

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en santé humaine

**EFFETS DES PESTICIDES AGRICOLES SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE
DES AMPHIBIENS**

Par
Marie-Soleil Christin-Piché

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

Jury d'évaluation

Président du Jury
et examinateur interne

Michel Charbonneau
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en santé humaine

Examineur externe

Georges Costan
Biologie de l'environnement
Environnement Canada, Centre Saint-Laurent

Directeur de recherche

Michel Fournier
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en santé humaine

Codirectrice de recherche

Pauline Brousseau
Biophage

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr. Michel Fournier, ainsi que ma codirectrice de recherche, Dr. Pauline Brousseau pour leur confiance et leur support.

Je tiens également à remercier Lucie Ménard, assistante de recherche, pour son soutien constant, son dynamisme et son éternelle bonne humeur.

Merci à Andrée Gendron et Stéphanie Barbeau, assistantes de recherche dans le laboratoire du Dr. Marcogliese au Centre Saint-Laurent, pour leur aide et leur travail ainsi que pour les belles journées de terrain passées avec elles.

Merci aussi à mes collègues de laboratoire, Stéphane Pillet, Andrew Rooney et Martin Poirier qui ont su me donner de judicieux conseils.

Merci à mes parents, Pierre et Marie-Christine pour la révision de ce document ainsi que pour leur appui constant fourni pendant ces deux années d'étude.

Finalement, merci à Philippe Dufresne, pour la révision de ce document, sa présence, sa patience et son amour inconditionnel.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	III
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VI
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	VII
RÉSUMÉ	IX
INTRODUCTION.....	XI
PREMIÈRE PARTIE	I
1. IMMUNOTOXICOLOGIE.....	3
1.1 EFFETS DES PESTICIDES SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE	4
1.2 RÉACTIONS IMMUNOTOXICOLOGIQUES.....	5
1.2.1 Immunosuppression.....	5
1.2.2 Hypersensibilité	6
1.2.3 Autoimmunité.....	8
2. DÉCLIN DES POPULATIONS D'AMPHIBIENS	9
2.1 SITUATION DES ESPÈCES DE GRENOUILLES AU CANADA	10
2.2 CAUSES DU DÉCLIN DES POPULATIONS D'AMPHIBIENS	11
2.2.1 Destruction de l'habitat naturel	12
2.2.2 L'introduction d'espèces exotiques	12
2.2.3 La consommation de cuisses de grenouilles	13
2.2.4 La détérioration de la qualité de l'eau	13
2.2.5 Pathogènes spécifiques aux amphibiens, changements climatiques, rayons ultraviolets et qualité de l'eau	14
3. LE SYSTÈME IMMUNITAIRE DES AMPHIBIENS.....	16
3.2.1 Le thymus et les lymphocytes T.....	18
3.2.2 La rate et les lymphocytes B.....	19
3.2.3 Autres organes lymphoïdes	19
3.3 L'IMMUNITÉ NATURELLE	20
3.4 L'IMMUNITÉ ACQUISE.....	21
3.4.1 Les complexes majeurs d'histocompatibilité	21
3.4.2 Les immunoglobulines	22
3.4.3 La diversité des anticorps dans la réponse humorale	22
3.5 LA TOLÉRANCE	23
4. MODULATEURS DU SYSTÈME IMMUNITAIRE DES AMPHIBIENS	24
4.1 EFFETS DES RAYONS ULTRAVIOLETS SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	24
4.2 LES PESTICIDES ET LES AMPHIBIENS.....	25
4.2.1 Effets immunotoxiques connus des produits chimiques sur les amphibiens.....	25

5. EFFETS CONNUS DES PESTICIDES UTILISÉS DANS LE MÉLANGE TESTÉ AU COURS DE LA PRÉSENTE ÉTUDE.....	29
5.1 LE LINDANE.....	30
5.2 LA DIELDRINE.....	32
5.3 L'ENDOSULFAN.....	34
5.4 L'ALDICARBE.....	36
5.5 LA MÉTRIBUZINE.....	37
5.6 L'ATRAZINE.....	38
6. MALADIES ASSOCIÉES À LA DISPARITION DES AMPHIBIENS.....	40
6.1 MYCOSE.....	41
6.2 INFECTIONS VIRALES.....	42
6.3 INFECTIONS BACTÉRIENNES.....	43
7. INTÉRACTION ENTRE SYSTÈME IMMUNITAIRE, POLLUANTS ET PARASITES.....	44
7.1 L'INFLUENCE DE LA POLLUTION SUR LES INFECTIONS PARASITAIRES.....	43
7.2 INTERACTIONS ENTRE LES PARASITES ET LE SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	45
7.3 EFFETS SYNERGIQUES DES POLLUANTS ET DES PARASITES SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	47
DEUXIÈME PARTIE.....	51
1. ARTICLE # 1: EFFECTS OF AGRICULTURAL PESTICIDES ON THE IMMUNE SYSTEM OF XENOPUS LAEVIS AND RANA PIPIENS.....	53
1.1 RÉSUMÉ FRANÇAIS DE L'ARTICLE #1.....	53
1.2 CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT AUX TRAVAUX DE RECHERCHE.....	53
1.3 ARTICLE # 1.....	55
2. ARTICLE # 2: EFFECTS OF AGRICULTURAL PESTICIDES ON THE IMMUNE SYSTEM OF RANA PIPIENS AND ON ITS RESISTANCE TO PARASITIC INFECTION.....	90
2.1 RÉSUMÉ FRANÇAIS DE L'ARTICLE # 2.....	90
2.2 CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT.....	91
2.3 ARTICLE # 2.....	92
TROISIÈME PARTIE.....	132
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	135
BIBLIOGRAPHIE.....	140

Liste des abréviations

APC	"Antigen presenting cell"	SRBC	"Sheep red blood cells", Érythrocytes de mouton
CD4	"Cluster of différenciation 4"		
CD8	"Cluster of différenciation 8"	T ₃	Triiodothyronine
CMH I	Complexe majeur d'histocompatibilité de type I	T ₄	Thyroxine
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de type II	TdT	"Terminal deoxynucleotidyl transferase"
ConA	Concanaviline A	T _H 1	"T helper 1 cells", lymphocyte T auxiliaire
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes	TNF- α	"Tumor necrosis factor α "
DMSO	Diméthyl sulfoxyde	TNT	Trinitrotoluène
FSH	Hormone folliculo-stimulante	UV	Ultraviolets
GABA	acide γ -aminobutyrique		
Ig	Immunoglobuline		
IL	Interleukine		
INF- γ	Interféron γ		
LH	Hormone lutéinisante		
LPS	Lypopolysaccharides		
MHV-3	"Murine herpes virus-3" Virus murin de l'herpès-3		
MLR	"Mixed lymphocyte réaction" Culture mixte lymphocytaire		
NK	Cellules "natural killer"		
PHA	Phytohémagglutinin		
PIP2	Phosphatidylionsitol		
RAG	"Recombination activating genes enzymes"		
RcT	Récepteur T		
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise		

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures

Figure-1 : Définition schématique de l'immunotoxicologie.....	4
Figure-2 : Les étapes de l'hypersensibilité cutanée causée par l'interaction antigènes lymphocytes.....	7
Figure-3 : Régions les plus touchées par le déclin des populations d'amphibiens.....	9
Figure-4 : Modèle proposé par Kiesecker <i>et al.</i> (2001) pour expliquer les liens existants entre les changements climatiques et le déclin dans les populations d'amphibiens.....	15
Figure-5 : Stades de développement de <i>Xenopus laevis</i>	17

Liste des tableaux

Tableau-1 : Situation de différentes espèces d'amphibiens retrouvées à travers le monde.....	10
--	----

Résumé

Pour mieux comprendre le rôle et l'implication des xénobiotiques dans la diminution des populations d'amphibiens, les effets d'un mélange de six pesticides agricoles sur le système immunitaire des grenouilles ont été étudiés. Puisque la modulation de certains paramètres du système immunitaire peut entraîner une augmentation de la sensibilité des animaux aux pathogènes, la résistance des grenouilles à un parasite, couramment retrouvé dans leur environnement, a aussi été évaluée. Finalement, le dernier objectif de la présente étude a été de vérifier si les xénobiotiques et les pathogènes pouvaient avoir un effet synergique sur le système immunitaire des amphibiens.

Afin de répondre à ces objectifs, deux espèces de grenouilles ont été utilisées : *Xenopus laevis*, un modèle de laboratoire et *Rana pipiens*, une espèce indigène au Québec. Les méthodes pour tester les compétences immunitaires des grenouilles ont d'abord été mises au point avec *X. laevis* puisqu'il s'agit d'une espèce bien étudiée par plusieurs chercheurs et qu'elle peut facilement être maintenue dans des conditions de laboratoire. Ensuite, les expériences ont été reprises avec *R. pipiens* afin de vérifier si les résultats obtenus avec *X. laevis* pouvaient s'appliquer à des espèces de grenouilles plus indigènes. Ceci nous a permis de déterminer si les pesticides peuvent affecter les amphibiens de la faune québécoise dans leur environnement naturel.

Les grenouilles ont été exposées *in vivo* au mélange de pesticides pendant une courte période de temps après laquelle certains paramètres de l'activité immunitaire étaient mesurés. La cellularité (concentration de cellules dans la rate), la viabilité et l'activité phagocytaire des splénocytes ainsi que la prolifération des lymphocytes ont été analysées. Suite à l'exposition aux pesticides la moitié des grenouilles *Rana pipiens* ont été infectées avec des larves du parasite *Rhabdias ranae* afin de vérifier si une exposition aux xénobiotiques affectait leur résistance aux pathogènes. La vitesse de migration, la maturation, le nombre et la taille des parasites infectieux ont été mesurés. Finalement, les compétences immunitaires des grenouilles parasitées ont été vérifiées et comparées à celles des grenouilles exposées aux pesticides seuls, afin de déterminer si les polluants et les parasites ont un effet synergique sur le système immunitaire.

Nos recherches ont permis de conclure que les pesticides utilisés en agriculture peuvent dérégler le système immunitaire des grenouilles. Chez les grenouilles *X. laevis*, le mélange de pesticides diminue le nombre de splénocytes et augmente leur activité phagocytaire. Ceci suggère que le mélange utilisé pourrait immunosupprimer les animaux et induire des réactions autoimmunes ou inflammatoires. Chez les *Rana pipiens*, les pesticides diminuent la prolifération des lymphocytes T ce qui pourrait inhiber le développement de la réponse immunitaire acquise et affaiblir la résistance aux pathogènes. D'ailleurs, il a été observé que l'exposition au mélange augmentait la maturation et la vitesse de migration des parasites chez les grenouilles. L'affaiblissement de la réponse immunitaire, causé par des pesticides, pourrait donc être une des causes responsables de l'augmentation des infections observées chez les amphibiens.

Nos résultats démontrent également que les pesticides et les pathogènes peuvent avoir un effet synergique sur le système immunitaire. En effet, il a été observé que les grenouilles exposées à la fois aux parasites et aux pesticides avaient une activité phagocytaire moins grande que les grenouilles exposées aux pesticides seuls. Les microorganismes ont la propriété d'altérer la réponse immunitaire afin de pouvoir y échapper et se reproduire dans l'hôte. Il est possible que l'immunosuppression créée par les pathogènes soit additive à celle créée par les pesticides. Une exposition à des contaminants suivie d'une infection complique souvent les réactions du système immunitaire et peut entraîner une réponse inadéquate de l'hôte l'empêchant de se défendre contre d'autres pathogènes.

Il est important d'étudier les effets de la pollution environnementale sur le système immunitaire afin d'être en mesure de comprendre comment les polluants peuvent entraîner la disparition de certaines espèces. Nos résultats indiquent que les pesticides peuvent accroître indirectement la sensibilité des amphibiens à différents pathogènes, en affaiblissant leur système immunitaire. Il devient donc évident que la relation entre les polluants et le système immunitaire constitue un sujet d'étude qui mérite d'être approfondi si nous voulons comprendre l'impact de nos pratiques agricoles sur les écosystèmes aquatiques. Ainsi, nous pourrions peut-être éventuellement les améliorer de façon à les rendre moins nocives.



Étudiant



Directeur de recherche

Introduction

Depuis environ trente ans, les populations de plusieurs espèces d'amphibiens ont fortement diminuées partout à travers le monde et certaines d'entre-elles sont même complètement disparues. La rapidité avec laquelle ces disparitions sont survenues laisse croire que des perturbations environnementales, causées par l'homme, en sont la cause. La destruction des habitats naturels, l'introduction d'espèces exotiques ainsi que le déversement de produits chimiques dans l'environnement des amphibiens ont, sans doute, fortement contribué à la diminution de leurs populations. La majorité des chercheurs s'entend pour dire que la disparition de ces animaux n'est pas due à une seule cause. Différents facteurs contribuent probablement au déclin des populations d'amphibiens dans chaque région affectée.

La forte mortalité des amphibiens dans plusieurs régions a souvent été associée à des épidémies. Deux hypothèses ont été émises pour tenter d'expliquer l'augmentation des maladies infectieuses chez les amphibiens. Premièrement, il est possible que le nombre et la virulence des pathogènes s'attaquant à ces animaux se soient accrus dans les dernières années. Deuxièmement il est aussi probable que le système immunitaire des animaux soit moins résistant qu'auparavant. Le fait que plusieurs agents stressants, comme les contaminants environnementaux, peuvent causer une immunosuppression vient appuyer la deuxième hypothèse. Le système immunitaire des amphibiens pourrait alors être affecté par de tels contaminants, ce qui les rendrait par la suite plus sensibles à différents types d'infections.

La présente étude immunotoxicologique a été entreprise afin de mieux comprendre le rôle de la pollution dans la disparition de plusieurs espèces d'amphibiens au Québec. Les effets d'un mélange de pesticides agricoles sur le système immunitaire de deux espèces de grenouilles, *Xenopus laevis* et *Rana pipiens*, ont été étudiés plus en profondeur. Ce mélange comportait quatre insecticides, le lindane, la dieldrine, l'endosulfan et l'aldicarbe, ainsi que deux herbicides, la métribuzine et l'atrazine. Ces pesticides ont été choisis à cause de leur présence dans l'eau de surface de plusieurs tributaires du fleuve Saint-Laurent au Québec (Canada).

Suite à une exposition *in vivo* des grenouilles au mélange de pesticides, différents paramètres immunitaires, soit la concentration, la viabilité et l'activité phagocytaire des splénocytes ainsi que la prolifération des lymphocytes, ont été évalués. Puisque la modulation de ces paramètres pourrait par la suite rendre les animaux plus sensibles aux pathogènes retrouvés dans leur environnement, un modèle biologique de résistance a été établi. Les grenouilles *Rana pipiens* ont d'abord été exposées aux pesticides et ensuite à des larves de parasites couramment retrouvés dans leur environnement (*Rhabdias ranae*). Le nombre, la taille, la vitesse de migration et la maturation des parasites ont ensuite été mesurés. De plus, l'effet synergique d'une infection parasitaire et d'une exposition aux pesticides a également été évalué. Ainsi, les résultats obtenus permettront d'évaluer en partie le rôle des xénobiotiques dans l'incidence des maladies infectieuses observées fréquemment chez les grenouilles

Première partie

Revue de la littérature

1. Immunotoxicologie

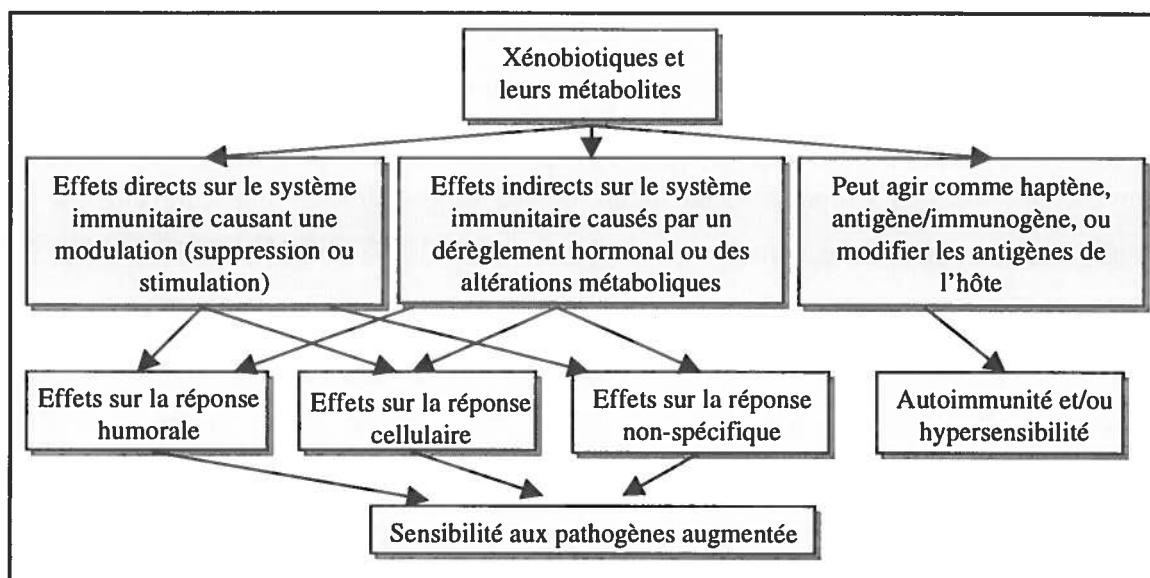
Les pesticides sont des xénobiotiques biocides, ce qui veut dire qu'ils sont délibérément ajoutés dans l'environnement pour tuer une forme de vie. Ils sont fabriqués dans le but de détruire un seul type d'organisme cible et doivent être sélectifs afin de ne tuer que cet organisme. Toutefois, la majorité des pesticides ne possède pas ces caractéristiques et leur utilisation sécuritaire est uniquement basée sur les techniques d'épandage et les quantités utilisées (Rodgers, 1995). Il est donc important de vérifier la véritable toxicité des pesticides et de déterminer les doses pouvant être utilisées sans causer de dommages à l'environnement et à la santé publique.

Comme tous les systèmes biologiques, le système immunitaire est sensible au déséquilibre de ses fonctions par des changements physiologiques, pathologiques ou suite à une exposition à des xénobiotiques. L'immunotoxicologie est l'étude des effets dommageables causés au système immunitaire, suite aux expositions à différents produits chimiques, comme des médicaments ou des contaminants environnementaux (National Research Council, 1992). Plusieurs polluants, comme les pesticides, sont immunotoxiques car ils peuvent endommager l'organisme en induisant une suppression ou une surexcitation du système immunitaire (Cornacoff *et al.*, 1988; Koner *et al.*, 1998; Fournier *et al.*, 1988; Flipo *et al.*, 1992; Banerjee et Hussain, 1986; Dean *et al.*, 1990; Olson *et al.*, 1987; Hooghe *et al.*, 2000). En effet, une exposition à des agents supprimeurs peut causer une augmentation de la sensibilité à différentes infections ou cancers (Banerjee *et al.*, 1996). D'un autre côté, lorsque certaines réponses du système immunitaire sont stimulées, des maladies autoimmunes ou des réactions d'hypersensibilité (allergies respiratoires et cutanées) peuvent se développer. Ces effets, supprimeurs ou stimulants, sont généralement observés à des doses plus faibles que celles induisant d'autres effets toxicologiques ou pharmacologiques. Les concentrations tolérées dans l'environnement pourraient alors être nuisibles pour certains systèmes, comme le système immunitaire, sans causer de dommages apparents aux individus exposés. Un diagramme de l'immunotoxicologie est présentée en figure 1.

1.1. Effets des pesticides sur le système immunitaire

Plusieurs effets immunotoxiques peuvent survenir suite à une exposition aux xénobiotiques. Ces effets peuvent comprendre : des changements histologiques dans les tissus ou organes du système immunitaire tels que, la moelle osseuse, le thymus, la rate ou les ganglions lymphatiques; des changements au niveau des fonctions des cellules immunitaires, tels qu'une maturation altérée des cellules immunocompétentes ou encore un dérèglement dans les sous-populations de lymphocytes B et T; une altération des réponses du système immunitaire comme, la réponse cellulaire, humorale ou non-spécifique. Un changement dans une ou plusieurs de ces composantes a le potentiel d'augmenter la sensibilité de l'hôte à certaines infections ou cancers.

Figure 1: Diagramme de l'immunotoxicologie (Adapté de Banerjee *et al.*, 1996)



Les pesticides ou leurs métabolites peuvent affecter plusieurs réponses du système immunitaire, telle que la réponse humorale, cellulaire ou non-spécifique, de façon directe ou indirecte. Ils peuvent également avoir la propriété d'induire des réactions d'autoimmunité ou d'hypersensibilité.

Les effets causés par les pesticides sur le système immunitaire peuvent être dus à deux mécanismes. Premièrement, il est possible que le système immunitaire réagisse à la présence de pesticides en fabriquant des anticorps spécifiques, en sécrétant des cytokines ou

encore en induisant la prolifération de lymphocytes effecteurs. Ces réactions immunologiques peuvent par la suite provoquer des allergies, des inflammations chroniques ou des maladies autoimmunes. Deuxièmement, les pesticides peuvent avoir une action directe ou indirecte sur le système immunitaire. Une action directe sur ce système peut survenir à plusieurs niveaux comme, par exemple, en détruisant les membranes des cellules lymphoïdes, en induisant la sécrétion de cytokines ou encore en provoquant des réponses inflammatoires. Une action indirecte survient lorsque les pesticides affectent d'autres systèmes, tels que les systèmes nerveux ou endocrinien, pouvant moduler le système immunitaire. En effet, ces trois systèmes sont intimement reliés par des mécanismes de rétroaction (Porter *et al.*, 1999). Plusieurs hormones et neurotransmetteurs peuvent moduler les réponses du système immunitaire. Par exemple les hormones de stress, telles les corticostéroïdes, peuvent supprimer certaines réponses immunitaires et par la suite accroître la sensibilité à différents types d'infections (Rollins-Smith, 1998). Il est donc possible que les pesticides modifient certains taux d'hormones ou de neurotransmetteurs entraînant une altération des réponses normales du système immunitaire.

1.2. Réactions immunotoxicologiques

Les polluants affectent souvent les organes lymphoïdes ou certaines sous-populations de cellules du système immunitaire en particulier. Au niveau du système immunitaire, les thymocytes, les monocytes, les lymphocytes, les cellules souches hématopoïétiques ainsi que les lymphocytes B activés, sont généralement les premières cibles des xénobiotiques (Luster *et al.*, 1990). Dans plusieurs cas, ces contaminants affectent plus d'une composante du système immunitaire à la fois, ce qui rend difficile la compréhension des interactions entre cellules et produits chimiques (Luster *et al.*, 1990). En général, trois types de réactions immunitaires peuvent survenir suite à une exposition aux polluants : une immunosuppression, une activation des réactions d'hypersensibilité ou encore le développement de réactions autoimmunes.

1.2.1. Immunosuppression

Certains xénobiotiques ont la propriété de réduire l'activité du système immunitaire. Lorsque tel est le cas, l'individu exposé peut développer plus facilement différentes maladies

à court ou à long terme. Une déficience d'une ou plusieurs fonctions immunologiques entraîne souvent le développement d'infections récurrentes par des pathogènes qui n'infecteront pas normalement des individus en santé. Ces infections peuvent être dues à des virus, des bactéries, des champignons ou encore des parasites dont les protozoaires. Le type prédominant d'infection dépend généralement des fonctions immunologiques affectées, du degré de la réduction du système immunitaire et également de la virulence du pathogène (Banerjee *et al.*, 1996). La vie ou la mort d'un individu va souvent dépendre de la vitesse à laquelle le système immunitaire arrêtera la prolifération d'un pathogène très virulent (Fournier *et al.*, 1988). Une immunosuppression des réponses normales, induite par des xénobiotiques, peut dérégler l'équilibre fragile du système immunitaire et favoriser la prolifération rapide d'un pathogène, lui permettant ainsi d'envahir l'organisme.

Une exposition à des produits chimiques immunotoxiques peut engendrer des risques additionnels chez des individus jeunes, âgés ou ayant un système immunitaire amoindri par la maladie (Banerjee *et al.*, 1996). Normalement, chez des individus en santé, le système immunitaire est capable de contourner les problèmes ou les faiblesses en utilisant des voies d'activation connexes. Toutefois, lorsque le système est déjà endommagé, il est possible que ces voies ne soient pas activées et qu'une réponse normale ne puisse pas se développer.

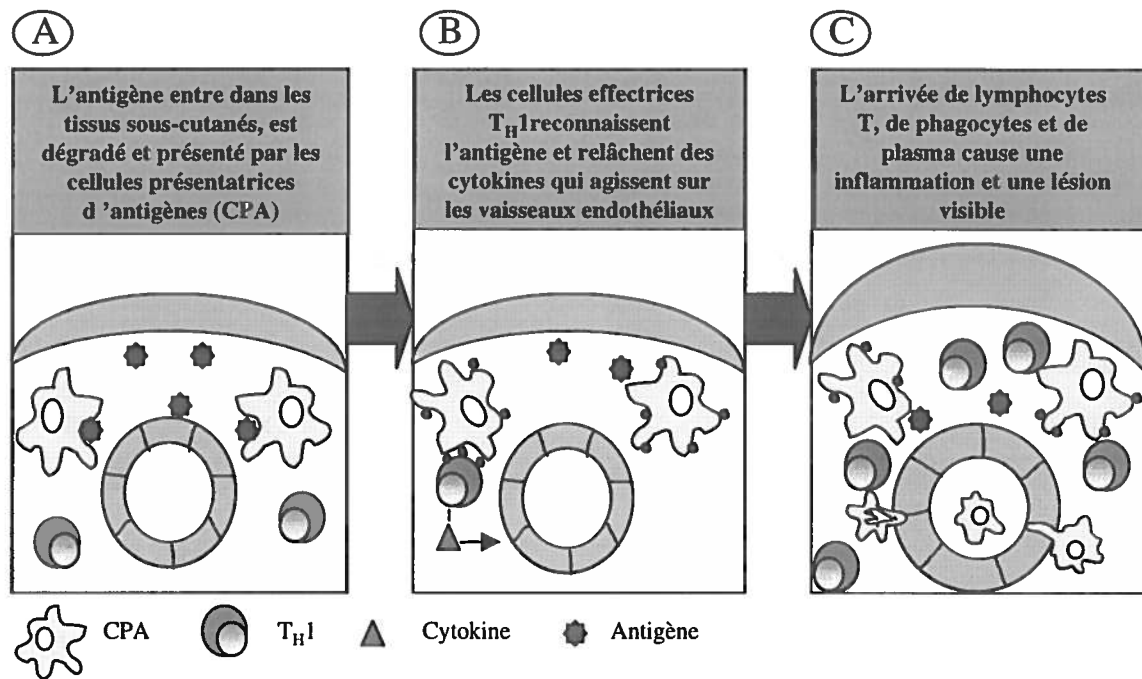
1.2.2. Hypersensibilité

D'autre part, les antigènes des xénobiotiques peuvent activer le système immunitaire. Dans de tels cas, ils provoquent une réaction exagérée du système immunitaire causant des réactions d'hypersensibilité et éventuellement des dommages à différents tissus. Ces réactions sont dues aux interactions entre les antigènes du produit chimique et leurs anticorps spécifiques ou aux interactions entre les antigènes et les lymphocytes effecteurs. Elles entraînent ensuite une cascade d'événements humoraux et cellulaires causant les effets pathophysiologiques observés.

Les réactions d'hypersensibilité sont les manifestations de l'immunotoxicité les mieux connues. L'habileté des produits chimiques, particulièrement ceux ayant un faible poids

moléculaire, d'induire une sensibilisation est généralement reliée à leur capacité de s'attacher à des protéines du corps. Ces molécules, liées à des protéines porteuses, sont alors appelées haptènes. Les haptènes ont la capacité d'initier des réponses humorales et cellulaires. En effet, une fois liés, ils peuvent être présentés, par des cellules présentatrices d'antigènes, à des lymphocytes qui seront activés (figure 2). Lorsqu'un individu est exposé une deuxième fois à ces haptènes, les lymphocytes effecteurs ayant déjà été activés une première fois, induiront des réactions d'inflammation causant différents symptômes, comme par exemple, des troubles respiratoires, gastro-intestinaux ou cutanés. Il est toutefois important de noter qu'une telle sensibilisation n'entraîne pas toujours le développement d'une maladie ou de symptômes.

Figure 2: Les étapes de l'hypersensibilité cutanée causée par l'interaction entre l'antigène et les lymphocytes (adapté de Janeway *et al*, 1999).



Lors du déclenchement d'une réaction d'hypersensibilité, la première étape est la capture et la présentation de l'antigène par les cellules présentatrices d'antigènes (A). Ensuite, les cellules T_H1 , ayant déjà été activées par le même antigène lors d'une exposition antérieure, migrent vers le site de la présentation et redeviennent activées (B). Puisque ces cellules T sont peu nombreuses dans le corps et qu'aucune inflammation n'est présente pour les attirer, plusieurs heures peuvent parfois être nécessaires avant que des cellules de la bonne spécificité arrivent au site de la présentation. Une fois au site, ces cellules relâchent des cytokines (B) qui agissent sur les

cellules endothéliales locales et recrutent les cellules responsables de l'inflammation (C). Une accumulation de plasma crée alors une inflammation et les symptômes cliniques de l'hypersensibilité cutanée apparaissent.

Certains pesticides utilisés en agriculture peuvent induire des réaction d'hypersensibilité de type allergique. Par exemple, certains animaux de laboratoire ont développé des anticorps IgE spécifiques, responsables des allergies, suite à une exposition au malathion (Vial *et al.*, 1996). De plus, une augmentation des cas d'asthme a été observée chez les fermiers utilisant l'insecticide carbamate (Vial *et al.*, 1996). Il est donc possible que des pesticides puissent créer des dommages au système immunitaire des travailleurs et des animaux vivants près des régions agricoles.

1.2.3. Autoimmunité

Une maladie autoimmune survient lorsque le système immunitaire d'un individu s'attaque à ses propres tissus ou organes. Ces maladies sont causées par la perte de la tolérance aux antigènes du soi. Une réponse autoimmune peut être produite directement via la circulation d'anticorps auto-réactifs, indirectement via la formation de complexes immuns ou encore via l'immunité cellulaire.

Une exposition à des xénobiotiques peut induire des maladies autoimmunes (Vial *et al.*, 1996). Toutefois, le mécanisme précis par lequel les produits chimiques induisent ces maladies n'est pas bien compris. Des prédispositions génétiques, des facteurs environnementaux et parfois une combinaison des deux peuvent mener à l'autoimmunité. Bien qu'il y ait peu d'études démontrant que les contaminants environnementaux peuvent induire des maladies autoimmunes (Luster *et al.*, 1990), il est probable que celles-ci soient induites chez les individus génétiquement sensibles alors que les individus résistants soient capables de tolérer des doses d'exposition plus élevées sans avoir d'effets secondaires (Gleichmann *et al.*, 1989).

Les xénobiotiques moduler le système immunitaire de plusieurs façons chez les animaux, incluant les humains. Ils peuvent supprimer ou stimuler le système immunitaire entraînant parfois des pathologies sévères. Il est également intéressant de noter que plusieurs mécanismes impliqués dans le fonctionnement du système immunitaire le sont aussi dans

l'embryogenèse et que bien des xénobiotiques immunosuppresseurs peuvent aussi agir comme tératogènes (Luster *et al.*, 1990). Il est alors bien important de comprendre les mécanismes d'action et les effets secondaires des xénobiotiques afin de protéger la faune et les populations exposées à ces polluants.

2. Déclin des populations d'amphibiens

Depuis le début des années 1970, un important déclin dans les populations d'amphibiens a été observé à travers le monde (Carey, 2000; Houlahan *et al.*, 2000) (Figure 3). Plusieurs populations ont fortement diminuées et apparaissent maintenant sur les listes d'espèces en voie d'extinction (Tableau 1). Leur disparition est inquiétante puisque ces animaux occupent une position clé dans la chaîne alimentaire. Ils contrôlent, entre autres, la quantité d'insectes et de plantes dans certains écosystèmes. La disparition d'amphibiens herbivores pourrait par la suite être la cause d'une augmentation de la croissance de certaines algues et ainsi d'une diminution de la quantité de nutriments pour d'autres espèces. Les amphibiens sont également à la base de la chaîne alimentaire pour plusieurs autres animaux. Par exemple, certaines espèces de serpents se nourrissent uniquement d'amphibiens et leurs populations pourraient diminuer fortement si leurs proies venaient à disparaître. Le déclin des populations d'amphibiens pourrait alors avoir d'importants effets sur plusieurs autres composantes des biotopes (Devillers et Exbrayat, 1992).

Figure 3: Régions les plus touchées par le déclin des populations d'amphibiens (identifiées par un ovale).

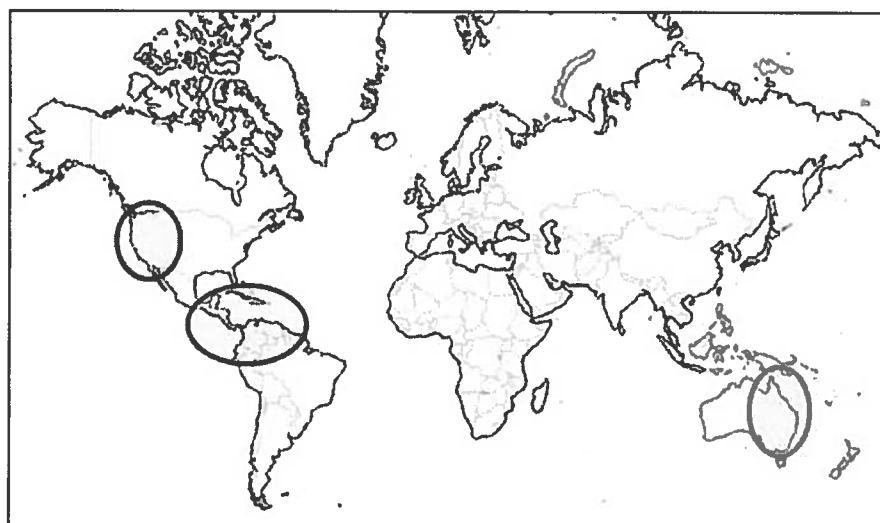


Tableau 1: Situation de différentes espèces d'amphibiens retrouvées à travers le monde (Blaustein *et al.*, 1994).

Espèces	Durée du suivi	Situation de la population	Bibliographie
<i>Bufo bufo</i> Crapaud commun	24 ans	Diminue	Blaustein <i>et al.</i> (1994)
<i>Bufo canorus</i> Crapaud Yosemite	12 ans	Diminue	Kagarise Sherman et Morton (1993)
<i>Bufo periglenes</i> Crapaud doré	9 ans	Diminue	Beebee <i>et al.</i> (1990)
<i>Bufo clamitans</i> Crapaud Natterjack	4 ans	Diminue	Crump <i>et al.</i> (1992)
<i>Rana pipiens</i> Grenouille léopard	10 ans	Extinction de 6 populations	Corn et Fogleman (1984)
<i>Rana sylvatica</i> Grenouille des bois	7 ans	Fluctue Diminue au Canada	Berven (1990) Blaustein <i>et al.</i> (1994)
<i>Pseudacris ornata</i> Grenouille ornata	12 ans	Fluctue	Blaustein <i>et al.</i> (1994)
<i>Eleutherodactylus coqui</i> Grenouille coqui	4 ans	Augmente	Woolbright (1991)
<i>Plethodon jordani</i> Salamandre joues rouges	5 ans	Stable	Hairston (1983)
<i>Plethodon glutinosus</i> Salamandre glissante	5 ans	Stable	Hairston (1983)
<i>Plethodon cinereus</i> Salamandre rouge-noire	14 ans	Stable	Jaeger (1980)
<i>Plethodon shenandoah</i> Salamandre shenandoah	14 ans	Diminue	Jaeger (1980)
<i>Ambystoma opacum</i> Salamandre marbrée	12 ans	Fluctue	Blaustein <i>et al.</i> (1994)
<i>Ambystoma talpoideum</i> Salamandre talpoideum	12 ans	Fluctue	Blaustein <i>et al.</i> (1994)
<i>Ambystoma tigrinum</i> Salamandre tigrée	12 ans	Fluctue	Blaustein <i>et al.</i> (1994)
<i>Ambystoma maculatum</i> Salamandre tachetée	5 ans	Fluctue	Husting (1965)

Les espèces en gris représentent les espèces présentes au Canada

2.1. Situation des espèces de grenouilles au Canada

La grenouille léopard ou *Rana pipiens*, était jadis présente un peu partout au Canada et dans le nord des États-Unis. Toutefois, entre les années 1970 et 1980, cette espèce a diminué en nombre dans les régions ouest de ces deux pays, telles qu'en Colombie Britannique, en Oregon et dans l'état de Washington. Elle est également disparue de plusieurs sites de reproduction dans les grandes prairies canadiennes (Manitoba, Saskatchewan et Alberta).

Les causes exactes du déclin dans ces régions ne sont pas connues. Il semble que personne n'ait étudié ces causes au moment le plus fort du déclin (Waye et Cooper, 1999, résultats non-publiés).

D'autres chercheurs ont constaté que plusieurs amphibiens, comme la grenouille verte (*Rana clamitans*), le crapaud américain (*Bufo americanus*) et le ouaouaron (*Rana catesbeiana*), souffraient de plusieurs malformations dans les régions agricoles situées dans la vallée du Saint-Laurent au Québec (Canada) (Ouellet *et al.*, 1997). Dans le sud du Québec, près des régions où sont cultivés intensément la pomme de terre et le maïs, les pesticides contaminent souvent les eaux souterraines et les cours d'eau situés à proximité. Des études de populations de grenouilles vivants dans ces régions ont démontré que plus de 10% des animaux avaient des malformations comme des ectomalies (absence de membres) ou des ectodactilies (absence de doigts). Toutefois, ces malformations ne dépassaient pas 1% dans les sites de référence avec très peu de pesticides dans l'environnement (Burkhart *et al.*, 1998).

2.2. Causes responsables du déclin des populations d'amphibiens

Puisque la disparition des amphibiens a été observée à l'échelle de la planète, il est difficile de croire qu'elle puisse être due à des fluctuations normales de populations (Pechmann et Wilbur, 1994). Les causes exactes de ce déclin ne sont pas encore bien comprises. La communauté scientifique s'entend toutefois pour déclarer que le haut taux de mortalité est probablement dû à plusieurs facteurs interagissant les uns avec les autres. Les différentes causes ayant été ciblées jusqu'à présent sont les suivantes : la destruction de l'habitat naturel des amphibiens (Boyer et Grue, 1995; Dunson *et al.*, 1992; Wake, 1991; Blaustein *et al.*, 1994), l'introduction d'espèces exotiques (Hayes et Jennings, 1986), la consommation des cuisses de grenouilles (Oza, 1990; Phillips, 1994), la détérioration de la qualité de l'eau (Boyer et Grue, 1995), les changements climatiques (Pounds, 2001; Kiesecker *et al.*, 2001), l'augmentation de l'exposition aux rayons ultraviolets (Kiesecker *et al.*, 2001; Kiesecker et Blaustein, 1995), l'augmentation de la quantité de polluants ou de pesticides dans l'environnement (Boyer et Grue, 1995; Carey *et al.*, 1999; Rollins-Smith, 1998; Carey et Bryant, 1995) et finalement l'apparition ou la prolifération de certains pathogènes

spécifiques aux amphibiens (Carey *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 1998; Carey, 2000; Johnson *et al.*, 1999).

2.2.1. Destruction de l'habitat naturel

Une seule cause contribuant à la disparition des amphibiens fait actuellement l'unanimité auprès de la communauté scientifique: la destruction de leur habitat naturel (Boyer et Grue, 1995). De nombreux articles et rapports ont démontré que cette destruction dans plusieurs régions contraignait les amphibiens à vivre et à se reproduire dans des endroits restreints, augmentant ainsi leur stress et leur taux de mortalité (Boyer et Grue, 1995). La destruction de l'habitat des amphibiens est importante dans plusieurs régions du globe. Par exemple, aux États-Unis, on estime entre 60-75 millions d'hectares le nombre de marais ayant été asséchés jusqu'à maintenant (Mitsch et Gosselink, 1986). En moyenne, 185 000 hectares ou 8.5% des marécages sont asséchés chaque année et il ne reste présentement que 58% des marais qui existaient dans les années 1960 aux États-Unis (Mitsch et Gosselink, 1986). Il semble donc clair que la diminution des ressources contribue grandement au déclin des populations d'amphibiens.

2.2.2. L'introduction d'espèces exotiques

Plusieurs autres facteurs, comme l'introduction d'espèces exotiques, peuvent contribuer au déclin des populations d'amphibiens (Hayes et Jennings, 1986). Ces espèces peuvent entrer en compétition avec les espèces indigènes pour la nourriture et les espaces de reproduction. Elles peuvent également s'en nourrir et ainsi contribuer à leur disparition. Par exemple, aux États-Unis, il a été observé que les populations de grenouilles diminuaient dans les régions où on avait introduit une nouvelle espèce de poisson, *Micropterus salmoïdes* (Boyer et Grue, 1995). Ces poissons, introduits dans l'environnement pour satisfaire les amateurs de pêche sportive, constituent, en effet, des prédateurs importants pour les amphibiens puisqu'ils se nourrissent aussi bien des œufs et des larves que des adultes. Cette observation démontre effectivement que les espèces introduites peuvent parfois contribuer à la disparition des amphibiens.

2.2.3. La consommation de cuisses de grenouilles

Bien que la consommation des cuisses de grenouilles ne soit pas la première cause responsable du déclin mondial dans les populations d'amphibiens, elle peut y contribuer dans certaines régions du globe. Aux Indes par exemple, la chasse aux grenouilles pour fin de vente et d'exportation a directement contribué à la diminution de la population (Oza, 1990).

2.2.4. La détérioration de la qualité de l'eau

La majorité des études faites en toxicologie aquatique auparavant évaluait la sensibilité des poissons et des invertébrés à différentes substances toxiques présentes dans l'eau (Boyer et Grue, 1995). Toutefois, depuis les années 1980, d'autres études ont démontré que les amphibiens étaient autant et souvent même plus sensibles, aux contaminants et aux variations de la qualité de l'eau, que les autres espèces aquatiques (Hall et Henry, 1992; Power *et al.*, 1989; Holcomb *et al.*, 1987). Les activités humaines, telles que les déversements d'effluents municipaux et industriels dans les cours d'eau ou encore l'agriculture massive en bordure des environnements aquatiques, peuvent diminuer la qualité de l'eau. Ces activités induisent des variations de pH, ainsi que des changements dans les concentrations d'oxygène dissout, de nitrates et de pesticides présents dans l'eau. Des variations dans chacun de ces paramètres affectent la santé des amphibiens (Boyer et Grue, 1995). En effet, des études ont démontré que l'acidification des eaux diminuait la fertilisation des œufs et la croissance des grenouilles (Beattie et Tyler-Jones, 1992). De plus, les nitrates contribuent à la croissance des algues réduisant ainsi la quantité de lumière pénétrant dans l'eau. Ceci diminue par la suite, le développement d'autres plantes aquatiques ce qui réduit la nourriture disponible pour certains amphibiens. D'autres chercheurs ont observé que les nitrates avaient la propriété de réduire l'appétit et l'activité physique des têtards, entraînant une perte de poids et une forte mortalité chez les animaux (Rouse *et al.*, 1999). La réduction de l'activité physique et de l'appétit des têtards pourraient s'expliquer en partie par le fait que les nitrates ont la propriété d'induire différentes anomalies chez les

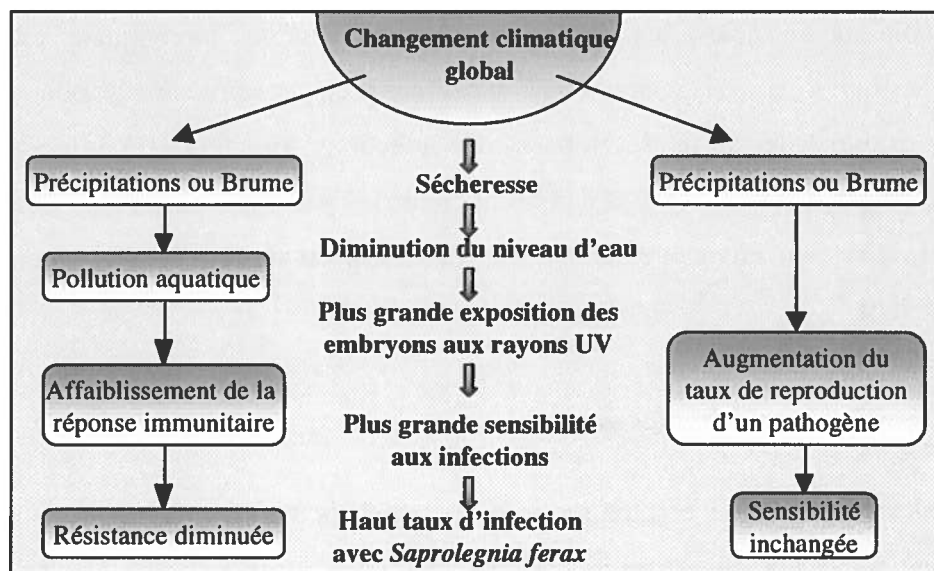
larves, telles que des malformation dans la queue, la tête et le système digestif. Le stress produit par une exposition aux nitrates entraîne également une diminution dans le nombre de globules blancs (Dappen, 1983). Une revue de l'effet des pesticides sur la santé des amphibiens sera effectuée au chapitre quatre de ce présent mémoire.

2.2.5. Pathogènes spécifiques aux amphibiens, changements climatiques, rayons ultraviolets et qualité de l'eau

Il est relativement facile de déterminer les causes de mortalité dans les endroits où il y a une destruction évidente de l'habitat, par exemple, lors de l'assèchement des marais ou lors des coupes de bois massives près des cours d'eau. Il est toutefois plus difficile de cibler les facteurs influençant un tel déclin dans les environnements peu perturbés par les activités humaines, tels que dans les parcs nationaux ou les réserves fauniques. Les fortes mortalités, observées dans ce genre d'environnement, sont souvent causées par des épidémies décimant la majorité des populations. La raison pour laquelle les populations d'amphibiens semblent plus sensibles qu'auparavant à différents pathogènes n'est pas très bien comprise. Plusieurs hypothèses ont été émises pour tenter d'expliquer ce phénomène. Il est possible que les amphibiens soient exposés à de nouveaux pathogènes plus virulents, causant la mort avant même que le système immunitaire ne développe une réponse adéquate (Carey, 1993). Ces organismes ont pu récemment évoluer d'une forme non-pathogène à une forme pathogène ou ont pu être introduits dans de nouveaux environnements par les activités humaines (Carey, 1993). Il est aussi probable que ces pathogènes soient capables d'immunosupprimer leurs hôtes, tout comme le virus du SIDA chez l'homme (Carey, 1993). Une troisième hypothèse est que différents changements environnementaux, comme des changements climatiques, une augmentation de l'exposition aux rayons UV ou une augmentation de la concentration de certains polluants dans l'eau, ont pu altérer le système immunitaire des amphibiens et les rendre plus sensibles aux différents pathogènes se trouvant dans leur environnement (Carey, 1993). Il est important de noter que ces hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives et qu'une augmentation des épidémies puisse être due à la fois à un changement dans le nombre et la virulence des pathogènes ainsi que dans l'efficacité du système immunitaire des amphibiens.

Kiesecker *et al.* (2001) ont récemment proposé un modèle pour tenter d'expliquer le rôle que les changements climatiques et les rayons UV pourraient jouer dans le déclin des populations d'amphibiens. Selon ce modèle, lorsque les précipitations sont réduites, les œufs d'amphibiens sont plus exposés aux rayons UV qui sont susceptibles d'induire des malformations chez les embryons et de les rendre plus sensibles à certaines infections. En effet, les œufs se développant dans les lacs et les étangs sont souvent exposés à la lumière directe du soleil. Normalement, la couche d'eau recouvrant ces œufs atténue énormément les rayons UV pouvant les atteindre et les endommager. Lorsque les précipitations sont réduites, cette couche protectrice diminue ce qui augmente l'exposition des œufs aux rayons du soleil. Dans certaines régions comme le nord-ouest des États-Unis, la quantité de précipitations est intimement liée aux cycles d'El Niño. L'augmentation de la fréquence et de l'amplitude de ces cycles, suite au réchauffement de l'océan Pacifique, pourrait éventuellement diminuer la quantité de précipitations dans ces régions. Ceci augmenterait l'exposition des œufs aux rayons UV et contribuerait à la mort de plusieurs d'entre eux (Kiesecker *et al.*, 2001) (Figure 4).

Figure 4: Modèle proposé par Kiesecker *et al.* (2001) pour expliquer les liens existants entre les changements climatiques et le déclin dans les populations d'amphibiens.



Au centre de la figure : les événements contribuant à la disparition des grenouilles. À gauche: des changements locaux, dans la quantité de précipitations tombant à chaque jour ou dans la quantité de brume présente dans les forêts tropicales, augmentent la concentration de produits chimiques dans les microenvironnements habités par les amphibiens. Une diminution de la réponse immunitaire, associée à une suppression par les polluants, accroît le risque d'infection par des pathogènes. À droite: des changements locaux, dans la quantité de précipitations tombant à chaque jour ou dans la quantité de brume présente dans les forêts tropicales, augmentent le taux de reproduction d'un pathogène alors que la sensibilité des amphibiens à ce pathogène demeure la même.

Une diminution dans la quantité de précipitations pourrait également augmenter la concentration de polluants retrouvés dans l'environnement des amphibiens. Si tel est le cas, ces contaminants pourraient avoir des effets immunotoxiques. La sensibilité des amphibiens à certaines infections serait ainsi augmentée. Il a d'ailleurs été observé, par le groupe de Kiesecker (2001) et de Pounds (1999), que les embryons de crapauds (*Bufo boreas* ou crapaud américain) vivants dans des régions où la quantité de précipitations était faible, contractaient plus souvent des infections avec le pathogène létal *Saproligenia ferax*. Une diminution dans la quantité de précipitations tombant à chaque jour pourrait également affecter les amphibiens en augmentant le taux de reproduction d'un pathogène sans modifier toutefois la sensibilité de ces animaux à ce pathogène. Le taux d'infection pourrait ainsi augmenter.

Dans des conditions normales, les amphibiens ont un système immunitaire efficace ressemblant beaucoup à celui des mammifères. Il peut les protéger contre une grande variété de pathogènes et empêcher qu'ils développent des infections chroniques. Afin de mieux comprendre comment les amphibiens se défendent contre les pathogènes retrouvés dans leur environnement, la section suivante résumera les grands aspects de la réponse immunitaire chez les amphibiens.

3. Le système immunitaire des amphibiens

Les amphibiens sont considérés comme les premiers vertébrés à avoir effectué la transition d'une vie aquatique à une vie terrestre. Même s'ils sont apparus il y a 150 millions d'années, ils peuvent nous aider à comprendre les différents changements, physiologiques,

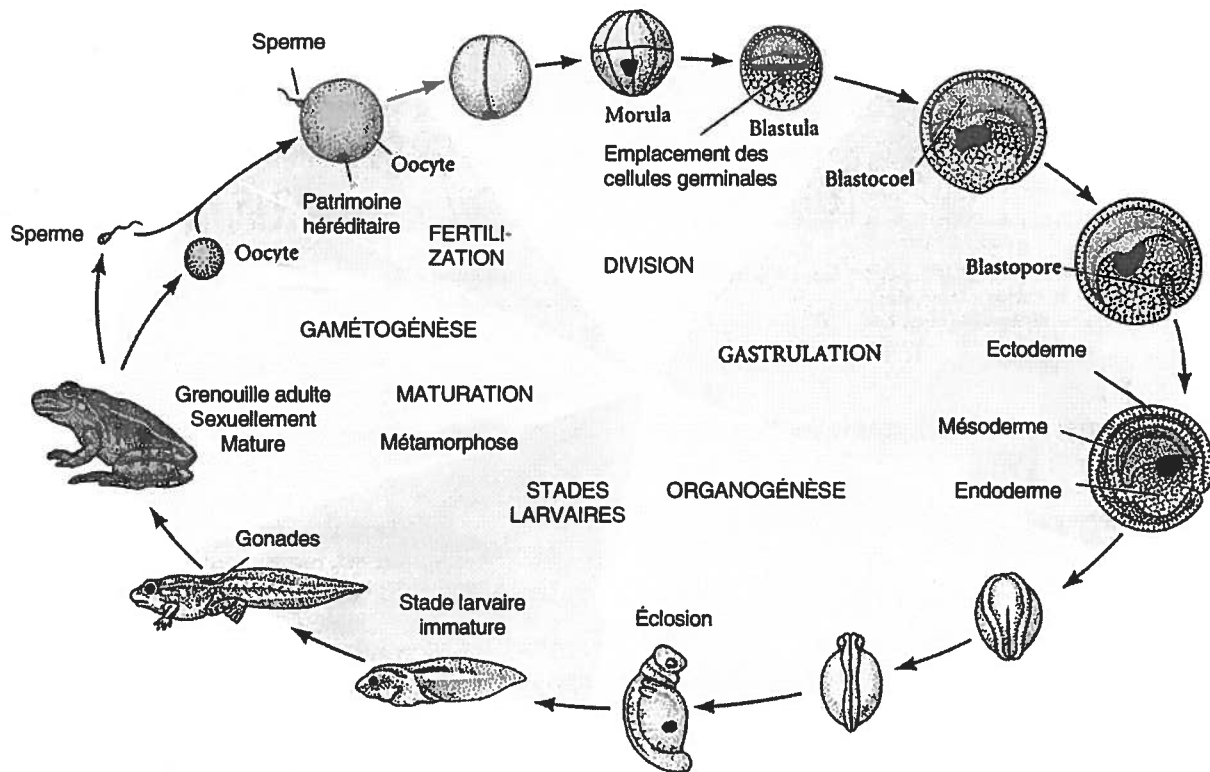
anatomiques, moléculaires et génétiques, qui ont permis aux grands vertébrés de survivre et de s'adapter à la vie terrestre (Flajnik, 1996). Pendant cette transition, le système immunitaire a évolué et a permis aux amphibiens de se défendre contre les pathogènes aussi bien en milieu aquatique que terrestre.

La majorité des études portant sur le système immunitaire des amphibiens ont été effectuées avec *Xenopus laevis*, un modèle expérimental privilégié par les chercheurs dû à la facilité avec laquelle cette espèce peut être élevée en laboratoire. Les éléments décrits dans cette section résumeront les connaissances actuelles sur le système immunitaire de cette espèce.

3.1. Les changements dans le système immunitaire lors de la métamorphose

Les grenouilles doivent passer par plusieurs stades afin d'atteindre l'âge adulte (Figure 5). À chacun de ces stades, leur système immunitaire se développe afin de devenir complètement compétent lorsque les grenouilles atteindront la maturité.

Figure 5 : Stades de développement des grenouilles



Pour survivre de façon autonome dans un environnement aquatique, les têtards doivent accélérer le développement de chacun de leurs organes afin qu'ils soient fonctionnels le plus rapidement possible (Flajnik *et al.*, 1987). La rapidité, privilégiée au détriment de la complexité, fait en sorte que certains organes et systèmes ne se développent pas complètement. Le système immunitaire est un des ces systèmes. En effet, bien que les têtards aient un système immunitaire compétent capable de les protéger contre d'éventuels pathogènes (Rollins-Smith, 1998), il est moins développé que celui des anoues adultes.

Contrairement à l'embryogenèse, qui mène à un développement progressif depuis l'état de l'œuf à l'état adulte, la métamorphose implique la perte et le remplacement subséquent de différents organes et fonctions. Lors de cette période, les têtards acquièrent plusieurs antigènes adultes (Just *et al.*, 1977; Morris, 1987; Ellison *et al.*, 1985; Wahli *et al.*, 1981) suite à l'apparition de nouvelles structures. Toutefois, leur système immunitaire ne reconnaît pas ces antigènes comme faisant partie du soi. Une réponse autoimmune contre ces antigènes pourrait se développer. Afin d'éviter une telle réponse, le développement du système immunitaire des anoues s'effectue en deux étapes (Rollins-Smith, 1998). Lorsque les têtards atteignent la métamorphose, leur système immunitaire est inhibé afin d'empêcher une réponse autoimmune contre les nouveaux antigènes adultes. Le nombre de lymphocytes T diminue d'environ 40% lors de la métamorphose. Cette baisse semble être causée par une augmentation de la concentration d'hormones corticostéroïdes (induisant l'apoptose) dans l'organisme. Suite à cette perte de lymphocytes T, le thymus est ensuite recolonisé par une seconde vague de lymphocytes qui, cette fois, persiste et est tolérante aux antigènes adultes.

3.2. La structure du système immunitaire

3.2.1. Le thymus et les lymphocytes T

Le rôle principal du thymus chez les mammifères est de produire des lymphocytes T. Toutefois, chez les têtards, ces lymphocytes sont fabriqués dans d'autres organes lymphoïdes pour ensuite migrer vers le thymus et le coloniser (DuPasquier *et al.*, 1989). Les cellules souches lymphocytaires sont produites dans un îlot ventral (ventral blood island) et dans la

plaque dorsale du mésoderme. Pour le moment, il est encore difficile de comprendre les fonctions exactes des cellules produites dans ces organes lymphoïdes. Ce sont probablement des cellules transitoires migrant vers le thymus et se différenciant ensuite en cellules accessoires ou en thymocytes.

Tout comme chez les mammifères, il existe deux types de lymphocytes T chez les anoures: les CD4 et les CD8, caractérisées respectivement par l'expression de molécules CD4 et CD8 à leur surface. Les lymphocytes CD4 activent d'autres cellules, comme les lymphocytes B (pour la production d'anticorps), via leurs récepteurs T (RcT), tandis que les CD8, aussi nommée lymphocytes cytotoxiques, tuent les cellules infectées par des virus. Il existe toutefois des différences entre les lymphocytes T de grenouilles adultes et ceux de têtards. Premièrement, les lymphocytes T de têtards ne possèdent pas de complexes majeurs d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) à leur surface, contrairement à ceux des grenouilles adultes. Ce n'est qu'après la métamorphose que le thymus est repeuplé avec une deuxième vague de lymphocytes possédant des CMH-II. Deuxièmement, les lymphocytes de têtards, contrairement aux grenouilles adultes, ne fabriquent pas l'équivalent de l'interleukine-2 (IL-2) retrouvée chez les mammifères (Rollins-Smith, 1998). Cette molécule est surtout importante dans le développement d'une réponse immunitaire acquise, ce qui suggère que les têtards ne sont pas capables de bâtir une telle réponse de façon aussi efficace que les adultes.

3.2.2. La rate et les lymphocytes B

Chez les grenouilles, la rate possède à la fois des caractéristiques d'organes lymphoïdes primaires et secondaires. Elle assure l'activation des lymphocytes et constitue un site d'hématopoïèse pour les granulocytes, les érythrocytes et les lymphocytes. Toutefois, les lymphocytes n'y prolifèrent pas en agglomérations comme dans les centres germinaux des mammifères (Manning, 1991).

3.2.3. Autres organes lymphoïdes

Les grenouilles possèdent certains organes lymphoïdes qui ne sont pas présents chez les mammifères. Ces organes peuvent être des sites d'hématopoïèse ou d'activation des

lymphocytes. En effet, il existe des nodules lymphoïdes dans les intestins des anoures adultes rappelant les plaques de Peyer retrouvées chez les mammifères. Ces nodules sont très riches en lymphocytes B et en plasmocytes produisant les anticorps IgM et IgX (DuPasquier *et al.*, 1989). De plus, le foie semble jouer un rôle très important dans la production de lymphocytes B (Hansen et Zapata, 1998) et dans la séquestration des antigènes (DuPasquier *et al.*, 1989).

3.3. L'immunité naturelle

La réponse immunitaire innée procure à l'organisme une protection rapide et non-spécifique. Chez les amphibiens, la capacité de fabriquer des peptides antimicrobiens est une des composantes de cette réponse immunitaire. Le mécanisme d'action de ces molécules n'a toutefois pas été bien étudié. Il est seulement connu que les amphibiens ont la capacité, après la métamorphose, de fabriquer de petits peptides antimicrobiens, comme les magainines, à la surface de leur peau et dans leurs voies gastro-intestinales. Ces peptides sont utilisés comme une des premières barrières de résistance contre différents pathogènes retrouvés dans l'environnement (Mor *et al.*, 1991).

Tout comme les autres vertébrés, les amphibiens possèdent des cellules phagocytaires (macrophages et neutrophiles) capables d'ingérer des pathogènes. Ils possèdent aussi un système du complément pouvant attaquer des bactéries directement, via l'activation de la voie alternative, ou indirectement avec l'action des anticorps via la voie classique (Carey *et al.*, 1999).

La présence de cellules NK ou « natural killer cells » est une autre composante importante de la réponse immunitaire innée. Ces cellules reconnaissent et tuent les cellules cancéreuses ainsi que celles infectées par des virus et des pathogènes intracellulaires. Elles reconnaissent plus spécifiquement les cellules déficientes dans la présentation des CMH-I à leur surface. Chez les anoures, les cellules NK semblent apparaître seulement après la métamorphose (Robert et Cohen, 1998). L'absence de ces cellules chez les têtards n'est pas surprenante puisque les molécules de CMH-I ne sont présentes que chez les grenouilles adultes. En effet, si les NK étaient présents chez les animaux ne possédant pas de CMH-I, ceux-ci

pourraient développer une réponse autoimmune (Horton *et al.*, 1998). Ainsi, même si les têtards ont une forme de résistance aux tumeurs, l'absence de cellules NK les rend probablement beaucoup plus sensibles à différents types de cancers et d'infections virales que les grenouilles adultes (Horton *et al.*, 1998).

3.4. L'immunité acquise

La réponse immunitaire acquise apparaît un certain temps après la détection d'antigènes étrangers. Elle est hautement spécifique pour un pathogène en particulier et permet la formation de cellules mémoires, capables de reconnaître rapidement les antigènes auxquels le corps a été préalablement exposé. Les amphibiens possèdent une bonne réponse immunitaire acquise, bien qu'elle soit moins rapide et moins spécifique que celle observée chez les mammifères.

3.4.1. Les complexes majeur d'histocompatibilité

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, présentes sur les cellules présentatrices d'antigènes, sont très importantes dans l'activation des lymphocytes T. Les CMH-I présentent les antigènes aux cellules CD8 alors que les CMH-II présentent les antigènes aux cellules CD4. Chez les anoures, la distribution des CMH-I et II change lors de la métamorphose (Kaufman *et al.*, 1990). En effet, chez les têtards, les CMH-II sont présents sur les cellules du stroma dans le thymus, les lymphocytes B, les macrophages et certaines cellules de la peau. Après la métamorphose, ils apparaissent sur les thymocytes et les lymphocytes T. Quant aux CMH-I, ils sont absents lors du stade larvaire et apparaissent à la surface de la plupart des cellules après la métamorphose. Puisque ces molécules sont absentes chez les têtards, il est peu probable que les lymphocytes T cytotoxiques, spécifiques aux CMH-I, soient présents à ce stade de développement. La raison pour laquelle les têtards ne possèdent pas de CMH-I n'est pas encore très bien comprise. Certains croient qu'ils sont absents puisque le nombre de lymphocytes présents est trop petit pour qu'il y en ait deux populations alors que d'autres suggèrent que l'absence de ces molécules empêcherait la destruction de cellules adultes, étrangères aux lymphocytes larvaires, lors de la métamorphose (DuPasquier *et al.*, 1989).

3.4.2 Les immunoglobulines

Tous les anticorps font partie d'une famille de protéines appelées immunoglobulines. Les grenouilles possèdent seulement trois types d'immunoglobulines : IgM, IgY et IgX (Rollins-Smith, 1998). Les IgM sont présents à de fortes concentrations dans le plasma et sont les premiers anticorps fabriqués lors d'une réponse immunitaire. Ils sont nombreux mais ont peu d'affinité. Les IgY, quant à eux, sont l'équivalent des IgG retrouvés chez les mammifères. Ils constituent la deuxième vague d'anticorps fabriqués et ont beaucoup d'affinité pour leurs antigènes lors d'une réponse immunitaire acquise. Finalement, les IgX sont retrouvés sur les lymphocytes B présents dans la voie gastro-intestinale (DuPasquier *et al.*, 1989). Leur rôle n'est pas encore très bien compris mais il est probable qu'ils soient l'équivalent des IgA retrouvés dans les muqueuses des mammifères.

3.4.3 La diversité des anticorps dans la réponse humorale

Chez les amphibiens, la réponse humorale est moins efficace que celle observée chez les mammifères. Les anticorps, fabriqués suite à une exposition à différents antigènes, semblent avoir moins d'affinité que les anticorps de mammifères (Hsu, 1998). De plus, cette affinité n'augmente pas dans le temps ou lors d'une seconde exposition au même antigène (Mor *et al.*, 1991). Le répertoire d'anticorps fonctionnels des amphibiens apparaît donc moins élaboré que celui des mammifères. Toutefois, la diversité des anticorps, créée par la recombinaison des régions V, D, J et C des gènes d'immunoglobulines, est aussi élevée que celle des mammifères (Mor *et al.*, 1991). De plus, les amphibiens possèdent les enzymes de recombinaison RAG ("Recombination Activating Genes enzymes") et TdT ("Terminal deoxynucleotidyl Transferase"), contribuant à la diversité des anticorps (Flajnik, 1996). Le manque d'efficacité de la réponse humorale et d'anticorps fonctionnels n'est donc pas dû au manque d'hypermutations et de recombinaisons. Il semble plutôt qu'une mauvaise sélection des anticorps ayant une haute affinité soit l'explication à ce phénomène (Hsu, 1998). Chez les mammifères, la sélection des anticorps de haute affinité est effectuée dans les centres germinaux. Cependant, les anoues ne possèdent pas ces structures particulières. Il est donc

probable qu'il n'existe pas de région spécifique chez les anoures pour effectuer une telle sélection. Ainsi, même si des lymphocytes B pouvant se différencier en plasmocytes sécrétant des anticorps de haute affinité sont créés, ceux-ci ne peuvent pas être adéquatement sélectionnés pour ensuite proliférer, se différencier et bâtir une défense humorale efficace (Hsu, 1998).

3.5 La tolérance

La tolérance est l'absence de réponse contre un antigène. La tolérance aux antigènes du soi est une caractéristique essentielle du système immunitaire; lorsque qu'elle est perdue, le système immunitaire peut détruire l'organisme. Le processus de tolérance est bien contrôlé chez les anoures. Avant la métamorphose, le système immunitaire des têtards est très tolérant (DuPasquier *et al.*, 1989). Il est d'ailleurs assez facile d'effectuer des greffes chez les têtards sans provoquer de réponse immunitaire puisque leur système immunitaire ne fait pas la différence entre les CMH du soi et du non-soi lorsque ceux-ci sont très peu différents. Toutefois, après la métamorphose, lorsque la deuxième vague de lymphocytes T envahit le thymus, une tolérance beaucoup plus efficace se développe. Le système immunitaire est alors capable de reconnaître spécifiquement les antigènes du soi et du non-soi afin de pouvoir mettre en place une réponse immunitaire adéquate.

Normalement, les amphibiens ont un système de défense bien développé, capable de monter une réponse immunitaire acquise efficace et sophistiquée (Rollins-Smith, 1998). L'augmentation de diverses infections, entraînant depuis plusieurs années un taux élevé de mortalité chez ces animaux, ne peut donc pas être expliquée par le fait qu'ils aient un système immunitaire « pauvre » et primitif. L'augmentation de la virulence des pathogènes ou la baisse de l'efficacité du système immunitaire des amphibiens, suite à l'action de divers facteurs environnementaux, pourrait expliquer l'augmentation des infections. Dans la section suivante nous résumerons spécifiquement les différents facteurs connus, naturels ou artificiels (créés par les activités humaines), pouvant moduler les fonctions immunitaires des amphibiens.

4 Modulateurs du système immunitaire des amphibiens

Plusieurs facteurs peuvent induire une modulation du système immunitaire des amphibiens. Certains sont d'origine naturelle tandis que d'autres sont créés directement ou indirectement par les activités humaines. Parmi les facteurs naturels, des variations de température corporelle, engendrées par des changements climatiques, peuvent premièrement amoindrir l'efficacité du système immunitaire (Cooper *et al.*, 1992; Maniero et Carey, 1997). Par exemple, il a été observé que le système immunitaire des grenouilles était moins efficace lors de l'hibernation (Cooper *et al.*, 1992). Deuxièmement, les changements engendrés lors de la métamorphose peuvent également inhiber ce système de façon passagère. Dans des conditions normales, le système immunitaire des amphibiens est capable de les protéger pendant cette suppression passagère. Toutefois, il est possible que la perte de lymphocytes soit accentuée dans de mauvaises conditions environnementales. Dans de tels cas, les animaux peuvent devenir plus sensibles à certaines maladies ou infections. Il est donc important d'étudier l'effet du stress environnemental sur le système immunitaire et de connaître les stades de développement durant lesquels les pathogènes attaquent les amphibiens et ceux durant lesquels les mécanismes du système immunitaire deviennent fonctionnels. Ces connaissances nous aideront à mieux comprendre comment certains pathogènes échappent aux défenses immunitaires des amphibiens.

4.1 Effets des rayons ultraviolets sur le système immunitaire

Un agent stressant est défini comme étant un agent capable de rompre l'homéostasie existant chez un animal. Tout stress environnemental peut avoir des effets directs ou indirects, sur le système immunitaire. Plusieurs facteurs, dont les rayons ultraviolets et les xénobiotiques, peuvent contribuer au stress des animaux et ainsi réduire certaines fonctions de leur système immunitaire (Vermeer et Hurks, 1994). Par exemple, les défenses antitumorales et la capacité de reconnaître les antigènes étrangers sur la peau sont diminuées suite à une exposition aux rayons UV. Les chances d'infections cutanées par des champignons, des bactéries, des virus ou des parasites sont ainsi augmentées (Selgrade *et al.*, 1997).

4.2 Les pesticides et les amphibiens

Dans plusieurs régions du globe, l'expansion de l'agriculture réduit la superficie et la qualité de l'eau des endroits où les grenouilles vivent et se reproduisent, contribuant à l'appauvrissement général des populations d'amphibiens (Bonin *et al.*, 1997). Les concentrations de pesticides retrouvées dans les cours d'eau excèdent fréquemment les taux recommandés pour protéger les espèces aquatiques (Berryman et Giroux, 1994). Les grenouilles sont souvent exposées à ces pesticides puisqu'elles se reproduisent dans les étangs peu profonds situés dans des régions agricoles (Bridges, 2000). La situation est encore plus critique lors de l'épandage des pesticides, au moment où une forte concentration de produits chimiques se retrouve dans ces étangs. Avec leur peau excessivement perméable, les amphibiens peuvent absorber plus facilement les polluants que d'autres types d'animaux (Lambert, 1997). Puisque les amphibiens ont un métabolisme lent et sont des organismes poïkylotermes, ils n'ont pas la même habilité de désintoxication que les mammifères (Lambert, 1997). Les pesticides s'accumulent dans leur corps et peuvent endommager leur santé de façon temporaire ou permanente. Peu d'études analysant l'effet des xénobiotiques sur différentes populations d'amphibiens sont présentement disponibles et les effets immunotoxiques des pesticides, aux concentrations retrouvées dans l'environnement, ne sont pas encore très bien connus chez ces animaux. La majorité des études ont été effectuées sur des mammifères (Sharma et Reddy, 1987) et différentes espèces de poissons (Luebke *et al.*, 1997; O'Halloran *et al.*, 1996; Zelikoff *et al.*, 1996; Karen *et al.*, 1996). Seulement quelques études nous démontrent que certains contaminants environnementaux peuvent avoir un effet sur le système immunitaire des amphibiens.

4.2.1 Effets immunotoxiques connus des produits chimiques sur les amphibiens

Plusieurs disparitions locales d'amphibiens ont été associées avec différents types d'infections par des pathogènes opportunistes (Worthylake et Hovingh, 1989; Carey, 1993; Cunningham *et al.*, 1996; Berger *et al.*, 1998; Carey, 2000; Johnson *et al.*, 1999). Une

suppression directe ou indirecte du système immunitaire par des contaminants environnementaux pourrait expliquer en partie ce phénomène.

Certaines études ont déjà démontré que les pesticides organochlorés ont la capacité d'inhiber, chez les mammifères, la chimotaxie des neutrophiles (Hermanowicz et Kassman, 1984) ainsi que certaines fonctions immunitaires des macrophages et des lymphocytes en culture (WHO, 1986). Les effets de ces polluants sur le système immunitaire des amphibiens n'ont toutefois pas encore été étudiés. Cependant, Gromysz-Kalkowaska et Szubartowska (1993) ont démontré qu'un pesticide utilisé en Pologne et appartenant aux organochlorés, le tétrachlorvinfos, avait la propriété de moduler la concentration de leucocytes dans le sang des amphibiens. Des grenouilles *Rana temporaria*, exposées à de fortes doses de ce produit (0.0125 mg/g et plus), subissaient une baisse importante dans leur nombre de lymphocytes et de basophiles ainsi qu'une hausse dans leur nombre de neutrophiles. Le mécanisme par lequel ce pesticide diminue les niveaux de certains leucocytes n'est pas bien compris. Il est possible qu'il s'attaque aux cellules directement en lysant leurs membranes ou indirectement en induisant la sécrétion d'hormones corticostéroïdes qui, elles-mêmes, pourraient activer des nucléases plasmatiques (Gromysz-Kalkowska et Szubartowska, 1993). Le mécanisme par lequel cet organochloré augmente le nombre de neutrophiles est toutefois plus clair. Il a été observé chez des grenouilles, provenant de sites contaminés, que cette augmentation était souvent accompagnée par l'apparition d'un grand nombre de neutrophiles immatures. Il serait donc fortement probable que ce pesticide, ainsi que d'autres, ait la propriété de perturber le cycle de différenciation des neutrophiles et même d'endommager les cellules souches (Chernyskova et Starostin, 1994). Ceci impliquerait alors que le nombre de neutrophiles dans le sang serait plus élevé mais que ces cellules seraient moins matures et moins efficaces contre les pathogènes.

Lorsque les lymphocytes, les éosinophiles et les neutrophiles sont affectés, il y a une augmentation des risques d'infection par différents parasites, bactéries ou même virus. Taylor *et al.* (1999) ont démontré qu'un autre pesticide faisant partie de la classe des organophosphorés, le malathion, avait la propriété de diminuer la résistance de certains crapauds à une bactérie, *Aeromonas hydrophila*, responsable de la maladie des jambes

rouges ou "red leg disease", une maladie ayant été la cause d'une importante mortalité chez les amphibiens. Le groupe de Taylor a exposé les animaux à de fortes concentrations du pesticide (0.011 mg/g et 0.0011 mg/g) et leur a injecté par la suite la bactérie. Les chercheurs ont constaté que les animaux exposés au malathion développaient plus facilement les signes cliniques de la maladie, comme l'hépatomégalie, et que plusieurs en mourraient comparativement aux animaux non-exposés. De plus, la bactérie ne pouvait être isolée que chez les animaux exposés. Il semble donc que l'exposition au malathion ait affectée le système immunitaire de ces animaux, les rendant plus sensibles à une infection par un pathogène.

Bien que certains amphibiens soient sensibles à la toxicité des polluants, d'autres sont plus résistants et semblent moins affectés, du moins au niveau de leur système immunitaire. En effet, suite à une exposition au 2,4,6-trinitrotoluène (TNT), aucun effet sur le système immunitaire n'a été observé chez la salamandre terrestre *Ambystoma tigrinum* (Johnson *et al.*, 2000). Ce polluant ne diminuait ni l'activité phagocytaire, ni la production de radicaux d'oxygène chez les phagocytes de la rate. De plus, aucune différence histologique ne pouvait être décelée entre les rates d'individus traités et celles d'individus non-traités. Toutefois, une augmentation d'une population de phagocytes comportant de grosses granulations noires a été notée dans le foie des salamandres exposées au TNT. Il est possible que ces cellules soient associées à une réponse inflammatoire ou qu'elles soient responsables de la phagocytose des érythrocytes dans des conditions d'hypoxie (Johnson *et al.*, 2000). Ceci permettrait de séquestrer le fer lors de la lyse des érythrocytes et éviterait ainsi une intoxication possible. Il est donc probable que le TNT induise la lyse des globules rouges chez les salamandres. Il est important de noter toutefois que le nombre d'individus utilisés dans cette étude était faible et que la corrélation entre une exposition au TNT et une augmentation de la population de phagocytes à grosses granulations dans le foie n'a pu être très bien établie.

Les métaux lourds, retrouvés fréquemment dans l'environnement, sont aussi des polluants qui peuvent diminuer la qualité des écosystèmes aquatiques. Le mercure est considéré comme étant un des polluants les plus dangereux à travers le monde (Jelaso *et al.*, 1997). Il

peut causer différents troubles aux niveaux du développement embryonnaire et du système nerveux chez plusieurs espèces d'animaux. Les effets délétères de ce contaminant sur le système immunitaire des amphibiens n'ont pas encore été beaucoup étudiés. Une étude récente a démontré que le mercure pouvait moduler les niveaux d'expression de l'interleukine-1 β (IL-1 β), une cytokine activant plusieurs réponses immunitaires (Jelaso *et al.*, 1997). Cette molécule est aussi présente dans le système nerveux lors du développement embryonnaire des amphibiens et des mammifères. Il a été observé que chez les embryons de *Xenopus laevis*, il y avait une diminution des niveaux d'IL-1 β dans les ganglions crâniens, suite à une exposition au méthylmercure. Il est possible que le méthylmercure diminue l'expression de cette molécule en empêchant la synthèse des protéines. Il est aussi probable que ce produit affecte la physiologie des membranes cellulaires et empêche ainsi le transport de l'IL-1 β dans les cellules des ganglions. Dans un cas comme dans l'autre, la diminution des niveaux d'IL-1 β peut avoir d'importantes répercussions sur le développement d'une réponse immunitaire adéquate rendant ainsi les animaux plus sensibles aux pathogènes de l'environnement.

Tout comme le méthylmercure, le cadmium est un métal lourd pouvant moduler la réponse immunitaire. À de faibles concentrations, il semble avoir des propriétés immunostimulantes chez les têtards puisqu'il a la propriété d'augmenter spontanément le nombre de lymphocytes B (Zettergren *et al.*, 1991). De plus, ce métal semble augmenter la réponse humorale des têtards. En effet, il a été observé que les animaux, exposés au cadmium et sensibilisés par la suite avec des érythrocytes de mouton (SRBC), avaient un taux plus élevé d'anticorps contre les antigènes des SRBC. La raison pour laquelle le cadmium a la propriété de stimuler le système immunitaire est encore peu comprise. Il est possible que ce métal soit capturé et associé à une protéine semblable aux métallothionéines des mammifères.

Bien que certains chercheurs aient étudié l'effet des xénobiotiques sur le système immunitaire des amphibiens, très peu d'études sont représentatives de la réalité actuellement présente dans nos écosystèmes. Entre autres, il y a peu de recherches analysant l'effet des polluants aux concentrations habituellement retrouvées dans l'environnement. De plus, les principales études ont surtout examiné l'effet toxique de différents polluants sur des

individus au stade embryonnaire durant une période de 96 heures (Deviller et Exbrayat, 1992). Cependant, il semble que dans les populations d'amphibiens, les animaux les plus sensibles aux infections soient ceux qui soit rendus aux stades qui précèdent ou suivent immédiatement la métamorphose. En effet, selon une étude de Rollins-Smith (1998), ces individus, dans la nature, sont ceux contractant le plus de maladies infectieuses. Un autre aspect qui mériterait d'être investigué se rapporte aux périodes précises d'exposition aux pesticides durant l'année. Les pesticides ne sont en effet appliqués que quelques fois par année pendant une courte période de temps correspondant à une abondance d'insectes ou de mauvaises herbes (Harris *et al.*, 2000). Une forte exposition des amphibiens à ces polluants est alors restreinte à quelques périodes dans l'année et par le fait même à quelques stades de développement. Il serait nécessaire de faire des recherches plus avancées avec des amphibiens rendus à ces différents stades afin de mieux évaluer les effets directs et indirects des contaminants environnementaux sur les animaux.

5 Effets connus des pesticides utilisés dans le mélange testé au cours de la présente étude

La majorité des études immunotoxicologiques effectuées sur des animaux de laboratoire se concentre sur les effets d'un seul type de substance toxique. Toutefois, dans l'environnement, les individus sont exposés à beaucoup plus qu'une substance à la fois. Il a déjà été observé qu'un mélange de pesticides avait des effets sur le système immunitaire des souris alors que la majorité de chacune des substances, testées individuellement aux mêmes concentrations, n'avait pas d'effets apparents sur ce système (Germolec *et al.*, 1989). Porter *et al.* (1993) ont également noté des effets similaires chez les rongeurs. Ils ont constaté que des changements dans les niveaux d'hormones thyroïdiennes, qui influencent la quantité de corticostéroïdes et par conséquent le système immunitaire, ne survenaient que suite à une exposition à un mélange de pesticides. Ces fluctuations d'hormones pouvaient alors avoir d'importantes conséquences au niveau de la physiologie, du développement et du comportement des amphibiens, si elles survenaient à certains stades bien précis du développement. Il est donc fort probable que les effets néfastes, immunologiques et physiologiques, résultent souvent de l'influence combinée de produits chimiques.

5.1 Le lindane

Le lindane est un insecticide faisant partie de la famille des organochlorés. Il est couramment utilisé en milieu agricole sur une grande variété de cultures et dans le contrôle d'insectes vecteurs de maladies. Présentement, le lindane est toujours employé en Amérique du Nord (environ 510 tonnes par an), mais on prévoit restreindre son utilisation dans les prochaines années. La concentration maximale acceptée dans l'environnement, afin de protéger les espèces aquatiques au Canada, est de 80 ppt (Exttoxnet, 1996). En moyenne, il est retrouvé à des concentrations de 0.33 ppt dans les tributaires du fleuve Saint-Laurent (Québec, Canada).

Le lindane est un pesticide très toxique pour les animaux aquatiques et les invertébrés puisqu'il peut facilement être bioaccumulé et persister chez ces organismes (Exttoxnet, 1996). Il a la propriété de moduler le métabolisme des sucres (Soengas *et al.*, 1997) et de diminuer l'efficacité de la reproduction chez les mammifères suite à une longue exposition (Beard et Rawlings, 1998). À de fortes concentrations, il peut également inhiber les contractions spontanées chez les femelles enceintes (Criswell et Loch-Caruso, 1999) et augmenter le stress hépatique oxydatif (Simon Giavarotti *et al.*, 1998). Le lindane peut aussi agir en tant que modulateur endocrinien. En effet, Ronco *et al.* (2001) ont constaté que ce pesticide avait la propriété de diminuer la stéroïdogénèse chez les rats mâles, ce qui avait un impact sur la quantité de testostérone produite. Cette baisse de testostérone induisait par la suite une altération des mécanismes impliqués dans la reproduction (Walsh et Stocco, 2000). Suwalsky *et al.* (2000) ont également constaté cette diminution suite à une exposition au pesticide. Ils ont observé que le lindane avait la propriété de s'attaquer particulièrement aux cellules de Leydig, qui fabriquent la testostérone. Il est donc probable que la diminution de la testostérone chez les mâles soit due à cette détérioration des cellules de Leydig. Chez les femelles, il a été observé que le lindane modulait les niveaux de progestérone et d'hormones lutéinisantes (Beard et Rawling, 1999). Suite à cette modulation, le nombre de femelles tombant enceinte après un accouplement était fortement diminué (Beard *et al.*, 1999). Le lindane peut également agir comme modulateur endocrinien sur d'autre système que le système reproducteur. En effet, ce pesticide peut altérer les niveaux d'hormones thyroïdiennes chez les brebis (Beard et Rawling, 1999). La quantité d'hormone T4 circulant

dans le sang est fortement diminuée suite à une exposition. Une modulation des hormones thyroïdiennes peut par la suite avoir des effets sur d'autres systèmes comme le système immunitaire.

Chez les amphibiens, le lindane peut accroître le pourcentage de mortalité des embryons. Devillers et Exbrayat (1992) ont démontré que suite à une exposition de 96 heures à 10 ppm, 10 % des embryons mourraient. Le pourcentage de mortalité augmentait lorsque la concentration du pesticide était plus élevée pour atteindre un maximum de mortalité (100%) suite à une exposition à 60 ppm. Cet insecticide a également la propriété de faire décroître le pourcentage d'éclosion des œufs de grenouilles. Il peut réduire l'éclosion de 20% suite à une exposition à 1 ppm pendant 96 heures. Finalement, à partir de 20 ppm, le lindane a la propriété d'augmenter significativement le nombre d'anomalies retrouvées chez les têtards. Plus la concentration de ce pesticide est forte, plus la quantité de malformations observées est élevée. Bien que ces études aient été faites en utilisant des concentrations relativement élevées de lindane et ce sur une courte période de temps, elles démontrent que l'insecticide peut avoir des effets toxiques chez les amphibiens. Afin de vérifier si ces résultats peuvent également s'appliquer aux espèces exposées dans leur environnement naturel, il faudrait faire d'autres études en utilisant des concentrations plus faibles de l'insecticide.

Des études immunotoxicologiques chez les rats démontrent que ce pesticide affecte certaines cellules du système immunitaire et qu'il a un effet sur le développement de ce système (Vial *et al.*, 1996). Il diminue la réponse des lymphocytes présents dans la rate ainsi que le nombre de cellules NK et de lymphocytes T cytotoxiques retrouvés dans le corps (Cornacoff *et al.*, 1988). Chez la souris, il peut également favoriser le développement des réactions d'hypersensibilité, supprimer la réponse humorale (Meera *et al.*, 1992; Koner *et al.*, 1998) et la synthèse de l'ARN dans les macrophages (Roux *et al.*, 1978). Pour le moment, peu d'études ont évalué l'effet de ce pesticides sur le système immunitaire des animaux aquatiques. Certaines ont toutefois démontré que le lindane pouvait significativement réduire le nombre de cellules présentes dans la rate et le pronéphros de poisson, ce qui laisse croire que les cellules lymphoïdes représentent probablement une cible importante de ce pesticide et que l'hématopoïèse pourrait être affectée chez les animaux aquatiques exposés

(Hart *et al.*, 1997). Plusieurs mécanismes peuvent être responsables des propriétés immunomodulatrices du lindane. Il est possible que ce pesticide altère les membranes plasmiques des cellules et les empêche par la suite d'avoir un fonctionnement normal (Meera *et al.*, 1992). Ses propriétés d'immunomodulateur pourraient aussi être attribuées à son activité estrogénique, puisque les estrogènes ont la propriété de moduler le système immunitaire. Finalement, certains chercheurs ont démontré que le lindane pouvait moduler les niveaux de calcium dans les leucocytes du sang et dans les phagocytes du pronéphros chez la truite arc-en-ciel (Betoulle *et al.*, 2000). Le calcium est un important médiateur de signaux en immunologie et sa modulation pourrait expliquer les altérations observées dans les fonctions du système immunitaire chez les poissons.

5.2 La dieldrine

La dieldrine est aussi un insecticide faisant partie de la famille des organochlorés. Elle fut grandement utilisée pour contrôler la quantité de vers, de scarabées et de termites dans les champs. Elle fut aussi d'une grande utilité dans le contrôle de certains moustiques vecteurs de maladies, comme la mouche tsé-tsé et les anophèles (Extoxnet, 1996). Elle est maintenant bannie dans plusieurs pays, dont le Canada (depuis 1987), puisqu'elle est considérée comme étant très toxique. Elle peut être bioaccumulée dans la chaîne alimentaire en étant emmagasinée dans les graisses des animaux. Elle peut également persister dans l'environnement et prendre jusqu'à plusieurs siècles pour se dégrader. La dieldrine est très toxique pour la majorité des êtres vivants, y compris les animaux aquatiques comme les poissons, les amphibiens et les crustacés. D'ailleurs, la concentration maximale acceptée dans l'environnement, afin de protéger les espèces aquatiques au Canada, est seulement de 56 ppt (Extoxnet, 1996). En moyenne, la concentration de dieldrine retrouvée dans les tributaires du fleuve Saint-Laurent (Québec, Canada) est de 0.15 ppt.

La dieldrine peut avoir des effets toxiques sur plusieurs organes et systèmes comme le foie, le système immunitaire et le système nerveux. Chez les mammifères, son mode d'action au niveau neurologique est bien connu. Elle bloque l'effet de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), un neurotransmetteur inhibiteur, et de son récepteur en se liant directement aux canaux de chlore des synapses (Brannen *et al.*, 1998). Le mode d'action de ce pesticide sur

les autres systèmes n'est pas encore bien compris. Il est toutefois connu que la dieldrine peut agir en tant que modulateur endocrinien. En effet, elle a la propriété de diminuer les niveaux de FSH et de LH chez les rates, ce qui a des effets néfastes sur le système reproducteur de ces animaux (Ateia *et al.*, 1990). De plus, chez l'humain, elle semblerait impliquée dans l'incidence de différents types de maladies, comme le cancer du sein (Hoyer *et al.*, 2000). Finalement, chez certains animaux comme les daphnie, il pourrait également avoir un impact dans la différenciation des sexes lors de l'embryogenèse (Dodson *et al.*, 1999).

Chez les amphibiens, la dieldrine a des effets tératogènes. Elle induit d'importantes déformations dans la moelle épinière, ce qui empêche les têtards de nager adéquatement et d'échapper à d'éventuels prédateurs (Schuytema *et al.*, 1991). Cet insecticide semble aussi diminuer l'hydrolyse de la phosphatidylinositol-2 (PIP2), un facteur impliqué dans la fertilisation des ovocytes. Une diminution de cette hydrolyse pourrait être responsable d'une baisse du taux de fertilisation chez des œufs de grenouilles (Fonovich de Shroeder et Penchen de D'Angelo, 1995). Le mécanisme d'action de la dieldrine sur le PIP2 n'est pas encore très bien compris. Il est possible que le pesticide active ou inhibe certains enzymes impliqués dans l'hydrolyse de la molécule (Fonovich de Shroeder et Penchen de D'Angelo, 2000). Finalement, ce pesticide a la propriété de diminuer les niveaux de globules rouges et blancs dans le sang des grenouilles (Devillers et Exbrayat, 1992). À des concentrations de 80 ppb, les niveaux d'érythrocytes diminuent significativement tandis que les leucocytes (ou globules blancs) le font à des concentrations de 50 ppb.

La dieldrine peut également créer de graves dommages aux systèmes nerveux central, endocrinien et immunitaire. Des études immunotoxicologiques démontrent que ce pesticide affecte le développement du système immunitaire chez l'humain (Vial *et al.*, 1996). En effet, un taux plus élevé de maladies, telles que les méningites, les bronchites et les infections aux oreilles, est observé chez les jeunes enfants ayant des parents mangeant du poisson principalement contaminé à la dieldrine (Dewailly *et al.*, 2000). Il est aussi connu que la dieldrine a la propriété de s'accumuler dans les globules rouges et conséquemment dans la rate, un organe lymphoïde très important dans l'induction d'une réponse immunitaire. De plus, lorsque ce pesticide est injecté dans le péritoine de souris, une

réduction importante est observée dans les réponses impliquant les lymphocytes T, comme la culture mixte lymphocytaire ou "Mixed Lymphocyte Reaction" (MLR), le nombre de plasmocytes et la production d'anticorps T-dépendants (sensibilisation avec des globules rouges) ou indépendants (sensibilisation avec des lipopolysaccharides, Fournier *et al.*, 1988). Cette toxicité humorale peut s'expliquer par une réduction simultanée de la capacité des cellules présentatrices d'antigènes (macrophages) de capturer et de présenter les antigènes (Flipo *et al.*, 1992). En effet, les macrophages sont une cible connue de la dieldrine et leur inhibition entraîne à la fois une réduction des réponses non-spécifiques, cellulaires et humorales (Loose *et al.*, 1981). Une réduction dans l'efficacité de ces réponses a pour conséquence de diminuer la résistance des animaux exposés à différents types d'infections telles les infections virales (murine herpes virus, MHV-3) (Krzystyniak *et al.*, 1985).

5.3 L'endosulfan

L'endosulfan est un insecticide très toxique faisant partie de la famille des hydrocarbures chlorés. Il peut être utilisé sur les cultures de thé, de café, de fruits, de légumes, de céréales et comme préservatif pour le bois. L'endosulfan n'est plus employé en Amérique Nord et dans plusieurs autres pays comme l'Allemagne, le Danemark et la Suisse. Dans quelques années, il ne devrait plus être utilisé dans la majorité des pays du globe. Ce pesticide est très toxique pour les animaux aquatiques et peut être bioaccumulé à de très hauts niveaux dans certains animaux comme les moules (Exttoxnet, 1996). Puisque ce pesticide n'est plus utilisé au Canada, les concentrations moyennes d'endosulfan retrouvées dans les tributaires du fleuve Saint-Laurent (Québec, Canada) sont seulement de 0.02 ppt.

Chez divers animaux aquatiques, il a été remarqué qu'à de fortes concentrations, l'endosulfan avait des effets toxiques sur les systèmes nerveux, rénal et respiratoire (Braunbeck et Applebaum, 1999). L'endosulfan a également la propriété d'agir en tant que modulateur endocrinien et ainsi avoir des effets sur le système reproducteur (Naqvi et Vaishnavi, 1993). Tout en réduisant la quantité de testostérone (Wilson et Leblanc, 1998) et de sperme (Dalsenter *et al.*, 1999) produite chez les mammifères, il peut provoquer l'atrophie des testicules et la formation de kystes aux ovaires (Naqvi et Vaishnavi, 1993). Chez les rongeurs, il peut également induire des changements dégénératifs dans les tubules

séminifères (Wilson et Leblanc, 1998) et histologiques dans les organes reproducteurs (Dalsenter *et al.*, 1999). Finalement, l'endosulfan peut moduler les quantités des hormones sécrétées par la glande thyroïde chez les poissons. Il augmente les niveaux de thyroxine (T4) tout en diminuant ceux de la triiodothyronine (T3) dans le sérum (Sinha *et al.*, 1991). La modification de ces niveaux d'hormones pourrait par la suite avoir des effets sur d'autres systèmes tel que le système immunitaire.

Chez les amphibiens, Berrill *et al.* (1998) ont constaté que ce pesticide avait peu d'effets immédiats sur la mortalité des embryons. Toutefois, les embryons exposés mourraient en grand nombre deux semaines après l'exposition, démontrant que l'endosulfan peut avoir de graves effets à long terme chez ces animaux. Il semblerait d'ailleurs responsable de la grande diminution de la population des grenouilles dans les montagnes Sierra en Californie (Sparling *et al.*, 2001). La forte mortalité des anoues dans cette région serait due aux propriétés suppressives de l'endosulfan sur l'activité de l'acétylcholinestérase chez les têtards. En plus d'avoir un effet toxique à long terme chez les amphibiens, l'endosulfan semble avoir d'autres effets plus subtils sur la santé de ces animaux. À de faibles concentrations, il peut altérer la sécrétion de phéromones chez les salamandres, ce qui les empêche de trouver un partenaire sexuel et diminue conséquemment leur taux de reproduction (Park *et al.*, 2001). Harris *et al.* (2000) ont aussi observé que l'endosulfan augmentait le nombre de déformations chez les têtards de *Rana pipiens*, les empêchant de nager aisément. De plus, ce pesticide cause des spasmes nerveux chez les juvéniles de la même espèce inhibant ainsi leur habilité à sauter et à maintenir leur équilibre. L'effet de l'endosulfan sur cette espèce est particulièrement préoccupant en Amérique du nord puisque dans certaines régions, ce pesticide est épandu pendant la période de métamorphose, justement au moment où les grenouilles sont très vulnérables.

Des études immunotoxicologiques ont également démontré que de faibles doses d'endosulfan avaient la propriété de réduire significativement la grosseur de la rate et d'altérer les réponses inflammatoires, humorales et cellulaires (Banerjee et Hussain, 1986). Suite à une exposition prolongée, des souris de laboratoire étaient incapables de produire des

niveaux suffisants d'anticorps (IgG, IgM) contre le tétanos ainsi que de sécréter les facteurs de migration essentiels dans le recrutement des leucocytes à un site d'inflammation.

5.4 L'aldicarbe

L'aldicarbe est un insecticide systémique extrêmement toxique, faisant partie de la famille des carbamates. Il est directement répandu sur le sol et est utilisé pour contrôler la quantité de mites, de nématodes et de pucerons, sur les cultures de coton, d'arachides et de fèves de soya. Ce pesticide peut facilement contaminer les eaux souterraines et causer des dommages à la santé humaine. Il a d'ailleurs la réputation d'être le pesticide ayant causé le plus d'empoisonnements alimentaires en Amérique du Nord suite à l'ingestion de nourriture contaminée (MMWR, 1986). Les effets néfastes de cet insecticide sont principalement observés au niveau du système nerveux puisque l'aldicarbe a la propriété de diminuer l'activité de l'acétylcholinestérase (Perkins et Schlenk, 2000). Il pourrait également avoir un effet au niveau du système endocrinien. En effet, l'aldicarbe a la propriété de moduler les niveaux d'hormones thyroïdiennes. Il a été observé que des souris exposées à des doses d'aldicarbe retrouvées dans l'environnement avaient des niveaux significativement moins élevés d'hormone T4 (Porter *et al.*, 1999). Une modulation dans les niveaux de cette hormone pourrait éventuellement affecter d'autres systèmes comme le système immunitaire.

L'aldicarbe est toujours utilisé en Amérique du Nord mais il est normalement très contrôlé et ne peut pas être employé n'importe où et sur n'importe quel type de culture. La concentration maximale acceptée dans l'environnement, afin de protéger les espèces aquatiques au Canada, est de 1 ppb (Exttoxnet, 1996). Toutefois, des concentrations plus élevées sont fréquemment retrouvées dans l'environnement. En effet, en moyenne 17 ppb d'aldicarbe sont retrouvés dans les tributaires du fleuve Saint-Laurent (Québec, Canada).

Pour le moment, aucune étude traitant de l'effet de l'aldicarbe sur les amphibiens n'est disponible. Toutefois, il a été démontré que des pesticides faisant partie de la même famille ont la propriété d'induire des malformations pendant le développement des amphibiens. Ces pesticides augmentent particulièrement l'incidence d'anomalies dans la colonne vertébrale des têtards, les empêchant de nager adéquatement (Ouellet *et al.*, 1997).

Bien que l'aldicarbe soit, pour les humains, le pesticide le plus toxique de la famille des carbamates, il ne semble pas avoir d'effets importants sur le système immunitaire aux concentrations retrouvées dans l'environnement. Les différentes études faites sur ce pesticide présentent des résultats contradictoires en ce qui concerne son effet sur le système immunitaire. Certaines études faites sur les rongeurs, démontrent que l'aldicarbe a un effet immunostimulant ou immunosuppresseur, alors que d'autres mentionnent qu'il n'a aucun effet (Thomas *et al.*, 1987). Lorsqu'injecté dans le péritoine de souris, l'aldicarbe inhibe spécifiquement les fonctions des macrophages (Dean *et al.*, 1990). En effet, dans ces conditions il altère les fonctions accessoires des macrophages et supprime indirectement les fonctions des lymphocytes T. Cette diminution des fonctions des macrophages a été associée à une suppression de la production d'IL-1 altérant la prolifération des lymphocytes T. À de fortes concentrations, il peut également supprimer, chez les souris, la réponse des lymphocytes B contre les globules rouges de mouton, ce qui peut laisser croire qu'un nombre insuffisant d'anticorps serait sécrété par les animaux fortement exposés (Olson *et al.*, 1987). Finalement, chez l'humain, l'aldicarbe peut diminuer le ratio de lymphocytes T CD4 et CD8 sans toutefois changer l'efficacité globale du système immunitaire (Fiore *et al.*, 1986). Même si ce pesticide peut moduler certaines réponses immunitaires normales, il n'inhibe pas la capacité des souris à se défendre contre des infections virales ou bactériennes (Bernier *et al.*, 1988). Son effet global sur le système immunitaire ne semble donc pas fortement affecter les animaux et les humains.

5.5 La métribuzine

La métribuzine est un herbicide sélectif, moyennement persistant, faisant partie de la famille des triazines. Il inhibe la photosynthèse de certaines plantes et est utilisé dans le contrôle annuel des mauvaises herbes sur les terres en jachère, les cultures de légumes et de tourbe. Il est toujours employé en Amérique du Nord et de 100 à 500 tonnes sont utilisées à chaque année au Canada. La concentration maximale acceptée dans l'environnement, afin de protéger les espèces aquatiques au Canada, est de 1 ppb (Exttoxnet, 1996). En moyenne des teneurs de 0.56 ppb de métribuzine sont retrouvées dans les tributaires du fleuve Saint-Laurent (Québec, Canada).

Normalement, la métribuzine n'a pas une grande toxicité pour la majorité des animaux puisqu'elle est rapidement éliminée dans l'urine et dans les fèces. Cependant, divers effets négatifs, causés par ce pesticide, sont rapportés dans certaines études. Il semble affecter le système nerveux et réduire la capacité d'apprentissage des rats (Boyd *et al.*, 1990) ainsi que de stimuler la production d'enzymes métaboliques dans le foie des cobayes, induisant éventuellement des changements histologiques dans cet organe (Tomaszewski *et al.*, 1986).

Chez les têtards de *Rana catesbeiana*, la métribuzine peut induire certaines mutations et créer des dommages à l'ADN (Clements *et al.*, 1997). Elle peut également avoir des effets tératogènes en provoquant des malformations dans le squelette et la queue des embryons de grenouilles (Ouellet *et al.*, 1997).

Finalement, cet herbicide peut avoir des effets sur la glande thyroïde. Il a été observé que des rats, traités au métribuzine, avaient une glande thyroïde beaucoup plus grosse que la normale. Cette hyperthyroïdie modulait par la suite la quantité de thyroxine sécrétée, ce qui affectait d'autres systèmes (Porter *et al.*, 1993). Entre autres, cette altération dans les niveaux de thyroxine pouvait affecter différents paramètres des systèmes nerveux et immunitaire (Porter *et al.*, 1993).

5.6 L'atrazine

L'atrazine est un herbicide sélectif très persistant faisant aussi partie de la famille des triazines. Il est utilisé, entre autres, dans le contrôle des mauvaises herbes sur les cultures de maïs, de canne à sucre, d'ananas et de sapins de Noël. Il a la propriété de se retrouver fréquemment dans les eaux souterraines et conséquemment dans l'eau potable (Exttoxnet, 1996). L'atrazine est grandement utilisé en Amérique du Nord sur les cultures de maïs. La concentration maximale recommandée dans l'environnement, afin de protéger les espèces aquatiques au Canada, est de 1.8 ppb. Toutefois, cette concentration est largement dépassée dans plusieurs cours d'eau au Québec. En effet, la concentration moyenne d'atrazine retrouvée dans les tributaires du fleuve Saint-Laurent (Québec, Canada) est de 21 ppb.

L'atrazine peut avoir des effets néfastes sur plusieurs systèmes, dont le système reproducteur. En effet, l'atrazine a des propriétés de modulateur endocrinien. Il a la capacité d'agir comme anti-estrogène et de moduler certaines fonctions du système reproducteur. Chez les rats mâles, il a la propriété de réduire la quantité de sperme ainsi que sa motilité dans l'épididyme. Chez les rates, il peut dérégler le cycle ovarien en inhibant la sécrétion de prolactine et d'hormone lutéinisante (LH) (Kniewald *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 2000). Ce pesticide pourrait aussi altérer la stéroïdogénèse chez certains animaux, comme par exemple chez les alligators, ce qui aurait nécessairement des effets néfastes sur le système reproducteur (Crain *et al.*, 1997). De plus, il pourrait augmenter l'incidence de cancer des glandes mammaires chez les rats en accroissant le vieillissement et les niveaux d'estrogènes endogènes chez les animaux (Chapin, *et al.*, 1996). Ce pesticide a également été associé à une augmentation de certains cancers chez l'humain, tels que la leucémie et les lymphomes, ainsi que le cancer du sein, des ovaires et de l'utérus (Hooghe *et al.*, 2000). Toutefois, la plupart des herbicides ont de faibles propriétés mutagènes et oncogènes. Il est donc probable que l'atrazine favorise le développement de différents cancers en réduisant l'efficacité du système immunitaire.

L'atrazine est faiblement bioaccumulé chez les poissons et est donc considéré peu toxique pour les animaux aquatiques (Extoxnet, 1996). Toutefois, suite à une exposition à cet herbicide, plusieurs effets non-létaux, comme un changement de comportement chez les poissons (Saglio et Trijasse, 1998), ont été observés chez les animaux aquatiques incluant les embryons de *Xenopus laevis* (Morgan *et al.*, 1996). L'atrazine peut également retarder le début de la métamorphose chez les salamandres exposées à de fortes concentrations (Larson *et al.*, 1998). Cependant, lorsque cette métamorphose est commencée, les individus exposés à de fortes doses atteignent la maturation plus rapidement que les individus non-exposés. Puisque la métamorphose est accélérée chez les animaux exposés, leur longueur et leur poids sont alors significativement plus faibles que ceux des individus non-exposés. Il est donc probable que ces animaux aient par la suite moins de chance de survivre et de se reproduire que ceux non-exposés. Contrairement à une exposition à de fortes doses, une exposition à de faibles doses retarde la durée complète de la métamorphose. Certains animaux exposés ne réussiront donc pas à atteindre l'âge adulte avant l'arrivée du froid, ce qui réduira

énormément leurs chances de survie pendant l'hiver. Cette expérience suggère que l'atrazine peut être toxique chez les amphibiens puisque des expositions à de faibles et de fortes doses peuvent toutes deux réduire les chances de survie des juvéniles lors du premier hiver.

Des études immunotoxicologiques chez l'humain ont démontré que l'atrazine pouvait moduler la production de certaines cytokines comme l'interféron- γ (INF- γ , cytokine de type I), l'interleukine-5 (IL-5, cytokine de type II) et le "tumor necrosis factor α " (TNF- α , une cytokine inflammatoire) (Hooghe *et al.*, 2000). En diminuant les cytokines de type-I et de type-II, l'atrazine peut moduler à la fois les réponses humorales et cellulaires. Cet herbicide pourrait également avoir un effet indirect sur le système immunitaire en diminuant significativement les niveaux d'hormones T_3 , sécrétées par la glande thyroïde (Kornilovskaya *et al.*, 1996), ou en agissant comme modulateur endocrinien au niveau de d'autres hormones (Cooper *et al.*, 2000).

6. Maladies associées à la disparition des amphibiens

Puisque certains produits chimiques ont la propriété de moduler le système immunitaire, il est possible que des polluants retrouvés dans l'environnement des amphibiens (tels que les pesticides) soient en mesure d'affaiblir leur système immunitaire, ce qui réduirait leur résistance aux infections.

Plusieurs maladies et infections ont été observées chez les amphibiens dans les dernières années. Certains microorganismes sont fatals pour les amphibiens tandis que d'autres parasitent les animaux de façon chronique (sans les tuer), pour de longues périodes de temps. Un équilibre entre la santé de l'hôte et la virulence du microorganisme est généralement atteint pour que les deux puissent vivre en harmonie (Skinner, 1982). Toutefois, il arrive que les microorganismes deviennent trop virulent et causent de graves maladies chez l'hôte. Lorsque tel est le cas, la virulence accrue des microorganismes est généralement due à des facteurs exogènes, comme par exemple à des perturbations causées par les activités humaines, qui provoquent des altérations chez le microorganisme ou l'hôte. Pour pouvoir se défendre contre ces pathogènes envahissants, les amphibiens doivent utiliser beaucoup de leur énergie. Ils en ont ainsi moins pour croître, se développer et se reproduire, trois variables affectant la dynamique de leurs populations.

6.1. Mycose

La disparition de plusieurs amphibiens semble se produire chez les animaux adultes et juvéniles vivants dans des régions relativement froides ou situées en haute altitude (Carey, 1993; Laurance *et al.*, 1996). Les animaux morts ou malades ont souvent des plaques d'épiderme se détachant de la surface de leurs peaux (Daszak *et al.*, 1999). Ils ont une posture anormale, sont léthargiques et perdent leur réflexe d'équilibre. Un examen détaillé de ces spécimens au microscope révèle souvent une infection avec une espèce de champignons faisant partie de la famille des chytridés. Normalement, ces champignons sont retrouvés dans les environnements aquatiques et les sols humides. Ils dégradent la cellulose, la chitine et la kératine (Berger *et al.*, 1998). Ils infectent majoritairement les plantes, les algues, les protistes et les invertébrés. Toutefois, depuis quelques années, une nouvelle espèce de chytridés, nommée *Batrachochytrium dendrobatidis*, s'attaque aux amphibiens adultes et juvéniles, vivants dans des régions relativement froides, en dégradant la kératine présente sur leur peau. Ce nouveau champignon, infectant les amphibiens, est le seul chytridé connu capable d'infecter des individus faisant partie du phylum des vertébrés (Daszak *et al.*, 1999).

Il y a une dizaine d'années, ce champignon ne semblait pas présent dans les régions où se produisent aujourd'hui de grandes épidémies. Pour le moment, la raison pour laquelle ce pathogène s'est propagé rapidement, d'une région à une autre, est toujours inconnue. Certaines activités humaines et/ou changements environnementaux, comme le réchauffement de la planète, auraient pu contribuer à la propagation de ce pathogène (Daszak *et al.*, 1999). Il est donc fort probable que ce chytride soit apparu récemment dans l'environnement. Les populations de grenouilles ne seraient pas encore immunisées contre ce champignon, ce qui les rendrait très vulnérables à son action pathogène. Il est aussi possible que le chytride soit devenu plus virulent qu'auparavant ou que les grenouilles soient devenues plus sensibles à cause de certains facteurs environnementaux, comme une augmentation de la concentration des polluants, ou certains facteurs pathologiques, comme par exemple des co-infections (Berger *et al.*, 1998).

6.2 Infections virales

Les irridovirus ont souvent été la cause de plusieurs épidémies et mortalités chez les amphibiens à travers le monde. Ces virus sont très virulents et sont souvent responsables d'infections systémiques chez les amphibiens. Les animaux les plus sensibles à ce type d'infection sont ceux au stade larvaire. Près de 100% des têtards infectés meurent suite à une infection. Ils développent une nécrose aiguë des lymphocytes ainsi que des tissus lymphoïdes et hématopoïétiques. Des hémorragies dans les tissus squelettiques ainsi que des changements histologiques dans le foie, les reins et la voie gastro-intestinale, sont aussi observés suite à une infection. Toutefois, tous ces symptômes ne sont pas uniquement dus aux irridovirus. En effet, les infections virales sont souvent accompagnées d'infections bactériennes chez les amphibiens (Cunningham *et al.*, 1996). Ces auteurs ont observé que plusieurs grenouilles étaient d'abord infectées par un irridovirus et ensuite par des bactéries opportunistes, comme *Aeromonas hydrophila*.

Les irridovirus apparaissent souvent dans des endroits perturbés par des activités humaines, comme par exemple près des fermes d'élevage et dans les environnements surpeuplés, ou dans les endroits où il y a une mauvaise circulation d'eau (Daszak *et al.*, 1999). Les activités humaines semblent donc être en partie responsables de l'incidence des infections par ce pathogène.

Le lien entre le déclin de la population des amphibiens et les irridovirus est moins clair que celui avec le champignon chytridé. Toutefois, ces virus représentent un grand danger pour les populations d'amphibiens, particulièrement pour celles ayant un faible taux de reproduction et celles ayant été épargnées des autres épidémies jusqu'à maintenant (puisqu'elles ne possèdent pas d'immunité spécifique) (Daszak *et al.*, 1999). En effet, une infections des têtards provenant des ces populations fragiles aurait nécessairement un impact négatif sur la population adulte pouvant se reproduire. Un taux de mortalité de 80% à 90% chez les têtards, causé par une infection virale, réduirait la population adulte d'environ 80% (Lampo et De Leo, 1998). Les animaux occupant des niches écologiques spéciales et ceux se reproduisant peu sont donc très vulnérables à ce type d'infection puisque peu de têtards atteignant l'âge adulte survivront à chaque année.

6.3 Infections bactériennes

Même si la diminution des populations d'amphibiens semble être majoritairement due à des mycoses ou des infections virales, il est important de considérer la possibilité que certaines disparitions locales puissent être dues à des infections bactériennes. Ce type d'infections pourrait principalement causer la mort des amphibiens vivants dans des conditions propices à une suppression de leur système immunitaire (Daszak *et al.*, 1999). Des environnements surpeuplés ou pollués ainsi qu'un climat froid sont toutes des conditions de stress pouvant éventuellement altérer certaines fonctions du système immunitaire. Il a déjà été observé que la bactérie *Aeromonas hydrophila*, responsable de la maladie des "jambes rouges", proliférait beaucoup plus rapidement suite à une exposition à des hormones de stress, retrouvées chez les vertébrés (Daszak *et al.*, 1999). Il est donc possible que cette bactérie soit capable de bénéficier des conditions de stress et d'immunosuppression chez son hôte pour augmenter sa prolifération en conséquence.

7 Interaction entre système immunitaire, polluants et parasites

Les xénobiotiques et les microorganismes peuvent tous deux, indépendamment, avoir des effets sur le système immunitaire. Ils peuvent moduler ce système en le supprimant ou en le stimulant. Dans certains cas, le corps est capable de palier à ces immunomodulations afin de pouvoir continuer à fonctionner normalement. Toutefois, qu'en est-il lorsque les effets des xénobiotiques sont combinés à ceux des microorganismes? Ces deux facteurs peuvent parfois avoir un effet synergique sur le système immunitaire et entraîner une immunomodulation plus forte que celle observée suite à l'action d'un seul de ces facteurs.

7.1 L'influence de la pollution sur les infections parasitaires

Le mode de vie des amphibiens les rend particulièrement vulnérables à différentes infections par des parasites (Tinsley, 1995). Premièrement, l'habitat humide, recherché par la majorité des amphibiens, favorise la survie des stades infectieux des pathogènes. Deuxièmement, lors de la reproduction, les amphibiens se rassemblent dans de petites étendues d'eau, où les

conditions optimales pour la transmission des parasites sont retrouvées. Finalement, la plupart des amphibiens vivent à la fois dans un environnement aquatique et terrestre possédant tous deux une faune de parasites qui leur est propre. La diversité des parasites chez les amphibiens est donc assez grande et il est important que leur système immunitaire soit capable de les reconnaître pour les éliminer ou les garder sous surveillance afin que ceux-ci ne les détruisent pas.

L'influence de la pollution sur les infections parasitaires des animaux aquatiques a surtout été étudiée chez les poissons. Plusieurs polluants peuvent affecter le système immunitaire des poissons les rendant plus sensibles aux pathogènes retrouvés dans leur environnement. Par exemple, certains métaux lourds comme le nickel, le zinc, le cuivre et le cadmium peuvent augmenter le nombre d'éosinophiles ainsi que supprimer les réponses humorale et cellulaire chez certains poissons (O'Neil, 1981). Le benzo(a)pyrène, le pentachlorophénol et l'hexachlorobenzène peuvent également supprimer la réponse immunitaire chez une espèce de poisson, en empêchant la production efficace d'anticorps (Fries, 1986). La raison pour laquelle ces polluants ont un effet sur le système immunitaire n'est pas encore très bien comprise. Il est probable qu'une exposition à des polluants, agissant comme agents stressants, induise la libération de cortisol, un immunosuppresseur bien connu (Khan et Thulin, 1991). Les animaux exposés à des polluants ont de plus tendance à jeûner, ce qui peut également influencer les réponses du système immunitaire. Certains polluants peuvent aussi agir directement sur des fonctions spécifiques du système immunitaire, les supprimant ou les stimulant, dépendant de leur activité immunomodulatrice.

Une exposition chronique à un ou plusieurs polluants peut augmenter la sensibilité à différents pathogènes surtout suite à une longue exposition. Certaines études démontrent que le nombre d'ectoparasites, comme les monogènes, ainsi que les endoparasites, comme les myxozoaires, sont beaucoup plus nombreux sur les nageoires et à l'intérieur du corps des poissons exposés à des polluants (Khan et Thulin, 1991). Les contaminants peuvent également moduler la période de latence des parasites ainsi que la durée de l'infection. En effet, plus l'immunosuppression est grande, plus la période de latence est courte et plus la durée de l'infection est longue. Dans des environnements pollués, une infection peut donc

se développer rapidement et persister longtemps, augmentant les dommages causés à la santé des poissons.

7.2 Interactions entre les parasites et le système immunitaire

L'évolution du système immunitaire des vertébrés s'est effectuée de façon à pouvoir contrôler un grand nombre de pathogènes. Le but d'un microorganisme est de survivre assez longtemps pour pouvoir se reproduire et assurer ainsi la survie de son espèce. Une infection agressive, détruisant et tuant l'hôte, n'est pas avantageuse à long terme pour le microorganisme. C'est la raison pour laquelle il développe souvent une niche au sein de laquelle il peut survivre et se reproduire sans affecter à long terme la survie de l'hôte qu'il infecte. Toutefois, les microorganismes vivant dans l'hôte sont toujours attaqués par le système immunitaire et doivent trouver des moyens pour lui échapper. Ils ont donc développé, au cours des années, une multitude de moyens afin d'empêcher leur détection et leur destruction.

Plusieurs agents infectieux peuvent entrer dans les lymphocytes B et T ainsi que dans les monocytes pour supprimer leurs fonctions (Kotwal, 1997). Ils peuvent diminuer leur prolifération en agissant sur des cytokines stimulantes ou en relâchant des facteurs qui détruisent directement les cellules (Riffkin *et al.*, 1996). Ils peuvent également supprimer certaines fonctions essentielles de ces cellules comme la sécrétion de radicaux superoxydes par les macrophages (Bruschi *et al.*, 1995), la production d'anticorps spécifiques par les lymphocytes B, ou encore la production de certaines cytokines par les lymphocytes T (Riffkin *et al.*, 1996). Avec ces différents mécanismes d'immunosuppression, le système immunitaire de l'hôte est affaibli et peut devenir sensible à certains types d'infections secondaires par des pathogènes opportunistes. Même si ces pathogènes ne sont pas normalement dangereux pour l'hôte, ils sont capables de provoquer de graves maladies chez des individus immunosupprimés (Kotwal, 1997). En effet, ils y prolifèrent beaucoup plus aisément et viennent à bout du système immunitaire en sécrétant différentes protéines qui en suppriment les dernières fonctions. Les hôtes parasités par des pathogènes immunosuppresseurs sont donc beaucoup plus sensibles à d'autres infections que des animaux en santé.

Une des meilleures stratégies développée par les microorganismes afin d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte est le mimétisme (antigène mimicry) de protéines clés retrouvées chez cet hôte (Riffkin *et al.*, 1996; Kotwal, 1997). Ceci permet aux pathogènes d'éloigner les cellules du système immunitaire qui seraient normalement capables de les reconnaître. Pour ce faire, les microorganismes peuvent soit présenter des antigènes à leur surface, empêchant ainsi les cellules immunitaires de les détecter, soit sécréter certaines molécules ressemblant à celles de l'hôte afin d'inhiber les réactions normales du système immunitaire. Par exemple, certains parasites peuvent sécréter des molécules ayant une grande homologie avec les cytokines, leur permettant ainsi de modifier les réponses immunitaires à leur guise (Riffkin *et al.*, 1996). Toutefois, le mimétisme des microorganismes peut souvent faire dévier l'immunité de l'hôte contre ses propres tissus. Le système immunitaire peut devenir incapable de reconnaître les molécules faisant partie du soi et celles du non-soi (Kotwal, 1997). Des réactions autoimmunes peuvent alors être déclenchées et provoquer de graves dommages chez l'hôte.

Dans plusieurs réactions immunitaires contre les microorganismes, les réponses de type-II sont stimulées. Ces réponses sont caractérisées par une sécrétion d'interleukine-5 (IL-5) par les éosinophiles, d'interleukine-3 et 4 (IL-3, IL-4) par les mastocytes et d'IgE par les lymphocytes (Riffkin *et al.*, 1996). Même si ces réponses servent à nuire aux parasites et à les détruire, elles entraînent souvent d'importants dommages chez l'hôte en induisant certaines maladies. Par exemple, les pathogènes peuvent engendrer la formation de complexes antigène-anticorps qui vont activer les neutrophiles et les macrophages, deux types de cellules importantes dans les réactions inflammatoires. La sécrétion exagérée d'IgE peut également suractiver les mastocytes et engendrer des réactions allergiques. Finalement, les lymphocytes T cytotoxiques, tuant les cellules infectées, peuvent causer des dommages aux tissus touchés par l'infection, en éliminant un trop grand nombre de cellules chez l'hôte. Donc, bien que la modulation de la réponse immunitaire par certains pathogènes cause de graves problèmes, il arrive parfois que ce soit la réponse immunitaire elle-même qui soit à la base des pathologies observées.

Dans un cas d'immunosuppression, d'autoimmunité ou d'hyperactivation causée par un microorganisme, l'hôte devient affaibli et ne peut plus se défendre adéquatement contre les pathogènes. Il est donc fort probable que dans une telle situation, une exposition à des agents immunosuppresseurs extérieurs, comme des polluants, ait des conséquences désastreuses pour l'hôte. Le système immunitaire, déjà affaibli par une infection, aurait de la difficulté à résister à une seconde immunosuppression par des agents extérieurs. Cette "double" immunosuppression pourrait rendre l'hôte très sensible aux pathogènes de l'environnement et pourrait le mettre dans une position où il lui serait complètement impossible de se défendre contre n'importe quel type de maladie, causant éventuellement sa mort.

7.3 Effets combinés des polluants et des parasites sur le système immunitaire

Les individus ayant un système immunitaire faible ne peuvent pas se défendre adéquatement contre les pathogènes retrouvés dans l'environnement. Les effets immunosuppresseurs de différents polluants sont souvent augmentés chez ces individus (Luebke *et al.*, 1999). Il a d'ailleurs été observé que des souris âgées, ayant un système immunitaire moins efficace, avaient plus de difficulté à se défendre contre une infection parasitaire suite à une exposition au 2,3,7,8-tétrachlorodibézo-p-dioxin, un immunosuppresseur bien connu (Luebke *et al.*, 1999). Leur réponse humorale était beaucoup plus faible que celle des jeunes individus exposés au même polluant. L'âge et les polluants semblent donc avoir un effet synergique sur le système immunitaire. Il est également possible que certains pathogènes et polluants aient un effet semblable sur ce système. Tel que mentionné dans la section précédente, certains microorganismes ont les moyens d'altérer le système immunitaire afin de pouvoir proliférer à l'intérieur de leur hôte. Une exposition à des contaminants, suivie d'une infection par ce genre de pathogène, complique souvent les réactions du système immunitaire et peut entraîner une réponse inadéquate de l'hôte, l'empêchant par la suite de se défendre contre d'autres microorganismes.

Plusieurs études ont été effectuées pour tenter de déterminer et de comprendre l'effet combiné des parasites et des polluants environnementaux sur le système immunitaire (Boroskovà et Dvornakova, 1997; Boroskovà *et al.*, 1993). Les chercheurs de ce

laboratoire ont observé que plusieurs métaux lourds avaient un effet suppresseur sur le système immunitaire, rendant les animaux inaptes à réagir adéquatement contre une infection avec le parasite *Ascaris suum*. Lors de ces études, l'activité des lymphocytes et des cellules phagocytaires, ainsi que les niveaux d'anticorps contre *Ascaris suum* ont servi d'indicateurs pour déceler une altération du système immunitaire par les contaminants. Ces paramètres ont été choisis puisque les lymphocytes, les phagocytes et les anticorps jouent normalement un rôle très important dans la défense immunitaire contre ce parasite. Des cobayes ont été exposés à des métaux lourds pour une courte période de temps, puis les a ensuite infectés avec le parasite *Ascaris suum* (Boroskovà, 1993). Les chercheurs ont constaté que les animaux exposés aux métaux lourds et aux parasites avaient un nombre moins élevé de lymphocytes B et T que les animaux exposés aux parasites seuls, bien que ces cellules auraient dû proliférer en réponse aux antigènes lors de la migration des larves. Ils ont également observé que les animaux exposés aux métaux lourds seuls avaient un nombre encore moins élevé de lymphocytes que les individus exposés aux métaux lourds et aux parasites. Une infection par des parasites semble donc capable de stimuler les lymphocytes des animaux exposés à des concentrations non-chroniques de métaux lourds, bien qu'ils soient immunosupprimés.

Les métaux lourds ont également la propriété de réduire significativement les fonctions des cellules phagocytaires, soit leur capacité à phagocyter et à activer la flambée oxydative. Une diminution dans l'efficacité de ces réponses a été observée chez des cobayes exposés aux métaux lourds (Boroskovà et Dvorožnakova, 1997; Boroskovà *et al.*, 1995; Boroskovà *et al.*, 1993; Soltys *et al.*, 1997). Toutefois, une infection subséquente de ces animaux stimulait l'activité phagocytaire bien qu'elle fut moins forte que chez les animaux non-exposés aux polluants. Une inhibition de l'activité phagocytaire, des macrophages du péritoine et des leucocytes polymorphonucléaires du sang, rend l'intensité des infections plus sévère puisque ces cellules migrent normalement vers les tissus pour participer à la destruction des parasites. Il a d'ailleurs été observé qu'une réduction de ces réponses immunologiques entraînait une augmentation de la migration des larves d'*Ascaris suum* dans les poumons. En effet, les poumons d'animaux exposés aux métaux lourds contenaient huit fois plus de larves que ceux des animaux non-exposés (Borskovà *et al.*, 1993). Cette augmentation de la migration

est probablement la conséquence d'une baisse de l'activité des cellules phagocytaires et aussi d'un déséquilibre général dans la réponse immunitaire. Ces altérations ont probablement été causées par une modulation des mécanismes immunitaires importants lors de la phase de migration des larves d'*Ascaris*.

Il a également été observé que certains métaux lourds, comme le chlorure de mercure avait la propriété d'altérer les niveaux d'anticorps circulant dans le sang chez les cobayes. En effet (Boroskovà *et al.*, 1995) ont noté que les niveaux d'anticorps spécifiques aux larves d'*Ascaris suum* étaient moins élevés chez les cobayes exposés au chlorure de mercure que chez les cobayes non-exposées. Étant donné que les métaux lourds ont la propriété de diminuer le nombre de lymphocytes B présents dans le sang, il est normal que les animaux exposés ne puissent pas produire une aussi grande quantité d'anticorps que les animaux non-exposés. Cette diminution dans la quantité d'anticorps pourrait également contribuer à l'augmentation de la migration des larves de parasites dans les poumons puisque celles-ci ne seraient plus marquées et reconnues adéquatement.

En plus d'affecter les lymphocytes B et T, les fonctions des cellules phagocytaires et les niveaux d'anticorps spécifiques aux parasites, les métaux lourds peuvent aussi avoir un impact sur la voie classique du complément. Contrairement aux autres fonctions du système immunitaire qui sont d'abord supprimées par une exposition aux polluants et ensuite stimulées par une exposition aux parasites, la voie classique du complément n'est supprimée que suite à l'exposition aux métaux lourds et aux parasites (Boroskovà *et al.*, 1995). Une exposition aux métaux lourds ou aux parasites seuls ne diminue pas cette réponse. Ce n'est que suite au stress de l'infection que nous pouvons voir une différence significative dans l'immunosuppression. Il y a donc un effet synergique des métaux lourds et des parasites sur l'activation de la voie classique du complément.

Khan (1998) a également observé que des poissons infectés par des parasites, comparativement à ceux non-infectés, devenaient plus sensibles à d'autres agents stressants présents dans l'eau, comme du pétrole ou de faibles concentrations d'hydrocarbures. 80% des animaux infectés mourraient suite à une exposition aux contaminants, ce qui laisse croire

que les poissons infectés deviennent beaucoup plus sensibles à tout autre stress causé par des agents extérieurs. Moles (1980) a également observé des réactions similaires. Des poissons parasités et exposés par la suite au naphthalène, au toluène ou au pétrole, devenaient plus sensibles aux agents stressants que ceux non-exposés. Les poissons exposés aux polluants doivent augmenter leur consommation d'énergie afin de détoxifier leur système. Il leur en reste ainsi moins pour se défendre contre les infections parasitaires, ce qui décroît leur chance de survie.

Une infection par des parasites, suite à une exposition à des polluants, peut soit stimuler ou inhiber les réponses du système immunitaire. Il est donc clair que ces deux facteurs interagissent l'un avec l'autre pour moduler les défenses du système immunitaire. Il est difficile pour le moment de comprendre exactement les mécanismes responsables de ces stimulations ou de ces suppressions. Une infection par des microorganismes complique souvent les réponses du système immunitaire et une immunosuppression, causée par des polluants, peut être accentuée ou diminuée lorsque combinée avec des pathogènes.

Bien que certains chercheurs aient tenté de démontrer que les xénobiotiques pouvaient avoir un effet sur le système immunitaire des amphibiens, aucune étude n'a encore été faite pour évaluer l'effet d'un mélange de pesticides, retrouvés dans l'environnement, sur le système immunitaire des grenouilles. Tel que mentionné précédemment, une immunomodulation causée par ces polluants pourrait influencer la résistance des animaux aux infections. De plus, les pesticides ainsi que les microorganismes pourraient avoir un effet synergique sur le système immunitaire, ce qui affaiblirait les animaux exposés. Dans le but de mieux comprendre le rôle et l'implication des polluants dans la diminution des populations d'amphibiens, nous avons donc décidé de porter cette étude sur la modulation des réponses immunitaires, causée par un mélange de pesticides, ainsi que sur l'interaction entre ces produits, les parasites et le système immunitaire des anoures.

Deuxième Partie

Articles Scientifiques

1 Article # 1: Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*

1.1 Résumé français de l'article #1

Effets des pesticides agricoles sur le système immunitaire de *Xenopus laevis* et *Rana pipiens*

Christin, M-S., Brousseau, P., Ruby, S., Ménard, L., Cyr, D., Marcogliese, D. et Fournier, M.

Depuis environ 30 ans, des épidémies ont décimé plusieurs populations d'amphibiens à travers le monde provoquant même la disparition complète de certaines d'entre elles. Plusieurs causes ont été suggérées pour expliquer ce déclin. Parmi elles, l'augmentation de la pollution et la diminution de la qualité de l'eau attirent de plus en plus l'attention. En effet, certains agents chimiques retrouvés dans l'environnement ont la propriété de moduler les réponses du système immunitaire. Puisque les amphibiens sont souvent exposés aux pesticides agricoles, il est possible que ces polluants affectent leur système immunitaire et les rendent ainsi plus sensibles à différents types de pathogènes. Dans cette étude, nous avons exposé deux espèces de grenouilles, *Xenopus laevis* et *Rana pipiens*, pendant une courte période de temps à un mélange de pesticides représentatif de ce qui est retrouvé dans l'environnement. Ce mélange contenait: de l'aldicarbe, de l'atrazine, de la dieldrine, de l'endosulfan, du lindane et de la métribuzine. Ces pesticides ont déjà été identifiés comme étant présents dans les eaux de surface de plusieurs tributaires du fleuve Saint-Laurent (Québec, Canada). Nos résultats démontrent que ce mélange peut altérer la cellularité et l'activité phagocytaire des splénocytes chez *Xenopus laevis* ainsi que la prolifération des lymphocytes chez *Rana pipiens*. Ils indiquent que les pesticides agricoles peuvent avoir un effet néfaste sur le système immunitaire des grenouilles et pourraient ainsi contribuer à la disparition globale des amphibiens en diminuant leur résistance aux infections.

1.2 Contribution de l'étudiant aux travaux de recherche

Les expériences sur le système immunitaire des grenouilles ont été faites par l'étudiante avec l'aide de Mme Pauline Brousseau, chercheur associée à l'INRS, et Mme Lucie Ménard,

assistante de recherche pour le Dr. Michel Fournier. La rédaction de cet article à été faite par l'étudiante dans le cadre de son projet de maîtrise. Cet article à été soumis à la revue "Developmental and Comparative Immunology".

1.3 Article # 1

EFFECTS OF AGRICULTURAL PESTICIDES ON THE IMMUNE SYSTEM OF *XENOPUS LAEVIS* AND *RANA PIPIENS*

^aChristin, M.S., ^aBrousseau, P. *, ^aMénard, L., ^bGendron, A.D., ^cRuby, S., ^aCyr, D.,

^bMarcogliese, D.J., ^dRollins-smith, L., ^aFournier, M.

^a INRS-Institut Armand-Frappier-Santé humaine, 245 Hymus blvd., Montreal, Qc, Canada, H9R 1G6, ^b St. Lawrence Centre, Environment Canada, 105 McGill St., 7th floor, Montreal, Qc, Canada, H3G 1M8, ^c Concordia University, Department of Biology, 1455 de Maisonneuve Blvd West, Montreal, Qc, Canada, H3G 1M8, ^d Vanderbilt University Medical Centre, 2201 West End Avenue, Nashville, TN, USA, 37232.

*: Corresponding author: Pauline Brousseau

Biophage Inc.

6100 Royalmount, Montreal (Qc)

Canada, H4P 2R2

Tel/fax: (514) 496-1453/1521

E-mail: pauline.brousseau@nrc.ca

Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*

ABSTRACT

Over the last 30 years, there have been mass declines in diverse geographic locations among amphibian populations. Multiple causes have been suggested to explain this decline. Among these, environmental pollution is gaining attention. Indeed, some chemicals of environmental concern are known to alter the immune system. Given that amphibians are frequently exposed to agricultural pesticides, it is possible that these pollutants alter their immune system and render them more susceptible to different pathogens. In this study, we exposed two frog species, *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*, for a short period of time to a mixture of pesticides representative of what is found in the environment. The pesticides were known to be present in surface water of many tributaries of the St-Lawrence River (Quebec, Canada). Our results demonstrate that the mixture of pesticides could alter the cellularity and phagocytic activity of *Xenopus laevis* and lymphocyte proliferation of *Rana pipiens*. Taken together, these results indicate that agricultural pesticides can alter the immune system of frogs and could contribute to their global decline by rendering them more susceptible to infections.

Key words: Pesticides; Immunotoxicology; Amphibians; Phagocytosis; Lymphocyte proliferation; *Rana pipiens*; *Xenopus laevis*.

INTRODUCTION

Over the past decades, the decline of the amphibian populations has been extensively reported [1]. This phenomenon is recognized and the patterns of losses exceed normal population fluctuations [1,2]. Several causes, such as UV radiation [3], climate changes [4], parasites and pathogens [5,6,7] as well as pollution [6,8,9,10] have been suggested for this decline. Among these, pollution is gaining attention, especially in regard to the toxic effects of xenobiotics on the immune system. It is thought that some chemicals might affect the immune system of susceptible organisms such as amphibians because an increase in susceptibility to infections has recently been observed in different anuran populations [5,6,7,11,12].

Observations of local die-off and even extinction of amphibian populations have been associated with infections by different pathogens [11,12]. It has been suggested that a direct or indirect suppression of the immune system by contaminants could prevent the immune system of amphibians from developing a normal and adequate immune response against pathogens [5]. It is well documented today that a wide variety of stressors such as ultraviolet radiation [4,13,14] and cold [15,16] can cause immunosuppression in amphibians. For the moment, limited data concerning immunotoxicity studies with pesticides are available for amphibians. However, it is clear from other animal studies that many chemicals including pesticides can alter the immune system either morphologically or functionally [17-20]. In many of these studies, the high concentrations used, the administration technique (injected or gavage instead of representative exposure as it occurs in the wild) and the fact that the pesticides were tested individually and not in a mixture do

not reflect relevant exposure that wildlife might experience. Therefore, the immunotoxic effects observed in experimental animals such as rodents are often hard to extrapolate to wildlife populations and sublethal effects of agricultural contaminants on the immune system of naturally exposed animals such as amphibians are not well understood.

To test the hypothesis that agricultural pesticides modulate the normal immune response of amphibians, we conducted *in vivo* experiments on *Xenopus laevis*, a frog laboratory model, and on *Rana pipiens*, a frog species indigenous to North America. We exposed these two species of frogs to different concentrations of a specific mixture of pesticides. This mixture contained four insecticides (lindane, dieldrin, endosulfan and aldicarb) as well as two herbicides (metribuzine and atrazine). The majority of these pesticides were selected for our studies because of their presence in surface water at different sites along the St-Lawrence River (Qc, Canada) [21,22]. The lower doses selected reflect in most cases common exposure levels in the environment and the higher doses were selected as extremes of what could potentially happen in highly contaminated environments. These pesticides are well studied and known to cause various toxic responses when used individually [23-32].

MATERIAL AND METHODS

The methods used in these experiments have been adapted from *the Manual of Immunological Methods* [33]. Some aspects of each protocol, such as cell concentrations, incubation time and temperature, mitogen concentrations, cells to bacteria ratio and speed of centrifugation have been adapted for each of the frog species. Preliminary experiments were made to determine the optimal conditions for each assay.

Animals and tissues collection

Young post-metamorphic *Xenopus laevis*, obtained from the supplier Xenopus One (Denver, MI, USA), were transferred into 20 gallon tanks filled with 18 litres of dechlorinated tap water at 20°C. Upon delivery, thirty animals were placed in each tank (6 tanks in total). Frogs were fed 3 times/week with young frog dried food (Boreal, St. Catherine, ON, Canada) according to standard procedure (Boreal company *Xenopus* manual).

Tadpoles of *Rana pipiens* at Gosner stage 25, were captured from a non-agricultural pond at Boucherville (Qc, Canada) and brought to the laboratory. The tadpoles were placed into tanks filled with dechlorinated tap water between 21.5°C and 22.5°C at a final density of approximately 1 tadpole per litre of water. Water was filtered with biological filter and was changed twice weekly. Tadpoles were fed with boiled lettuce *ad libidum* every day. The animals were kept in the tanks until metamorphosis. After metamorphosis, the juvenile frogs were placed in two level tanks to simulate terrestrial and aquatic environments. On average, two animals were placed in each tank. They were fed with live crickets (Mirido

Importations, Montreal, Qc, Canada) covered with phosphorus-free carbonate calcium powder (4 crickets/frog, 3 times a week).

Animals were sacrificed by bathing them in a solution of 0.8% tricaine methanesulfonate, MS-222, (Boreal, St. Catherines, ON, Canada) dissolved in distilled water. Before the beginning of the exposures and before sacrifice, each *Rana pipiens* (but not *X. laevis*) was weighed and measured. Spleens were removed aseptically and cell suspensions were prepared in complete amphibian L-15 medium (Biomedica, Drummondville, Qc, Canada). In each cell suspension, the cells were stained with trypan blue and then counted. Cell suspensions were further adjusted as required by the concerned assay.

Determination of cell concentration and viability

A drop of each cell suspension was introduced into an improved Neubauer hemocytometer. Total number of cells was determined microscopically. In parallel, viability was determined microscopically by staining cells with trypan bleu and evaluating their membrane permeability to this dye.

Chemicals

The chemicals used in the experiments were purchase from Chemservice (West Chester, PA, USA). These were: atrazine ($C_8H_{14}C_1N_5$), metribuzine ($C_8H_{14}N_4OS$), endosulfan ($C_{12}H_6C_{14}O_2S$), lindane ($C_6H_6C_{16}$), dieldrin ($C_{12}H_8C_{16}O$) and aldicarb ($C_7H_{14}N_2O_2S$). Atrazine stock solution was prepared in deionized water, with the help of a sonicator at a

concentration of 30 ppm. Metribuzine and aldicarb stock solutions were prepared in deionised water respectively at concentrations of 110.01 ppm and 3060 ppm. Dieldrin, endosulfan and lindane stock solutions were prepared in 0.01 % DMSO respectively at concentrations of 30 ppb, 4 ppb and 66 ppb. DMSO stock solution was prepared in deionised water at a concentration of 0.01%. Control and test solutions were thoroughly mixed prior to use.

Toxicity testing

Xenopus laevis

Six different treatment groups were used for the experiment: control with dechlorinated clean water, control with DMSO, 0.1X, 1.0X, 10X and 100X, where X represents the concentration of pesticides in the mixture that can reflect those normally found in the environment [21] (atrazine: 1X=21 ppb; metribuzine: 1X=0.56 ppb; aldicarb: 1X=17 ppb (no longer found in the environment at this concentration); dieldrin: 1X=0.15 ppt; endosulfan: 1X=0.02 ppt; lindane: 1X=0.33 ppt). We exposed 180 *Xenopus laevis* (n=30 for each treatment) for 7, 14 and 21 days. After each exposure period, 10 froglets were sampled from the tanks. Six were used for immunological assays and four for other experiments which will be reported elsewhere (Ruby *et al.* in preparation).

Froglets were allowed to acclimatise over a period of 7 days, in 18 litres of fresh water, before the mixture of pesticides was introduced in the tanks. After acclimatisation, test solutions were renewed twice a week by removing the total content in the tanks and adding an equal volume of fresh solution. Mortality was recorded daily. Temperature was

maintained at 19°C and each tank was aerated with oxygen. The photoperiod simulated conditions in southern Quebec (Canada) during mid-June to mid-July. The whole experiment was performed twice.

Rana pipiens

Five different treatment groups were used for the experiment: control with dechlorinated clean water, control with DMSO, 0.1X, 1.0X, and 10X, where X represents the concentration of pesticides found in the environment, as described above. One hundred *Rana pipiens* (n=20 for each treatment) were exposed for 21 days. Ten frogs from each group (50 in total) were sacrificed 21 days after the beginning of the exposures in order to test different immune parameters. The remaining 50 frogs were used to conduct other experiments, which will be reported elsewhere. Since *R. pipiens* needs both an aquatic and terrestrial environment after metamorphosis, the frogs were kept for 16 hours per day in 20 gallon aquaria containing 1 litre of contaminated water, and for the remaining 8 hours, in inclined aquaria containing a small volume of clean water and a dry platform. Test solutions were renewed three times a week by removing the total content of water in the tanks and adding an equal volume of fresh solutions. Mortality was recorded daily. Ambient temperature was maintained between 20°C and 22°C. Due to the small water volume, no aeration was required and each aquarium was equipped with a cover to minimize water evaporation. The photoperiod simulated conditions in southern Quebec (Canada) during mid-June to mid-July. The experiment was conducted once.

Phagocytosis

Spleen cells (1×10^5 cells/500 μ L of L15) were mixed with fluorescent (FITC) *Escherichia coli* K-12 (Molecular probe, Eugene, OR, USA) at a ratio of 1:25 (phagocytes:bacteria). The mixture was incubated at 26°C for *X. laevis* and at 29°C for *R. pipiens*. After one hour of incubation, 25 μ L of trypan blue was added to the cell suspensions in order to quench the fluorescence of bacteria that had not been internalised. Negative controls were obtained by incubating the cells without bacteria. The fluorescence of engulfed bacteria was then analyzed by flow cytometry. The fluorescence emission was collected at 520 nm (FL1). A FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) with an air-cooled argon laser providing an excitation at 488 nm was used. A total of 10,000 events were acquired for each sample. The data were analyzed, from a dot plot showing two parameters: size (Forward Scatter, FSC) on the Y-axis and complexity (Side Scatter, SSC) on the X-axis. On this dot plot, the phagocytic cells population was isolated in order to analyze their phagocytic capacity. From this plot, a fluorescence (FL-1) frequency distribution histogram was obtained, which is a direct representation of the splenocytes' phagocytic activity. Data collection and analysis were performed with the WinMDI 2.8 program.

Blastogenesis

Spleen cells (60,000 cells/100 μ L of L15 + 0.05% mercaptoethanol) were mixed with 100 μ L of single mitogen in round bottom microwell plates. Final concentration of each mitogen was 5 μ g/mL for ConA (concanavilin A) and 2.5 μ g/mL for PHA (phytohemagglutinin).

Microplates were incubated for 72 hours at 26°C with 5% CO₂ for *X. laevis*, and at 29°C for *R. pipiens*. Eighteen hours before the end of the incubation, 0.5μCi of ³H-methyl thymidine (ICN, Costa Mesa, CA, USA) was added to each well. The DNA was then captured on filters and transferred to scintillation vials. The incorporated ³H-methyl thymidine was measured with a β scintillation counter. The results are expressed in DPM (disintegrations per minute).

Statistical Analysis

Data for all assays (cellularity, viability, phagocytosis and lymphocyte proliferation) were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) using the SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) and SAS system (SAS institute Inc., Cary, NC, USA) software. The assumption of normality and homoscedasticity were verified before each ANOVA. When a significant difference was detected at $P < 0.05$, the means were compared using a Tukey-Kramer studentized range test.

RESULTS

Effects of pesticides on the viability of frogs

Xenopus laevis

Mortality was only observed at the highest concentrations of pesticide (10X and 100X). For the first set of experiments, 15 frogs died in the 100X tank and 2 in the 10X tank. In the second set of experiments, 5 frogs died in the 100X tank while none died in the 10X treatment group.

Rana pipiens

No mortality due to pesticide exposure was observed.

Effect of pesticides on cellularity and viability of frog's splenocytes

Cellularity and viability were measured by microscopic counts. Results are expressed in % of normal response, which represents: (spleen cellularity of each group/spleen cellularity of the control water group) x 100.

Xenopus laevis

Significant differences in the concentration of cells present in the spleens of *Xenopus laevis* exposed for 7, 14 and 21 days were observed. Compared to the DMSO control (67.91 ± 8.92 , mean $\pm$ s.e.m), cellularity was significantly decreased in the spleen following a 7 days exposure of frogs to the 100X concentrations (28.98 ± 1.52 , Figure 1A). Moreover,

compared to the frogs exposed to clean water, cellularity of the spleen from all other exposed frogs, including the ones exposed to DMSO, decreased. Following a 14 day exposure to pesticides, cellularity decreased in the spleen of frogs exposed to the 100X (40.71 ± 5.92) concentrations compared to the clean water and DMSO group (87.06 ± 4.90 , Figure 1B). Finally, frogs exposed for 21 days to the 10X (49.51 ± 7.81) and 100X (30.23 ± 2.55) concentrations had a lower cellularity in their spleens compared to animals exposed to clean water and DMSO (89.31 ± 7.03 , Figure 1C). However, the viability of these cells was relatively constant between the different treatment groups during the whole treatment. No difference were observed in the viability following a 7, 14 or 21 day treatment. Therefore, the mixture of pesticides seems to have an effect on the number of cells present in the spleen, but not on their viability. ANOVA results are presented in Table 1.

Rana pipiens

No significant difference in the concentration and the viability of cells present in the spleen of exposed frogs were observed compared to controls (Figure 2).

Effects of pesticides on the number of frog's phagocytic splenocytes

The phagocytic activity was determined by measuring the quantity of splenocytes that was able to ingest fluorescent bacteria. Results are expressed in % of normal response which represents: (number of active phagocytes present in the spleen of exposed frogs/number of active phagocytes present in the spleen of frogs exposed to clean water) x 100.

Xenopus laevis

No significant difference in the number of phagocytic cells present in the spleen of *X. laevis* exposed to pesticides for 7 and 14 days was observed (data not shown). However, after 21 days of exposure, the frogs exposed to a concentration of 1.0X (120.67 ± 5.14 , mean $\pm$ s.e.m), 10X (129.07 ± 9.69) and 100X (135.55 ± 2.91) had significantly higher numbers of active phagocytes in their spleens, when compared to the control animals (104.35 ± 4.59 , Figure 3). ANOVA results are presented in Table 1.

Rana pipiens

Even though a slight decrease was observed in the number of active phagocytes present in the spleens of frogs exposed to pesticides, the overall comparison indicated no significant difference among each treatment group (Figure 4).

Effect of pesticides on the proliferation of T lymphocytes present in frog spleens

Lymphocyte proliferation was measured by ^3H uptake following a mitogen stimulation. Results are presented in DPM which represents the quantity of radioactive thymidine incorporated in the lymphocytes DNA.

Xenopus laevis

No mitogenic effect was observed with *X. laevis*, which means that no lymphocyte stimulation was observed. However, pesticides tended to lower the proliferation of spleen cells after 21 days of exposure in the absence of mitogen (data not shown).

Rana pipiens

Significant differences in the proliferation of T lymphocytes (in response to T lymphocyte mitogen) present in the spleen of *R. pipiens* exposed to pesticides were detected. Indeed, frogs exposed to concentrations of 0.1X (1342.43 ± 304.32 for ConA and 974.75 ± 86.02 for PHA mean $\pm$ s.e.m), 1.0X (1464.53 ± 558.71 for ConA and 1797.40 ± 500.55 for PHA) and 10X (623.92 ± 77.80 for ConA and 556.52 ± 53.56 for PHA) had a lower proliferation of T lymphocytes (in response to ConA and PHA) in their spleens compared to frogs exposed to DMSO (3562.08 ± 554.67 for ConA and 3585.37 ± 633.72 for PHA). Moreover, proliferation of splenocytes in the absence of mitogen was significantly lower in all exposed frogs compared to DMSO treated frogs. However, T lymphocyte proliferation in response to PHA and Con A was not significantly different in frogs exposed to clean water compared to pesticide exposed frogs. The effect of pesticides on B lymphocytes remains to be determined. Results and summary statistics of ANOVA are respectively presented in Figure 5 and Table 2.

DISCUSSION

Because the survival of amphibians is closely linked to water availability, contamination of this water may be a precursor for increased mortality events either directly or indirectly by modulating the efficiency of the immune system. At the present time, irridovirus [34], chytrid fungus [12] and parasites [4,7] all seem to contribute to declines observed in the amphibian populations since the 1970's. The increase in infections by these pathogens could be explained by different hypotheses. These pathogens could have newly emerged in the environment, the proliferation or the virulence of these pathogens could have increased in the ecosystem due to different causes such as a global climate change, or the immune system of amphibians could have become compromised and pathogens have a greater facility to infect and kill the animals. These two last hypotheses are not mutually exclusive and an increase in the populations of these pathogens as well as a decreased efficiency in the immune system could both explain higher degrees of infection in the amphibian populations.

The immunotoxic effects of agricultural pesticides at environmentally relevant concentrations have not been widely studied. Our findings support the hypothesis that agricultural pesticides have an effect on cells of frog immune system. Indeed, our results demonstrate that pesticides, and to a lesser extent DMSO, have the ability to decrease the number of cells present in lymphoid organs such as the spleen. At high concentrations (100X), our mixture decreased the number of splenocytes in *Xenopus laevis* treated for 7, 14 and 21 days, showing that it can have a short and a long term effect on the cells. When the frogs were exposed for longer periods (14 and 21 days), lower concentrations of pesticides were required to diminish the cellularity. Gromysz-Kalkowaska *et al.* [35] observed similar

effects in *Rana temporaria* frogs exposed to an organophosphorus insecticide, tetrachlorvinfos. Indeed, animals exposed to high concentrations of this pesticide had a lower number of leukocytes in their blood when compared to non-exposed animals. The mechanism by which this decrease in cell number occurred was not well understood. It is possible that the contaminant provoked directly the lysis of the leukocytes or indirectly by inducing the secretion of corticosteroid hormones, which could further activate special plasma nucleases able to cause the destruction of immune cells.

Given that we had a high variance in our groups, it is difficult to determine exactly which concentration of our pesticide mixture is necessary to affect the number of cells in the spleen. However, we observed that as the concentration of xenobiotics increased, the mean number of spleen cells seemed to decrease, suggesting a dose-response relationship. The concentrations at which we observe this decrease in the cellularity are not environmentally realistic. Even if this gives us an indication that pesticides can affect the anuran immune cells, it is very unlikely that frogs will be exposed to high concentrations of pollutants during several days. Nevertheless, we noted that as the time of exposure increased, a reduction in cellularity was observed at lower concentrations. This indicated that long term exposure to pesticides might impair the immune system to a greater extent than short exposure. For the moment, we do not know whether these xenobiotics influence the production of splenocytes or if they destroy them once they are produced. The decreased number of cells in the spleen might further result in a decreased efficiency of the immune system to respond against pathogens. The increase in epidemic diseases associated with amphibian decline could be explained, at least in part, by this effect of pollution on the immune system.

Our results also demonstrate that contaminants found in the environment of amphibians can modulate basic immune responses, such as phagocytosis and lymphocyte proliferation. Indeed, our results showed that pesticides have the capacity to increase the number of phagocytes and decrease the lymphocyte proliferation. Similar results have also been obtained elsewhere. Indeed, Podstawka (1994) demonstrated that dichlorvos, an organophosphate pesticide used in Poland, had the ability to increase phagocytosis of mice macrophages while decreasing their capacity to kill microorganisms by producing reactive oxygen species [36]. Moreover, *in vitro* exposure of immunocytes (murine and human) to malathion suppressed the generation of immune and mitogenic responses [37]. Along with our results, these findings clearly demonstrate that environmental contaminants have the ability to modulate some immune functions.

Phagocytes are often implicated in inflammation. They ingest foreign bodies, present them to lymphocytes and release specific mediators responsible for the recruitment of other cells to the site of inflammation. They are therefore very important in the elimination of an infection. However, when phagocytes become hyperstimulated chronic inflammation can occur which can result in pathological symptoms. It has already been observed that malathion, an organophosphate pesticide, had the ability to influence the course and intensity of SLE (systemic lupus erythematosus) in genetically predisposed mice [38]. Certain pesticides, such as the ones used in our mixture, may have the ability to hyperstimulate immune cells and lead to hypersensitivity reactions or autoimmune diseases which could induce acute damages to different tissues. For the moment, it is not known what percentage of activation of immune cells is required to cause tissue damage. Studies with longer

exposure time would be needed to evaluate if the phagocyte activation observed in our experiment is enough to lead to inflammation related disease.

The inability of T lymphocytes to proliferate in frogs exposed to low concentration of pesticides (0.1X) likely to be found in the environment could decrease the animal's ability to respond to an antigen. Like mammals, frogs have two different populations of lymphocytes. The T cells are produced and mature in the thymus while the B cells are produced in the spleen and mature independently of the thymus. The T cells are very important in the development of an immune response. Even if B lymphocytes are responsible for antibody production, T cells play an important role in the removal of infected cells and in the stimulation of B lymphocytes. Indeed, before the production of antibodies occurs, T cells must stimulate B cell development and maturation (for a complete review of T and B lymphocyte interaction, refer to Janeway *et al.*, 1999 [39]). Therefore, a decrease in T cell function will probably contribute to a diminution of antibody production and the acquired immune response will take a much longer time to establish, possibly resulting in septicemia. A reduced proliferation of T lymphocytes will slow down clonal expansion and sufficient specific effector cells will not be produced to fight infections. Even if an animal has been previously exposed to an antigen and has the specific memory cells to initiate a response, the overall decrease in proliferation will limit the strength of the immune response [15].

This study does not explain why the proliferative response of amphibian lymphocytes is lessened following a xenobiotic exposure. However, Maniero and Carey (1997) observed a similar effect on lymphocytes after cold exposure. They suggested that since PHA stimulate mitosis by mimicking an antigen binding to T lymphocytes, it is possible that a loss of, or

change in receptors implicated in antigen binding could be responsible for the diminished proliferation of lymphocytes. The pesticides that we used in our mixture could act in the same way. Another explanation for the decrease proliferation of T cells could reside in the production of specific cytokines. Indeed, it has already been observed that other pesticides, such as carbofuran, could suppress the production of and responsiveness to IL-2 [40]. A decrease in the production of and responsiveness to this cytokine reduces the proliferation of T lymphocytes. It would therefore be interesting to verify if the pesticides used in our mixture could impair the production of IL-2. Finally, the suppression of T lymphocyte proliferation could be due to the suppression of effector functions of antigen presenting cells (APCs). If the pesticides have the ability to inhibit the processing and presentation of antigens by APCs, the lymphocytes won't be able to recognize and proliferate in response to this antigen [40]. Further research will be needed in order to understand the exact effect of our pesticide mixture on the ability of T lymphocytes to proliferate in response to a mitogen.

In the cellularity and the proliferation of lymphocyte assay, DMSO seem to have an effect on the immune cells. Indeed, DMSO decreased the number of cells present in the spleen of *X. laevis* following a 7 day exposure but increased the proliferation of T lymphocytes in *R. pipiens* following a 21 day exposure. The effect of DMSO on the cellularity of *X. laevis* spleens seem to be only a short term effect since following a 14 and 21 day exposure the decrease is no longer observed. The reason why this substance modulate these immune competences is not known. Further studies would be needed to understand its action on the immune system. Even though DMSO has some effects on frogs, these effects are not as important as the one created by other vehicles like methanol. Indeed, in previous experiments, we used methanol to dissolve certain pesticides contained in our mixture. We

observed that this vehicle created sex reversal in developing frogs and had a negative effect on the survival of animals. Therefore, even if DMSO affects slightly the immune system of frogs it is still probably a good vehicle. It doesn't seem to affect the development and growth of anurans, and we can determine its effect on the immune system of frogs by comparing the competences of animals exposed to clean water with the ones of animals exposed to DMSO.

Our results finally suggest that a difference in susceptibility (for the cellularity and phagocytosis) exists between the two frog species studied. Indeed, *R. pipiens* seems less susceptible to pesticides than *X. laevis*. Two hypotheses can be suggested to explain these differences but the exact reason is still not clear. The first hypothesis is that in our experimental conditions, *R. pipiens* frogs were exposed to pesticides only during 16 hours compared to a 24 hours exposure for *X. laevis*. Since *R. pipiens* frogs were less exposed to our mixture, they might have suffered less from the effects of the pesticides. Moreover, it is also possible that we had more variation in our groups of *R. pipiens* since it was an outbreed species from a population exposed to the natural environment. The larger standard errors may have prevented us from detecting significant differences between each groups. Experiments with larger sample size would be required to determine if *R. pipiens* is as sensitive as *X. laevis* to pesticides. A second hypothesis is that *R. pipiens* has developed a certain tolerance against pesticides since it is an indigenous frog species and is more often exposed environmental perturbations in general. Gutleb *et al.* [41] proposed a similar explanation following the observation that *Rana catesbeiana* tadpoles were less sensitive than *Xenopus laevis* tadpoles to polyhalogenated aromatic hydrocarbons (PHAHs). Indeed, following an exposure to PHAH, *R. catesbeiana* developed fewer malformations than *X.*

laevis, suggesting that tadpoles of the Ranidae family may be less sensitive than *X. laevis* to PHAH-mediated malformations.

To our knowledge, this is the first study that determined the combined effects of pesticides, stimulating natural exposure, on the immune system of amphibians. Up to date, very few studies have measured the impact of a pesticide mixture on animal health. Most research has evaluated the effects of pesticides administered individually. However, in the environment, it is very rare that animals are exposed to only one substance at the time. Moreover, the immunotoxic effects observed in experimental animals, such as rodents, are often hard to extrapolate to wildlife populations because of the high concentrations and the administration techniques used. This study emphasises the importance of understanding the link between physiological response and the ecological responses to aquatic pollution. It has become increasingly clear that to predict how pollutants may translate into species loss, we must understand the exact effects of pesticides on the immune system. Our results indicate that pesticides can increase the susceptibility of amphibians to pathogens by modulating their immune systems. The interaction between pesticides and the immune system deserve further studies if we want to clearly understand the impact of agricultural practices on aquatic systems.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Marlène Fortier for its work on the adaptation of immunological techniques on anurans and Stéphanie Barbeau who participated in the rearing of frogs. Thanks are also due to the Toxic Substance Research Initiative (TSRI) for their financial support.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: *Effects of pesticides on cellularity and viability of splenocytes from Xenopus laevis following a 7(A), 14(B) or 21(C) day exposure.* Cellularity was influenced following an *in vivo* exposure to pesticides. *Xenopus* exposed to the 100X concentration for 7 and 14 days as well as those exposed to the 10X and 100X concentrations for 21 days had a significantly lower concentration of cells in their spleen. Moreover, cellularity of frogs exposed to clean water during 7 days was significantly higher compared to all other treated groups. Viability of these cells was not influenced. Cellularity results are expressed in % normal response ((cellularity in the spleens of exposed frogs / cellularity in the spleen of clean water frogs) x 100) and viability is expressed in % viability ((alive cells / total cells) x 100). * = significant difference at $P < 0.05$ compared to DMSO group.

Figure 2: *Cellularity and viability of splenocytes from Rana pipiens following a 21 day exposure.* Cellularity and viability were not influenced following an *in vivo* exposure to pesticides. Cellularity results are expressed in % normal response ((cellularity in the spleens of exposed frogs / cellularity in the spleen of frogs exposed to clean water) x 100) and viability is expressed in % viability ((alive cells/total cells) x 100).

Figure 3: *Effects of pesticides on the number of phagocytic splenocytes present in the spleen of Xenopus laevis following a 21 day exposure.* *Xenopus laevis* exposed to the 1.0X, 10X and 100X concentrations had a higher number of phagocytic cells in their spleen. Results are expressed in % normal response ((number of phagocytes present in the spleen of exposed

frogs / number of phagocytes present in the spleen of frogs exposed to clean water) x 100). *
= significant difference at $P < 0.05$ compared to DMSO group.

Figure 4: *Effects of pesticides on the number of phagocytic splenocytes present in the spleen of Rana pipiens following a 21 day exposure.* *Rana pipiens* exposed to the mixture of pesticides did not have a significantly lower number of phagocytic cells in their spleen. Results are expressed in % normal response ((number of phagocytes present in the spleen of exposed frogs / number of phagocytes present in the spleen of frogs exposed to clean water) x 100).

Figure 5: *Effects of pesticides on T lymphocyte proliferation of Rana pipiens following a 21 day exposure.* Mitogenic stimulation was decreased at all concentrations tested. Results are expressed in DPM (radioactivity count). * = significant difference at $P < 0.05$ compared to DMSO.

REFERENCES

- [1] Houlahan, J.E., Findlay, C.S., Schmidt, B.R., Meyer, A.H. and Kuzmin, S.L. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 2000; 404:754-755.
- [2] Alford, R.A. and S.J. Richards. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecological Systematics* 1999; 30:133-165.
- [3] Kiesecker, J.M. and Blaustein, A.R. Synergism between UV-B radiation and pathogen magnifies amphibian embryo mortality in nature. *Proceedings of the National Academy of Science* 1995; 92:11049-11052.
- [4] Pounds, J.A., Fogden, M.P.L. and Campbell, J.H. Biological response to climate change on a tropical mountain. *Nature* 2001; 398:611-615.
- [5] Carey, C. Infectious disease and worldwide decline of amphibians populations with comments on emerging diseases in coral reef organisms and in human. *Environmental Health Perspectives* 2000; 108, suppl.1:143-150.
- [6] Boyer, R. and Grue, C.E. The need for water quality criteria for frogs. *Environmental Health Perspectives* 1995; 103(4):352-357.
- [7] Johnson, P.T.J., Lunde, K.B., Ritchie, E.C. and Launer, A.E. The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship. *Science* 1999; 284:802-804.
- [8] Carey, C., Cohen, N. and Rollins-Smith, L. Amphibian decline and immunological perspective. *Developmental and Comparative Immunology* 1999; 23:459-472.
- [9] Rollins-Smith, L.A. Metamorphosis and the amphibian immune system. *Immunological Reviews* 1998; 166:221-230.
- [10] Carey, C. and Bryant, C.J. Possible interrelation among environmental toxicants, amphibian development and decline of the amphibian population. *Environmental Health Perspective* 1995; 103 suppl.4:13-17.
- [11] Worthylake, K.M. and Hovingh, P. Mass mortality of salamanders (*Ambystoma tigrinum*) by bacteria (*Acinobacter*) in oligotrophic seepage mountain lake. *Great Basin National Member* 1989; 49:364.
- [12] Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Grenn, D.E. Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocombe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K.R., Maratelli, G. and Parkes, H. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Science* 1998; 95:9031-9036.

- [13] Vermeer, B.J. and Hurks, M. The clinical immunotoxicity of pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1996; 24:149-154.
- [14] Selgrade, M.J., Repacholi, M.H. and Kore, H.S. Ultraviolet radiation-induced immune modulation: potential consequences for infections, allergic and autoimmune disease. *Environmental Health Perspective* 1997; 105:332-334.
- [15] Maniero, G.D. and Carey, C. Changes in selected aspects of immune function in the leopard frog, *Rana pipiens*, associated with exposure to cold. *Comparative Physiology Part B* 1997; 167:256-263.
- [16] Cooper, E.L., Wright, R.K., Klempau, A.E. and Smith, C.T. Hibernation alters the frog immune system. *Cryobiology* 1992; 29:616-631.
- [17] Sharma, R.P. and Reddy, V. Toxic effects on chemicals on the immune system. In *Toxicology*. Washington: Hemisphere Publishing, 1987. p. 555-591.
- [18] Luebke, R.W., Hodson, P.V., Faisal, M., Ross, P.S., Grasman, K.A. and Zelikoff, J. Aquatic pollution-induced immunotoxicity in wildlife species. *Fundamental and Applied Toxicology* 1997; 37:1-15.
- [19] O'Halloran, K., Ahokas, J.T. and Wright, P.F.A. 1996. *In vitro* responses of fish immune cells to three classes of pesticides. In: *Ecotoxicology: Responses, biomarkers and risk assessment*. Fair Haven: SOS Publication, 1996. p. 535-538.
- [20] Zelikoff, J.T., Wang, W., Islam, N., Flesher, E. and Twedok, L.E. 1996. Immune response of fish as biomarkers to predict the health effects of aquatic pollution: application of laboratory assays for field studies. In *Ecotoxicology: Responses, biomarkers and risk assessment*. Fair Haven: SOS Publication, 1996. p. 263-279.
- [21] Giroux, I. Contamination de l'eau par les pesticides dans les régions de culture de maïs et de soya au Québec. Direction des écosystèmes aquatiques, Ministère de l'environnement, 1999. 23 pp.
- [22] Rondeau, B. Pesticides dans les tributaires du fleuve Saint-Laurent 1989-1991. Environnement Canada-Région du Québec, Conservation de l'environnement, Centre Sain-Laurent, Rapport scientifique et technique ST-62 1996; 58 pages.
- [23] Vial, T., Nicolas, B. and Descotes, J. Clinical immunotoxicity of pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1996; 48:215-229.
- [24] Meera, P., Rao, P.R., Shanker, R., Tripathi, O. Immunomodulating effect of gamma-HCH (lindane) in mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 1992; 14:261-282.

- [25] Dewailly, E., Ayotte, P., Bruneau, S., Gingras, S.D., Belles-Isles, M. and Roy, R. Susceptibility to infections and immune status in Inuit infants exposed to organochlorine. *Environmental Health Perspectives* 2000; 108:205-211.
- [26] Fonovich de Shroeder, T. and Pechen D'Angelo, A.M. Dieldrin modifies the hydrolysis of PIP2 and decreases the fertilisation rate in *Bufo arenarum* oocytes. *Comparative Biochemical Physiology and Comparative Pharmacological and Toxicological Endocrinology* 1995; 14:747-752.
- [27] Dalsenter, P.R., Dallegrave, E., Mello, J.R., Langeloh, A., Oliveira, R.T. and Faqi, A.S. Reproductive effects of endosulfan on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. *Human Experimental Toxicology* 1999; 18:583-589.
- [28] Harris, M.L., Chora, L., Bishop, A. and Bogart, J.P. Species and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology* 2000; 64:263-270.
- [29] Dean, T.N., Kakkanaiah, V.N., Nagarkatti, M. and Nagarkatti, P.S. Immunosuppression by aldicarb of T cell response to antigen-specific and polyclonal stimuli results from defective IL-1 production by the macrophages. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1990; 106:408-417.
- [30] Porter, W.P., Green, S.M., Debbink, N.L. and Carlson, I. Groundwater pesticides: interactive effects of low concentrations of carbamates aldicarb and methomyl and the triazine metribuzine on thyroxine and somatotropin levels in white rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1993; 40: 15-34.
- [31] Cooper, R.L., Stoker, T.E., Tyrey, L., Glodman, J.M. and McElroy, W.K. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicological Science* 2000; 53:297-307.
- [32] Larson, D.L., McDonald, S., Fivizzani, A.J., Newton, W.E. and Hamilton, S.J. Effects of the herbicide atrazine on *Ambystoma tigrinum* metamorphosis: duration, larval growth, and hormonal response. *Physiological Zoology* 1998; 71:671-679.
- [33] Brousseau, P., Payette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boermans, H., Flippe, D. and Fournier, M. *Manual of immunological methods*. Boca Raton: CRC Press, 1999.
- [34] Laurance, W.F., McDonald, K.R. and Speare, R. Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rain forest frogs. *Conservative Biology* 1996; 10:406-413.
- [35] Gromysz-Kalkowaska, K. and Szubartowska, E. Toxicity of tetrachlorvinfos to *Rana temporaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1993; 105C(2):285-290.

- [36] Podstawka, U. Toxic effects of dichlorvos on neutrophils of human peripheral blood *in vitro*. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieni* 1994; 45(1-2):119-123.
- [37] Rodgers, K.E. and Ellefson, D.D. Modulation of respiratory burst activity and mitogenic response of human peripheral blood mononuclear cells and murine splenocytes and peritoneal cells by malathion. *Fundamental and Applied Toxicology* 1990; 14(2):309-317.
- [38] Rodgers, K.E. Effects of oral administration of malathion on the course of disease in MRL-1pr mice. *Journal of Autoimmunity* 1997; 10(4):367-373.
- [39] Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Capra, J.D. Immunobiology, the immune system in health and disease 4th edition. New York: Garland Publishing, 1999. 635pp.
- [40] Jeon, S-D., Lim, J-S. and Moon, C-K. Carbofuran suppresses T-cell-mediated immune responses by the suppression of T-cell responsiveness, the differential inhibition of cytokine production, and NO production in macrophages. *Toxicology Letters* 2001; 119:143-155.
- [41] Gutleb, A.C., Appelman, J., Bronkhorst, M., Van den Berg, J.H., Murk, A.J. Effects of oral exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) on the development and metamorphosis of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *The Science of the Total Environment* 2000; 262(1-2):147-157.

Figure 1

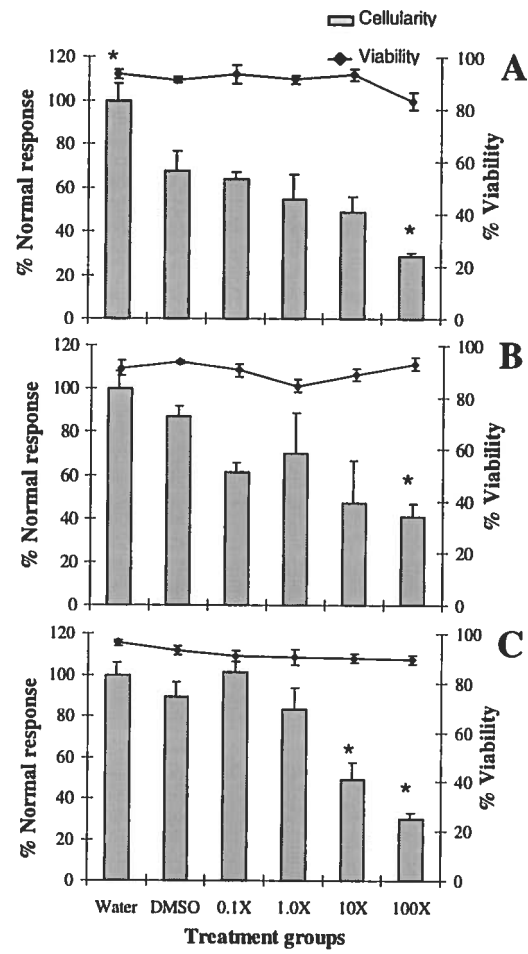


Figure 2

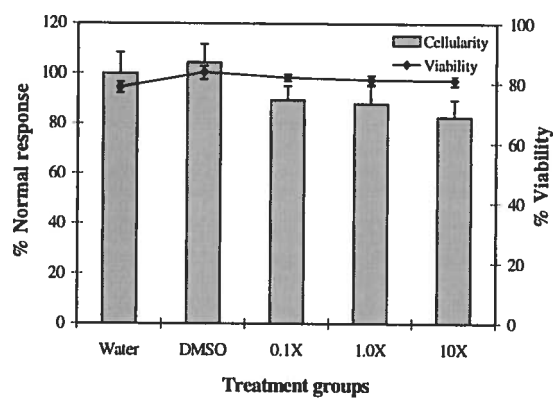


Figure 3

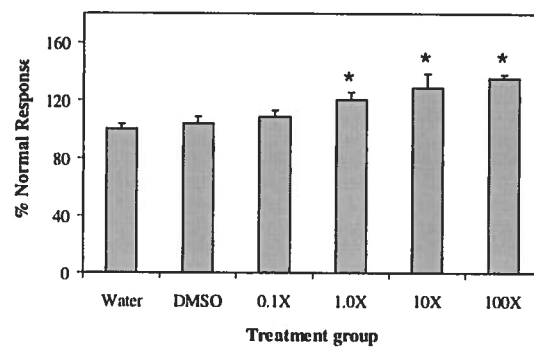


Figure 4

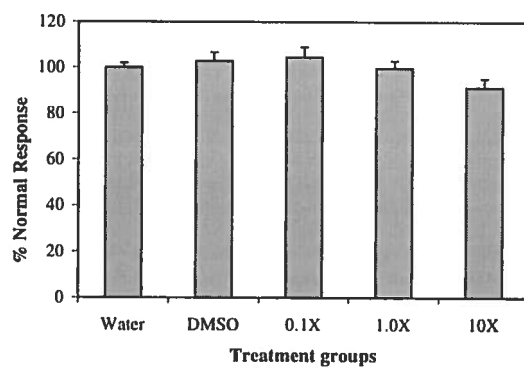


Figure 5

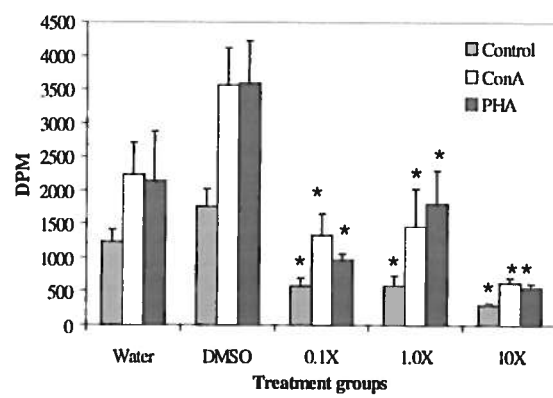


Table 1: ANOVA results for experiments performed on *Xenopus laevis*.

	N ^a	F ^b	P ^c	Df ^d
Cellularity				
day 7	4	7.361	0.035	5
day 14	4	15.514	0.008	5
day 21	4	14.359	0.009	5
Phagocytosis	5	6.794	< 0.001	5

^a Sample size^b Results of ANOVA F test^c Significance probability^d Degree of freedom

Table 2: ANOVA results for experiments performed on *Rana pipiens*.

	N ^a	F ^b	P ^c	Df ^d
Cellularity	10	1.603	0.180	4
Phagocytosis	10	1.140	0.351	4
Lymphocyte proliferation				
Without mitogen	6	12.42	0.0001	4
ConA	6	6.621	0.0009	4
PHA	6	5.87	0.0018	4

^a Sample size^b Results of ANOVA F test^c Significance probability^d Degree of freedom

2 Article # 2: Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection

2.1 Résumé français de l'article # 2

Effets des pesticides agricoles sur le système immunitaire de *Rana pipiens* et sur sa résistance à une infection parasitaire

Christin, M-S., Gendron, A., Brousseau, P., Ménard, L., Marcogliese, D., Ruby, S., Cyr, D. et Fournier, M.

Depuis les 30 dernières années, les populations de plusieurs espèces d'amphibiens ont diminué à travers le monde. Plusieurs causes ont été suggérées pour expliquer ce déclin. Parmi elles, la pollution environnementale attire de plus en plus l'attention. En effet, certains contaminants retrouvés dans l'environnement, comme les pesticides, ont la propriété de moduler les réponses du système immunitaire. Puisque les amphibiens sont fréquemment exposés aux pesticides, il est possible que ceux-ci altèrent leur système immunitaire et les rendent plus sensibles à différents types d'infections. Dans cette étude, nous avons démontré qu'un mélange de pesticides représentatif de ce qui se retrouve dans l'environnement, pouvait altérer la prolifération des lymphocytes chez les grenouilles *Rana pipiens*. La diminution de cette prolifération rendait par la suite les animaux plus sensibles à un nématode couramment retrouvé chez les *Rana*: *Rhabdias ranae*. La vitesse de migration ainsi que la maturation des larves de ce parasite augmentaient chez les animaux exposés à de fortes concentrations de pesticides. Les pesticides utilisés pouvaient donc diminuer certaines réponses immunitaires contre les parasites puisque suite à une exposition, les animaux ne pouvaient plus se défendre adéquatement contre ces pathogènes. Finalement, les pesticides et les parasites semblent avoir un effet synergique sur le système immunitaire puisqu'une diminution dans l'activité phagocytaire était uniquement observée suite à une exposition aux pesticides et à une infection avec les larves de parasites. Ceci suggère que l'immunosuppression causée par les parasites et les pesticides pourrait être cumulative. Ces résultats démontrent que les pesticides agricoles

peuvent avoir un effet néfaste sur le système immunitaire et ainsi diminuer la résistance des animaux aux pathogènes.

2.2 Contribution de l'étudiant

Les expériences sur le système immunitaire des grenouilles ont été faites par l'étudiante avec l'aide de Mme Pauline Brousseau, chercheur associée à l'INRS, et Mme Lucie Ménard, assistante de recherche pour le Dr. Michel Fournier. Les expériences portant sur la parasitologie ont toutes été effectuées dans le laboratoire du Dr. Marcogliese travaillant pour Environnement Canada au Centre Saint-Laurent (Montréal, Qc). La rédaction de cet article à été faite par l'étudiante dans le cadre de son projet de maîtrise. Cet article sera soumis à la revue "Environmental Toxicology and Chemistry".

2.3 Article #2

IMMUNOTOXICITY IN FROGS

Corresponding author: Michel Fournier
INRS-Institut Armand-Frappier/Santé Humaine
245 boul. Hymus, Pointe-Claire (Qc)
Canada, H9R 1G6
Tel/fax: (514)630-8824/8850
E-mail:michel.fournier@inrs-sante.quebec.ca

EFFECTS OF AGRICULTURAL PESTICIDES ON THE IMMUNE SYSTEM OF *RANA*
PIPIENS AND ON ITS RESISTANCE TO PARASITIC INFECTION

† Marie-Soleil Christin

‡ Andrée, D., Gendron

† Pauline Brousseau

† Lucie Ménard

‡ David, J., Marcogliese

† Daniel Cyr

§ Sylvia Ruby

† Michel Fournier

† INRS-Institut Armand-Frappier/Santé humaine, 245 Hymus blvd, Pointe-Claire, Qc,
 Canada, H9R 1G6

‡ St. Lawrence Centre, Environment Canada, 105 McGill, 7th Floor, Montreal, Qc, Canada,
 H2Y 2E7

§ Concordia University, Department of Biology, 1455 de Maisonneuve blvd., Montreal, Qc,
 Canada, H3G 1M8.

AUTHOR DISCLAIMER

The results presented in this paper have not been reported elsewhere in this format. Graphs of *Rana pipiens* exposed to pesticides only have been presented in an other paper submitted to *Developmental and Comparative Immunology*. However, discussion and analysis of these results are presented in a different way for this paper.

ABSTRACT

In the last 30 years, many amphibian species have experienced a population decline throughout the world. Multiple causes have been proposed to explain this decline. Among these, environmental pollution is gaining attention. Indeed, some chemicals of environmental concern are known to alter the immune system. It is possible that agricultural pesticides could modulate the immune system of anurans and render them more susceptible to different pathogens. In this study, we found that a mixture of six pesticides, at concentrations similar to what is found in the environment, could reduce the lymphocytes proliferation in juvenile *Rana pipiens*. Following the exposure to pesticides, a reduction in the resistance of frogs to *Rhabdias ranae*, a common *Rana* nematode was observed. In addition, pesticides and parasites may have a cumulative effect on the immune system since a suppression in the phagocytic activity was only measured after the exposure to pesticides and the infection with the nematodes. Finally, a decrease in lymphocyte proliferation as well as in cellularity was observed in frogs following an exposition to pesticides and parasites. Taken together, these results demonstrate that agricultural pesticides can have an effect on the immune system and could subsequently diminish the resistance of frogs to pathogens.

Key words: Pesticides, Immunotoxicology, Amphibians, Parasites, *Rana pipiens*

INTRODUCTION

Since the 1970's, an important decline in the amphibian populations has been observed throughout the world [1]. This is a recognised phenomenon and the patterns of losses seem to exceed normal population fluctuations [1,2]. Several causes, such as UV radiation [3], climate changes [4], infections [5,6,], introduction of exotic species [7], habitat losses [8,9], and pollution [10,11,12] have been suggested for this decline. It is likely that no single factor or group of factors has been the causative agent of the decline throughout the world; each locality may have its own particular cause or causes [12].

Observations of amphibian local die-offs have been associated with infections by different kinds of pathogens [13,14]. Environmental changes, severe enough to be directly lethal, are not necessary to cause the demise amphibian populations: sublethal exposures could be sufficient to cause immunosuppression and an increased vulnerability to infections [15]. It is known that some xenobiotics might suppress directly or indirectly the immune system [6,10,14] and prevent the amphibians from developing a normal and adequate immune response against pathogens [5].

It is well documented today that a wide variety of stressors, such as ultraviolet radiations [4,17,18] and cold [19,20], can cause immunosuppression in amphibians. For the moment, limited data concerning immunotoxicity studies with pesticides are available for these animals. Most reports on that subject studied the effects of toxicants for 96 hours on anurans larvae [21]. The data obtained with these experiments help us to understand the immunotoxicity of different contaminants on amphibians, but they do not represent

what is happening in the environment. Even though only few studies evaluated the effects of contaminants on the immune system of amphibians [22,23,24,25], it is clear from other animal studies that many chemicals, including pesticides, can alter their immune system either morphologically or functionally [26,27,28]. An immunomodulation caused by the action of contaminants could subsequently reduce the ability of these animals to defend themselves against invading pathogens [29,30].

To test the hypothesis that agricultural pesticides modulate immune responses and increase the sensitivity of amphibians to parasites, we conducted *in vivo* experiments on *Rana pipiens*, a frog species indigenous to North America. We exposed the frogs to different concentrations of a specific mixture of pesticides and then challenged the animals with larvae of a skin-penetrating parasite, *Rhabdias ranae*, a nematode commonly found in semi-terrestrial ranid frogs [31]. In order to infect frogs with this parasite, larvae present in infected frog feces were taken. Indeed larvae of *Rhabdias ranae* penetrate the skin and migrate to the lungs where they become hermaphroditic adults capable of producing eggs. These eggs hatch in the gut and further accumulate into feces where they become free living adult males or females, copulating and giving birth to skin penetrating invasive molts [31].

On the other hand, the mixture of pesticides used contained four insecticides (lindane, dieldrin, endosulfan and aldicarb) and two herbicides (metribuzine and atrazine). Most of these pesticides were selected because of their presence in surface water at different sites along the St-Lawrence River (Québec, Canada) [32,33]. The lower doses selected were chosen as common exposure levels in the environment and the higher doses were selected as an extreme of what could potentially happen in highly contaminated environments. These

pesticides are well studied and are known to cause various damages when used individually [34-39]. However, to our knowledge, their combined effect on the immune system has never been studied.

MATERIAL AND METHODS

The methods used in these experiments have been adapted from the "*Manual of immunological methods*"[40]. Cells concentrations, incubation time and temperature, mitogens concentrations, cells to bacteria ratio and speed of centrifugation have been adjusted for the frog species. Preliminary experiments were made to determine the optimal conditions for each assay.

Animals and tissue collection

Tadpoles of *Rana pipiens* at Gosner stage 25 were captured from a non-agricultural pond, in Boucherville (Qc, Canada) and brought to the laboratory. The tadpoles were placed into tanks filled with dechlorinated tap water between 21.5 °C and 22.5 °C at a final density of approximately 1 tadpole per litre of water. Water was filtered with biological filter and changed twice weekly. Tadpoles were fed *ad libidum* with boiled lettuce every day. The animals were kept in the tanks until metamorphosis. At metamorphosis, the juvenile *Rana pipiens* were placed in two level tanks to simulate terrestrial and aquatic environments. On average, two animals were placed in each tank. They were fed with live crickets (Mirido Importations, Montreal, Qc, Canada) covered with phosphorus-free carbonate calcium powder (4 crickets/frog, 3 times a week).

Animals were sacrificed using a solution of 0.8% tricaine methanesulfonate (MS-222, (Boreal, St. Catherines, ON, Canada) in distilled water. Before the beginning of the exposure and after sacrifice, each *Rana pipiens* was weighted and measured. Spleens were

removed aseptically and used to do cell suspensions in complete amphibian L-15 medium (Biomedica, Drummondville, Qc, Canada). Cells from an aliquot of each suspension was stained with trypan blue and then counted. Cell suspensions were then adjusted to the concentration required by the concerned assay.

Determination of cell concentration and viability

A drop of each cell suspension was introduced into an improved Neubauer hemocytometer. Total number of cells was determined microscopically. In parallel, cell viability was determined by microscopy, observing the membrane permeability of cells to trypan blue.

Chemicals

The chemicals used in the experiments were purchase from ChemService (West Chester, PA, USA). These were: atrazine ($C_8H_{14}ClN_5$), metribuzine ($C_8H_{14}N_4OS$), endosulfan ($C_{12}H_6C_{14}O_2S$), lindane ($C_6H_6Cl_6$), dieldrin ($C_{12}H_8C_{16}O$) and aldicarb ($C_7H_{14}N_2O_2S$). Atrazine stock solution was prepared in deionized water, with the help of a sonicator at a concentration of 30 ppm. Metribuzine and aldicarb stock solutions were prepared in deionised water respectively at concentrations of 110.01 ppm and 3060 ppm. Dieldrin, endosulfan and lindane stock solutions were prepared in 0.01 % DMSO respectively at concentrations of 30 ppb, 4 ppb and 66 ppb. DMSO stock solution was prepared in deionized water at a concentration of 0.01%. Control and test solutions were thoroughly mixed prior to use.

Toxicity testing

Five different treatment groups were used for the experiment: control with clean water, control with DMSO, 0.1X, 1.0X, and 10X, where X represents the concentration of pesticide normally found in the environment (atrazine: 1X=21 ppb; metribuzine: 1X=0.56 ppb; aldicarb: 1X=17 ppb, no longer found in the environment at this concentration; dieldrin: 1X=0.15 ppt; endosulfan: 1X=0.02 ppt; lindane: 1X=0.33 ppt). One hundred *Rana pipiens* (n=20 for each treatment) were exposed for 21 days. Ten frogs from each group were sacrificed 21 days after the beginning of the exposures in order to test different immune parameters. The remaining 50 frogs were exposed individually to 30 *Rhabdias ranae* for 24 hours and kept for 21 days in clean water, after which they were sacrificed to test their immune functions as well as to verify their degree of infection. A detailed protocol for infection of *Rana pipiens* will be available in Gendron *et al.*, in preparation.

Since *R. pipiens* needs both an aquatic and terrestrial environment, the frogs were kept for 16 hours per day in aquaria containing 1 litre of contaminated water, and for the remaining 8 hours, in inclined aquaria containing a small volume of clean water and a dry platform. Each aquarium was equipped with a cover to minimise water evaporation. Test solutions were renewed three times a week by removing the total content of water in the tanks and adding an equal volume of fresh solutions. Mortality was recorded daily. Ambient temperatures ranged from 20°C to 22°C. The photoperiod simulated conditions in Southern Québec (Canada) during mid-June to mid-July.

Phagocytosis

Spleen cells (1×10^5 cells/500 μ L of L15) were mixed with fluorescent (FITC) *Escherichia coli* K-12 (Molecular Probe, Eugene, OR, USA) at a ratio of 1:25 (phagocytes:bacteria). The mixture was incubated at 29°C for one hour after which 25 μ L of trypan blue was added to the cell suspensions in order to quench the fluorescence of bacteria that were not internalised. Negative controls were obtained by incubating the cells with no bacteria. The fluorescence of engulfed bacteria was then analysed by flow cytometry. The fluorescence emission was collected at 520nm (FL1). A FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) with an air-cooled argon laser providing an excitation at 488nm was used. A total of 10,000 events were acquired for each sample. The data were then analysed from a dot plot showing two parameters: size (Forward scatter, FSC) on the Y-axis and complexity (Side scatter, SSC) on the X-axis. On this dot plot, the phagocytic cell populations was isolated in order to analyse their phagocytic activity. From this plot, a fluorescence (FL-1) frequency distribution histogram was obtained, which is a direct representation of the splenocyte phagocytic activity. Data collection and analysis were performed with the WinMDI 2.8 program.

Lymphocyte proliferation assay

Spleen cells (60,000 cells/100 μ L of L15 + 0.05 % mercaptoethanol) were mixed with 100 μ L of single mitogen in round bottom microwell plates. Final concentration of each mitogen was 5 μ g/mL for ConA (Concanavilin A) and 2.5 μ g/mL for PHA (Phytohemagglutinin).

Microplates were incubated for 72 hours at 29°C with 5% CO₂. Eighteen hours before the end of the incubation, 0.5 µCi of ³H-methyl thymidine (ICN, Costa Mesa, CA, USA) was added to each well. The DNA was then captured on filters and transferred to scintillation vials. The incorporated ³H-methyl thymidine was measured with a β scintillation counter. The results are expressed in DPM (disintegration per minute).

Statistical Analysis

Data for all assays (cellularity, viability, phagocytosis and lymphocyte proliferation) were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) using the Statistica (Statsoft, Tulsa, OK, USA) and SAS system (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) Software. The assumption of normality and homoscedasticity were verified before each ANOVA. When significant difference was detected at P<0.05, the means were compared using a Tuckey-Kramer Studentized range test. To test the interactive effects of pesticides and parasites on frogs, two-way ANOVA was used with SAS system software. Significant effects were found at P<0.05.

RESULTS

Effects of pesticides on cellularity and viability of frog's splenocytes

Cellularity and viability were measured by microscopic counts. As illustrated in Table 1, exposure of frogs to pesticides did not significantly alter the number and the viability of splenocytes. Although a tendency towards a lower cellularity is observed as the concentration of pesticides increases, no significant difference was measured between the treatment groups. ANOVA results are presented in Table 2.

Effects of pesticides on the proliferation of T lymphocytes present in frog spleens

As illustrated in Table 1, exposure of frogs to pesticides significantly reduced the proliferation of T lymphocytes in response to mitogens (ConA and PHA), at all concentrations tested compared to the proliferation observed in frogs exposed to DMSO. Moreover, the proliferation of splenocytes in the absence of mitogens was significantly reduced in all frogs exposed to pesticides compare to frogs exposed to DMSO. However, in comparison to animals exposed to clean water, the proliferation of T lymphocytes in response to mitogen (but not in the absence of mitogen) was not reduced in animals exposed to pesticides. Effects of pesticides on B lymphocyte proliferation remains to be determined since stimulation with LPS (lipopolysaccharides) didn't provide any results. ANOVA results are presented in Table 2.

Effects of pesticides on the infection parameters of *Rhabdias ranae*

Prevalence of *Rhabdias ranae* was higher in all treated groups compared to DMSO. Indeed prevalence of infection was 70% in DMSO control whereas in frogs exposed to 0.1X, 1.0X and 10X concentrations of pesticides, prevalence was 80%, 100% and 100% (Table 3).

Effects of pesticides and parasites on cellularity and viability of frog's splenocytes

Significant difference was observed in the cellularity and viability of cells present in the spleen of frogs exposed to pesticides and subsequently to parasites (Figure 1). Indeed, compared to frogs exposed to clean water and DMSO, frogs exposed to the 10X concentration had a lower number of cells in their spleen. Moreover, compared to the spleen cellularity of frogs exposed to DMSO only, the cellularity of frogs exposed to DMSO and parasites was slightly increased. This increase in cellularity was only observed in the frogs treated with DMSO. ANOVA results are presented in Table 4.

Effects of pesticides and parasites on the proliferation of T lymphocytes present in frog spleens

Compared to non infected frogs, frogs infected with *Rhabdias ranae* after a pesticide exposure have a higher T lymphocytes proliferation (Figure-2). However, infected frogs exposed to a high concentration of pesticides (10X) have a lower T lymphocytes proliferation (in response to ConA and PHA) than all the other groups of infected frogs (represented by *). Mitogenic proliferation in response to ConA in DMSO and 10X group were respectively: 7705.73 ± 1773.61 and 2350.17 ± 313.27 (mean $\pm$ s.e.m). ANOVA results are presented in Table 4.

Effects of pesticides on the number of frog phagocytic splenocytes

As illustrated in Table 1, exposure of frogs to pesticides did not significantly alter the percentage of active phagocytes in the spleen of frogs. Although a decrease in the percentage of phagocytes is observed as the concentration of pesticides increases, no

significant difference was measured between the different treatment groups. ANOVA results are presented in Table 2.

Effects of pesticides and parasites on the number of frog phagocytic splenocytes

Exposure of frogs to pesticides alone does not alter the percentage of active phagocytes in the spleen (Table 1). However, when frogs are exposed to a high concentration of pesticides (10X) and are subsequently infected with *Rhabdias ranae* larvae, their percentage of phagocytes decreases (Figure-7). Percentage of normal responses for the number of active phagocytes in infected frogs exposed to DMSO and 10 X concentration were respectively: 92.23 ± 2.18 and 51.60 ± 5.97 (mean $\pm$ s.e.m). ANOVA results are presented in Table 4.

Combined effect of pesticide and parasite on the phagocytosis and lymphocyte proliferation

A two-way ANOVA was performed in order to determine if the parasites and the pesticides could act together to disregulate the immune system. It was found that pesticides and parasites had an effect on the phagocytosis but not on the T lymphocyte proliferation. Two way ANOVA results are presented in Table 5.

DISCUSSION

In this study, we determined the effects of a representative mixture of pesticides on the immune system of frogs before and after exposure to the parasitic nematode infection. Even though the mixture of pesticides did not have any effect on the cellularity and phagocytic activity of cells present in the spleen, our results suggest that a short-term administration of pesticides can have an effect on other immune competences of anurans. Indeed, when frogs were exposed to concentrations of 0.1X, 1.0X and 10X, their T cells proliferation was found to be significantly reduced compared to the DMSO control animals. T cells have a central role in the defence of extra cellular parasites by activating B cells [41]. Once activated, specific B cells can differentiate into plasma cells capable of secreting highly specific antibodies. When the proliferation of T cells is inhibited, activation of B cells and secretion of antibodies will also be reduced, which means that a pathogen will have a greater facility to invade the body.

The reduction of certain immunological responses in the exposed groups might explain in part the increase of prevalence of *Rhabdias ranae* in these groups. Indeed, prevalence of the parasite increased with contaminant doses up 100% at 1.0X and 10X, suggesting that exposed frogs have some difficulties to resist infection. Moreover, frogs exposed to increasing contaminant exposure had a greater number of *Rhabdias ranae* in their lungs 21 days post infection challenge (Gendron *et al.* in preparation). Arrival to these organs allows the nematodes to become hermaphroditic adults, capable of producing infectious larvae [31]. Increased speed of migration has a consequence for both the direct host and the other frogs

living in the same area. It is likely that as more infectious larvae are produced, more frogs will be infected.

Boroskovà *et al.* (1993) [42] did a similar experiment with guinea pigs. Indeed, the animals were exposed to heavy metal emission and further challenged with the parasite *Ascaris suum*. They observed an increase in the number of migrating larvae in animals following an exposition to contaminants. They suggested that the exposition to contaminants caused the alteration of immune mechanisms important during the migration phase of *Ascaris suum* larvae. During this phase, antigens recognition is important in order for the immune system to destroy the parasites. The same thing could have happened in the infected frogs used in our experiment. An inhibition of antigens recognition or presentation, might therefore be the explanation for the reduced lymphocyte proliferation observed in the frogs exposed to the 10X concentration.

It is interesting to note that the immunological responses observed were not the same prior and after the infection with the larvae. Indeed, the cellularity in the spleen of infected but non-exposed frogs (DMSO infected group), increased slightly after the infection with *Rhabdias ranae*. This increase in cellularity might result from the fact that the immune system of frogs is stronger 21 days post pesticide exposure. It is also possible that the number of cells present in the spleen increases in response to infection. Indeed, after an infection, the immune system is primed and the cells of this system are proliferating and dividing in order to fight the invading pathogens. An increased number of cells in the spleen would therefore be normal. An interesting point is that no difference in the cellularity was noted after the infection, compared to the cellularity before the infection, in the group of

frogs exposed to the 0.1X and 1.0X concentration of pesticides. This might indicate splenocytes are not able to proliferate in response to an infection. Exposure of frogs to pesticides as well as to pesticides and parasites would be required at the same time to better understand the impact of pesticides and parasites on the immune system. Finally, the cellularity of infected frogs exposed to the 10X concentration was significantly reduced compared to the cellularity of infected frogs exposed to DMSO. Since no difference among these groups was observed in the cellularity following a 21 day exposure to pesticides only, this might indicate that the mixture used creates delayed long term damage on the immune system. It is also possible that following a pesticide exposure, the infection with parasites increased the immunosuppression in highly exposed frogs.

Moreover, compared with the frogs exposed to the pesticides only, the proliferation of lymphocytes was increased in the water, the DMSO, the 0.1X and the 1.0X groups of frogs exposed to pesticides and subsequently infected with *Rhabdias ranae*. The T cells' response in the 0.1X and the 1.0X groups was comparable to the one observed in the DMSO and the clean water group, showing that the lymphocytes from exposed frogs were able to respond normally to mitogens. However, the T cells' proliferation of frogs exposed to the 10 X concentration was not increased as much as in the other groups (0.1X and 1.0X) in response to ConA. This indicates that 21 days after an exposition to pesticides, animals exposed to a high concentration of pesticides are not able to respond adequately to mitogens. Two hypothesis, that are not mutually exclusive, can be suggested to explain the increase lymphocyte proliferation observed in control and lightly exposed animals and the decrease lymphocyte proliferation observed in heavily exposed frogs. As mentioned previously, the increase in lymphocyte proliferation observed in water, DMSO, 0.1X and 1.0X group might

result from the fact that 21 days after the exposition, the immune system of frogs is stronger and more mature, which allows a better response of T lymphocyte to mitogens. The weak response observed in 10X exposed animals might therefore indicate that their immune system have suffered long term damage from an exposition to pesticides. In order to determine if the mixture used can have permanent effects on this system, longer periods of recuperation after exposure would be required. The second hypothesis suggests that lymphocyte proliferation increases in the water, DMSO, 0.1X and 1.0X groups in response to infection. This would then imply that animals exposed to the high concentration of pesticide were not able to respond adequately against pathogens. The two experiments mentioned in this paper (exposure to pesticides and then to parasites) should be done at the same time to understand better what are the effects of each treatment on the immune system of anurans.

Finally, no significant difference was observed among groups in the percentage of active phagocytes before the infection. However, 21 days after the infection, the frogs exposed to the 10X concentration showed a decrease in the percentage of active phagocytes present in their spleen. A lower percentage of phagocytes ingesting fluorescent bacteria was found. The explanation for these results is still not clear. A two way ANOVA indicates that the parasites and the pesticides have an interactive effect on the immune system. Similar effects have also been observed by Boroskovà *et al.* (1995) [43]. Indeed, it was observed that an exposition of guinea pigs to either heavy metals or *Ascaris suum* parasite alone didn't have an effect on some immune competence such as the classical pathway of complement. However, when the animals were exposed to heavy metals and further to the parasites, a decrease in this function was observed. Therefore, in this experiment the pollutants and the

parasites were interacting together to alter some immune competences. It is possible that other pathogens, such as *Rhabdias ranae*, could have a similar effect on the immune system when combined with pesticides. Parasites can alter the immune response in various ways to escape the immune surveillance [44]. Their aim is often to develop a niche in the host in which they are able to survive and reproduce, without significantly disrupting the viability of the organism which they have infected [44]. Therefore, their effects alone often do not suppress the immune system enough to impair the normal responses of the host. However, it is possible that when their suppressive effects are combined with the ones induced by pesticides, the immune responses of the host might be seriously damaged. An exposition to pollutants, followed by an infection, might complicate the immune system reactions, which can further inhibit an adequate defence against other pathogens.

Our study will help to provide a general understanding on the impact of agricultural practices on aquatic systems. Our results suggest that pesticides can increase the susceptibility of organisms to pathogens, by depressing their immune system. Furthermore, parasites and pathogens may become more virulent in immunocompromised individuals (Gendron et al., in preparation). Since animals exposed to pollutants have an increased energy consumption associated with detoxification and elimination, they have less energy to defend themselves against different pathogens [45]. Moreover, pathogens and pesticides might have a synergistic effect on the immune system. This is of particular concern since lots of frogs living in the wild are infected with various parasites and pathogens, which are normally not lethal. If pollutants can increase the immunosuppression of infected frogs, it might render the animals vulnerable to all sorts of infections. It is then clear that the interaction between pesticides, parasites and the immune system deserves further studies.

This might help us to understand the causes responsible for the decline in amphibian populations observed since the 1970's.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank Marlène Fortier for her work on the adaptation of immunological techniques on anurans and Stéphanie Barbeau who participated in the rearing of frogs. Thanks are also due to the Toxic Research Initiative (TSRI) for their financial support.

REFERENCES

- [1] **Houlahan, J.E., Findlay, C.S., Schmidt, B.R., Meyer, A.H. and Kuzmin, S.L.** 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*. **404**:754-755.

- [2] **Alford, R.A. and S.J. Richards.** 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecological Systematics*. **30**: 133-165.

- [3] **Kiesecker, J.M. and Blaustein, A.R.** 1995. Synergism between UV-B radiation and pathogen magnifies amphibian embryo mortality in nature. *Proceedings of the National Academy of Science*. **92**:11049-11052.

- [4] **Pounds, J.A., Fogden, M.P.L. and Campbell, J.H.** 2001. Biological response to climate change on a tropical mountain. *Nature*. **398**:611-615.

- [5] **Carey, C.** 2000. Infectious disease and worldwide decline of amphibians populations with comments on emerging diseases in coral reef organisms and in human. *Environmental Health Perspectives*, **108**. suppl.1:143-150.

- [6] **Johnson, P.T.J., Lunde, K.B., Ritchie, E.C. and Launer, A.E.** 1999. The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship. *Science*. **284**:802-804.

- [7] **Hayes, M.P. and Jennings, M.R.** 1986. Decline of Ranid species in western North America: are bullfrogs (*Rana catesbeian*) responsible? *Journal of Herpetology*. **20**:490-509.

- [8] **Blaustein, A.R., Wake, D.B. and Sousa, W.P.** 1994. Amphibian declines: judging stability, persistence and susceptibility of population to local and global extinction. *Conservation Biology*. **8**:60-71.

- [9] **Dunson, W.A., Wyman, R.I. and Corbett, E.S.** 1992. A symposium on amphibian declines and habitat acidification. *Journal of Herpetology*. **26**:342-349.

- [10] **Carey, C., Cohen, N. and Rollins-Smith, L.** 1999. Amphibian decline and immunological perspective. *Developmental and Comparative Immunology*. **23**:459-472.

- [11] **Rollins-Smith, L.A.** 1998. Metamorphosis and the amphibian immune system. *Immunological Reviews*. **166**:221-230.

- [12] **Carey, C. and Bryant, C.J.** 1995. Possible interrelation among environmental toxicants, amphibian development and decline of the amphibian population. *Environmental Health Perspective*. **103** suppl.4:13-17.

- [13] **Worthylake, K.M. and Hovingh, P.** 1989. Mass mortality of salamanders (*Ambystoma tigrinum*) by bacteria (*Acinobacter*) in oligotrophic seepage mountain lake. *Great Basin Nat Mem.* **49**:364.
- [14] **Berger, L., Speare, R., Daszak, P, Grenn, D.E. Cunnigham, A.A., Goggin, C.L., Slocombe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K.R., Maratelli, G. and Parkes, H.** 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Science.* **95**:9031-9036.
- [15] **Carey, C., Maniero, G.D., Harper, C.W., Snyder, G.K.** 1996. Measurements of several aspects of immune function in toads (*Bufo marinus*) after exposure to low pH. In Zelikoff, J.T., Lynch, J.M., Shepers, J., eds, *Modulators of immune Responses, the evolutionary trail, volume 2*. SOS publication, Fair Haven, NJ, USA, pp 565-576.
- [16] **Lambert, M.R.K.** 1997. Environmental effects of heavy spillage from a destroyed pesticide store near Hargeisa (Somaliland) assessed during the dry season, using reptiles and amphibians as bioindicators. *Archives of Environmental Contamination Toxicology.* **32**:80-93.
- [17] **Vermeer, B.J. and Hurks, M.** 1996. The clinical immunotoxicity of pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health.* **24**:149-154.

- [18] **Selgrade, M.J., Repacholi, M.H. and Kore, H.S.** 1997. Ultraviolet radiation-induced immune modulation: potential consequences for infections, allergic and autoimmune disease. *Environmental Health Perspective*. **105**:332-334.

- [19] **Maniero, G.D. and Carey, C.** 1997. Changes in selected aspects of immune function in the leopard frog, *Rana pipiens*, associated with exposure to cold. *Comparative Physiology part B*. **167**:256-263.

- [20] **Cooper, E.L., Wright, R.K., Klempau, A.E. and Smith, C.T.** 1992. Hibernation alters the frog immune system. *Cryobiology*. **29**:616-631.

- [21] **Devillers, J. and Exbrayat, J.M.** 1992. *Ecotoxicity of chemicals to amphibians*. Gordon and Breach Science Publisher, Philadelphia, PA, USA, 338pp.

- [22] **Gromysz-Kalkowaska, K. and Szubartowska, E.** 1993. Toxicity of tetrachlorwinfos to *Rana temporaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **105C**: 285-290.

- [23] **Sharon, K.T., Williams, E.S. and Mills, K.W.** 1999. Effects of malathion on disease susceptibility in Woodhouse's toads. *Journal of Wildlife Disease*. **35**:536-541.

- [24] **Jelaso, A.M., Mackay, D. and Ide, C.F.** 1997. Methylmercury decreases IL-1• immunoreactivity in the nervous system of the developing frog *Xenopus laevis*. *NeuroToxicology*. **18**:841-850.

- [25] **Zettergen, L.D., Boldt, B.W., Petering, D.H., Goodrich, M.S., Weber, D.N. and Zettergen, J.G.** 1991. Effect of prolonged low-level cadmium exposure on the tadpole immune system. *Toxicology letters*. **55**:11-19.
- [26] **Luebke, R.W., Hodson, P.V., Faisal, M., Ross, P.S.** 1997. Grasman, K.A. and Zelikoff, J. Aquatic pollution-induced immunotoxicity in wildlife species. *Fundamental and Applied Toxicology*. **37**:1-15.
- [27] **O'Halloran, K., Ahokas, J.T. and Wright, P.F.A.** 1996. *In vitro* responses of fish immune cells to three classes of pesticides. In Zelikoff, J.T., Lynch, J.M., Shepers, J., eds, *Ecotoxicology: Responses, Biomarkers and Risk Assessment*. SOS publication, Fair Haven, NJ, USA, 535-538.
- [28] **Zelikoff, J.T., Wang, W., Islam, N., Flesher, E. and Twedok, L.E.** 1996. Immune response of fish as biomarkers to predict the health effects of aquatic pollution: application of laboratory assays for field studies. In Zelikoff, J.T., Lynch, J.M., Shepers, J., eds, *Ecotoxicology: Responses, Biomarkers and Risk Assessment*. SOS publication, Fair Haven, NJ, USA, 263-279.
- [29] **Fournier, M., Chevalier, G., Nadeau, D., Trottier, B. and Krzystyniak, K.** 1988. Virus-pesticide interactions with murine cellular immunity after sublethal exposure to dieldrin and aminocarb. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. **1**:103-118.

- [30] **Krzystyniak, K., Hugo, P., Flipo, D. and Fournier, M.** 1985. Increased susceptibility to mouse hepatitis virus 3 of peritoneal macrophages exposed to dieldrin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **80**:397-408.
- [31] **Goater, C.P. and Vandebos, R.E.** 1997. Effects of larval history and lungworm infection on the growth and survival of juvenile wood frogs (*Rana Sylvatica*). *Herpetologica*. **53**: 331-338.
- [32] **Giroux, I.** 1999. Contamination de l'eau par les pesticides dans les régions de culture du maïs et de soya au Québec, campagnes d'échantillonnage de 1996, 1997 et 1998. Ministère de l'environnement, direction des écosystème aquatiques, pp 24.
- [33] **Rondeau, B.** 1996. Pesticides dans les tributaires du fleuve Saint-Laurent 1989-1991. Environnement Canada-Région du Québec, conservation de l'environnement, Centre Saint-Laurent. Rapport scientifique et technique, ST 62, pp 58.
- [34] **Vial, T., Nicolas, B. and Descotes, J.** 1996. Clinical immunotoxicity of pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. **48**:215-229.
- [35] **Meera, P., Rao, P.R., Shanker, R., Tripathi, O.** 1992. Immunomodulating effect of gamma-HCH (lindane) in mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. **14**:261-282.

- [36] **Fonovich de Shroeder, T. and Pechen D'Angelo, A.M.** 1995. Dieldrin modifies the hydrolysis of PIP2 and decreases the fertilisation rate in *Bufo arenarum* oocytes. *Comparative Biochemical Physiology and Comparative Pharmacological and Toxicological Endocrinology*. **14**:747-752.

- [37] **Dalsenter, P.R., Dallegrave, E., Mello, J.R., Langeloh, A., Oliveira, R.T. and Faqi, A.S.** 1999. Reproductive effects of endosulfan on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. *Human Experimental Toxicology*. **18**:583-589.

- [38] **Porter, W.P., Green, S.M., Debbink, N.L. and Carlson, I.** 1993. Groundwater pesticides: interactive effects of low concentrations of carbamates aldicarb and methomyl and the triazine metribuzine on thyroxin and somatotropin levels in white rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. **40**: 15-34.

- [39] **Larson, D.L., McDonald, S., Fivizzani, A.J., Newton, W.E. and Hamilton, S.J.** 1998. Effects of the herbicide atrazine on *Ambystoma tigrinum* metamorphosis: duration, larval growth, and hormonal response. *Physiological Zoology*. **71**:671-679.

- [40] **Brousseau, P., Payette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boermans, H., Flipo, D. and Fournier, M.** 1999. *Manual of Immunological Methods*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

- [41] **Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Capra, J.P.** 1999. *Immunobiology, the immune system in health and disease 4th edition*. Garland Publishing, New York, NY, USA, pp 835.

- [42] **Borosková, Z., Benkova, M., Soltys, J., Krupicer, I. and Simo, K.** 1993. Effects of heavy metals emission on cellular immunity of guinea pigs with experimental ascariosis. *Veterinary Parasitology*. **47**: 245-254.

- [43] **Borosková, Z., Soltys, J. and Benkova, M.** 1995. Effect of mercury on the immune response and mean intensity of *Ascaris suum* infection in guinea pigs. *Journal of helminthology*. **69**:187-194.

- [44] **Riffkin, M., Seow, H-F., Jackson, D., Brown, L., Wood, P.** 1996. Defence against the immune barrages: Helminth survival strategies. *Immunology and Cell Biology*. **74**:564-574.

- [45] **Skinner, R.H.** 1982. The interrelation of water quality gill parasite and gill pathology of some fishes from south Biscayne Bay, Florida. *Fishery bulletin*. **80**:269-279.

TABLES

Table 1: Effects of pesticides on the spleen cellularity, the viability, the phagocytosis and the T lymphocyte proliferation in *Rana pipiens* exposed to different concentrations of pesticides.

	Water	DMSO	0.1X	1.0X	10X
Cellularity	100 ± 8.41	104.44 ± 7.27	89.48 ± 5.50	87.98 ± 7.15	82.74 ± 6.82
Viability	78.59 ± 1.78	83.60 ± 2.18	81.93 ± 1.17	81.17 ± 1.56	80.93 ± 1.66
Lymphocyte proliferation					
Control	1242.03 ± 179.75	1758.88 ± 263.59	585.35 ± 111.85	585.14 ± 145.61	296.58 ± 25.14
ConA	2233.03 ± 472.33	3562.08 ± 554.67	1342.43 ± 304.32	1464.53 ± 558.71	623.92 ± 77.80
PHA	2152.77 ± 718.44	3585.37 ± 633.72	974.75 ± 86.02	1797.40 ± 500.55	556.52 ± 53.56
Phagocytosis	100 ± 2.03	102.93 ± 3.74	104.51 ± 4.53	99.86 ± 3.22	91.39 ± 3.70

Results are expressed in mean ± s.e.m.

No significant difference were noted for the spleen cellularity, the viability and phagocytosis between each treatment group. However, T lymphocyte proliferation was decrease in frogs exposed to all concentration tested compared to frogs exposed to DMSO.

Table 2: ANOVA results for *Rana pipiens* exposed to pesticides only

	N	P	F	Df
Cellularity	10	0.180	1.603	4
Phagocytosis	10	0.096	2.034	4
Lymphocyte proliferation				
Without mitogen	6	0.0001	12.42	4
ConA	6	0.0009	6.621	4
PHA	6	0.0018	5.870	4

Table 3: Effects of pesticides on the prevalence of *Rhabdias ranae* 21 days post infection challenge

Treatment	Required time for detection of <i>Rhabdias</i> in feces (day) ¹	Prevalence of infection 21 days post-challenge (%)	Average abundance of <i>Rhabdias</i> 21 days post-challenge	
			total ²	lungs
Water	16.45	80	22.3	2.95
DMSO	16.43	70	23.4	4.5
0.1 X	17.00	80	22.3	3.7
1.0 X	14.90	100	22.2	4.7
10 X	15.00	100	22.9	6.8

¹ interval between the time of exposition of frogs to *Rhabdias* (challenge) and the moment where the parasite larvae are observed in frog feces (shows the establishment of nematodes in the lungs)

² sum of *Rhabdias* in the abdominal cavity (subadults) and in the lungs (adults)

Prevalence of *Rhabdias ranae* increased with increasing concentration of pesticides

Table 4: ANOVA results for *Rana pipiens* exposed to pesticides and parasites

	N	P	F	Df
Cellularity	10	0.001	4.774	4
Phagocytosis	10	<0.001	20.825	4
Lymphocyte proliferation				
Without mitogen	6	0.187	1.676	4
ConA	6	0.007	3.911	4
PHA	6	0.192	1.672	4

Table 5: Two-way ANOVA results performed on *Rana pipiens* exposed to either pesticides alone or to parasites and pesticides

	Pesticides				Parasites				Pesticides and parasites			
	F	P	N	Df	F	P	N	Df	F	P	N	Df
Phagocytosis	11.04	<0.0001	10	4	26.82	<0.0001	10	4	4.29	0.0032	10	4
Lymphocyte proliferation												
Control	2.79	0.0357	6	4	58.79	<0.0001	6	4	-	-	6	4
ConA	3.74	0.0092	6	4	35.00	<0.0001	6	4	-	-	6	4
PHA	3.52	0.0131	6	4	45.89	<0.0001	6	4	-	-	6	4

FIGURE LEGENDS

Figure 1: *Effect of pesticides and parasites on cellularity and viability of frog splenocytes.*

The overall ANOVA indicated significant difference in the concentration but not the viability of cells present in the spleen of exposed *Rana pipiens*. *Rana pipiens* exposed to 10X concentration of pesticides have a lower concentration of cells in their spleen compared to animals exposed to DMSO and clean water. Cellularity results are expressed in % normal response [(number of cells in spleen of exposed frogs / number of cells in spleen of frogs exposed to clean water) x 100]. Viability is expressed in % of viability [(number of alive cells / number of total cells) x 100].

Figure 2: *Effect of pesticides and parasites on the proliferation of T lymphocytes present in the frog spleen.*

The overall ANOVA indicated significant difference in the proliferation of T lymphocytes present in the spleen of exposed and infected *R. pipiens* frogs. *R. pipiens* exposed to a high concentration of pesticide (10X) had a lower proliferation of T lymphocyte in their spleen compared to animals treated with low concentrations of pesticides. Results are expressed in DPM (radioactivity count).

Figure 3: *Effect of pesticides and parasites on the number of frog phagocytic splenocytes.*

The overall ANOVA indicated significant difference in the percentage of active phagocytes present in the spleen of exposed *R. pipiens*. Contrarily to frogs exposed to pesticides only, infected *R. pipiens* exposed to high concentration of pesticides (10X) had a lower percentage of phagocytes in their spleens compared to all the other infected animals (control and exposed). Results are expressed in % normal response [(number of phagocytes present in the spleens of exposed frogs / number of phagocytes present in the spleen of frogs exposed to clean water) x 100].

FIGURES

Figure 1

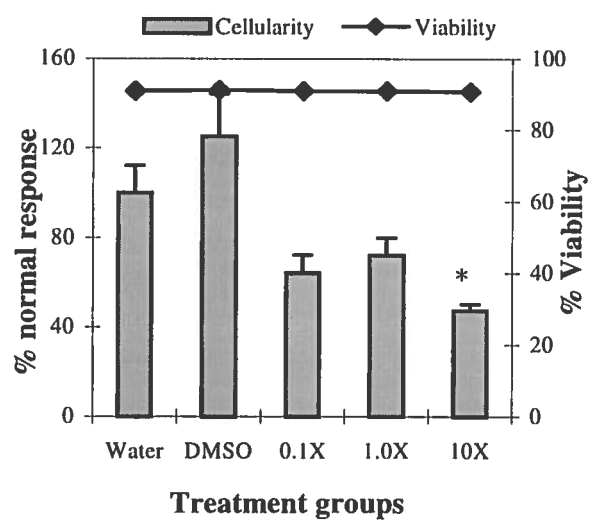


Figure 2

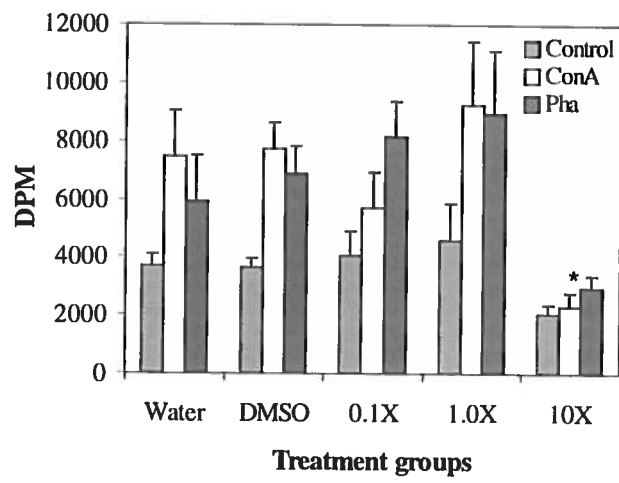
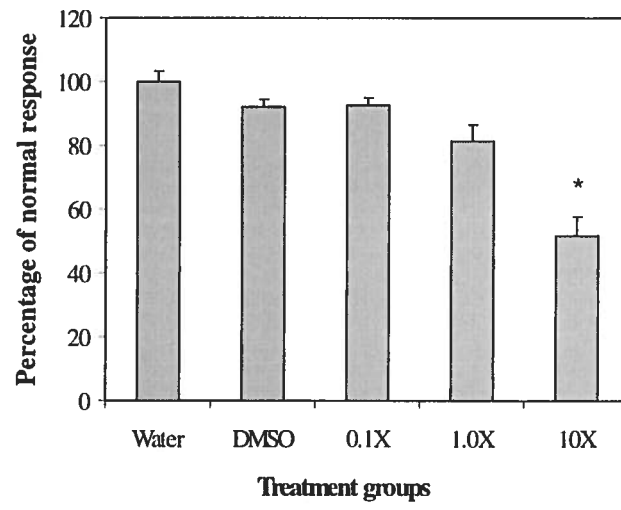


Figure 3



Troisième Partie

Discussion générale

Discussion générale

Les amphibiens occupent une position clé dans la chaîne alimentaire. Le déclin de leurs populations, observé depuis quelques années à travers le monde, est inquiétant. Dans plusieurs régions, ces animaux forment une proportion importante de la biomasse des vertébrés et leur utilité dans l'environnement est indéniable. Par exemple, à certains endroits ils contrôlent la quantité d'algues ou d'insectes tandis qu'ailleurs, ils sont la proie de carnivores. S'ils continuent à disparaître, certaines espèces seront affectées à court ou à long terme et l'impact global sur divers écosystèmes est encore difficile à déterminer.

Jusqu'à maintenant, très peu d'études ont été effectuées pour tenter d'évaluer l'effet d'un mélange de pesticides sur la santé des animaux. La majorité des études traite des effets individuels de chacun de ces pesticides. Toutefois, dans l'environnement, il est très rare que les animaux ne soient exposés qu'à une seule substance à la fois. Il est donc primordial de tenter de comprendre comment peuvent agir et interagir les contaminants auxquels la faune est exposée.

Avant notre recherche, très peu de données étaient disponibles concernant l'effet des pesticides agricoles sur le système immunitaire des amphibiens. Plusieurs chercheurs avaient toutefois fortement suggéré que ces agents chimiques pouvaient avoir des effets néfastes sur la santé des amphibiens étant donné la facilité avec laquelle ils peuvent pénétrer dans leur corps par leur peau très perméable. Le système immunitaire a souvent été ciblé comme étant un des systèmes pouvant être affecté par de faibles doses de polluants. L'hypothèse émise par certains chercheurs était donc que les xénobiotiques pouvaient altérer ce système et par le fait même affaiblir la résistance des amphibiens aux pathogènes retrouvés dans leur environnement. Aucune étude cependant n'avait encore déterminé l'effet d'un mélange de pesticides, retrouvés dans l'environnement, sur le système immunitaire des amphibiens. Notre recherche a donc été orientée dans ce sens.

Le premier objectif nous a permis de déterminer qu'un mélange de pesticides, fréquemment retrouvés dans les eaux de surface de plusieurs tributaires du fleuve Saint-Laurent (Québec, Canada), pouvait moduler les compétences immunitaires des grenouilles. En effet, chez les

grenouilles *Xenopus laevis*, ce mélange avait la propriété de diminuer la cellularité ainsi que la prolifération de base des splénocytes et d'augmenter l'activité phagocytaire. La diminution de la concentration cellulaire dans la rate pourrait éventuellement mener à une réduction de l'efficacité du système immunitaire ce qui rendrait les animaux plus sensibles à différentes infections. L'augmentation des épidémies chez les amphibiens pourrait alors être en partie expliqué par le fait que leur système immunitaire est affecté par la pollution. L'augmentation de l'activité phagocytaire pourrait, d'un autre côté, induire des réactions inflammatoires chroniques et ainsi causer divers dommages aux tissus.

Chez les grenouilles *Rana pipiens*, le mélange de pesticides utilisé avait la propriété de diminuer la prolifération des lymphocytes. Cette suppression empêcherait la division des lymphocytes suite à un contact avec un antigène spécifique. Ainsi, l'expansion clonale ne pourrait avoir lieu et un nombre suffisant de lymphocytes, se différenciant en cellules effectrices, ne serait pas atteint pour combattre de façon efficace une infection. Ces résultats nous laissent croire que l'espèce *Rana pipiens* est moins sensible à l'action de notre mélange que l'espèce *Xenopus laevis*. Deux hypothèses peuvent être émises pour tenter d'expliquer ces différences, mais la ou les causes exactes demeurent toujours incomprises. La première hypothèse est que les grenouilles *R. pipiens*, n'ayant été exposées aux pesticides que 16 heures par jour comparativement aux 24 heures d'exposition auxquelles les *X. laevis* étaient soumises, auraient subi moins de dommages. Il est également possible que le petit nombre d'individu, issus d'une lignée non cosanguine, utilisé dans l'étude avec les *Rana pipiens* ait augmenté la variabilité à un point tel qu'il est devenu impossible de détecter les différences significatives entre les groupes de traitement. Il serait donc intéressant de refaire les mêmes expériences avec un nombre plus grand d'individus dans chaque groupe afin de vérifier si cette fois nous pourrions déceler des différences entre les grenouilles exposées aux pesticides et celles non-exposées. La deuxième hypothèse est qu'étant donné que l'espèce *R. pipiens* est indigène, il est possible que ces grenouilles aient développé une certaine tolérance aux pesticides suite à des expositions répétées dans l'environnement. Des études plus approfondies seraient toutefois requises afin de déterminer si les *R. pipiens* sont vraiment moins sensibles aux pesticides que les *X. laevis*.

Pour le moment, les mécanismes exacts par lesquels les pesticides utilisés peuvent moduler le système immunitaire ne sont pas encore compris. Ils pourraient endommager les membranes cellulaires des splénocytes, inhiber l'hématopoïèse, tuer les cellules souches, empêcher la présentation ou la reconnaissance des antigènes étrangers et bien d'autres choses encore. Des études mécanistiques *in vitro* approfondies seront nécessaires afin de déterminer précisément la raison pour laquelle ils sont immunotoxiques.

Pour l'instant, nous ne savons toujours pas si les effets des pesticides, observés sur le système immunitaire, sont persistants. Il serait possible que ces polluants produisent des effets immédiats sur la réponse immunitaire mais qu'une fois l'exposition terminée, ils s'estompent progressivement. Si tel était le cas, les amphibiens risqueraient moins d'être affectés par les xénobiotiques puisqu'ils sont généralement exposés à de fortes doses pendant seulement quelques périodes bien précises de l'année, correspondant à l'épandage massif de pesticides pour éradiquer les mauvaises herbes et les insectes ravageurs. Pendant ces périodes de fortes expositions, les animaux seraient sensibles à différents pathogènes pour ensuite pouvoir retrouver une résistance presque normale. Afin de déterminer si les pesticides ont un effet à long terme sur le système immunitaire, il faudrait poursuivre l'étude en utilisant des groupes de récupération. Les grenouilles seraient alors exposées à notre mélange pendant une courte période de temps pour être ensuite transférées dans des bassins contenant de l'eau non-contaminée pour une période prolongée. Nous serions alors en mesure de mieux déterminer si les pesticides agricoles affectent les amphibiens de façon permanente.

Le second objectif de notre étude était de vérifier si les altérations, causées par les pesticides au système immunitaire, pouvaient rendre les grenouilles plus sensibles à des infections parasitaires. Nos résultats démontrent que les *Rana pipiens* exposées à de fortes concentrations de pesticides avaient plus de parasites matures dans leurs poumons que les grenouilles faiblement exposées. Les larves de parasites étaient donc capables de migrer et d'atteindre la maturation plus rapidement chez ces grenouilles. Ceci nous suggère que les mécanismes du système immunitaire, importants dans la reconnaissance d'antigènes étrangers lors de la migration des larves, étaient supprimés chez les animaux fortement

exposés. Pour mieux comprendre comment les pesticides peuvent diminuer la résistance des animaux aux parasites, des études portant directement sur les réponses immunitaires antiparasitaires, telles que l'activation des éosinophiles, seraient nécessaires. Nous pourrions ainsi vérifier si l'immunosuppression de ces réactions est à la base de la perte de résistance contre ces organismes. Il serait également intéressant de déterminer si notre mélange peut accroître les paramètres d'infection de pathogènes plus virulents. L'expérience pourrait alors être reprise avec des microorganismes responsables des fortes mortalité d'amphibiens dans la nature, comme les irridovirus ou les bactéries *Aeromonas hydrophila*. Cette nouvelle expérience nous permettrait de compléter nos connaissances sur la responsabilité des pesticides agricoles dans l'augmentation des infections observée dans la faune des amphibiens.

Le dernier objectif de notre recherche était de vérifier si les pesticides et les parasites pouvaient avoir un effet synergique sur le système immunitaire. Nos résultats démontrent qu'effectivement, ces deux facteurs peuvent avoir un tel effet. Chez les *Rana pipiens*, une diminution dans l'activité phagocytaire était observée uniquement après une exposition aux pesticides et aux parasites. Les microorganismes peuvent affecter le système immunitaire afin de pouvoir y échapper. Ils ont toutes sortes de méthodes leur permettant de ne pas être reconnus ou de supprimer le système immunitaire afin de pouvoir vivre et se reproduire dans l'hôte sans contrainte. Il est possible qu'une immunosuppression, causée par ces pathogènes, s'additionne à celle causée par les pesticides. Il serait important de faire des recherches sur d'autres compétences du système immunitaire afin de déterminer si l'effet synergique des pesticides et des parasites peut être observé sur d'autres réponse que la phagocytose. L'utilisation de pathogènes plus virulents serait également nécessaire afin de pouvoir observer des effets plus marqués sur le système immunitaire. En effet, certains microorganismes plus agressifs induiraient probablement une plus grande immunosuppression, ce qui nous permettrait de voir plus facilement les effets additifs des pesticides et des parasites.

En terminant, nos résultats ont permis de mieux comprendre l'effet des contaminants environnementaux sur le système immunitaire des amphibiens. Ils ont également montré

l'importance de prendre en considération l'effet immunotoxicologique des polluants dans la diminution et la disparition de plusieurs espèces d'amphibiens. Notre étude démontre que l'immunosuppression causée par les xénobiotiques pourrait en partie expliquer l'augmentation des infections observée fréquemment chez les amphibiens dans les dernières années. À notre connaissance, cette étude est la première à démontrer que les pesticides et les pathogènes pourraient avoir un effet synergique chez les amphibiens. Si tel est vraiment le cas, les amphibiens se retrouveraient dans un cercle vicieux duquel il leur serait difficile de s'échapper sans un changement important dans les activités humaines. En effet, les pesticides augmenteraient leur sensibilité aux infections et ces infections les rendraient encore plus sensibles à l'action immunotoxique des pesticides. Il est alors primordial de mieux comprendre les impacts que nos pratiques agricoles peuvent avoir sur les écosystèmes fragiles afin de pouvoir éventuellement les améliorer de façon à les rendre moins nocives pour les populations d'amphibiens.

Bibliographie

- ATEIA, M.M., Zaki, A.A. et Korayem, W.I., 1990. "Toxic effect of dieldrin on gonadotrophin levels (FSH and LH) in serum of mature female albino rats". Archives of Experimental Veterinary medicine, vol.44, 357-360.
- BANERJEE, B.D. et Hussain, Q.Z. 1986. "Effect of sub-chronic endosulfan exposure on humoral and cell-mediated immune response in albino rats". Archives of Toxicology, vol.59, 279-284.
- BANERJEE, B.D., Koner, B.C. et Ray, A. 1996. "Immunotoxicity of pesticides : perspectives and trends". Indian Journal of Experimental Biology, vol.34, 723-733.
- BEARD, A.P. et Rawlings, N.C. 1998. "Reproductive effects in mink (*Mustela vison*) exposed to the pesticides Lindane, Carbofuran and Pentachlorophenol in a multigeneration study". Journal of Reproductive Fertility, vol.113, 95-104.
- BEARD, A.P. et Rawlings, N.C. 1999. "Thyroid function and effects on reproduction in ewes exposed to the organochlorine pesticides lindane or pentachlorophenol (PCP) from conception". Journal of Toxicology and Environmental Health part A, vol.58, 509-530.
- BEARD, A.P., Bartlewski, P.M. et Rawlings, N.C. 1999. "Endocrine and reproductive function in ewes exposed to the organochlorine pesticides lindane or pentachlorophenol". Journal of Toxicology and Environmental Health part A, vol.56, 23-46.
- BEATTIE, R.C. et Tyler-Jones, R. 1992. "The effects of low pH and aluminium on breeding success in the frog *Rana temporaria*". Journal of Herpetology, vol.26, 413-422.
- BEEBEE, T.J.C., Flower, R.J., Stevenson, A.C., Patrick, S.T., Appleby, P.G., Fletcher, C., Marsh, C., Natkanski, J., Rippey, B. et Battarbee, R.W. 1990. "Decline of the Natterjack toad *Bufo calamita* in Britain: Paleoecological, documentary and experimental evidence for breeding site acidification". Biological Conservation, vol.53, 1-20.
- BERGER, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E, Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocombe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K.R., Marantelli, G. et Parkes, H. 1998. "Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America". Proceedings of the National Academy of Science, vol. 95, 9031-9036.
- BERNIER, J., Fournier M., Blais Y., Lombardi P., Chevalier G., and Krzystyniak K. 1988. "Immunotoxicity of aminocarb. I. Comparative studies on sublethal exposure to aminocarb and dieldrin in mice". Pesticide Biochemistry and Physiology, vol. 30, 238-250.
- BERRILL, M., Coulson, D., McGillivray, L., Pauli, B. 1998. "Toxicity of endosulfan to aquatic stages of anura amphibians". Environmental Toxicology and Chemistry, vol.17, 1738-1744.

BERRYMAN, D. et Giroux, I. 1994. "La contamination des cours d'eau par les pesticides dans les régions de culture intensive de maïs au Québec. Campagne d'échantillonnage de 1992 à 1993". Ministère de l'environnement et de la faune, direction des écosystème aquatiques, Ste. Foy, Québec, Canada, 134 p.

BERVEN, K.A. 1990. "Factor affecting population fluctuation in larval and adult stages of the wood frog (*Rana sylvatica*)". Ecology, vol.71, 1599-1608.

BETOULLE, S., Duchiron, C. et Deschaux, P. 2000. "Lindane differently modulates intracellular calcium levels in two populations of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune cells: head kidney phagocytes and peripheral blood leucocytes". Toxicology, vol.14, 203-215.

BLAUSTEIN, A.R., Wake, D.B., Sousa, W.P. 1994. "Amphibian Declines : Judging Stability, Persistence, and Susceptibility of Population to Local and Global Extinction". Conservation Biology, vol. 8, 60-71.

BONIN, J., Desgranges, J.-L., Rodrigue, J. et Ouellet, M. 1997. "Anuran species richness in agricultural landscape of Québec : Foreseeing long-term results of road call survey. Herpetological Conservation, vol.1, 246-257.

BOROSKOVÀ, Z. et Dvoroznakova, E. 1997. "The effect of cadmium on the immune behaviour of guinea pigs with experimental ascariasis". Journal of Helminthology, vol.71, 139-146.

BOROSKOVÀ Z., Benkova, M., Soltys, J., Krupicer, I. et Simo, K. 1993. "Effects of heavy metals emission on the cellular immunity of guinea pigs with experimental ascariasis". Veterinary Parasitology, vol.47, 245-254.

BOROSKOVÀ, Z., Soltys, J. et Benkova, M. 1995. "Effect of mercury on the immune response and mean intensity of *Ascaris suum* infection in guinea pigs". Journal of Helminthology, vol.69, 187-194.

BOYD, C.A., Weiler, M.H. et Porter, W.P. 1990. "Behavioural and neurochemical changes associated with chronic exposure to low-level concentration of pesticide mixture". Journal of Toxicology and Environmental Health, vol.30, 209-221.

BOYER, R. et Grue, C.E. 1995. "The need for water quality criteria for frogs". Environmental Health Perspectives, vol.103 (4), 352-357.

BRANNEN, K.C., Devaud, L.L., Liu, J. et Lauder, J.M. 1998. "Prenatal exposure to neurotoxicants dieldrin or lindane alters tert-butylbicyclophosphorothionate binding to GABA(A) receptors in fetal rat brainstem", Developmental Neuroscience, vol.20, 34-41.

BRAUNBECK, T. et Appelbaum, S. 1999. "Ultrastructural alterations in the liver and intestine of carp *Cyprinus carpio* induced orally by ultra-low doses of endosulfan". Disease of Aquatic Organism, vol.36, 183-200.

- BRIDGES, C.M. 2000. "Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the Southern Leopard Frog (*Rana sphenoccephala*)". Environmental Contamination and Toxicology, vol.39, 91-96.
- BRUSCHI, F., Carulli, G., Azzara, A. et Minnucci, S. 1995. "Inhibition of neutrophil oxidative metabolism by Trichinellosis patient sera-parasite origin or host induction". Parasite Immunology, vol.17, 253-260.
- BURKHAT, J.G., Helgen, J.C. et Fort, D.J. 1998. "Introduction of mortality and malformation in *Xenopus laevis* embryos by water course associated with field frog deformities". Environmental Health Perspective, vol. 106, 841-848.
- CAREY, C. 1993. "Hypothesis concerning the causes of the disappearance of boreal toads from the mountains of Colorado". Conservation Biology, vol. 7 (2), 355-362.
- CAREY, C. 2000. "Infectious disease and worldwide decline of amphibians populations, with comments on emerging diseases in coral reef organisms and in humans". Environmental Health Perspectives, vol. 108, Supplement 1, 143-150.
- CAREY, C. et Bryant, C.J. 1995. "Possible Interrelation among Environmental Toxicants, Amphibian Development, and Decline of Amphibian Population". Environmental Health Perspectives, vol. 103, Supplemental 4, 13-17.
- CAREY, C., Cohen, N. et Rollins-Smith, L. 1999. "Amphibian decline and immunological perspective". Developmental and comparative immunology, vol. 23, 459-472.
- CHAPIN, R.E., Stevens, J.T., Hughes, C.L., Kelce, W.R., Hess, R.A. et Daston, G.P. 1996. "Endocrine modulation of reproduction". Fundamental and Applied Toxicology, vol.29, 1-17.
- CHERNYSKOVA, E.V. et Starostin, V.J. 1994. "The peripheral blood of frogs in the genus *Rana* as a test system for assessing environmental pollution". Izv Akad Nauk Ser Biol, vol.4, 656-660.
- CLEMENTS, C., Ralph, S. et Petras, M. 1997. "Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay". Environmental Molecular Mutagen, vol.29, 277-288.
- COOPER, E.L., Wright, R.K., Klempau, A.E. et Smith, C.T. 1992. "Hibernation alters the frog immune system". Cryobiology, vol.29, 616-631.
- COOPER, R.L., Stoker, T.E., Tyrey, L., Glodman, J.M. et McElroy, W.K. 2000. "Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function". Toxicological Science, vol. 53(2), 297-307.

CORN, P.S. et Fogleman, J.C. 1984. "Extinction of mountain populations of the northern leopard frog (*Rana pipiens*) in Colorado". Journal of Herpetology, vol.18, 147-152.

CORNACOFF, J.B., Lauer, L.D., House, R.V., Tucker, A.N., Thurmond, L.M., Vos, J.G., Working, R.K., et Dean, J.H. 1988. "Evaluation of the immunotoxicity of beta-hexachlorocyclohexane". Fundamental and Applied Toxicology, vol.11, 293-299.

COTMAN, C.W., Brinton, R.E., Galaburda, A., McEwen, B. et Schneider, D.N. 1987. The Neuro-Immune-Endocrine Connection. New York: Raven Press, 150p.

CRISWELL, K.A. et Loch-Caruso, R. 1999. "Lindane-induced inhibition of spontaneous contractions of pregnant rat uterus". Reproductive Toxicology, vol.13, 481-490.

CRUMP, M.L., Hensley, F.R. et Clark, K.L. 1992. "Apparent decline of the golden toad: underground or extinct?" Copeia, vol.1992, 413-420.

CUNNIGHAM, A.A., Langton, T.E.S., Bennett, P.M., Lewin, J.F., Drury, S.E.N. et Gough, R.E. 1996. "Pathological and microbial findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*)". Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, vol. 351, 1529-1557.

DALSENTER, P.R., Dallegrave, E., Mello, J.R., Langeloh, A., Oliveira, R.T. et Faqi, A.S. 1999. "Reproductive effects of endosulfan on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation". Human Experimental Toxicology, vol.18, 583-589.

DAPPEN, G.E. 1983. "Effects of nitrates upon hemopoietic, lymphoid and vascular tissues of tadpoles and frogs". Proceedings of the Nebraskan Academy of Science Affiliated Society, vol.92, 23.

DASZAK, P., Berger, L., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., Green, D.E. et Speare, R. 1999. "Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines". Emerging Infectious Diseases, vol.5, 735-748.

DEAN, T.N., Kakkanaiyah, V.N., Nagarkatti, M. et Nagarkatti, P.S. 1990. "Immunosuppression by aldicarb of T cell responses to antigen-specific and polyclonal stimuli results from defective IL-1 production by the macrophages". Toxicology and Applied Pharmacology, vol.106, 408-417.

DEVILLERS, J. et Exbrayat, J.M. 1992. Ecotoxicity of chemicals to amphibians. Gordon and Breach Science Publisher, Philadelphia, 338pp.

DEWAILLY, E., Ayotte, P., Bruneau, S., Gingras, S.D., Belles-Isles, M. et Roy, R. 2000. "Susceptibility to infections and immune status in Inuit infants exposed to organochlorines". Environmental Health Perspectives, vol. 108, 205-211.

DODSON, S.I., Merritt, C.M., Torrentera, L., Winter, K.M., Tornehl, C.K. et Girvin, K. 1999. "Dieldrin reduces male production and sex ratio in *Daphnia galeata mendotae*". Toxicology and Industrial Health, vol. 15, 192-199.

DU PASQUIER, L. Schwager, J. and Flajnik, M.F. 1989. "The immune system of *Xenopus*". Annual Review of Immunology, vol. 7, 251-275.

DUNSON, W.A., Wyman, R.I. et Corbett, E.S. 1992. "A symposium on amphibian declines and habitat acidification". Journal of Herpetology, vol.26, 342-329.

ELLISON, T.R., Mathisen, P.M. and Miller, L. 1985. "Developmental changes in keratin patterns during epidermal maturation". Developmental Biology, vol. 112, 329-337.

EXTOXNET, 1996. Banque de données disponible sur Internet à l'adresse suivante: <http://ace.orst.edu/cgi-bin/mfs/01/pips.htm>, visité le 30/04/2001.

FIORE, M.C., Anderson, H.A., Hong, R., Golubjanikov, R., Seiser, J.E., Nordstrom, D., Hanrahan, L. et Belluck, D. 1986. "Chronic exposure to aldicarb-contaminated groundwater and human immune function". Environmental Research, vol.41, 633-645.

FLAJNIK, M.F. 1996. "The immune system of ectothermic vertebrates". Veterinary Immunology and Immunopathology, vol.54, 145-150.

FLAJNIK, M.F., Hsu, E., Kaufman, J.F. and Du Pasquier, L. 1987. "Changes in the immune system during metamorphosis". Immunology Today, vol. 8, 58-64.

FLIPO, D., Bernier, J., Girard, D., Krzystyniak, K. et Fournier, M. 1992. "Combined effects of selected insecticides on humoral immune response in mice". International Journal of Immunopharmacology, vol.14, 747-752.

FONOVICH DE SHROEDER, T. et Penchen de D'Angelo, A.M. 1995. "Dieldrin modifies the hydrolysis of PIP2 and decreases the fertilisation rate in *Bufo arenarum* oocytes". Comparative Biochemical Physiology and Comparative Pharmacological and Toxicological Endocrinology, vol.112, 61-67.

FONOVICH DE SHROEDER, T. et Penchen de D'Angelo, A.M. 2000. "The turnover of phospholipid fatty acyl chains is activated by the insecticide Dieldrin in *Bufo arenarum* oocytes". Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology, vol.14, 82-87.

FOURNIER, M., Chevalier, G., Nadeau, D., Trottier, B. et Krzystyniak, K. 1988. "Virus-pesticide interactions with murine cellular immunity after sublethal exposure to dieldrin and aminocar". Journal of Toxicology and Environmental Health, vol.1, 103-118.

FRIES, C.R. 1986. "Effects of environmental stressors and immunosuppressants on immunity in *Fundulus heteroclitus*". American Zoologist, vol.26, 271-282.

GERMOLEC, D.R., Yang, R.S.H., Ackermann, G.J., Rosenthal, G.J., Boorman, G.A., Blair, P. et Luster, M.I. 1989. "Toxicology studies of a chemical mixture of 25 groundwater contaminants. II. Immunosuppression in B6C3F₁ mice". Fundamental and Applied Toxicology, vol.13, 377-387.

GLEICHMANN, E., Kimber, I. et Purchase, F.H. 1989. "Immunotoxicology :suppressive and stimulatory effects of drugs and environmental chemicals on the immune system". Archives of Toxicology, vol.63, 257-273.

GROMYSZ-KALKOWSKA, K. and Szubartowska, E. 1993. "Toxicity of tetrachlorwinfos to *Rana Temporaria*". Comparative Biochemistry and Physiology, vol.105C(2), 285-290.

HAIRSTON, N.G. 1983. "Growth, survival and reproduction of *Plethodon jordani*: tradeoffs between selective pressures". Copeia, vol.1983, 1024-1035.

HALL, R.J. et Henry, P.F.P. 1992. "Review: assessing effects of pesticides on amphibians and reptiles: status and needs". Herpetology Journal, vol.2, 65-71.

HANSEN, J.D. and Zapata, A.G. 1998. "Lymphocyte development in fish and amphibians. Immunological Reviews", vol. 166, 199-220.

HARRIS, M.L., Chora, L., Bishop, A. et Bogart, J.P. 2000. "Species and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*". Bulletin of Environmental Contamination Toxicology, vol.64, 263-270.

HART, L.J., Smith, S.A., Smith, B.J., Robertson, J. et Holladay, S.D. 1997. "Exposure of tilapian fish to the pesticide lindane results in hypocellularity of the primary hematopoietic organ (pronephros) and the spleen without altering activity of phagocytic cells in these organs". Toxicology, vol.118, 211-221.

HAYES, M.P. et Jennings, M.R. 1986. "Decline of Ranid species in western North America: are bullfrogs (*Rana catesbeiana*) responsible?". Journal of Herpetology, vol.20, 490-509.

HERMANOSWICZ, A. and Kassman, S. 1984. "Neutrophil function and infectious disease in workers occupationally exposed to phospho-organic pesticides: Role of mononuclear-derived chemotatic factor for neutrophils". Clinical Immunology and Immunopathology, vol.33, 13-22.

HOLCOMB, G.W., Philips, G.L., Sulaiman, A.H. et Hoffman, A.D. 1987. "Simultaneous multiple species testing: acute toxicity of 13 chemicals to 12 diverse freshwater amphibian, fish, and invertebrate families". Archives of Environmental Contamination Toxicology, vol.16, 697-710.

HOOGHE, R.J., Devos, S. and Hooghe-Peters, E.L. 2000. "Effects of selected herbicides on cytokine production in vitro". Life Science, vol.66 (26), 2519-2525.

HORTON, J.D., Horton, T.L., Dzialo, R., Gravenor, I., Minter, R., Ritchie, P., Gartland, L., Watson, M.D., Cooper, M.D. 1998. "T-cell and natural killer cell development in thymectomized *Xenopus*". Immunological Reviews, vol. 166, 245-258.

HOULAHAN, J.E., Findlay, C.S., Schmidt, B.R., Meyer, A.H. et Kuzmin, S.L. 2000. "Quantitative evidence for global amphibian population declines". Nature, vol. 404, 752-755.

HOYER, A.P., Jorgensen, T. et Grandjean, P. 2000. "Breast cancer and dieldrin". Lancet, vol.25, 1852-1853.

HSU, E. 1998. "Mutation, selection and memory in B lymphocytes of exothermic vertebrates". Immunological Reviews, vol. 162, 25-36.

HUSTING, E.L. 1965. "Survival and breeding structure in a population of *Ambystoma maculatum*". Copeia, vol.1965, 352-362.

JAEGER, R.G. 1980. "Density-dependent and independent causes of extinction of a salamander population". Evolution, vol.34, 617-621.

JELASO, A.M., Mackay, D. and Ide, C.F. 1997. "Methylmercury Decreases IL-1 β Immunoreactivity in the Nervous System of the Developing Frog *Xenopus laevis*", Neurotoxicology, vol.18(3), 841-850.

JANEWAY, C.A., Travers, P., Walport, M., Capra, J.D. 1999. Immunobiology, the immune system in health and disease 4th edition, Garland Publishing, New York, 635pp.

JOHNSON, M.S., Holladay, S.D., Lippenholz, K.S., Jenkins, J.L. et McCain, W.C. 2000. "Effects of 2,4,6-Trinitrotoluene in a holistic environmental exposure regime on a terrestrial salamander, *Ambystoma trigrinum*". Toxicological Pathology, vol.28, 334-341.

JOHNSON, P.T.J., Lunde, K.B., Ritchie, E.C. and Launer, A.E. 1999. "The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship". Science, vol.284, 802-804.

JUST, J.J., Schwager, J. and Weber, R. 1977. "Hemoglobin transition in relation to metamorphosis in normal and isogenic *Xenopus*". Wilhem Roux's Archives of Developmental Biology, vol. 183, 307-323.

KAGARISE SHERMAN, C. et Morton, M.L. 1993. "Population declines of Yosemite toads in the eastern Sierra Nevada of California". Journal of Herpetology, vol.27, 186-198.

KAREN, G., MacDougal, K.C. et Mericko, P. 1996. "Signal Transduction in Teleost Lymphocytes as a Target for the Action of Environmental Metals". Dans Ecotoxicology : Responses, Biomarkers and Risk Assessment. Fair Haven : SOS publication eds, p.407-415.

KAUFMAN, J., Skjoedt, K. and Salomonsen, J. 1990. "The MHC Molecules of Nonmammalian Vertebrates". Immunological Reviews, vol. 133, 83-83.

KHAN, R.A. 1988. "Experimental transmission, development and effects of a parasitic copepod, *Lernaeocera branchialis* on Atlantic cod, *Gadus morhua*". Journal of Parasitology, vol.74, 586-599.

KHAN, R.A. et Thulin, J. 1991. "Influence of Pollution on Parasites of Aquatic Animals". Advances in Parasitology, vol. 30, 201-238.

KIESECKER, J.M. et Blaustein, A.R. 1995. "Synergism between UV-B radiation and a pathogen magnifies amphibian embryo mortality in nature". Proceedings of the National Academy of Science, vol. 92, 11049-11052.

KIESECKER, J.M., Blaustein, A.R. et Belden, L.K. 2001. "Complex causes of amphibian populations declines". Nature, vol. 410, 681-684.

KNIEWALD, J., Jakominic, M., Tomljenovic, A., Simic, B., Romac, P., Vranesic, D. et Kniewald, Z. 2000. "Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine". Journal of Applied Toxicology, vol. 20, 61-68.

KONER, B.C., Banerjee, B.D. et Ray, A. 1998. "Organochlorine pesticide-induced oxidative stress and immune suppression in rats". Indian Journal of Experimental Biology, vol.36, 395-398.

KORNILOVSKAYA, N.G., Gorelaya, M.V., Usenko, V.S., Gerbilsky, L.V. et Berezin, V.A. 1996. "Histological studies of atrazine toxicity on thyroid gland in rats". Biomedical and Environmental Science, vol.9, 60-66.

KOTWAL, G.J. 1997. "Microorganisms and their interaction with the immune system". Journal of Leukocyte Biology, vol.62, 415-429.

KRZYSTYNIAK, K., Hugo, P., Flipo, D. et Fournier, M. 1985. "Increased susceptibility to mouse hepatitis virus 3 of peritoneal macrophages exposed to dieldrin". Toxicology and Applied Pharmacology, vol.80, 397-408.

LAMBERT, M.R.K. 1997. "Environmental effects of heavy spillage from a destroyed pesticide store near Hargeisa (Somaliland) assessed during the dry season, using reptiles and amphibians as bioindicators". Archives of Environmental Contamination Toxicology, vol.32, 80-93.

LAMPO, M. et De Leo, G.A. 1998. "The invasion ecology of the toad *Bufo marinus* : From South America to Australia". Ecological Applications, vol.8, 388-396.

LARSON, D.L., McDonald, S., Fivizzani, A.J., Newton, W.E. et Hamilton, S.J. 1998. "Effects of the herbicide atrazine on *Ambystoma tigrinum* metamorphosis : duration, larval growth, and hormonal response". Physiological Zoology, vol.71, 671-679.

- LAURANCE, W.F., McDonald, K.R., Speare, R. 1996. "Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rain forest frogs". Conservative Biology, vol.10, 406-413.
- LOOSE, L.D., Silkworth, J.B., Charbonneau, T., et Blumenstock, F. 1981. "Environmental Chemical-Induced Macrophage Dysfunction". Environmental Health Perspectives, vol.39, 79-91.
- LUEBKE, R.W., Copeland, C.B., Andrews, D.L. 1999. "Effects of ageing on resistance to *Trichinella spiralis* infection in rodents exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin". Toxicology, vol.136, 15-26.
- LUEBKE, R.W., Hodson, P.V., Faisal, M., Ross, P.S., Grasman, K.A. et Zelikoff, J. 1997. "Aquatic Pollution-Induced Immunotoxicity in Wildlife Species". Fundamental and Applied Toxicology, vol. 37, 1-15.
- LUSTER, M.I., Germolec, D.R. et Rosenthal, G.J. 1990. "Immunotoxicology : review of current status". Annals of Allergy, vol.64, 427-432.
- MANIERO, G.D. and Carey, C. 1997. "Changes in selected aspects of immune function in the leopard frog, *Rana pipiens*, associated with exposure to cold". Comparative Physiology part B, vol.167, 256-263.
- MANNING, M.J. 1991. "Histological organisation of the spleen: implication for immune function in amphibian". Research in Immunology, vol. 142, 355-359.
- MEERA, P., Rao, P.R., Shanker, R. et Tripathi, O. 1992. "Immunomodulating effect of gamma-HCH (lindane) in mice". Immunopharmacology and Immunotoxicology, vol.14, 261-282.
- MITSCH, W.J. et Gosselink, J.G. 1986. Wetlands. New York: Van Nostrand Reinholds, 539 p.
- MOLES, A. 1980. "Sensitivity of parasitized coho salmon fry to crude oil, toluene and naphthalene". Transaction of the American Fisheries Society, vol.109, 293-297.
- MOR, A., Nguyen, V.H., Delfour, A., Migliore-Samour, D. and Nicolas, P. 1991. "Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide on amphibian skin". Biochemistry, vol. 30, 8824-8830.
- MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT (MMWR). 1986. Aldicarb food poisoning from contaminated melons. Atlanta, Ga. Us department of health, education and welfare, public health service, centre for disease control, vol.35, 175-176.
- MORGAN, M.K., Scheuerman, P.R., Bishop, C.S. et Pyles, R.A. 1996. "Teratogenic potential of atrazine and 2,4-D using FETAX". Journal of Toxicology and Environmental Health, vol.48, 151-168.

MORRIS, S.M. Jr. 1987. "Thyroxin elicits divergent changes in mRNA levels of two urea cycle enzymes and one gluconeogenic enzyme in tadpole liver". Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 259, 144-148.

NAQVI, S.M. et Vaishnavi, C. 1993. "Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals". Comparative Biochemistry and Physiology part C, vol.105, 347-361.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1992. Biologic markers in immunotoxicology. Washington D.C.: National Academy Press, 206 p.

O'HALLORAN, K., Ahokas, J.T. et Wright, P.F.A. 1996. "In Vitro Responses of Fish Immune Cells to Three Classes of Pesticides". Dans Ecotoxicology: Responses, Biomarkers and Risk Assessment. Fair Haven : SOS publication eds, p. 535-538.

O'NEIL, J.G. 1981. "The humoral immune response of *Salmo trutta* L. and *Cyprinus carpio* L. exposed to heavy metals". Journal of Fish Biology, vol.19, 297-306.

OLSON, L.J., Erickson, B.J., Hinschill, R.D., Wyman, J.A., Porter, W.P., Binning, L., Bidgood, R.C. et Nordheim, E.V. 1987. "Aldicarb immunomodulation in mice : An inverse dose-response to parts per billion levels in drinking water". Archives of Environmental Contamination Toxicology, vol.16, 433-439.

OUELLET, M., Bonin, J., Rodrigue, J., DesGranges, J-L. et Lair, S. 1997. "Hindlimb Deformities (Ectomelia, Ectodactyly) in Free-Living Anurans From Agricultural Habitats". Journal of Wildlife Diseases, vol.33, 95-104.

OZA, G.M. 1990. "Ecological effects of the frog's leg trade". Environmentalist, vol. 10, 39-42.

PARK, D., Hempleman, S.C. et Propper, C.R. 2001. "Endosulfan exposure disrupts pheromonal systems in the red-spotted newt: a mechanism for subtle effects of environmental chemicals". Environmental Health Perspectives, vol.109, 669-673.

PECHMANN, J.H.K. et Wilbur, H.M. 1994. "Putting declining amphibian population in perspective : natural fluctuations and human impact". Herpetologia, vol.50, 65-84.

PERKINS, E.J. et Schlenk, D. 2000. "In vivo acetylcholinesterase inhibition, metabolism, and toxicokinetics of aldicarb in channel catfish: role of biotransformation in acute toxicity". Toxicological Science, vol. 53, 308-315.

PHILLIPS, K. 1994. Tracking the vanishing frogs: an ecological mystery, 1st edition. New York : St-Martin's Press, 244 p.

PORTER, W.P., Green, S.M., Debbink, N.L. et Carlson, I. 1993. "Groundwater pesticides :interactive effects of low concentrations of carbamates aldicarb and methomyl

and the triazine metribuzine on thyroxin and somatotropin levels in white rats". Journal of Toxicology and Environmental Health, vol.40, 15-34.

PORTER, W.P., Jaeger, J.W. et Carlson, I.H. 1999. « Endocrine, immune and behavioural effects of aldicarb (carbamate, atrazine (triazine) and nitrate (fertilizer) mixture at groundwater concentrations ». Toxicology and Industrial Health, vol.15, 133-150.

POUNDS, J.A. 2001. « Climate and amphibian declines ». Nature, vol. 410, 639-640.

POUNDS, J.A., Fogden, M.P.L. et Campbell, J.H. 1999. "Biological response to climate change on a tropical mountain". Nature, vol.398, 611-615.

POWER, T., Clark, K.L., Harfenist, A. et Peakall, D.B. 1989. A review and evaluation of the amphibian toxicological literature. Technical report no.61, 222 p. Ottawa: Canadian Wildlife Service.

RIFFKIN, M., Seow, H-F., Jackson, D., Brown, L., Wood, P. 1996. "Defence against the immune barrages: Helminth survival strategies". Immunology and Cell Biology, vol.74, 564-574.

ROBERT, J. and Cohen, N. "Evolution of immune surveillance and tumor immunity: studies in *Xenopus*". Immunological Reviews, 1998, 166:231-243.

RODGERS, K. 1995. "The immunotoxicity of pesticides in rodents". Human and Experimental Toxicology, vol.14, 111-113.

ROLLINS-SMITH, L.A. "Metamorphosis and the amphibian immune system. Immunological Reviews", 1998, 166:221-230.

ROUSE, J.D., Bishop, C.A. et Struger, J. 1999. "Nitrogen pollution : an assessment of its threat to amphibian survival". Environmental Health Perspective, vol.107, 799-803.

ROUX, F., Puisseux-Dao, S., Treich, I. et Fournier, E. 1978. "Effect of lindane on mouse peritoneal macrophages". Toxicology, vol.11, 259-269.

SAGLIO, P. et Trijasse, S. 1998. "Behavioural responses to atrazine and diuron in goldfish". Archives of Environmental Contamination Toxicology, vol. 35, 484-491.

SCHUYTEMA, G.S., Nebeker, A.V., Griffis, W.L., Wilson, K.N. 1991. "Teratogenesis, and bioconcentration in frogs exposed to dieldrin". Archives of Environmental Contamination Toxicology, vol.21, 332-350.

SELGRADE, M.J., Repacholi, M.H. et Kore, H.S. 1997. "Ultraviolet radiation-induced immune modulation : potential consequences for infections, allergic and autoimmune disease". Environmental Health Perspective, vol. 105, 332-334.

- SHARMA, R.P. et Reddy, V. 1987. "Toxic Effects of chemicals on the immune system". Dans Toxicology. Washigton : Hemisphere Publishing Corp eds, p. 555-591.
- SIMON GIAVAROTTI, K.A., Rodrigues, L., Rodrigues, T., Junqueira, V.B. et Videla, L.A. 1998. "Liver microsomal parameters related to oxidative stress and antioxidant systems in hyperthyroid rats subjected to acute lindane treatment". Free Radical Research, vol.29, 35-42.
- SKINNER, R.H. 1982. "The interrelation of water quality, gill parasite and gill pathology of some fishes from south Biscayne Bay, Florida". Fishery Bulletin. Vol.80, 269-279.
- SOENGAS, J.L., Strong, E.F., Aldegunde, M. et Andres, M.D. 1997. "Effect of an acute exposure to lindane (gamma-hexachlorohexane) on brain and liver carbohydrate metabolism of rainbow trout". Ecotoxicology and Environmental Safety, vol.38, 99-107.
- SOLTYS, J., Borosková, Z. et Dvorožnáková, E. 1997. "Effects of concurrently administered copper and mercury on phagocytic cell activity and antibody levels in guinea pigs with experimental ascariasis". Journal of Helminthology, vol.71, 339-344.
- SPARLING, D.W., Fellers, G.M. and McConnell, L.L. 2001. "Pesticides and amphibian population declines in California, USA". Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 20(7), 1591-1595.
- TAYLOR, S.K., Williams, E.S. and Mills, K.W. 1999. "Effects of Malathion on Disease Susceptibility in Woodhouse's Toads". Journal of Wildlife Disease, vol.35(3), 536-541.
- THOMAS, P.T., Ratajczak, H.V., Eisenberg, W.C., Furedi-Machacek, M., Ketels, K.V. et Barbera, P.W. 1987. "Evaluation of host resistance and immunity in mice exposed to the carbamate pesticides aldicarb". Fundamental and Applied Toxicology, vol.9, 82-89.
- TINSLEY, R.C. 1995. "Parasitic disease in amphibians : control by the regulation of worm burdens". Parasitology, vol.111, S153-S178.
- TOMASZEWSKI, J., Zwierz, K., Musiatowicz, B et Jezyna, C. 1986. "Liver Histology in chronic metribuzine poisoning of the guinea pig". Acta Biologica Hungarica, vol.37, 121-128.
- VERMEER, B.J. et Hurks, M. 1994. "The clinical relevance of immunosuppression by UV irradiation". Journal of photochemical and photobiology, vol.24, 149-154.
- VIAL, T., Nicolas, B. et Descotes, J. 1996. "Clinical Immunotoxicity of Pesticides". Journal of Toxicology and Environmental Health, vol.48, 215-229.
- WAHLI, W., David, I.B., Ryffel, G.U. and Weber, R. 1981. "Vitellogenesis and vitellogenin gene family". Science, vol. 212:298-304.
- WAKE, D.B. 1991. "Declining amphibian population". Science, vol. 253, 860-860.

WAYE, A. et Cooper, E.L., 1999. Résultats non-publiés.

WILSON, V.S. et Leblanc, G.A. 1998. "Endosulfan elevates testosterone biotransformation and clearance in CD-1 mice". Toxicology and Applied Pharmacology, vol.148, 158-168.

WOOLBRIGHT, L.L. 1991. "The impact of hurricane Hugo on forest in Puerto Rico". Biotropica, vol.23, 462-467.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1986. "Organophosphorus insecticides: A general introduction". Environmental Health Criteria 63. World Health Organization, Genève, 181pp.

WORTHYLAKE, K.M. et Hovingh, P. 1989. "Mass mortality of salamanders (*Ambystoma tigrinum*) by bacteria (*Acinetobacter*) in an oligotrophic seepage mountain lake". Great Basin National Mem., vol.49, 364-364.

ZELIKOFF, J.T., Wang, W., Islam, N., Flesher, E. et Twerdok, L.E. 1996. "Immune Response of Fish as Biomarkers to Predict the Health Effects of Aquatic Pollution : Application of Laboratory Assays for Field Studies". Dans Ecotoxicology : Responses, Biomarkers and Risk Assessment, Fair Haven : SOS publication eds, p. 273-279.

ZETTERGREN, L.D., Boldt, B.W., Petering, D.H., Goodrich, M.S., Weber, D.N. and Zettergren, J.G. 1991. "Effects of prolonged low-level cadmium exposure on the tadpole immune system". Toxicology Letters, vol.55(1), 11-19.