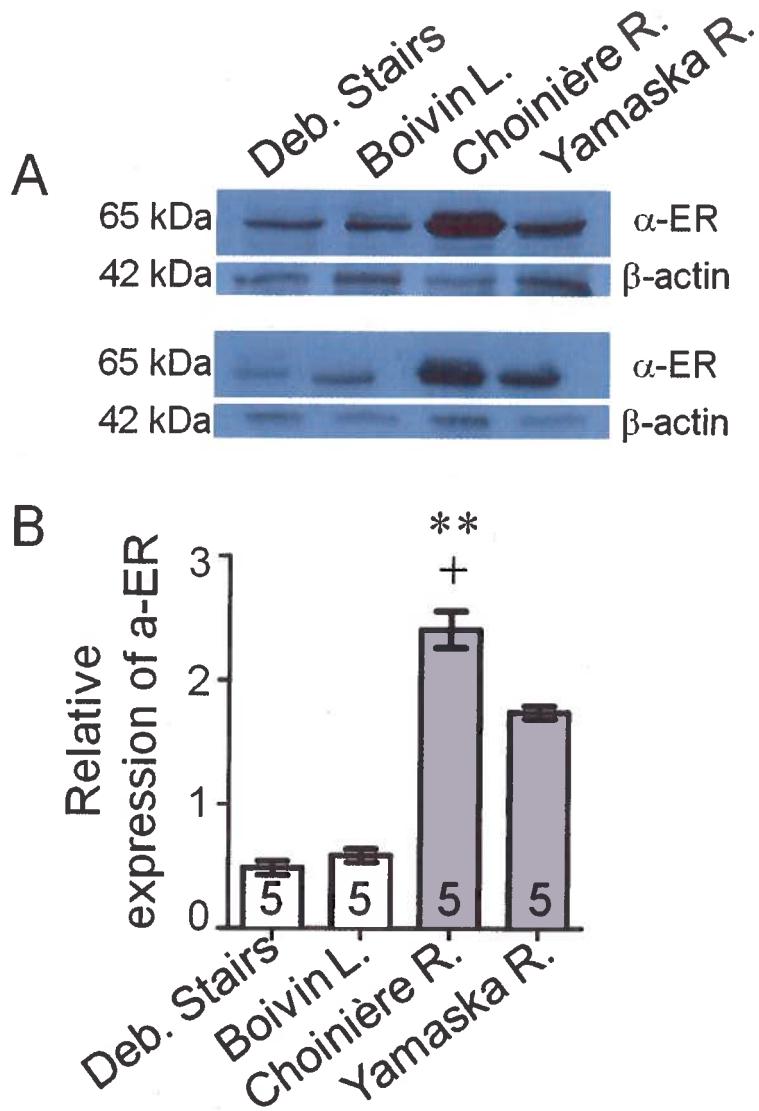


Figure 5: Two examples of Western analyses (A) of proteins extracted from bullfrog testes collected in sites of low and moderate agricultural intensity in 2009. Membrane incubated with anti-oestrogen receptor alpha (α -ER) and with β -actin for loading control. Expression of α -ER (B) relative to expression of β -actin. Numbers in figure B describe the number of samples (applicable for A and B). Columns labelled with an asterisk are different from Deborah Stairs and columns labelled with a plus sign are different from Boivin Lake. One, 2 or 3 symbols represents $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, or $p \leq 0.001$, respectively

Chapitre 3 – Présentation d'un article scientifique: Sexual differentiation and gonad development of bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles in agricultural environment.

Résumé en français

Les causes du déclin mondial des populations d'amphibiens sont présentement incertaines. De nombreuses études en laboratoire suggèrent que la contamination agricole est une des causes possibles de ce déclin. Dans l'étude présente, des têtards de ouaouaron (*Lithobates catesbeianus*) ont été recueillis à proximité des sites de reproductions et à d'autres sites dans le bassin versant de la rivière Yamaska, au Québec. Ces sites présentent une intensité agricole faible, modérée ou élevée, ce qui correspond à une superficie en culture à grande interligne de $\leq 19\%$, 20-50 % ou $\geq 60\%$. Des têtards ont été achetés d'un fournisseur en milieu exempt de contamination agricole et ont été maintenus en captivité à titre de contrôles. Les animaux ont été classés selon qu'ils étaient des têtards précoce, médians ou avancés, selon leur stade de développement. Les mesures morphométriques et le complexe néphrogonadal des têtards terrain et des têtards en captivité ont été récoltés après l'euthanasie. Les complexes néphrogonadaux ont été traités en histologie et leur intégrité a été évaluée par microscopie optique. Les têtards des sites à intensité agricole élevée et plusieurs têtards des sites à intensité agricole modérée ont montré des mesures morphométriques inférieures comparé aux têtards des sites à intensité agricole faible ($p \leq 0.05$). Aussi, les têtards des sites à intensité agricole élevée ont montré un différentiation sexuelle différée comparativement à ce qui est suggéré dans la littérature et plus souvent que chez les têtards des sites à intensité agricole faible. Chez les mâles, le compte des gamètes a montré des tendances inconsistantes. Toutefois, l'histopathologie a montré de nombreux ovocytes testiculaires chez les têtards des sites à intensité agricole élevée, alors qu'aucun n'a été observé aux sites à intensité agricole faible. Chez les têtards femelles avancés des sites à intensité agricole élevée, le développement des gamètes

avancés s'est vu retardé par rapport aux têtards des sites à intensité agricole faible. Les variations dans le compte des gamètes et les anomalies dans le ratio sexuel entre les sites de même intensité agricole sont inconsistants et il n'est pas possible d'établir une relation claire avec les mécanismes d'inversion sexuelle. Les mesures morphométriques réduites chez les têtards des sites à intensité agricole élevée suggèrent que leur développement est altéré par l'eau de mauvaise qualité et que leur potentiel de survie est probablement précaire. Les résultats de l'étude suggèrent que le développement des têtards et de leur système reproducteur est affecté par la contamination associée avec une intensité agricole modérée et élevée.

Contribution de l'étudiant

La contribution de l'étudiante à cet article est majeure, car tous les travaux de laboratoire ont été réalisés par l'étudiante, de même que l'établissement du plan d'expérience. La majorité des conclusions et la rédaction de l'article sont le fruit du travail d'équipe entre l'étudiante et les directeurs de recherche. Les travaux ont démontré pour la première fois les effets spécifiques de la contamination agricole du bassin versant de la rivière Yamaska sur le développement des têtards de ouaouarons et de leur système reproducteur. L'étude renforce l'hypothèse générale que l'exposition aux contaminants agricoles est néfaste, spécialement lors des stades précoces de développement. L'analyse des pesticides dans les échantillons d'eau ont été réalisés par le Centre d'expertise en analyses environnemental du Québec. L'article sera publié sous peu.

Sexual differentiation and gonad development of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles in agricultural environment.

Mireille Plouffe-Malette ^a, Monique Boily ^{b, c}, Philip Spear ^{b, c}, Patrick Devine ^a

^a INRS – Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada. ^b Centre TOXEN, Département des Sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, H2X 3X8, Canada. ^c Centre interinstitutionnel de recherche en écotoxicologie (CIRÉ) 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada.

M Plouffe-Malette : mireille.plouffe-malette@iaf.inrs.ca

M Boily : boily.monique@uqam.ca

P Spear : spear.philip@uqam.ca

P Devine : patrick.devine@novartis.com

Corresponding author

P Devine; Telephone: 011-617-871-4833; Fax: 011-617-871-4931

Key words: *Lithobates catesbeianus*, tadpoles, sexual differentiation, reproductive system development, agricultural pollution

Abstract

The causes of the worldwide decline of amphibian populations are presently unclear. Several laboratory studies suggest that agricultural contamination is one of the possible causes of that decline. In the present study, bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles were collected in breeding sites from the Yamaska river watershed, Québec. These sites range from low, moderate, to high agricultural intensity, which are respectively surrounded by $\leq 19\%$, 20-59 % and $\geq 60\%$ wide-row crops. Control tadpoles were also purchased commercially and kept in captivity until certain stages of development. Animals were classified as being early, medium or late tadpoles; according to the developmental stage they had reached. After sacrifice, morphometric measurements and nephrogonadal complexes were taken. Development and integrity of gonads were assessed by histology and light microscopy. Tadpoles from sites of high agricultural intensity showed significantly smaller body weights and lengths at medium and late stages compared to tadpoles from sites of low agricultural intensity ($p \leq 0.05$). Tail widths were also significantly reduced in tadpoles of all stages at sites of high agricultural intensity, and in medium tadpoles at sites of moderate agricultural intensity. Furthermore, a delayed sexual differentiation was observed more often in tadpoles from sites of high agricultural intensity than tadpoles from sites of low agricultural intensity or tadpoles in captivity. In males, gamete counts showed inconsistent tendencies, but histopathology of the testes showed several oocytes in tadpoles from sites of high agricultural intensity, while none were observed in tadpoles from sites of low agricultural intensity. In females, a delayed development of advanced gametes was observed in early and late-staged tadpoles from sites of moderate and high agricultural intensity, compared to captive tadpoles. Variations in gamete counts and the abnormality of sex ratios among sites of the same agricultural intensity are inconsistent and it is not possible to definitively prove that there is disruption of male reproductive development. Smaller morphometric measures of tadpoles from contaminated sites suggested their development is impaired by water of poor quality and their

survival is probably endangered. These results suggest that the development of the bullfrog tadpole reproductive system is affected in watersheds associated with moderate and intensive agriculture.

1 Introduction

The decline and extinction of amphibian populations has been observed worldwide since the late 1980s (Wyman, 1990; Wake and Morovitz, 1991; Alford and Richards, 1999). Numerous causes have been proposed for that decline, among which habitat destruction (Pechmann and Wilbur, 1994; Coloma, 1995) and water contamination (Kirk, 1988; Carey and Bryant, 1995) are the most likely suspects. Increased difficulty with locomotion and orientation were observed in tadpoles of several anuran species following exposure to field-grade formulation of the most-frequently detected pesticides, including atrazine (Howe *et al.*, 1998). Also, limb deformities including syndactyla and dysmelia were reported in many amphibian species (Ouellet *et al.*, 1997; Buckhart *et al.*, 1998). Intensive agricultural practices are suspected to modify streams beds and habitat suitability and to contaminate waterways with fertilizers, manure, soil particles, antibiotics (Sarman *et al.*, 2006), hormones (Lee *et al.*, 2007), metals, microorganisms and pesticides (MDDEP, 1997; Jjemba, 2002).

Recent field studies which have measured retinoids (vitamin A) in male bullfrogs show that factors associated with intensive agricultural practices may affect the body weight and retinoid stores of male bullfrogs (Boily *et al.*, 2005; Bérubé *et al.*, 2005). Among other effects, glyphosate is suspected to cause oxidative stress, which can impair their survival. It has been shown by Tavera-Mendoza *et al.* (2002a; 2002b) that exposure of tadpoles to the most-frequently detected pesticide, atrazine, causes impairment of sexual differentiation and gonadal development in both males and females. These studies showed that exposure to low levels of atrazine result in reduced testicular volume in males and decreased numbers of primary germ cells in both genders. This is supported by the studies of Hayes *et al.* (2002; 2003) showing hermaphroditic and demasculinized male clawed frog (*Xenopus laevis*) after exposure at low-concentrations of atrazine. Sexual differentiation of tadpoles has been shown to occur between Gosner stages 33 and 36 (Gosner, 1960). The undifferentiated gonad contains primordial

germ cells that have not yet developed towards either oogonia or spermatogonia. During differentiation of the female, the medulla regresses, resulting in an ovarian cavity. Primordial germ cells eventually develop into oogonia and oocytes. In male tadpoles, the primordial germ cells migrate to the cortex of the gonad and eventually differentiate into spermatogonia and spermatocytes (Kelley, 1996). The female gonad is characterized by the presence of the ovarian cavity, oogonia (primary and secondary) and oocytes, as described by Hayes *et al.* (1998) and by Girish and Saidapur (2000).

Bullfrogs and tadpoles from six independent collection sites have been studied in the Yamaska River watershed, with locations representing various types and intensities of agricultural activity. The levels of agricultural intensity were defined as the percentage of farmland surrounding the waterway and separated into low ($\leq 19\%$), moderate (20-59 %) and high ($\geq 60\%$) (Primeau *et al.*, 1999). Water quality and chemical contaminants at these sites were described by Spear *et al.* (2009), showing increasing contamination of the most frequently detected pesticides as follows: Deborah Stairs < Choinière reservoir < Yamaska River < Pot-au-Beurre River < Noire River < Barbue River. Boivin Lake is a site that was added to the study in 2007 and that has a water quality equivalent to Deborah Stairs (unpublished data). Among contaminants, pesticides (atrazine, metolachlore, demethenamide, dicamba), nitrate and nitrite were found in the Yamaska River drainage basin (Spear *et al.*, 2009).

The objective of this research was to examine the health and reproductive developmental stages of tadpoles collected at sites of varying water quality to determine if there are differences in development of tadpoles at the different sites. Adult bullfrogs and water quality have been examined at these sites for multiple years (Spear *et al.*, 2009) and were chosen for the differing agricultural activity surrounding each site. Morphometric measurements and histological assessments of gonads were performed on captured tadpoles from each site, and comparisons were made with commercially acquired tadpoles allowed to

develop in the laboratory. Results suggest that size and health of tadpoles varied from site to site, with more polluted sites containing tadpoles with impaired growth and development of the reproductive system.

2 Materials and methods

2.1 Study sites

The reference site, Deborah Stairs, is a 2.5 ha pond located in a protected forested wetland surrounded by an area of low agricultural intensity ($\leq 19\%$). It has satisfactory water quality (MDDEP, 1997). Both Boivin Lake and Choinière reservoir are located along the Yamaska-North River, the first waterway downstream of the latter. They are located in an area of moderate agricultural intensity (Boivin lake $\leq 19\%$, Choinière reservoir 20-59 %), but the sites have very different water quality. Boivin Lake has satisfactory water quality and serves as the principal source of tap water of the nearby town of Granby, and so was considered as a second reference site. In contrast, Choinière reservoir has poor water quality (MDDEP, 1997). Choinière reservoir is very deep and acts as a decantation basin with only surface water entering the Yamaska North River downstream of the reservoir. Also, numerous swamps between both sites were designed to help improve the water quality of Boivin Lake (Groison, 2000). The Yamaska River is located at the confluence of Yamaska, Yamaska North and Yamaska Southeast Rivers in an area of moderate agricultural intensity (20-59 %). Finally, Noire and Barbeue Rivers are located in areas of high agricultural activity ($\geq 60\%$) and show very poor water quality (MDDEP, 1997).

2.2 Animal capture

Up to 20 bullfrog tadpoles were captured at each of the 6 study sites during the first week of June, in both 2008 and 2009. Animals were captured with a seine during the day and were euthanized upon capture with 0.3 % tricaine

methanesulfonate (MS-222) buffered with 0.2 % NaHCO₃. Each animal was assigned a unique alphanumerical ID, was weighed and multiple morphometric measurements were taken, including body length, tail length and width, hindlimb length and interocular distance. Developmental stages were determined according to Gosner (1960). Animals were grouped into 3 categories; early tadpoles (stages 25 to 30), medium tadpoles (stages 31 to 35) and late tadpoles (stages 36 to 40). Nephro-gonadal complexes were collected and fixed in Bouin's solution for 24h. Collections were approved by the Ministère de la faune et des ressources naturelles. All manipulations of animals were approved by the animal care committees of the Institut national de la recherche scientifique and the University of Québec at Montréal.

2.3 Tadpoles in captivity

Two cohorts of 35 tadpoles at stage 25 (Gosner, 1960) were purchased from Boreal Northwest (St-Catharines, ON, Canada). They were reared at a density of 2 tadpoles/L, as suggested by Flores-Nava *et al.* (1999) for optimal growth and metamorphosis. Tadpoles were kept at 25±1 °C, with a photoperiod of 14 h light/10 h dark, and given Nasco tadpole chow. Tanks were filled with aerated water (25±1 °C) that was replaced 1-3 times/day. They were euthanized upon reaching the appropriate developmental groups; early, medium and late. Morphometric measures, staging, and collection of nephro-gonadal complexes were done as described for field tadpoles.

2.4 Histological analyses of gonads

Fixed tissues were dehydrated in graded alcohols and citrisolv and were embedded in paraffin (Surgipath, Richmond, IL). Tissues were serially sectioned at 5 µm with a rotary microtome and stained with haematoxylin and eosin. For each animal, 3 sections 100 µm apart were analyzed for gender identification and staging of gametes. In females, four stages of oogonia/oocytes can be observed;

resting primary oogonia (RPOg), late primary oogonia (LPOg), secondary oogonia (SOg) and stage I oocyte (Ocl) (Figure 1A). RPOg and LPOg, are found predominantly in the cortex of the gonad, and are differentiated by the more intense staining of cytoplasm versus nucleus in LPOg. SOg are larger, surrounded by squamous primary follicular cells and the nucleus occupies most of the cell. Cells are present around the cytoplasmic membrane of the secondary oogonia. Ocl are surrounded by follicular cells, nuclear membrane is light and visible, (50-350 µm diameter). Male gonads are characterized by the presence of cysts of spermatogonia and spermatocytes (Figure 1B). Spermatogonia are large cells containing an oval nucleus with multiple nucleoli and very lightly stained cytoplasm. Spermatocytes are smaller cells with a smaller, highly stained, nucleus. All such analyses were conducted without knowledge of sample identity using a Leica DM 1000 optical microscope. Images of gonads were recorded using an inverted Nikon Eclipse-Ti microscope coupled with a Scion CFW1600C camera (Scion Corporation, Frederick, MD), using Visicapture software (Scion Corporation, Frederick, MD). Digital measurements were made on these images using image J software (NIH, Bethesda, MD, USA).

2.5 Statistical analyses

Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Normality of distributions was verified with a Shapiro-Wilk normality test and homogeneity of variance was verified with a Bartlett's test for morphometric measurements and gamete counts. Distributions that failed the normality test were subjected to a Kruskal Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison post-hoc test, while data with normal distributions were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's multiple means comparisons post-hoc test. Sex ratios were evaluated using the Fisher exact test.

3 Results

Tadpoles were successfully captured at all 6 study sites in 2008 and at 5 sites in 2009. None were captured at Boivin Lake in 2009. At each site, a maximum of 20 tadpoles were captured, with the exception of Noire and Barbue Rivers, where only 15 and 8 animals were captured, respectively, in 2009. The maximal number of animals could not be caught at these 2 sites, in spite of large sampling efforts of with 16 and 30 man-hours, respectively, as compared to 3 and 4 man-hours at other sites (Table 1). Though they are not statistically significant, differences were observed from the expected 50:50. For early-stage tadpoles, most animals were sexually differentiated and the sex ratio was different from the expected 50:50 at all sites designated as having high agricultural activity, with 70 to 100 % being female. For medium-stage tadpoles, the sex ratio was different from the expected 50:50 only at Barbue River with 77.8 % being female. For late-stage tadpoles, there were still a few undifferentiated animals, mostly at contaminated sites (Table 1). Also, the sex ratio at both reference sites were different from the expected 50:50 with 36.4 % female in Deborah Stairs and 100 % in Boivin Lake and at the contaminated sites Choinière reservoir and Barbue River for late tadpoles with respectively 75 and 33.3 % female.

Morphometric measurements tended to be lower in tadpoles from sites of moderate and high agricultural intensity compared to sites of low agricultural intensity. Body weights were significantly smaller in medium tadpoles from sites of moderate and high agricultural intensity and in late tadpoles from sites of high agricultural intensity, compared to tadpoles from sites with less agricultural activity (Figure 2A). Body lengths of tadpoles were similar among tadpoles from sites of low and moderate agricultural intensity, tadpoles from sites of high agricultural intensity were smaller than those from sites of low (medium tadpoles) and medium (late tadpoles) intensity agriculture respectively (Figure 2B). Tail length results show similar tendencies as body length (data not shown). Tail widths were significantly smaller in early tadpoles from sites of high agricultural

intensity than those from sites of either low or moderate agricultural intensity (Figure 2C). In medium tadpoles, tail widths were significantly smaller at sites of both moderate and high agricultural intensity compared to medium tadpoles from sites of low agricultural intensity. Finally in late tadpoles, tail widths were significantly smaller at sites of high agricultural intensity than those at sites of low agricultural intensity (Figure 2C). Hindlimb length tended to be smaller in late tadpoles from sites of moderate and high agricultural intensity, though results were not significantly different (data not shown). Interocular distance was significantly smaller in early and medium tadpoles from sites of high agricultural intensity compared to sites of moderate and low agricultural intensity in respectively (data not shown).

Tadpoles in captivity showed high mortality. Ammonia levels were frequently unbalanced, which was likely involved in this mortality. Healthy animals were used for analysis of gonads. There were a sufficient number of females, while there were too few males to conduct statistical analyses. Results of gonadal development are shown compared to wild-caught females (Figure 3B).

Gamete counts were not significantly different among different sites in male tadpoles. There was a tendency, however, for higher percentages of advanced gametes (Sc) in male tadpoles with increasing agricultural intensity in early and late tadpoles compared to tadpoles from sites of low agricultural intensity, while the opposite was observed in medium tadpoles, with no advanced gametes in tadpoles from sites of high agricultural intensity (Figure 3A). Several ovotestes (Figure 1C) were observed in male tadpoles from sites of high agricultural intensity, though the frequency was not sufficient to conduct statistical analyses. In females, tadpoles from sites of low, moderate and high agricultural intensity were compared to tadpoles grown in captivity. In early tadpoles, a larger percentage of late primary oogonia was observed in captive tadpoles compared to tadpoles from sites of moderate and high agricultural intensity (Figure 3B). There were no early tadpoles obtained from sites of low agricultural intensity. In

medium tadpoles, there was a higher percentage of advanced gametes (Ocl) in captive tadpoles and in tadpoles at sites of low agricultural intensity compared to sites of moderate and high agricultural intensity (Figure 3B). The opposite tendency was observed for resting primary oogonia. Finally a higher percentage of advanced gametes (Ocl) was observed in late captive tadpoles compared to all late field tadpoles, whereas patterns of oocyte development were similar among field sites (Figure 3B).

4 Discussion

In this study, we examined the status of the reproductive system and sexual differentiation of bullfrog tadpoles in aquatic environments surrounded by varying agricultural intensity, comparing them to tadpoles allowed to develop in captivity. Tadpoles from sites of medium and high agricultural intensity were smaller than tadpoles from sites of low agricultural intensity, suggesting their development is impaired. Also, tadpoles from sites of high agricultural intensity show a delayed sexual differentiation and an unbalanced sex ratio more often than tadpoles from sites of low agricultural intensity and from captive tadpoles, though the difference was not significant. Gamete counts in males showed inconsistent tendencies among the different developmental stages, while the histopathology of the gonads show multiple feminized males at sites of high agricultural intensity. Finally, gamete counts in early and late-staged females showed delayed development of advanced gametes, predominantly at sites of moderate and high agricultural intensity, compared to captive tadpoles.

In 2008, a minimum of 17 animals were captured at each site, while capture was only successful in 5 sites in 2009. Elevated water levels in 2009 were likely one cause why no animals were captured at the reference site Boivin Lake. During the spring of 2009, abundant rainfall increased the water level of Boivin Lake by more than 30 cm above normal, and the altered shoreline vegetation made using the nets more difficult. Also, capture at Noire and Barbue Rivers was less

successful in 2009 in spite of the larger sampling effort made (Table 1). Capture of adults was also unsuccessful at Noire and Barbue Rivers (unpublished data). In addition to the effects of weather, changes in population dynamics may have been a factor contributing to poor captures. Results over the past few years suggest that there may be fewer animals at sites of high agricultural intensity, with the ones captured being smaller and less developed. Alternatively, local differences in food availability, predators, or overall quality of sites could give some sites specific advantages over others. Furthermore, the diversity of genetics and migration patterns of frogs at the various sites is relatively unknown, so there may be genetic differences among the populations found at each site.

Measurements of body and tail size can be associated with energy storage before metamorphosis, and it has been suggested that it is an important parameter for successful development, along with growth and differentiation rates (Wilbur and Collins, 1973; Smith-Gill and Berven, 1979; Crump, 1981). Since metamorphosis includes a temporary period of anorexia and high energy needs, metamorphosis can probably not be successfully completed until a minimal amount of energy is stored (Griffiths, 1961). Although not always significant, animals from sites of moderate and high agricultural intensity have reduced body and tail measurements at all developmental stages compared to sites of low agricultural intensity, suggesting that they have a reduced storage capacity, decreased feeding behaviour, or an impaired growth rate. A smaller size before metamorphosis or a low level of stored energy in tadpoles might influence survivorship and fitness in adults. Semlitsch (1990) suggested that tadpoles with smaller body size are more susceptible to predation by insects. Alternatively, tadpoles might be undergoing metamorphosis earlier in contaminated sites. It was shown by Buskirk and McCollum (2000) that swimming performance was greater in tadpoles with a larger tail surface. So in addition to their probable precarious survivorship, small animals from sites of moderate and high agricultural intensity may be more susceptible to predation due to lower swimming performance. Thus, regardless of the underlying

mechanism or intermediate effect, our results suggest that tadpoles at sites with poor water quality are likely at a disadvantage to those at cleaner sites.

Early studies of sexual differentiation by Swingle (1926) suggested that it is difficult to distinguish male tadpoles from undifferentiated tadpoles prior to Gosner stage 35, or that gonads of male tadpoles differentiated later than females. In contrast, females are easily distinguished due to the ovarian cavity and the uniqueness of the oogonia and oocytes. This is consistent with our results of sexual ratios observed for early tadpoles. All study sites show a high percentage of females, except for Deborah Stairs, which had 40% females. It has been shown that tadpoles exposed to estradiol during gonadal differentiation develop into fertile female (Chang and Witschi, 1956) while tadpoles exposed to a testicular graft develop into males, likely due to the testosterone produced by that tissue (Mikamo and Witschi, 1963). Orton *et al.* (2006) also suggested that exposure of tadpoles to atrazine and nitrate, two typical agricultural contaminants, induced skewed sex ratios. For medium tadpoles, all study sites had normal sex ratios, except for Barbee River and Lake Boivin which had higher percentages of females. For late tadpoles, sex ratios were different from the expected 50:50 in both reference sites and the 2 contaminated sites, Choinière reservoir and Barbee River. These sites show higher and lower percentages of females, respectively, and because the abnormality of the sex ratios is inconsistent among sites of the same agricultural intensity, it is not possible to make a clear relation with the sex-reversal mechanism.

Among the captured animals, most of the early tadpoles were already differentiated as either male or female and several late tadpoles were still undifferentiated after stage 36 (Table 1). This is inconsistent with the results of Witschi (1931) and Mayer *et al.* (2002) suggesting that sexual differentiation begins around Gosner stage 33 and is completed by stage 36; which is the medium tadpole stage. Our results demonstrate that sites of high agricultural intensity have more of undifferentiated animals after stage 36. It was shown by

Mayer *et al.* (2003) that octylphenol, an estrogen-like endocrine disruptor chemical, accelerated sexual differentiation of bullfrog tadpoles. Also, Orton *et al.* (2006) showed that exposure of leopard frogs to atrazine or nitrate can lead to premature development of gonads. Although field studies involve more uncontrolled variables than laboratory studies, it is probable that tadpoles from the Yamaska River drainage basin differentiated over a wider range of developmental stages than reported in the literature. This could be due to the presence of endocrine disrupting chemicals or other contaminants found in local pollution, especially agricultural run-off (Kloas *et al.*, 1999; Lutz and Kloas, 1999; Morton *et al.*, 2002; Orton *et al.*, 2006) but the differences in percent females captured between supposedly clean sites complicate the interpretation of these results. Ovotestes observed in males from sites of high agricultural intensity are also likely to be due to endocrine disruptor chemicals. Indeed, Aravindashan *et al.* (2004) suggested that sex reversal and ovotestes can be caused by xenoestrogenic contaminants. This is supported by the study of Orton *et al.* (2006) which showed that exposure to nitrate and atrazine also causes ovotestes. Unfortunately, we would need better characterization of the water of the chosen sites to improve our understanding of how the local environments are impacting the development of bullfrogs present at each site. Currently, we have used data from the MDDEP, which has evaluated data on contaminants, pesticide levels, turbidity, nitrate and phosphate levels, temperature, and other variables measured multiple times throughout the spring and summer would help assess the real situation to which tadpoles are exposed during the developmental process. This information would aid in interpreting results.

Several variables might have impacted the studies including the weather and water levels. Also, since the agricultural pattern is not very homogenous, exhaustive qualification of specific contaminants at each study site would help interpreting the results. Industrial contamination is not involved in the study since all study sites are in agricultural environment, except for Boivin Lake, which is located in a filtrating wetland. The difference among study sites could be due to

the different climates of the sites, or to differences in the local populations of bullfrogs.

In conclusion, this study characterized differences in sexual differentiation and development in tadpoles at different sites of the Yamaska river watershed. Significant decreases in morphometric measures, delayed sexual differentiation, and several ovotestes all suggest a negative impact of agricultural intensity on tadpoles and disruption of the normal function of their endocrine system. Overall, results show that tadpoles from sites of high agricultural intensity may be exposed to endocrine disruptor chemicals, possibly xenoestrogens. The particular variable(s) that is or are causing such effects remain to be identified, and the specific mechanism of action that could be involved is still to be determined. Further monitoring of these sites may lead to identification of the detrimental variable as agricultural patterns and processes change with time.

5 Acknowledgements

This research was funded by National Sciences and Engineering Research Council (NSERC), the Centre interinstitutionnel de recherche en écotoxicologie (CIRÉ), Hydro-Québec and Fondation Armand-Frappier. Field assistance was provided by Marc Levasseur, Sophie Dussault, Érik Gendreau-Berthiaume, Isabelle Lefebvre, Cynthia D. Franci and Philippe Lamarre, and Stephanie Petrillo.

6 References

- Alford, R.A., Richards, S.J., 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 30, 133-165
- Aravindakshan, J., Paquet, P., Gregory, M., Dufresne, J., Fournier, M., Marcogliese, D.J., Cyr, D.G., 2004. Consequences of xenoestrogen exposure on male reproductive function in spottail shiners (*Notropis hudsonius*). *Toxicol. Sci.* 78, 156-165
- Bérubé, V., 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. *Aquat. Toxicol.* 71, 109-120
- Boily, M.H., Bérubé, V.E., Spear, P.A., DeBlois, C., Dassylva, N., 2005. Hepatic retinoids of bullfrogs in relation to agricultural pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1099-1106
- Buckhart, J.G., Ankley, G., Bell, H., Carpenter, H., Fort, D., Gardiner, D., Gardner, H., Hale, R., Helgen, J.C., Jepson, P., Johnson, D., Lannoo, M., Lee, D., Lary, J., Levey, R., Magner, J., Meteyer, C., Shelby, M.D., Lucier, G., 1998. Strategies for assessing the implications of malformed frogs for environmental health. *Environ. Health Perspect.* 108, 83-90
- Buskirk, J.V., McCollum, A., 2000. Influence of tail shape on tadpole swimming performance. *J. Exp. Biol.* 203, 2149-2158
- Carey, C., Bryant, C.J., 1995. Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations. *Environ. Health Perspect.* 103, 13-17
- Chang, C.Y., Witschi, E., 1956. Genic control and hormonal reversal of sex differentiation in *Xenopus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 93, 140-144
- Coloma, L.A., 1995. Ecuadorian frogs of the genus *Colostethus* (anura: Dendrobatidae). Natural history museum, University of Kansas. 87, 1-72
- Crump, M.L., 1981. Energy accumulation and amphibian metamorphosis. *Oecologia*. 49, 167-169

- Flores-Nava, A., Vera-Munoz, P., 1999. Growth, metamorphosis and feeding behaviour of *Rana catesbeiana* Shaw 1802 tadpoles at different rearing densities. Aquaculture research. 30, 341-347
- Girish, S., Saidapur, S.K., 2000. Interrelationship between food availability, fat body, and ovarian cycles in the frog, *Rana tigrina*, with a discussion on the role of fat body in anuran reproduction. J. Exp. Zool. 286, 487-493
- Gosner, K.L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica. 16, 183-190
- Griffiths, I. 1961. The form and function of the fore-gut in anuran larvae (Amphibia, Salientia) with particular reference to the manieotto glandular. Proc. Zool. Soc. London. 137: 249-283
- Groison, V., 2000. Profil du bassin versant de la rivière Yamaska. Conseil de gestion du bassin versant de la Yamaska (COGEBY)
- Hayes, T.B., 1998. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. J Exp Zool. 281, 373-399
- 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. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 5476-5480
- 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. Environ. Health Perspect. 111, 568-575
- Howe, G.E., Gillis, R., Mowbray, R.C., 1998. Effect of chemical synergy and larval stage on the toxicity of atrazine and alachlor to amphibian larvae. Environ. Toxicol. Chem. 17, 519-525
- Jjemba, P.K., 2002. The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. Agric. Ecosyst. Environ. 93, 267-278

- Kelley, D.B., 1996. Sexual differentiation in *Xenopus laevis*. In: The biology of *Xenopus*. Edited by: HR Kobel, RC Tinsley. Zoological society of London by Clarendon Press, Oxford
- Kirk, J.J., 1988. Western spoted frog (*Rana pretiosa*) mortality following forest spraying of DDT. Herpetological review. 19, 51-53
- Kloas, W., Lutz, I., Einspanier, R., 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors : II. Estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*. Sci. Total. Environ. 225, 59-68
- Lee, L.S., Carmosini, N., Sassman, S.A., Dion, H.M., Sepulveda, M.S., 2007. Agricultural contributions of antimicrobials and hormones on soil and water quality. Advances in agronomy. 93, 1-68
- Lutz, I., Kloas, W., 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. Sci. Total Environ. 225, 49-57
- Mayer, L.P., Overstreet, S.L., Dyer, C.A., Propper, C.R., 2002. Sexually dimorphic expression of steroidogenic factor 1 (SF-1) in developing gonads of the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. General and Comparative Endocrinology. 127, 40-47
- Mayer, L.P., Dyer, C.A., Propper, C.R., 2003. Exposure to 4-tert-octylphenol accelerates sexual differentiation and disrupts expression of steroidogenic factor 1 in developing bullfrogs. Environ. Health Perspect. 111, 557-561
- MDDEP – Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs.
Last accessed September 9th 2010. Bassin versant de la rivière Yamaska (1997). URL : http://www.mddep.gouv.qc.ca/milieu_agri/pratiques-agri/yamaska/pollution.htm
- Mikamo, K., Witschi, E., 1963. Functional sex-reversal in genetic females of *Xenopus laevis*, induced by implanted testes. Genetics. 48, 1411-1421
- Morton, M.G., Dickson, K.L., Waller, W.T., Acevedo, M.F., Mayer, F.L., Ablan, M. Jr., 2000. Methodology for the evaluation of cumulative episodic exposure to chemical stressor in aquatic risk assessment. Environ. Toxicol. Chem. 19, 1213-1221

- Orton, F., Carr, J.A., Handy, R.D., 2006. Effects of nitrate and atrazine on larval development and sexual differentiation on the northern leopard frog *Rana pipiens*. Environ. Toxicol. Chem. 25, 65-71
- Ouellet, M., Bonin, M., Rodrigue, J., DesGRanges, J.L., Lair, S., 1997. Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. J. Wild. Distrib. 33, 95-104
- Pechmann, J.H.K., Wilbur, H.M., 1994. Putting declining amphibian populations in perspective: natural fluctuations and human impacts. Herpetologica. 50, 65-84
- Primeau, S., LaViolette, N., St-Onge, J., Berryman, D., 1999. Le bassin versant de la rivière Yamaska : profil géographique, sources de pollution et interventions d'assainissement section 1. In : Le bassin de la rivière Yamaska : l'état de l'écosystème aquatique. Ministère de l'environnement du Québec. Envirodoq # EN990224. Rapport # EA-14
- Sarman, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. Chemosphere. 65, 725-759
- Semlitsch, R., 1990. Effects of body size, dibship, and tail injury on the susceptibility of tadpoles to dragonfly predation. Can. J. Zool. 68, 1027-1030
- Smith-Gill, S.J., Berven, K.A., 1979. Predicting amphibian metamorphosis. Am. Nat. 113, 563-585
- Spear, P.A., Boily, M., Giroux, I., DeBlois, C., Leclair, M.H., Levasseur, M., Leclair, R., 2009. Study design, water quality, morphometric and age of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in sub-watershed of the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada. Aquat. Toxicol. 91, 110-117
- Swingle, W.W., 1926. The germ cells of anurans. II. An embryological study of sex differentiation in *Rana catesbeiana*. J. Morphol. 41, 441-546

- Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M., Cyr, D., Marcogliese, D., 2002a. Response of the amphibian tadpoles (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. Environ. Toxicol. Chem. 21, 527-531
- Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M., Cyr, D., Marcogliese, D., 2002b. Response of the amphibian tadpoles (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the ovary. Environ. Toxicol. Chem. 21, 1264-1267
- Wake, D.B., Morovitz, H.J., 1991. Declining amphibian populations : a global phenomenon? Findings and recommendations. Alytes. 9, 33-42
- Wilbur, H.M., Collins, J.P., 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. Science. 182, 1305-1314
- Witschi, E., 1931. Studies on sex differentiation and sex determination in amphibian: V. Range of cortex-medulla antagonism in parabiotic twins of Ranidae and Hylidae. J. Exp. Zool. 58, 113-145
- Wyman, R.L., 1990. What's happening to the amphibians? Conserv. Biol. 4, 350-352

7 Tables

Table 1: Sampling effort in man-hours per study site and numbers of tadpoles of each gender (undifferentiated, male, female) and sexual ratio of differentiated animals expressed as percentage of females for early-, medium- and late-stage tadpoles collected in 2008 and 2009.

Study sites	Sampling effort (man- hour)	Early tadpoles				Medium tadpoles				Late tadpoles			
		2008/2009	UD	M	F	% F	UD	M	F	% F	UD	M	F
Deb. Stairs	6/4	1	3	2	40.0	1	8	9	52.9	1	7	4	36.4
Boivin Lake	12/34	0	0	0		2	3	8	72.7*	0	0	2	100.0
Choinière res.	3/3	3	2	6	75.0	9	9	8	47.1	0	0	1	100.0
Yamaska Riv.	16/6	2	1	3	75.0	3	3	6	54.5	2	7	8	53.3
Noire Riv	2/16	0	0	2	100.0	4	4	7	58.3	1	8	7	46.7
Barbue Riv.	24/30	2	3	7	100.0	1	1	7	77.8*	3	2	1	33.3

UD: Undifferentiated tadpoles, M: Male tadpoles, F: Female tadpoles.

8 Figures

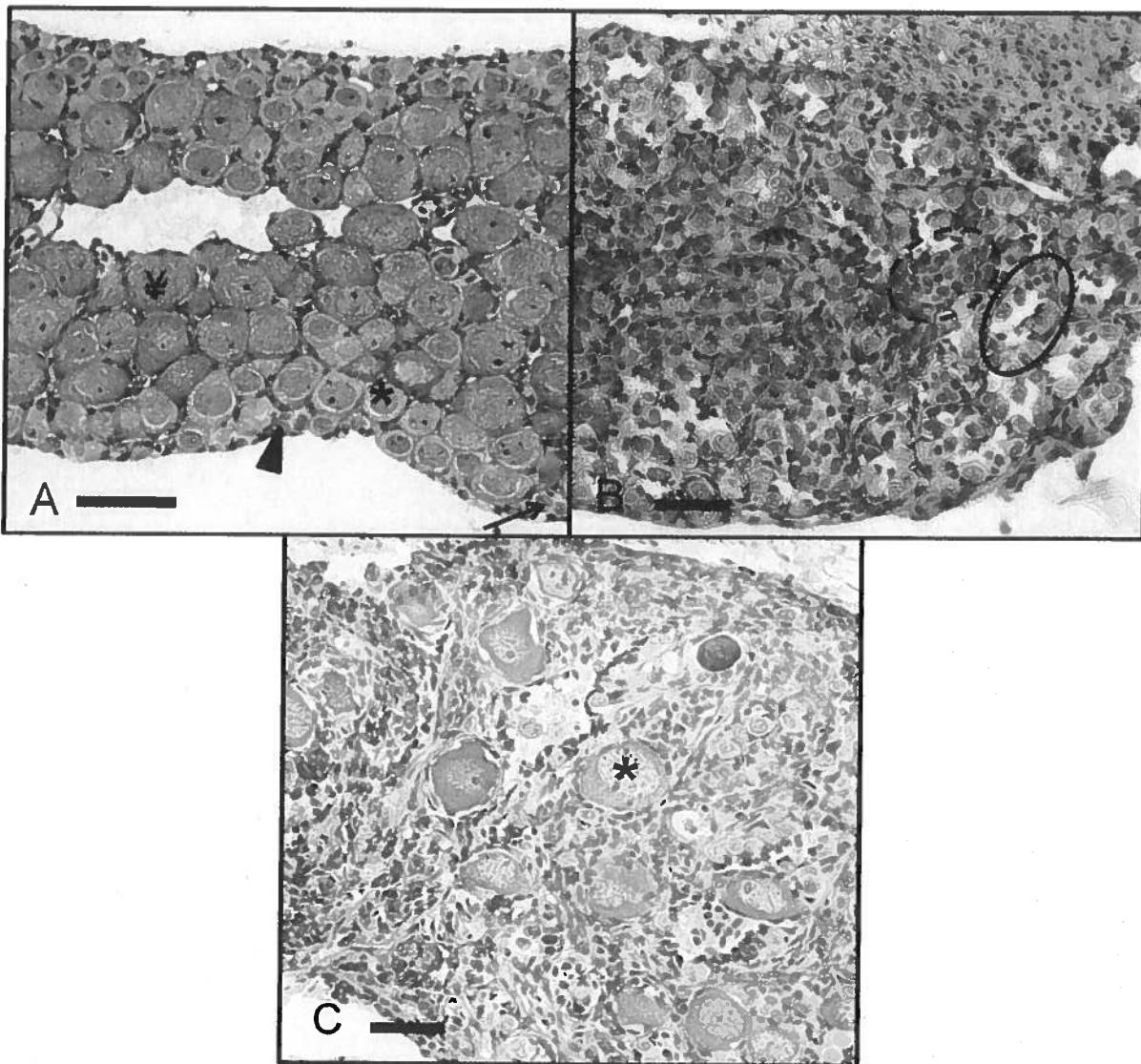


Figure 1: Gonads of (A) a normal female, (B) a normal male and (C) of a feminized male bullfrog tadpole collected, respectively, at Deborah Stairs pond, Boivin Lake and Noire River. Magnification = 200x, scale bars = 100 μm . In (A), arrow = resting primary oogonia, arrowhead = late primary oogonia, * = secondary oogonia and ¥ = oocyte stage I. In (B), circle = spermatogonial cysts, dotted circle = spermatocyte cyst. In (C), * = oocytes in a testis

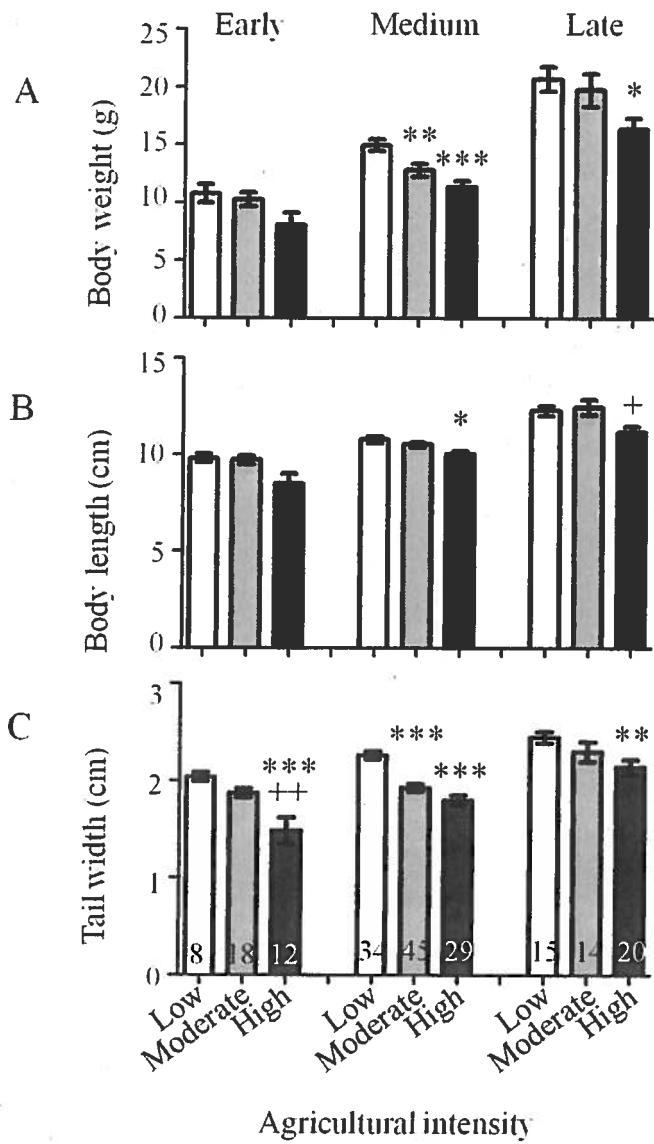


Figure 2: Mean (A) body weight, (B) body length and (C) tail width \pm standard error (SE) in early-, medium- and late-stage tadpoles that were collected at sites of low, moderate or high agricultural intensity. Numbers in figure C are sample numbers (applicable for A, B and C). Columns labelled with an asterisk are different from sites of low agricultural intensity and columns labelled with a + are significantly different from sites of moderate agricultural intensity. One, 2 or 3 symbols represents $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, or $p \leq 0.001$, respectively.

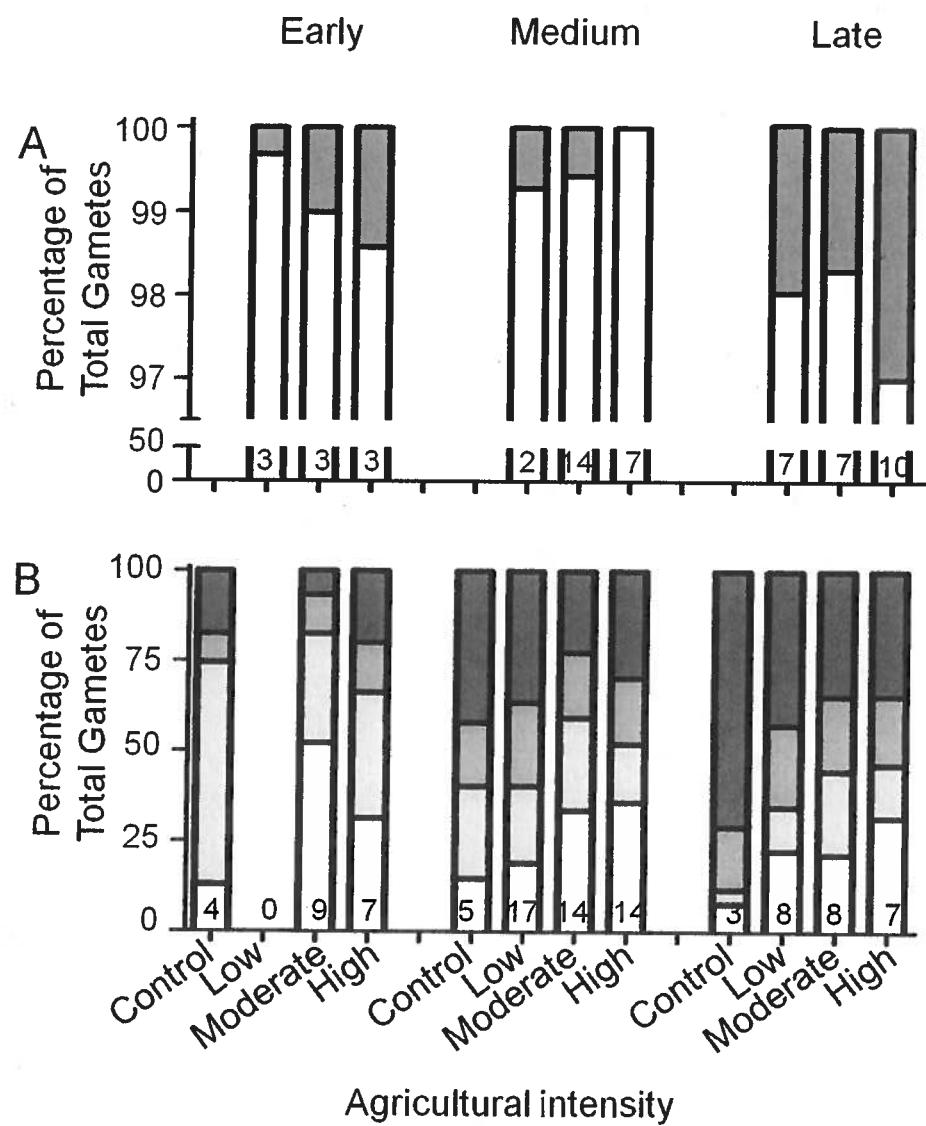


Figure 3: Percentage of gametes of each type in early-, medium- and late-stage (A) male or (B) female tadpoles that were captured at sites of low, medium or high agricultural intensity. Female tadpoles (B) were also compared to captive tadpoles. Male gametes were classified as cysts of spermatogonia (Sg, white area) or spermatocytes (Sc, grey area), while female gametes were classified as resting or late primary oogonia (RPOg, white area or LPOg, light grey area), secondary oogonia (SOg, medium grey area) or stage I oocytes (Oci, dark area). Numbers in figure C are sample numbers (applicable for A, B and C).

Chapitre 4 – Discussion et perspectives

L'agriculture intensive et la destruction des habitats qui lui est associée sont parmi les nombreux facteurs responsables des anomalies observées chez les amphibiens et de leur déclin (Coloma, 1995; Alford et Richards, 1999). Bien que controversées (section 3.2), de nombreuses études ont tenté de montrer les effets de la contamination agricole sur les amphibiens. D'une part, certaines études montrent que les pesticides retrouvés fréquemment dans les eaux de surface sont sans effet (Solomon *et al.*, 1996). D'autre part, de nombreuses études montrent que de faibles concentrations sont néfastes sur divers systèmes, voire pour la survie des amphibiens (Marian *et al.*, 1983; Shoemaker *et al.*, 1992; Ouellet *et al.*, 1997; Burkhart *et al.*, 1998; Howe *et al.*, 1998; Rice *et al.*, 1999; Allran et Karasov, 2001; Tavera-Mendoza *et al.*, 2002a et 2002b; Hayes *et al.*, 2002 et 2003).

L'objectif de ce projet de recherche était de corrélérer les effets de l'intensité de l'activité agricole sur le développement et l'intégrité du système reproducteur des populations de ouaouaron dans le bassin versant de la rivière Yamaska. À cette fin, des ouaouarons adultes et têtards ont été capturés à plusieurs des sites de reproduction dans le bassin versant de la rivière Yamaska. Ces sites sont situés dans des régions présentant une contamination agricole d'intensité variant de faible ($\leq 19\%$), à modérée (20-50 %) à élevée ($\geq 60\%$), selon le pourcentage de terre en culture autour du plan d'eau. Les mesures morphométriques et les organes du système reproducteur ont été prélevés sur chaque animal. Les gonades ont été évaluées en histologie afin de déterminer leur développement et leur intégrité.

Plusieurs facteurs ont affecté les résultats de l'étude, notamment le simple fait qu'il s'agisse d'une étude terrain et non d'une étude laboratoire. D'abord, une petite quantité d'animaux ont été récoltés à chaque site, afin d'éviter la surexploitation, puisque les animaux ont été récoltés au sein de populations

sauvages limitées. Contrairement à une étude laboratoire, la plupart des paramètres ne peuvent pas être contrôlés lors d'une étude terrain. À titre d'exemple, les sites d'échantillonnage ne sont pas homogènes entre eux, ni au niveau de leur patron agricole, ni au niveau du climat et des ressources alimentaires disponibles. En effet, les précipitations et le niveau d'eau a présenté des variations importantes entre les sites d'échantillonnage et les années, ce qui a nécessairement influencé la concentration des contaminants de façon ponctuelle ou plus durable. Les variations dans le niveau d'eau ont également influencé l'effort requis pour la capture des animaux. À titre d'exemple, la capture des têtards du lac Boivin a été un échec complet en 2009, résultant d'un niveau d'eau d'environ 35 cm au dessus de la normale. Ensuite, les ressources alimentaires, les populations prédatrices et la diversité des patrons génétiques sont différentes entre les sites et ont pu contribuer à modifier la constitution, les chances de survie et le potentiel reproducteur des populations de ouaouaron.

La capture d'adulte au site rivière à la Barbue a été un échec complet de 2007 à 2009 et la capture de têtards a été peu fructueuse, avec seulement 8 animaux capturés en 2009. Aussi, les animaux récoltés à ce site présentent des mesures morphométriques inférieures à celles des animaux récoltés aux sites référence. Spear et collaborateurs (2009) ont suggéré cinq hypothèses pour expliquer le déclin au site rivière à la Barbue, soit (1) les mâles de plus grande taille fuient le site rivière à la Barbue, (2) la population du site rivière à la Barbue est instable parce qu'elle est maintenue par des mâles plus jeunes ou de plus petite taille, (3) les mâles de plus grande taille ont un plus faible taux de survie ou (4) de croissance au site rivière à la Barbue et (5) il existe une différence génétique importante entre les mâles du sites rivière à la Barbue et les mâles des autres sites d'échantillonnage. Dans le cadre de l'étude présente, les hypothèses retenues sont spécialement celles impliquant la faible constitution des mâles au site rivière à la Barbue, puisque les mesures morphométriques des individus de ce site sont significativement inférieures, en comparaison aux sites de référence. En effet, en milieu à contamination agricole élevée, les mâles de forte taille

peuvent être moins nombreux, résultant d'une population maintenue par des mâles de petite taille et le taux de survie de tous les individus peut être compromis. Les résultats ne sont pas assez nombreux pour qu'une hypothèse ne se démarque, toutefois les tendances pointent vers une mauvaise fertilité des mâles.

Il a également été suggéré par Crump (1981) que des adultes de petite taille sont le résultat d'un faible taux de croissance et d'une faible quantité d'énergie stockée durant le stage larvaire. En effet, les têtards des sites à intensité agricole modérée et élevée ont montré des mesures morphométriques inférieures à celles des têtards des sites référence. Cette différence est souvent significative, spécialement chez les têtards des sites à intensité agricole élevée, suggérant que ces animaux ont une capacité de stockage d'énergie réduite, des comportements d'alimentation défaillants ou un taux de croissance réduit. La taille corporelle et de la queue des têtards peut être directement associée à la quantité d'énergie stockée (Crump, 1981) et est connue pour être un paramètre important dans l'induction de la métamorphose, à même titre que le taux de croissance et de différenciation (Wilbur et Collins, 1973; Smith-Gill et Berven, 1979). La taille des têtards à la métamorphose peut influencer leurs chances de survie et leur potentiel durant la phase adulte. En effet, l'énergie stockée est nécessaire pour traverser la phase d'anorexie de la métamorphose et pour compenser la grande quantité d'énergie requise par la métamorphose (Griffiths, 1961). Il a aussi été suggéré que les têtards présentant des mesures morphométriques inférieures sont plus susceptibles à la prédation (Semlitsch, 1990) et sont moins performants en nage (Buskirk et McCollum, 2000). Les résultats de l'étude suggèrent que les têtards des sites à intensité agricole élevée ont un net désavantage au niveau des chances de survie par rapport aux têtards des sites référence.

Dans la littérature, il est suggéré que la différenciation sexuelle des têtards se déroule entre les stades 33 et 36, c'est-à-dire durant la période de têtard médian

(Witschi, 1931; Mayer et al., 2002). Aussi, durant le développement des têtards, il est difficile de distinguer les têtards mâles des têtards indifférenciés avant le stade 35 (Swingle, 1926). Les femelles, quant à elles, présentent une cavité ovarienne qui permet de les différencier plus tôt. Par contre, les résultats de l'étude sont contradictoires à la littérature, puisque la plupart des têtards précoces capturés étaient déjà différenciés et plusieurs têtards avancés étaient toujours indifférenciés, bien qu'ils aient atteint le stade 36. Aussi, les têtards des sites à intensité agricole élevée présentent une différenciation sexuelle retardée plus souvent que les têtards des sites référence. Il est connu que l'exposition à des perturbateurs endocriniens peut modifier ou retarder la différenciation sexuelle. En effet, il a été montré par Mayer et collaborateurs (2003) que l'exposition à l'octylphénol accélère la différenciation sexuelle, alors qu'Orton et collaborateurs (2006) ont montré que l'exposition à l'atrazine ou aux nitrates cause une différenciation sexuelle prématuée et altère les ratios sexuels. Aussi, la différenciation sexuelle peut artificiellement être influencée vers un genre ou vers un autre. En effet, des têtards exposés à l'oestradiol durant le développement se différencient en femelles fertiles (Chang et Witschi, 1956), tandis que ceux exposés à un greffon testiculaire se différencient en mâles fertiles (Mikamo et Witschi, 1963). Étant donné la nature de la contamination dans le bassin versant de la rivière Yamaska, il est très probable que la différenciation sexuelle des têtards s'effectue sur un plus large rang de stades et que les ratios sexuels soient débalancés, résultant de l'exposition à des perturbateurs endocriniens et aux autres contaminants retrouvés dans le ruissellement agricole.

L'évaluation histopathologique des gonades a montré que les mâles adultes des sites à intensité agricole élevée ont une incidence de dégénérescence testiculaire précoce et avancée significativement supérieure en comparaison aux mâles des sites de référence. D'autres études ont montré que la dégénérescence testiculaire, de même que la diminution du niveau de testostérone et la perte de la fonction reproductive peuvent être induits en

immunisant des taureaux (Cook *et al.*, 2000), rats (McLachlan *et al.*, 1995) et étalons (Turkstra *et al.*, 2005) contre la gonadolibérine.

Durant le développement normal, des kystes de cellules germinales croissent le long de la paroi du lobule, puis évoluent en kystes de spermatogonies, indiquant le début d'un cycle de spermatogénèse. Aussi, Saidapur et collaborateurs (1981) ont montré que les stades précoce de la spermatogénèse sont dépendants des androgènes chez la grenouille indienne sauteuse (*Rana cyanophlyctis*) et chez les rongeurs (Sharpe *et al.*, 1992, Gendt *et al.*, 2004). La diminution du nombre de kystes de spermatogonies le long de la paroi du lobule aux sites réservoir Choinière et rivière Noire, présentant respectivement une intensité agricole modérée et élevée, pourrait être liée à un trouble de la régulation des androgènes ou à l'exposition à des substances anti-androgéniques.

L'histopathologie des gonades a également montré plusieurs ovocytes dans les testicules des mâles des sites à intensité agricole élevée, bien que l'incidence ne soit pas suffisante pour effectuer des analyses statistiques. Il a été montré que l'intersexualité et le développement d'ovocytes testiculaires peuvent être causés par l'exposition de Queue à tache noire (*Notropis hudsonius*) mâles à des xénoestrogènes retrouvés dans le fleuve St-Laurent (Aravindakshan *et al.*, 2004). Ceci est supporté par une autre étude montrant que l'exposition d'amphibiens à l'atrazine et aux nitrates retrouvés dans la contamination agricole cause des ovocytes testiculaires (Orton *et al.*, 2006). Ces études suggèrent que les animaux des sites à intensité agricole élevée sont exposés à des xénoestrogènes ou à des substances favorisant l'expression des estrogènes, tels des inducteurs de l'aromatase (CYP), l'enzyme responsable de la transformation des androgènes en œstrogènes. Globalement, l'évaluation histopathologique des gonades suggère des troubles de l'intégrité du système reproducteur causé par des perturbateurs endocriniens, notamment des xénoestrogènes.

L'étude a permis de déterminer les nombreux effets néfastes de la contamination agricole sur le développement et l'intégrité du système reproducteur des ouaouarons. Toutefois, étant donné ses limites, l'étude terrain ne permet pas de déterminer les mécanismes d'action spécifiques de la contamination à chaque site d'échantillonnage. Des études plus approfondie et plus détaillée ainsi qu'un suivi continual de la qualité d'eau des sites d'échantillonnage permettraient de mieux comprendre les différents facteurs et conditions spécifiques causant les effets néfastes.

Dans des conditions idéales, le suivi de la qualité de l'eau impliquerait l'analyse hebdomadaire des conditions physico-chimiques et des contaminants d'intérêt, ainsi que le suivi des fermes avoisinantes. L'analyse de ces informations par rapport aux conditions météorologiques permettrait de connaître spécifiquement la quantité appliquée ou ruisselée de chaque contaminant. Puis, en comparant avec l'analyse hebdomadaire des contaminants d'intérêt, l'exposition des animaux aux contaminants pourrait être approximée plus spécifiquement que dans l'étude présente (i.e. intensité agricole faible, modérée ou élevée).

Dans l'étude présente, le maintien de têtards en captivité s'est avéré un bon outil pour observer leur développement normal dans un milieu sain. L'exposition de tels têtards à des mélanges de pesticides ou même à des échantillons de l'eau des sites d'échantillonnage pourrait s'avérer utile pour déterminer quels contaminants dans le cocktail environnemental sont responsables des effets observés. Bien entendu ces substances devraient être exclues des prochaines générations de pesticides et engrais.

Bibliographie

- Alford, R.A., Richards, S.J., 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. Annual review of ecology and systematics. 30: 133-165
- Allran, J.H., Karasov, W.H., 2001. Effects of atrazine on embryos, larvae, and adults of anuran amphibians. Environ. Toxicol. Chem. 20: 769-775
- Aravindakshan, J., Paquet, P., Gregory, M., Dufresne, J., Fournier, M., Marcogliese, D.J., Cyr, D.G., 2004. Consequences of xenoestrogen exposure on male reproductive function in spottail shiners (*Notropis hudsonius*). Toxicol. Sci. 78: 156-165
- Barr, W.A., 1968. Patterns of ovarian activity. Dans: Perspectives in endocrinology : Hormones in the lives of lower vertebrates. Par: Barrington, E.J.W., Jorgensen, C.B., Academic Press. New York. 164-238
- Bern, H.A., 1992. The fragile fetus. Dans : Chemically-induced alternations in sexual and functional development : the wildlife/human connections. Par: Colborn, T., Clements, C., Princeton scientific publishing Co. Inc. Princeton. NJ. 9-15
- 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 pages
- Bérubé, V.E., Boily, M.H., DeBlois, C., Dassylva, N., Spear, P.A., 2005. Plasma retinoids profile in bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural intensity of sub-watershed in the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada. Aquatic. Tox. 71: 109-120
- Biodidac. 1999a. Urogenital system of a male frog. Page consultée le 14 septembre 2010. URL :
http://biodidac.bio.uottawa.ca/thumbnails/filedet.htm?File_name=amph097b&File_type=gif

Biodidac. 1999b. Urigenital system of a female frog. Page consultée le 14 septembre 2010. URL :

http://biodidac.bio.uottawa.ca/thumbnails/filedet.htm?File_name=Amph098b&File_type=gif

Blaustein, A.R., 1994. Chicken little or Nero's fiddle? A perspective on declining amphibian populations. *Herpetologica*. 50: 85-97

Blaustein, A.R., Hoffman, P.D., Hokit, D.G., Kiesecker, J.M., Walls, S.C., Hays, J.B., 1994a. UV repair and resistance to solar UV-B in amphibian eggs: a link to population declines? *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 1791-1795

Blaustein, A.R., Wake, D.B., Sousa, W.P., 1994b. Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conserv. Biol.* 8: 60-71

Blaustein, A.R., Edmond, B., Kiesecker, J.M., Beatty, J.J., Hokit, D.G., 1995. Ambient ultraviolet radiation causes mortality in salamander eggs. *Ecol. Applica.* 5: 740-743

Blaustein, A.R., Hoffman, P.D., Kiesecker, J.M., Hays, J.B., 1996. DNA repair activity and resistance to solar UV-B radiation in eggs of the red-legged frog. *Conserv. Biol.* 10: 1398-1402

Browder, L.W., Erickson, C.A., Jeffery, W.R., 1991. Oogenesis. Dans: *Developmental Biology*, 3rd ed. Saunders College Publishing, USA. 55-115

Brown, D. D., Wang, Z., Furlow, J. D., Kanamori, A., Schwartzman, R. A., Remo, B. F., Pinder, A., 1996. The thyroid hormone-induced tail resorption program during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:1924-1929

Burkhart, J.G., Helgen, J.C., Fort, D.J., Gallagher, K., Bowers, D., Propst, T.L., Gernes, M., Magner, J., Shelby, M.D., Lucier, G., 1998. Induction of mortality and malformation in *Xenopus laevis* embryos by water sources associated with field frog deformities. *Environ. Health Perspect.* 106: 841-848

- Burnette, W.N., 1981. «Western blotting»: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analyt. Biochem.* 112: 195-203
- Buskirk, J.V., McCollum, A., 2000. Influence of tail shape on tadpole swimming performance. *J. Exp. Biol.* 203:2149-2158
- Carey C., Bryant, C.J., 1995. Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations. *Environ. Health Perspect.* 103: 13-17
- Centre d'interprétation de la nature du lac Boivin (CINLB). 2005. Le Marais. Page consultée le 14 septembre 2010. URL :
<http://darwin.cyberscol.qc.ca/Centre/CINLB/marais/Accueil.html>
- Chang, C.Y., Witschi, E., 1956. Genic control and hormonal reversal of sex differentiation in *Xenopus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 93:140-144
- Cistude Nature. 2005a. Carte de répartition de la représentation de la grenouille taureau dans le monde. Page consultée le 14 septembre 2010. URL :
<http://www.grenouilletaureau.net/>
- Cistude Nature. 2005b. Grenouille taureau : cycle biologique. Page consultée le 14 septembre 2010. URL : <http://www.grenouilletaureau.net/>
- Clements, M.J., Lofthouse, R., Tata, R.J., 1975. Sequential changes in the protein synthetic activity of male *Xenopus laevis* liver following induction of egg-yolk proteins by estradiol-17 beta. *J. Biol. Chem.* 250: 2213-2218
- Colborn, T., Jumanoski, D., Myers, J.P., 1996. Our stolen future, are we threatening our fertility, intelligence & survival : a scientific detective story. Dutton. New York
- Coloma, L.A., 1995. Ecuadorian frogs of the genus *Colostethus* (anura : Dendrobatidae). Natural history museum, University of Kansas. 87: 1-72
- Conseil canadien des ministres de l'environnement (CCME). 2002. Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life. Page consultée le 10 mai 2009. URL : <http://www.ccme.ca/sourcetotap/atrazine.html>

- Cook, R.B., Popp, J.P., Kastelic, J.P., Robbins, S., Harland, R., 2000. The effects of active immunization against gnRH on testicular development, feedlot performance, and carcass characteristics of beef bulls. *J. Anim. Sci.* 78, 2778-2783
- Corn, P.S., Fogleman, J.C., 1984. Extinction of montane populations of the northern leopard frog (*Rana pipiens*) in Colorado. *Journal of herpetology*. 18: 147-152
- Crain, D.A., Guillette, L.J., Rooney, A.A., Pickford, D.B., 1997. Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligato mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environmental health perspectives*. 105: 528-533
- Crump, M.L., 1981. Energy accumulation and amphibian metamorphosis. *Oecologia*. 49: 167-169
- Crump, M.L., Hensley, F.R., Clark, K.L., 1992. Apparent decline of the golden toad: underground or extinct? *Copeia*. 1992: 413-420
- Davis, D.L., Bradlow, H.L., Wolff, M., Woodruff, T. 1993. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ. Health Perspect.* 101: 372-377
- Deal, L.M., Hess, F.D., 1980. An analysis of the growth inhibitory characteristics of alachlor and metolachlor. *Weed Sci* 28: 168-175
- Denver, R.J., 1997. Environmental stress as a developmental cue: corticotropin-releasing hormone is a proximate mediator of adaptive phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Hormones and behavior*. 31: 169-17
- Dodd, M.H.I., Dodd, J.M., 1976. The biology of metamorphosis. Dans: *Physiology of the amphibian*. Par: B Lofts. Academic Press. New York. 467-599
- Drost, C.A., Fellers, G.M., 1996. Collapse of a regional frog fauna in the Yosemite area of the California Sierra Nevada, USA. *Conservation biology*. 10: 414-425
- Duellman, W.E., Trueb, L., 1986. *Biology of amphibian*. McGraw-Hill. New York.

- Dunson, W.A., Wyman, R.L., Corbett, E.S., 1992. A symposium on amphibian declines and habitat acidification. *J. Herpet.* 26: 349-352
- Elicieri, B.P., Brown, D.D., 1994. Quantification of endogenous thyroid hormone receptors and during embryogenesis and metamorphosis in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 269: 24459-24465
- Environnement Canada. 2010. Les masses d'eau du Saint-Laurent. Page consultée le 14 septembre 2010. URL :
http://www.mddep.gouv.qc.ca/milieu_agri/pratiques-agri/yamaska/pollution.htm
- Facemire, C.F., Gross, T.S., Guillette Jr, L.J., 1995. Reproductive impairment in the Florida panther : nature or nurture? *Environ. Health Perspect.* 103: 79-86
- Feller, G.M., Drost, C.A., 1993. Disappearance of the cascades frog *Rana cascadae* at the southern end of its range, California, USA. *Biol. Conserv.* 65: 177-181
- Fisher, R.N., Shaffer, H.B., 1996. The decline of amphibians in California's Great Central Valley. *Conserv. Biol.* 10: 1387-1397
- Franchi, L.L., Mandl, A.M., Zuckerman, S. 1962. The development of the ovary and the process of oogenesis. Dans: The ovary. Par: Zuckerman, S. Academic Press. Londres. 1-88
- Gallien, L., 1940. Recherches sur la physiologie hypophysaire dans ses relations avec les gonades et le cycle sexuel, chez la grenouille rousse *Rana temporaria* L. *Bull. Biol. Fr. Belg.* 74: 1-42
- Galton, V.A., 1992. The role of thyroid hormone in amphibian metamorphosis. *Trends. Endocrinol. Metabol.* 3: 96-100
- Gamradt, S.C., Kats, L.B., 1996. Effect of introduced crayfish and mosquitofish on California newts. *Conserv. Biol.* 10: 1155-1162

- Gendt, K. de, Swinnen, J.V., Sauders, P.T.K., Schoonjans, L., Dewerchin, M., Devos, A., Tan, K., Atanassova, N., Claessens, F., Lécureuil, C., Heyns, W., Carmeliet, P., Guillou, F., Sharpe, R.M., Verhoeven, G., 2004. A sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 1327-1332
- Giroux, I., 2002. Contamination de l'eau par les pesticides dans les régions de culture de maïs et de soya au Québec: résultats des campagnes d'échantillonnage 1999, 2000 et 2001, et évolution temporelle de 1992 à 2001. Ministère de l'Environnement du Québec, envirodoq n° ENV20020365, rapport no. QE-137.
- Gosner, K.L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica. 16: 183-190
- Griffiths, I., 1961. The form and function of the fore-gut in anuran larvae (*Amphibia, salientia*) with particular reference to the manicotto glandulare. Proc Zool Soc London 137: 249-283
- Groison, V., 2000. Profil du bassin versant de la rivière Yamaska. Conseil de gestion du bassin versant de la Yamaska (COGEBY), 159 pages
- Hayashi, T., Hanaoka, Y., Hayashi, H., 1992a. The complete amino acid sequence of the follitropin β -subunit of the bullfrog *Rana catesbeiana*. Gen. Comp. Endocrinol. 88: 144-150
- Hayashi, H., Hayashi, T., Hanaoka, Y., 1992b. Amphibian lutropin and follitropin from the bullfrog (*Rana catesbeiana*). Eur. J. Biochem. 203: 185-201
- Hayashi H, Hayashi, T., Hanaoka, Y., 1992c. Amphibian lutropin from the bullfrog *Rana catesbeiana* complete amino acid sequence of the β -subunit. Eur. J. Biochem. 205: 105-110
- Hayes, T.B., 1998. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: Genetic and developmental mechanisms. J. Exp. Biol. 281: 373-399

- Hayes, M.P., Jennings, M.R., 1986. Decline of ranid frog species in western north america: are bullfrogs (*Rana catesbeiana*) responsible? Journal of herpetology. 20: 490-509
- 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. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 99: 5476-5480
- Hayes, T., Hatsoon, K., Tsui, M., Hoang, A., Haefelle, C., Vonk, A., 2003. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*) Laboratory and field evidence. Environ. health perspect. 111: 568-575
- Heyer, W.R., Rand, A.S., da Cruz, C.A.G., Peixoto, O.L., 1988. Decimations, extinctions, and colonizations of frog populations in southeast Brazil and their evolutionary implications. Biotropica. 20: 230-235
- Hill, R., 1937. Oxygen evolution by isolated chloroplasts. Nature. 139S: 881-882
- Hirshfield, A.N., Midgley, A.R., 1978. The role of FSH in the selection of large ovarian follicles in the rat. Biol. Reprod. 19: 606-611
- Howe, G.E., Gillig, R., Mowbray, R.C., 1998. Effect of chemical synergy and larval stage on the toxicity of atrazine and alachlor to amphibian larvae. Environ. Toxicol. Chem. 17: 519-525
- Hussein, S.Y., El-Nasser, M.A., Ahmed, S.M., 1996. Comparative studies on the effects of herbicide atrazine on freshwater fish *Oreochromisniloticus* and *Chrysichthyes auratus* at Assiut, Egypt. Bull Environ Contam Toxicol 57:503-510
- Iwasawa, H., Yamaguchi, K., 1984. Ultrastructure study of gonadal development in *Xenopus laevis*. J. Neurochem. 38: 657-661
- Jennings, W.B., Bradford, D.F., Johnson, D.F., 1992. Dependence of the garter snake *Thamnophis elegans* on amphibians in the Sierra Nevada of California. J, Herpet. 26: 503-505
- John, K.R., Fenster, D., 1975. The effects of partitions on the growth rates of crowded *Rana pipiens* tadpoles. Am Midl Nat. 93: 123-130

- Johnson, D.A., Gautsch, J.W., Sportsman, J.R., Elder, J.H., 1984. Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Analysis techniques* 1: 3-8
- Kanamori, A., Brown, D. D., 1992. The regulation of thyroid hormone receptor beta genes by thyroid hormone in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 267:739-745
- Kelley, D.B., 1996. Sexual differentiation in *Xenopus laevis*. Dans: The biology of *Xenopus*. Par: Kobel, H.R., Tinsley, R.C., Clarendon Press, Oxford
- Kent, R.A., Pauli, B.D., Trotter, D.M., Gareau, J., 1991. Canadian water quality guidelines for metolachlor. Department of the Environment, Inland Waters Directorate Scientific Series Publ. No. 184, 34+ pp, Ottawa, ON, Canada, K1A 0H3 (ISBN 0 662-18724-5)
- Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R., 1995. Synergism between UV-B radiation and a pathogen magnifies amphibian embryo mortality in nature. *Proc. Nat. Acad. S. U.S.A.* 92: 11049-11052
- Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R., 1997. Influences of egg laying behavior on pathogenic infection of amphibian eggs. *Conserv. Biol.* 11: 214-220
- Kime, D.E., 1998. Endocrine disruption in fish. Kluwer Academic Publisher. POB 322 3300 AH Dordrecht The Netherlands. 416
- Kirk, J.J., 1988. Western spotted frog (*Rana pretiosa*) mortality following forest spraying of DDT. *Herpetol. Rev.* 19: 51-53
- Kloas, W., Lutz, I., Einspanier, R., 1999. Amphibians as a model to study disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*. *Sci. Total. Environ.* 225: 59-68
- Knuesli, E., 1970. History of the development of triazine herbicide. *Residue Rev.* 32: 1-9
- Kupferberg, S.J., 1993. Bullfrogs (*Rana catesbeiana*) invade a northern California river: a plague or species coexistence? *Bulletin of the Ecological Society of America. Froglog.* 7: 319-320

- Laurence, W.F., McDonald, K.R., Speare, R., 1996. Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rain forest frogs. *Conserv. Biol.* 10: 406-413
- Leloup, J., Buscaglia, M., 1977. La triiodothyronine, hormone de la métamorphose des amphibiens. *CR. Acad. Sci. Paris.* 284D : 2261-2263
- Licht, L.E., 1967. Growth inhibition in crowded tadpoles: intraspecific and interspecific effects. *Ecology* 48: 736 745
- Licht, P., Papkoff, H., 1974. Separation of two distinct gonadotropins from the pituitary gland of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Endocrinology.* 94: 1587-1594
- Licht, P., McCreery, B.R., Barnes, R., Pang, R., 1983. Seasonal and stress related changes in plasma gonadotropins, sex steroids, and corticosterone in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50: 124-145
- Lillie, R.D., Pizzolato, P., Donaldson, P.T., 1976. Nuclear stains with soluble metachrome mordant lake dyes. The effect of chemical endgroup blocking reactions and the artificial introduction of acid groups into tissues. *Histochemistry.* 49: 23-25
- Llewellyn, B.D., 2009. Nuclear staining with alum-hematoxylin. *Biotech. Histochem.* 84: 159-177
- Lofts, B., 1961. The effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on the testis of hypophysectomized frogs (*Rana temporaria*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 1: 179-189
- Lofts, B., 1964. Seasonal changes in the functional activity of the interstitial and spermatogenic tissues of green frog *Rana esculenta*. *Gen Comp. Endocrinol.* 4:550-621
- Lofts, B., 1974. *Physiology of the amphibian. Volume II.* Academic Press of New York and London
- Luna, L.G., 1968. *Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, New York: McGraw-Hill

- Lutz, I., Kloas, W., 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors :
I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *Sci. Total Environ.* 225: 49-57
- Maguire, R.J., Tkacz, R.J., 1993. Occurrence of pesticides in the Yamaska River, Québec. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25: 220-226
- Marian, M.P., Arul, V., Pandian, T.J., 1983. Acute and chronic effects of carbaryl on survival, growth, and metamorphosis in the bullfrog (*Rana tigrina*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12: 271-275
- Mayer, L.P., Overstreet, S.L., Dyer, C.A., Propper, C.R., 2002. Sexually dimorphic expression of steroidogenic factor 1 (SF-1) in developing gonads of the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 127: 40-47
- Mayer, L.P., Dyer, C.A., Propper, C.R., 2003. Exposure to 4-tert-octylphenol accelerates sexual differentiation and disrupts expression of steroidogenic factor 1 in developing bullfrogs. *Environ. Health Perspect.* 111:557-561
- McDiarmid, R.W., 1992. Standards methods for measuring and monitoring biological diversity of amphibians. *Occ Pap Canadian Wildl Serv* 76: 80-82
- McLachlan, R.O., Wreford, N.G., Krester, D.M. de, Robertson, D.M., 1995. The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized adult rat. *Endocrinology.* 136, 4035-4043
- Mikamo, K., Witschi, E., 1963. Functional sex-reversal in genetic females of *Xenopus laevis*, induced by implanted testes. *Genetics.* 48: 1411-1421
- Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs (MDDEP). 1997. Bassin versant de la rivière Yamaska. Page consultée le 14 septembre 2010. URL :
http://www.mddep.gouv.qc.ca/milieu_agri/pratiques-agri/yamaska/pollution.htm

- Mosconi, G., Carnevali, O., Franzoni, M.F., Cottone, E., Lutz, I., Kloas, W., Yamamoto, K., Kikuyama, S., Polzonetti-Magni, A.M., 2002. Environmental estrogens and reproductive biology in amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.* 126, 125-129
- Orton, F., Carr, J.A., Handy, R.D., 2006. Effects of nitrate and atrazine on larval development and sexual differentiation on the northern leopard frog *Rana pipiens*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 65-71
- Ouellet, M., Bonin, J., Rodrigue, J., DesGranges, J.L., Lair, S., 1997. Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *J. Wildl. Dis.* 33: 95-104
- Packard, M.J., Seymour, R.S., 1997. Evolution of the amniotic egg. Dans : Amniote Origins: Completing the Transition to Land. Par: Sumida, S.S., Martin, K.L.M. Londres. Academic Press. 265-290
- Paniagua, R., Fraile, B., Saez, F.J., 1990. Effects of photoperiod and temperature on testicular function in amphibians. *Histol Histopathol* 5:365-378
- Pechmann, J.H.K., Wilbur, H.M., 1994. Putting declining amphibian populations in perspective: natural fluctuations and human impacts. *Herpetologica*. 50: 65-84
- Perlman, A.J., Wolffe, A.P., Champion, J., Tata, J.R. 1984. Regulation by estrogen receptor of vitellogenin gene transcription in *Xenopus* hepatocyte cultures. *Mol Cell Endocrinol.* 38: 151-161
- Polzonetti-Magni, A.M., Mosconi, G., Carnevali, O., Yamamoto, K., Hanaka, Y., Kikuyama, S., 1998. Gonadotropins and reproductive function in the anuram amphibian, *Rana esculenta*. *Biology of reproduction*. 58: 88-93
- Pounds, J.A., Crump, M.L., 1994. Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation biology*. 8: 72-85
- Prasad, T.A.V., Srinivas, T., Rafi, G.M., Reddy, D.C., 1991. Effect *in vivo* of atrazine on hematology and oxygen consumption in fish, *Tilapia mossambica*. *Biochem. Int.* 23: 157-162

- 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, section 1. Dans: Le bassin de la rivière Yamaska: l'état de l'écosystème aquatique, ministère de l'Environnement du Québec, envirodoq no EN990224, rapport no. EA-14
- Pudney, J., 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc. Res. Tech.* 32: 459-497
- Rastogi, R.K., Iela, L., 1980. Steroidogenesis and spermatogenesis in anuran amphibia: a brief survey. Dans: *Steroids and Their Mechanism of Action in Nonmammalian Vertebrates*. Par: Delrio, G., Brachet, J., New York Raven Press. 131-146
- Réseau Canadien de conservation des amphibiens et des reptiles (RECCAR). 2010. Amphibiens en diminution Page consultée le 14 septembre 2010.
URL : <http://www.carcnet.ca/francais/amphibiens/amphibissuesfr.php>
- Rice, T.M., Blackstone, B.J., Nixdorf, W.L., Taylor, D.H., 1999. Exposure to lead induces hypoxia-like responses in bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*). *Environ Toxicol Chem* 18:2283-2288
- Risch, S.J., 1963. Intercropping as cultural pest control: prospects and limitations. *Environmental managements*. 7: 9-14
- Safe, S., 2005. Clinical correlates of environmental endocrine disruptors. *Trends Endocrinol. Metabol.* 16: 139-144
- Saidapur, S.K., Yajurvedi, H.N., Hooli, M.A., 1981. The effect of cyproterone acetate on spermatogenesis and thumb pads of the skipper frog, *Rana cyanophlyctis* (Schn.). *Experientia*. 37: 1162-1163
- Sanderson, J.T., Seinen, W., Giesy, J.P., Berg, M. van den., 2000. 2-chloro-s-triazine herbicide induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? *Toxicol. Sci.* 54: 121-127
- Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H., Vennstrom, B., 1986. The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature*. 324: 635-640

- Seale, D.B., 1980. Influence of amphibian larvae on primary production, nutrient flux, and competition in a pond ecosystem. *Ecology*. 61: 1531-1550
- Semenza, J.C., Tolbert, P.E., Rubin, C.H., Guillette, Jr L.J., Jackson, R.J., 1997. Reproductive toxins and alligator abnormalities at Lake Apopka, Florida. *Environ. Health Perspect.* 105: 1030-1032
- Semlitsch, R., 1990. Effects of body size, diet, and tail injury on the susceptibility of tadpoles to dragonfly predation. *Can. J. Zool.* 68: 1027-1030
- Sharpe, R.M., Maddocks, S., Millar, M., Kerr, J.B., Saunders, P.T.K., McKinnell, C., 1992. Testosterone and spermatogenesis identification of stage-specific, androgen-regulated proteins secreted by adult rat seminiferous tubules. *J. Andro.* 13, 172-184
- Shimabukuro, R.H., Swanson, H.R., 1969. Atrazine metabolism, selectivity and mode of action. *J. Agric. Food Chem.* 17: 199-25
- Shoemaker, V.H., Hillman, S.S., Hillyard, S.D., Jackson, D.C., McClanahan, L.L., Withers, P.C., Wygoda, M.L., 1992. Exchange of water, ions, and respiratory gases in terrestrial amphibians. In: *Environmental Physiology of the Amphibians*. Eds: Feder, M.E., Burggren, W.W., University of Chicago Press, Chicago, IL, USA. 81-124
- Smith, D.C., 1987. Adult recruitment in Chorus frogs: Effects of size and date at metamorphosis. *Ecology*. 68(2): 344-350
- Smith-Gill, S.J., Berven, K.A., 1979. Predicting amphibian metamorphosis. *Am Nat.* 113: 563-585
- Solomon, K.R., Baker, D.B., Richards, R.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, W.M., 1996. Ecological risk assessment of atrazine in north American surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 31-76
- Spear, P.A., Boily, M., Giroux, I., DeBlois, C., Leclair, M.H., Levasseur, M., Leclair, R., 2009. Study design, water quality, morphometrics and age of the bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in sub-watersheds of the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada. *Aquat. Toxicol.* 91: 110-117

- Steinwascher, K. 1978. Interference and exploitation competition among tadpoles of *Rana utricularia*. *Ecology*. 59:1039-1046
- Stewart, M.M., Woolbright, L.L., 1996. Amphibians. Dans: The food web of a tropical rain forest. Par: Reagan, D.B., Walde, R.B. University Chicago Press. Chicago. 273-320
- Swingle, W.W., 1926. The germ cells of anurans. II. An embryological study of sex differentiation in *Rana catesbeiana*. *J. Morphol.* 41: 441-546
- Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M., Cyr, D., Marcogliese, D., 2002a. Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. *Environmental toxicology and chemistry*. 21: 527-531
- Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M., Cyr, D., Marcogliese, D., 2002b. Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the ovary. *Environmental toxicology and chemistry*. 21: 1264-1267
- Tenniswood, M.P.R., Searle, P.F., Wolffe, A.P., Tata, J.R., 1983. Rapid estrogen metabolism and vitellogenine gene expression in *Xenopus hepatocyte* culture. *Mol. Cell Endocrinol.* 30: 329-345
- Toft, C.A., 1985. Resource partitioning in amphibians and reptiles. *Copeia*. 1985: 1-21
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76: 4350-4354
- Trotter, D.M., Baril, A., Wong, M.P., Kent, R.A., 1990. Canadian water quality guidelines for atrazine. Department of the Environment, Inland Waters Directorate Scientific Series Publ. No. 168, 106+ pp, Ottawa, ON, Canada, (ISBN 0-662-18038-0)
- Turkstra, J.A., Meer, F.J.U.M. van der, Knaap, J., Rottier, P.J.M., Teerds, K.J., Colenbrander, B., Meloen, R.H., 2005. Effects of GnRH immunization in sexually mature pony stallions. *Anim. Reprod. Sci.* 86: 247-259

- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 1994. Atrazine, simazine and cyanazine; notice of initiation of special review. Fed. Reg. 59:60412-60443
- van Oordt, P.G.W.J. van., 1960. The influence of the internal and external factors in the regulation of the spermatogenic cycle in amphibian. Zool. Soc. London Symp. 2: 29-52
- van Oordt, P.G.W.J. van., 1961. The gonadotrophin producing and other cell types in the distal lobe of the pituitary of the common frog, *Rana temporaria*. Gen. Comp. Endocrinol. 1: 364-374
- van Oordt, P.G.W.J. van., Dongen, W.J. van., Lofts, B., 1968. Seasonal changes in endocrine organs of the male common frog, *Rana temporaria*. I. The pars distalis of the adenohypothysis. Z. Zellforsch. 88: 549-559
- Wake, D.B., Morovitz, H.J., 1991. Declining amphibian populations : a global phenomenon? Findings and recommendations. Alytes. 9: 33-42
- Wan, M.T., Buday, C., Schroeder, G., Kuo, J., Pasternak, J., 2006. Toxicity to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus tshawytscha*, and *Rana catesbeiana* of Atrazine, Metolachlor, Simazine, and Their Formulated Products. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 76: 52-58
- Weinberger, C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Gruol, D.J., Evans, R.M. 1986. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. Nature. 324:641-646
- Wiegand, S.J., Boland, P., Tancopoulos, G.D., 2000. Cooperative roles for the angiopoietins and vascular endothelial growth factor in ovarian angiogenesis. Dans: Ovulation: evolving scientific and clinical concepts. Par: Adashi, E.Y., Springer-Verlag. New York. 175-186
- Wilbur, H.M., Collins, J.P., 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. Science. 182: 1305-1314
- Wissinger, S.A., Whiteman, H.H., 1992. Fluctuation in a rocky mountain population of salamanders: anthropogenic acidification or natural variation? J. Herpetol. 26: 377-391

- Witschi, E., 1931. Studies on sex differentiation and sex determination in amphibian: V. Range of cortex-medulla antagonism in parabiotic twins of Ranidae and Hylidae. *J. Exp. Zool.* 58: 113-145
- Wyman, R.L., 1990. What's happening to the amphibians? *Conserv. Biol.* 4: 350-352
- Wyman, R.L., Jancola, J., 1992. Degree and scale of terrestrial acidification and amphibian community structure. *J. Herpetol.* 26: 392-394
- Yaoita, Y., Brown, D.D., 1990. A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis. *Genes and development.* 4: 1917-1924
- Yaoita, Y., Shi, Y.B., Brown, D.D., 1990. *Xenopus laevis* alpha and beta thyroid hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 7090-7094

Annexe – Méthodologie détaillée

A.1 Les sites d'échantillonnage dans le bassin versant de la rivière Yamaska

Les 7 sites d'échantillonnage sont distribués dans des régions du bassin versant de la rivière Yamaska présentant une intensité agricole faible (0-19 %), modérée (20-59 %) ou élevée (60 % et plus) (Primeau *et al.*, 1999; Bérubé *et al.*, 2005). L'intensité agricole représente la proportion de terre en culture autour du cours d'eau. La qualité d'eau globale des sites d'échantillonnage a été décrite par Spear et collaborateurs (2009), montrant une contamination agricole croissante entre les sites Deborah Stairs < Réservoir Choinière < Rivière Yamaska < Rivière Pot-au-Beurre < Rivière Noire < Rivière à la Barbe. Le site Lac Boivin a été ajouté à l'étude en 2007 et présente un niveau de contamination équivalent au site Deborah Stairs (données non publiées). Dans la figure 13, la qualité des eaux de surface a été établie par le MDDEP (1997) selon les paramètres physico-chimiques, les résidus et débris flottants et la production excessive de plantes aquatiques, de champignons et moisissures et de bactéries. Selon le MDDEP (1997) la qualité d'eau peut être définie comme étant bonne, satisfaisante, douteuse, mauvaise ou très mauvaise.

Le site Deborah Stairs est un étang de 2,5 ha situé dans l'habitat faunique Deborah Stairs, un milieu humide et boisé protégé dans la municipalité de Knowlton. Ce site est situé dans le sous-bassin versant Yamaska Sud-est, lequel présente une intensité agricole faible ($\leq 19\%$) avec 8459 ha en culture et 8942 unités animales (u.a.) (MAPAQ, données non publiées). L'indice de qualité d'eau est satisfaisant (MDDEP, 1997), ce qui fait de Deborah Stairs un site référence de l'étude.

Les sites lac Boivin et réservoir Choinière sont situés sur la rivière Yamaska Nord et dans le sous-bassin versant du même nom, dans la ville de Granby. Ce sous-bassin versant présente une intensité agricole variable selon les régions

(lac Boivin \leq 19 % et réservoir Choinière 20-59 %) avec 8810 ha en culture et 23656 u.a. (MAPAQ, données non publiées). L'indice de qualité d'eau est différent entre les deux sites, étant satisfaisant au lac Boivin et douteux au réservoir Choinière (MDDEP, 1997). Le lac Boivin est situé dans le Centre d'interprétation de la nature du lac Boivin (CINLB), en aval du réservoir Choinière qui est situé dans un milieu humide protégé depuis 1992 dans le parc national de la Yamaska. Le réservoir Choinière est muni d'un barrage qui ne permet qu'aux eaux de surface de s'en écouter, de sorte que les contaminants peuvent être adsorbés à la matière organique en suspension et sédimentés dans le réservoir. Ensuite, le lac Boivin agit comme marécage filtrant, ce qui contribue à améliorer la qualité de l'eau entre les deux sites (Groison, 2000; CINLB, 2005).

Les sites rivière Yamaska et rivière à la Barbue sont situés dans le sous-bassin versant de la rivière Yamaska qui est très vaste et qui présente une intensité agricole variable (rivière Yamaska 20-59 % et rivière à la Barbue \geq 60 %) avec 100525 ha et 157780 u.a. (MAPAQ, données non publiées). L'indice de qualité d'eau de ces sites est douteux à la rivière Yamaska et mauvais à la rivière à la Barbue (MDDEP, 1997). Le premier site est situé sur la rivière Yamaska à la confluence des rivières Yamaska, Yamaska Nord et Yamaska Sud-est. Ce site est situé dans une petite aire de conservation dans la municipalité de Farnham, en aval d'une région d'intensité agricole modérée. Le site rivière à la Barbue, quant à lui, est situé dans la municipalité de St-Damasse où l'activité agricole est très intense.

Le site rivière Noire est situé dans le sous-bassin versant du même nom, lequel représente le tiers de la superficie totale du bassin versant de la rivière Yamaska. Le sous-bassin versant présente une intensité agricole élevée (\geq 60 %) avec 69909 ha en culture et 2579 u.a. (MAPAQ, données non publiées). Le site rivière Noire est situé dans la municipalité de St-Pie où l'activité agricole est très intense et présente un indice de qualité d'eau mauvais (MDDEP, 1997).

Finalement, le site rivière Pot-au-Beurre est situé dans la baie Lavallière, un milieu humide de 1400 ha dans la municipalité de Ste-Anne-de-Sorel. Ce site est situé dans le sous-bassin versant Pot-au-Beurre qui présente une intensité agricole modérée (20-59 %) avec 10215 ha en culture et 7916 u.a. (MAPAQ, données non publiées).

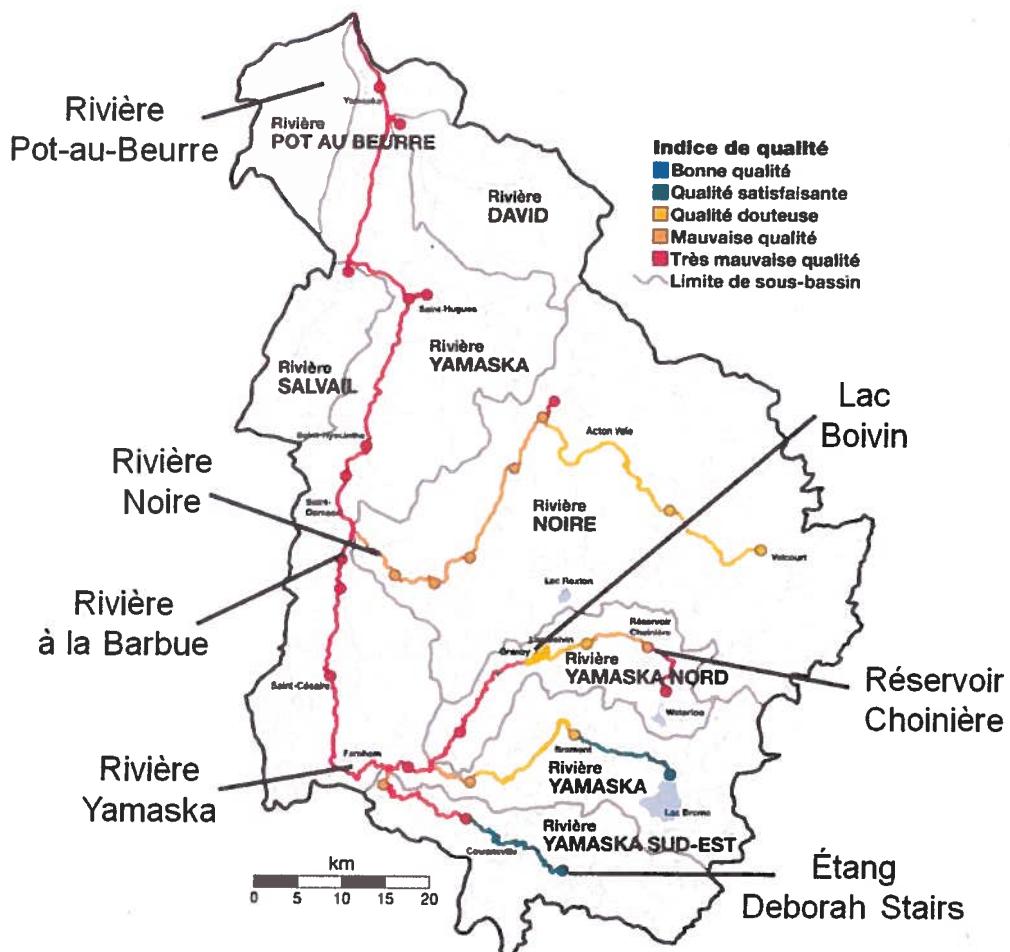


Figure 13: Carte de la situation géographique des sites d'échantillonnage dans le bassin versant de la rivière Yamaska et indice de qualité d'eau de chaque rivière. L'indice de qualité d'eau est fonction de la couleur du cours d'eau tel qu'indiqué dans la légende. MDDEP, 1997

A.2 La capture et le traitement des ouaouarons têtards et adultes

Un maximum de 20 têtards et de 35 adultes ouaouarons ont été capturés à chaque site d'échantillonnage. La capture et la manipulation des animaux ont été réalisées selon un protocole du Comité institutionnel de protection des animaux de l'Université du Québec à Montréal et de l'INRS Institut Armand-Frappier, avec l'approbation du Ministère des ressources naturelles et de la faune. Les têtards ont été capturés durant la première semaine du mois de juin, à l'aide d'un filet seine de 150 cm X 300 cm avec des mailles de 0,5 cm. L'échantillonnage a été effectué de jour et les têtards ont été maintenus dans un contenant d'eau du site jusqu'au moment de l'euthanasie, soit pour une durée maximale de 2 h. Les têtards ont été euthanasiés par intoxication au tricaine méthanesulfonate (MS-222) (Sigma-Aldrich, MO) 0,3 % tamponné avec 0,2 % de bicarbonate de sodium (NaCO_3) (Sigma-Aldrich, MO). Les adultes, quant à eux, ont été capturés de la mi-juin à la fin juillet. Ils ont été éblouis à l'aide d'une lampe, puis ont été capturés à l'aide d'une épuisette ou à la main, selon s'ils étaient dans l'eau ou sur la berge. L'échantillonnage a eu lieu entre 21 h et 2 h, suivi d'une période de 12 à 16 h en captivité dans des bassins sécuritaires contenant 8 cm d'eau du site d'échantillonnage et des tubes de plastique faisant office de cachettes. Après la capture, les adultes ont été anesthésiés au MS-222 0,1 % tamponné avec 0,2 % de NaCO_3 pour les mesures morphométriques et la prise de sang, puis jusqu'à 12 animaux ont été euthanasiés à chaque site par rupture de la corde neurale pour la collecte des tissus.

Afin de dresser un portrait complet des individus et de relativiser certains paramètres, plusieurs caractéristiques morphométriques ont été mesurées. Chez les têtards, les mesures morphométriques retenues sont la masse et la longueur corporelle, la longueur et la largeur de la queue, la longueur des membres et la distance interoculaire (Figure 14) et l'organe recueilli est le complexe néphrogonadal (Figure 15). Ce dernier a été fixé dans la solution de Bouin (acide acétique glacé, formaldéhyde 37 % et acide picrique 1,3 %, proportion 15 :3 :1).

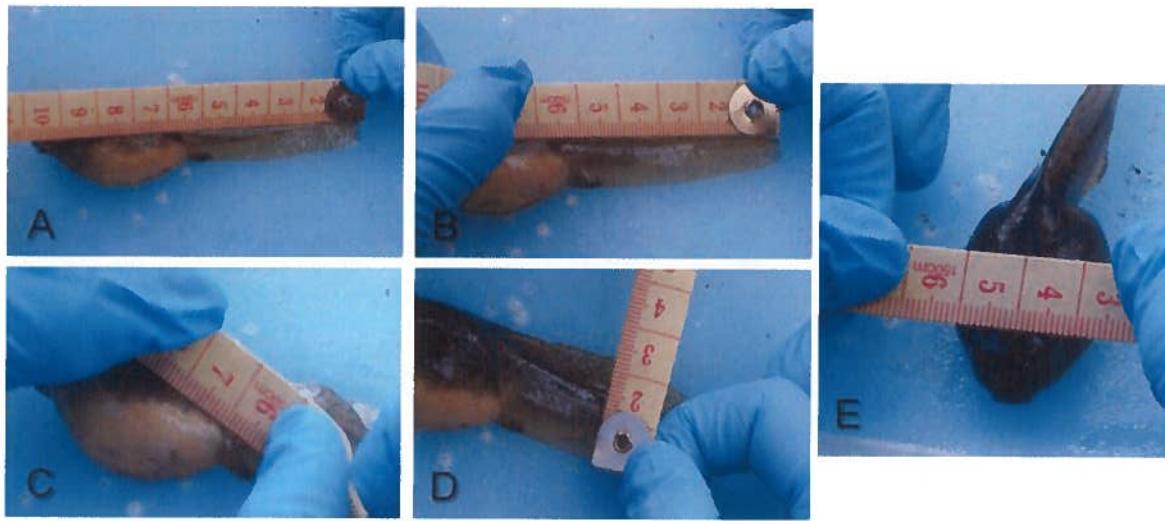


Figure 14 : Mesures morphométriques chez les têtards. A: longueur corporelle; B: longueur de la queue; C: longueur du membre arrière; D: largeur de la queue; E: distance interoculaire.

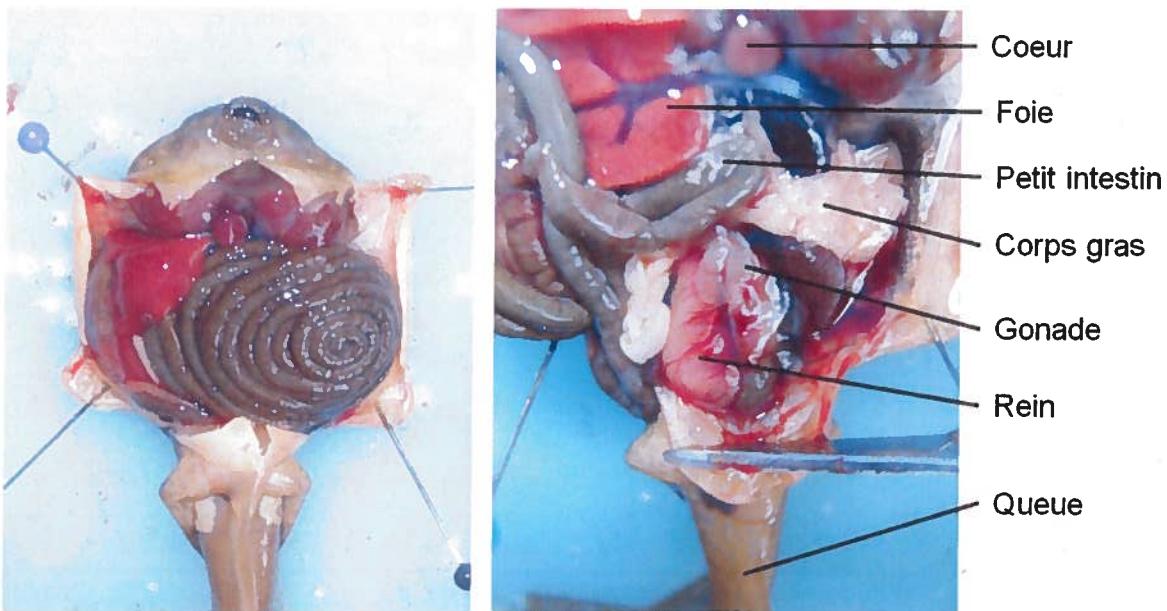


Figure 15 : Cavité abdominale du têtard de ouaouaron et localisation du cœur, du foie, du petit intestin, du corps gras, de la gonade, du rein et de la queue.

Chez les adultes, les mesures morphométriques retenues sont la masse corporelle, la longueur corporelle, la longueur entre le museau et le cloaque (SVL de l'anglais *snout to vent length*), la longueur du tibia, le diamètre du tympan, l'épaisseur de la glande nuptiale et la couleur de la gorge (Figure 16). Le sang a été recueilli avant l'euthanasie par l'artère fémorale ou par ponction intracardiaque lorsque la première méthode s'est avérée infructueuse. Après l'euthanasie, le cerveau, le cœur, le foie, les reins, les glandes surrénales, les gonades, les œufs et la glande nuptiale ont été prélevés. Ces tissus ont été départagés entre différents groupes de recherche afin de maximiser l'utilisation des animaux.

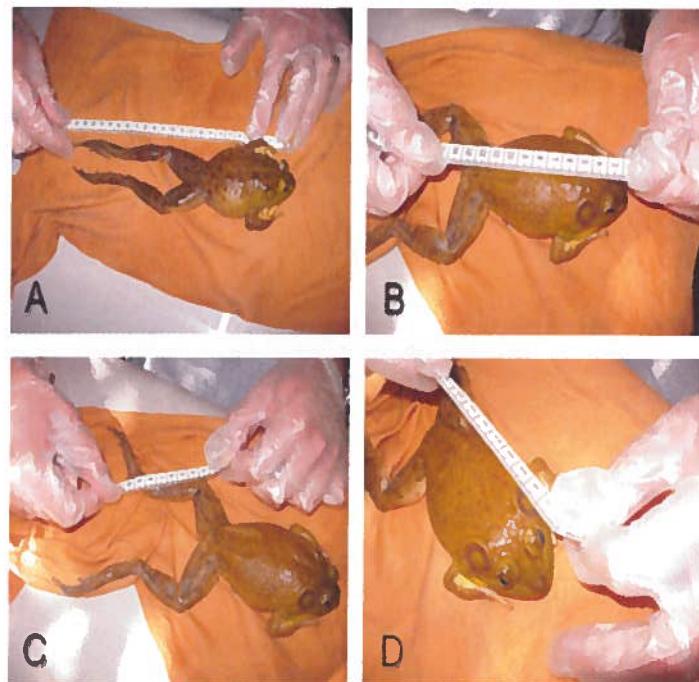


Figure 16 : Mesures morphométriques chez les adultes. A: longueur corporelle; B: SVL; C: longueur du tibia; D: diamètre du tympan.

A.3 Fixation des tissus et disposition sur les lames de microscope

Les complexes néphrogenadaux des têtards et un testicule par adulte ont été fixés dans la solution de Bouin entre 1 et 6 minutes après l'euthanasie, tandis que le second testicule a été congelé dans l'azote liquide. Les échantillons ont été transférés dans une solution d'éthanol 70 % après une période de fixation variant entre 16 et 20 h, puis cette solution a été renouvelée à chaque 48 h jusqu'à ce que la coloration jaune caractéristique de l'acide picrique présent dans la solution de Bouin soit très atténuee.

Les tissus ont été déshydratés et imprégnés de paraffine par trempage dans une série de bains de solvants et de paraffine. La procédure de trempage inclut 45 minutes dans des bains d'éthanol 80 %, 95 %, puis dans 3 bains à 100 %. Le dernier bain d'éthanol 100 % contient une petite quantité de chlorure de cobalt (CoCl_2), de sorte que le tissu soit légèrement coloré en bleu et que le bain change de couleur du bleu au rose si l'éthanol se voit contaminé avec de l'eau. Ensuite viennent des périodes de trempages de 70 minutes dans 2 bains de solvant citrisolv ®, puis 30 minutes dans 3 bains de paraffine à 56 °C. Cette procédure de déshydratation a été effectuée à l'aide d'un TissueTek VIP de Miles scientifics (Princeton, Minnesota, États-Unis). Le citrisolv ® est un solvant à base de limonène faisant office de remplacement du xylène vu son caractère plus sécuritaire. Les tissus ont ensuite été figés dans des blocs de paraffine sur une histocassette tel que décrit par Luna (1968).

Les blocs de paraffine contenant les tissus ont été sectionnés en tranches de 5 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome rotatif MT-970 de Miles scientifics (Princeton, Minnesota, États-Unis). Les sections conservées, soit 3 sections à chaque 100 µm ont été mises sur des lames régulières pour la coloration (Richmond, Illinois, États-Unis). Les lames ont été mises à chauffer pour une période variant de 4 à 10 h à 90 °C.

Au moment de l'utilisation des tissus, les lames destinées à l'histologie ont subit une série de trempages dans des bains de solvants et de colorants visant à déparaffiner les tissus. La procédure de trempage commence avec 3 bains de 5 minutes dans le citrisolv ® afin de dissoudre la paraffine, puis 2 bains de 2 minutes dans l'éthanol 100 % et 95 %, 1 bain de 1 minute dans l'éthanol 70 % afin d'éliminer le citrisolv ® et de déshydrater les sections de tissu, puis 1 bain de 1 minute sous un jet d'eau courant.

A.4 Coloration à l'hématoxyline et éosine

Afin d'effectuer l'observation directe des tissus au microscope, les lames ont été colorées à l'hématoxyline et éosine. À la suite des trempages dans le citrisolv ®, l'éthanol et l'eau tel que décrit précédemment, les lames ont subit une série de trempages dans des bains de colorants et d'éthanol. La procédure de trempage commence avec un bain de 3 minutes dans l'hématoxyline afin de colorer le noyau des cellules en bleu, puis un bain de 1 minute sous un jet d'eau courant afin de rincer les excédents de colorant. Par la suite, les lames sont trempées dans un bain d'acide acétique 1 %, d'eau potable et de solution Scott pendant 30 secondes chacun. Cette dernière solution est composée de 0,2 % de NaCO₃ et de 2 % de sulfate de magnésium (MgSO₄) en solution aqueuse. Les lames sont ensuite trempées rapidement 10 fois dans un bain d'éthanol 70 % afin de retirer l'eau des lames, puis dans le bain d'éosine en solution alcoolique afin de colorer le cytoplasme des cellules. Par la suite, les lames sont trempées rapidement 2 fois dans un bain d'éthanol 70 %, puis 10 fois dans deux bains d'éthanol 95 % et finalement pendant 1 minute dans deux bains d'éthanol 100 %. Ces bains d'éthanol permettent de retirer les excédents de colorant et de déshydrater les tissus. Finalement, les lames sont trempées dans trois bains de citrisolv ® pendant 5 minutes afin de déshydrater complètement les tissus pour leur conservation. Les lames ont ensuite été couvertes d'une lamelle maintenue par du milieu de montage permanent Permount™ de Fisher Scientific International (Hampton, New Hampshire, États-Unis).

Le colorant hématoxyline est un composé d'hématoxyline oxydé et d'ions d'aluminium (Lillie *et al.*, 1976; Llewellyn, 2009) qui colore les nucléoprotéines riches en arginine, tel les histones. Le colorant éosine, quant à lui, est une contre coloration qui marque les structures éosinophiles en rose orangé. Ces structures incluent le cytoplasme, de nombreuses protéines intra et extra cellulaires et les corps de Lewy et de Mallory (Lillie *et al.*, 1976).

A.5 Évaluation des gamètes des têtards

L'évaluation des gonades des têtards consiste en le compte des gamètes de chaque type et l'évaluation de l'intégrité du tissu. Chez les femelles, 3 sections entières espacées de 100 µm, soit 20 sections de 5 µm, ont été observées et le compte des gamètes de chaque type a été compilé par individu. 4 types de gamètes (Figure 8) ont été comptés chez les femelles, soit (1) les ovogonies primaires dormantes (RPOg de l'anglais *resting primary oogonia*), (2) les ovogonies primaires avancées (LPOg de l'anglais *late primary oogonia*), (3) les ovogonies secondaires (SOg de l'anglais *secondary oogonia*) et (4) les ovocytes de type I (OcI de l'anglais *oocyte type I*).

Les RPOg présentent une couleur très intense qui découle de la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. Aussi, la distinction entre le noyau et le cytoplasme est quasi nulle et on les retrouve spécialement en périphérie de la gonade. Les LPOg se distinguent des RPOg spécialement par la différenciation entre le noyau et le cytoplasme. Le noyau présente une coloration intense par rapport à son cytoplasme et on peut observer une activité mitotique intense, la chromatine condensée étant souvent visible dans le noyau. Tout comme les RPOg, les LPOg sont surtout présentes en périphérie de la gonade.

Les SOg sont d'une taille plus importante que les RPOg et LPOg. Le noyau occupe une grande partie de la cellule et on peut parfois observer la membrane nucléaire qui est plus pâle. La membrane plasmique des SOg est entourée de

cellules folliculaires en devenir qui sont d'apparence squameuse. Finalement, les Ocl sont d'une taille beaucoup plus importante que les ovogonies, allant jusqu'à 350 µm. La membrane nucléaire est pâle et bien visible et le noyau contient de nombreux nucléoles de tailles variées. Des cellules folliculaires sont présentes sur la membrane plasmique, elles se distinguent par leur coloration foncée.

Chez les mâles, un champ complet à grossissement 400 X sur 3 sections entières espacées de 100 µm, soit 20 sections de 5 µm, ont été observées et le compte des gamètes de chaque type a été compilé par individu. 2 types de gamètes (Figure 6) ont été retrouvés chez les mâles, soit (1) les kystes de spermatogonies (Sg) et (2) les kystes de spermatocytes (Sc).

Les spermatogonies et les spermatocytes se distinguent principalement par leur taille et par l'apparence de leur noyau. Les spermatogonies sont des cellules de plus grande taille et leur cytoplasme est très peu coloré par l'éosine. Leur noyau est de forme oblong et présente plusieurs nucléoles, tandis que celui des spermatocytes est de petite taille et très fortement coloré par l'hématoxyline.

A.6 Évaluation des gonades chez les adultes mâles

Chez les adultes mâles, l'évaluation des gonades inclut l'évaluation de l'intégrité testiculaire, le compte du nombre de kystes de spermatogonies le long de la paroi du lobule séminifère, la mesure du diamètre des lobules séminifères et l'évaluation de la continuité de la spermatogénèse. 3 sections entières espacées de 100 µm, soit 20 sections de 5 µm, ont été observées et les résultats ont été compilés par individu.

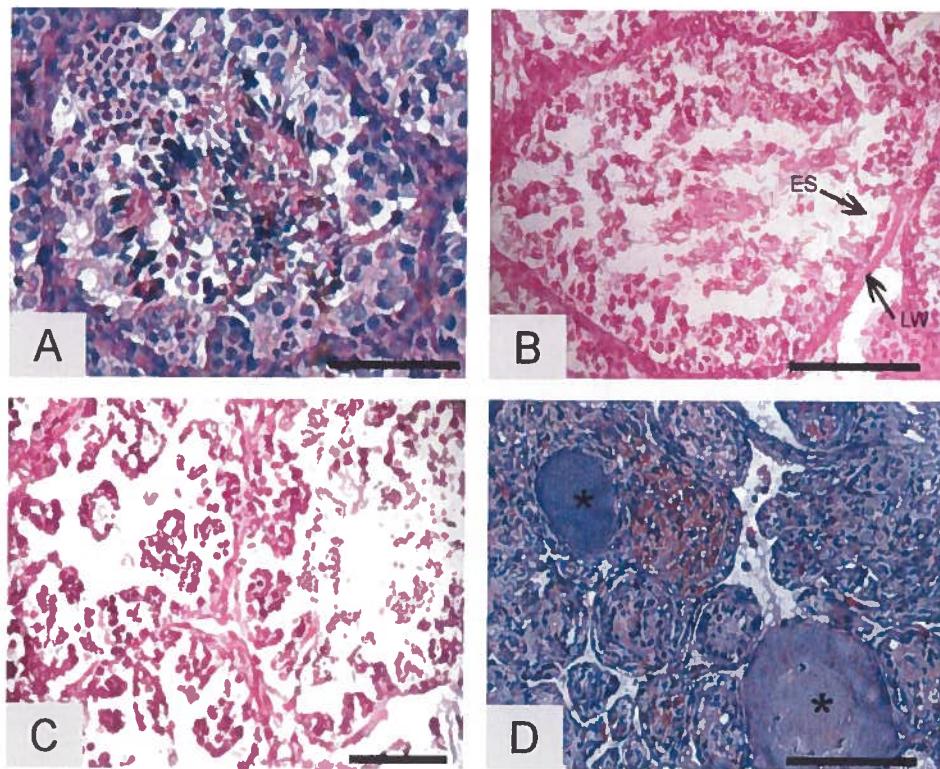


Figure 17 : Différents niveaux d'intégrité testiculaire. (A) testicule normal contenant des lobules séminifères, des kystes de spermatogonies, de spermatocytes et de spermatides et des spermatozoïdes, (B) testicule présentant la dégénérescence précoce montrant des espaces vides dans le lobule séminifère, (C) testicule présentant la dégénérescence avancée montrant surtout des débris cellulaires et une structure lobulaire douteuse (D) ovocytes testiculaires chez un mâle féminisé. Coloration à l'hématoxyline et éosine. ES = Espace vide (de l'anglais *empty space*). LW = Paroi du lobule séminifère (de l'anglais *lobule wall*). Grossissement 300 X (D) et 400 X (A, B et C). Barres = 100 µm. Grossissement 300 X (D) et 400 X (A, B et C). Barres = 100 µm.

Trois niveaux d'intégrité testiculaire ont été définis, soit (1) le testicule normal, (2) la dégénérescence précoce et (3) la dégénérescence avancée. Les testicules normaux (Figure 17A) sont caractérisés par la présence de lobules séminifères contenant des kystes de spermatogonies, de spermatocytes et de spermatides,

ainsi que les spermatozoïdes. Les testicules présentant la dégénérescence précoce (Figure 17B) sont caractérisés par des espaces vides causés par l'absence de formation de spermatogonies le long de la paroi du lobule séminifère. Les testicules présentant la dégénérescence avancée (Figure 17C) sont caractérisés par l'absence de structure lobulaire et l'absence de détail cytoplasmique et nucléaire, le tissu étant composé de cellules germinales dégénérées. L'intégrité testiculaire est également compromise par la présence d'ovocytes testiculaires (Figure 17D).

A.7 Immunobuvardage de type Western

Des immunobuvardages de type Western ont été effectués sur le plasma des ouaouarons à la recherche de récepteurs à œstrogène. Les testicules ont été homogénéisés dans 500 µL de tampon de lyse contenant 1 mM de fluorure de phenylmethanesulfonyl (PMSF). Ce dernier est un inhibiteur de nombreuses protéases et permet de conserver l'intégrité des protéines. Les homogénats de testicules ont été centrifugés pendant 10 minutes à 16000 x G à 4 °C, puis les surnageants ont été récoltés et congelés immédiatement à -20 °C.

Cinq mL de surnageant testiculaire ont été chargés sur un gel de polyacrylamide 7 % en conditions dénaturantes. Les protéines ont migré sur le gel par électrophorèse à 120 V pendant 1 h, puis ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose par une seconde électrophorèse à 100 V pendant 1 h (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981). L'intégrité des bandes de protéines dans chaque puits a été vérifiée à l'aide d'une solution deponceau S, lequel a la capacité de colorer les bandes de protéines de façon réversible. La membrane de nitrocellulose a ensuite été incubée dans une solution contenant 10 % de lait sans matières grasses pendant 1 h à température ambiante afin de bloquer les sites de liaison inutilisés sur la membrane. La membrane de nitrocellulose a effectivement la propriété de lier les protéines de façon non-spécifique et le blocage des sites de liaison inutilisés par le lait permet de réduire le bruit de fond

causé par l'interaction non-spécifique entre la membrane et l'anticorps (Johnson *et al.*, 1984).

Après le blocage des sites de liaison inutilisés, la membrane a été incubée avec une solution d'anticorps primaire à 4 °C pendant une nuit. La membrane a ensuite été rincée à plusieurs reprises dans une solution saline tamponnée avec du tris et contenant 0,1 % de Tween-20 (polysorbate-20) (TBS-T de l'anglais *tris buffered saline tween-20*), puis a été incubée avec une solution d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP de l'anglais *horseradish peroxidase*) pendant 1 h à température ambiante. La membrane a été rincée à nouveau dans la solution TBS-T, puis incubée dans le luminol Immun-Star de BioRad (Hercules, Californie, États-Unis). Ce dernier émet de la chémiluminescence lorsqu'il est en présence d'un oxydant adéquat, tel l'HRP. La luminescence des protéines d'intérêt ont été révélées sur un film à rayon X à l'aide de l'appareil X-OMAT 100A Processor de Kodak (Rochester, New-York, États-Unis). La densitométrie des bandes révélées sur le film à rayon X a été mesurée et comparée (α -ER / β -actine) afin de déterminer l'expression relative des récepteurs à œstrogène α par rapport à l'expression de l'actine β qui est sensiblement égale d'un tissu à un autre.

A.8 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism 5.01 (GraphPad La Jolla, CA, États-Unis). La normalité de toutes les distributions obtenues a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk. L'hypothèse nulle (h_0) du test de Shapiro-Wilk stipule que la distribution testée n'est pas différente de la distribution normale, tandis que l'hypothèse alternative (h_1) stipule que la distribution testée est différente de la distribution normale.

h_0 ; distribution testée = distribution normale

h_1 ; distribution testée \neq distribution normale

De nombreux paramètres ont été comparés entre les sites, notamment les mesures morphométriques et les comptes de gamètes. Les distributions non différentes de la distribution normale ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA de l'anglais *analysis of variance*), suivi d'un test complémentaire de Tukey. Les distributions différentes de la distribution normale, quant à elles, ont été soumises à une analyse non paramétrique de Klustal-Wallis, suivi d'un test complémentaire de Dunn. L'hypothèse nulle de ces tests stipule que les moyennes comparées proviennent de la même population, tandis que l'hypothèse alternative stipule que les moyennes comparées proviennent de populations différentes. Ces tests permettent de déterminer si plusieurs distributions sont différentes les unes des autres en comparant la moyenne de chacune avec la moyenne de toutes les autres.

$$h_0; \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \dots = \mu_x$$

$$h_1; \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \dots \neq \mu_x$$