

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPACT DE CONTAMINANTS AGRICOLES SUR LE MÉTABOLISME
OSSEUX DU OUAOUARON (*RANA CATESBELANA*) ET SUR LES CELLULES
OSTÉOBLASTIQUES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
VÉRONIQUE ARSENEAU

AOÛT 2012

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier mon directeur de recherche, le professeur Robert Moreau. Je le remercie non seulement pour son expertise scientifique, mais pour toutes ses caractéristiques humaines qui ont fait en sorte de ne pas simplement rendre cette maîtrise instructive, mais agréable. Je le remercie aussi pour la confiance qu'il a toujours eue à mon égard.

Je tiens aussi à remercier mes collègues de laboratoire, avec qui j'ai pu échanger évidemment sur mon projet, mais aussi sur des sujets aussi variés que la politique et les nouvelles applications de Iphone : Jérôme Lizotte, Olga Kerkhova, Corine Martineau, Rachel Pierre, Abdallah Fallah et Céline Signor, merci!

Je voudrais aussi remercier Jaime Sanchez Dardón, pour son expertise en cytofluorométrie et Marc Levasseur qui a agi à titre de deuxième observateur lors des analyses squelettochronologiques. Mes remerciements aussi au professeur Philip Spear qui a su me guider à l'intérieur du « Projet Ouaouaron ».

Je remercie aussi mes amies de dîner, de pauses café, et de 5 à 7 avec qui j'évolue depuis les débuts de mon baccalauréat. Catherine Pilote, Marie-Christine Bellemare et Gabrielle Dubuc-Messier, merci de partager mon quotidien scientifique.

Finalement, je remercie ma famille et mes amis avec qui j'ai pu partager mes moments de joie et d'angoisse au cours des deux dernières années. Votre support est assurément à la source de ma réussite.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	viii
LISTE DES SYMBOLES	xi
RÉSUMÉ	xii
PROBLÉMATIQUE	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	4
1.1. Tissu osseux	4
1.1.1. Système squelettique	4
1.1.2. L'os	4
1.1.3. Ostéoblastes et formation osseuse.....	5
1.1.4. Ostéoclastes et résorption osseuse	6
1.1.5. Remodelage osseux.....	6
1.1.7. Métabolisme osseux amphibien	10
1.1.8. Contaminants et métabolisme osseux	10
1.2. Problématique environnementale	10
1.2.1. Le ouaouaron (<i>Rana catesbeiana</i>)	10
1.2.2. Effets observés chez la grenouille.....	11
1.2.3. Principaux contaminants agricoles.....	12
1.2.4. Perturbateurs de l'activité aromatasase	17
1.2.5. Perturbateurs de la synthèse des rétinoïdes	18
1.2.6. Apoptose	19
1.3. Hypothèses et objectifs.....	19

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES	22
2.1. Protocole de terrain et évaluation de l'âge	22
2.1.1. Sites et méthode de capture.....	22
2.1.2. Évaluation de l'âge.....	23
2.1.3. Évaluation de l'architecture osseuse et analyses sériques.....	24
2.2. Cultures cellulaires des ostéoblastes	25
2.2.1. Essais in vitro	26
2.2.2. Cytométrie en flux.....	27
2.3. Analyses statistiques.....	29
CHAPITRE III	
RÉSULTATS	31
3.1 Le volet in vivo : grenouilles.....	31
3.1.1 Paramètres morphométriques et estimation de l'âge	31
3.1.2 Appréciation qualitative de la morphologie osseuse	35
3.1.3 Volume osseux.....	36
3.1.4 Analyses sériques.....	40
3.2 Le volet in vitro : les lignées cellulaires ostéoblastiques	41
3.2.1 Étude de la cytotoxicité.....	41
3.2.2 Étude du mécanisme de toxicité de l'endosulfan.....	44
3.2.2.1 Détermination du mode de mort cellulaire	44
3.2.2.2 Évaluation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)	
49	
3.2.2.3 Évaluation du potentiel mitochondrial	50
3.2.2.4 Endosulfan et la protection obtenue avec des antioxydants	52
CHAPITRE IV	
DISCUSSION	56
4.1I Influence de contaminants agricoles sur le métabolisme osseux du ouaouron (Rana catesbeiana) évoluant aux abords de la rivière Yamaska.....	57
4.2 Atrazine et métolachlore : évaluation de la cytotoxicité	62

4.3 Endosulfan : cytotoxicité et mécanisme d'action.....	63
CHAPITRE 5	
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	69
ANNEXE A	
CONCENTRATION ($\mu\text{g/L}$) DES PESTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS DANS LES SITES ÉCHANTILLONNÉS LE 7 JUILLET 2008	72
ANNEXE B	
AFFICHE PRÉSENTÉE DANS LE CADRE DU COLLOQUE DU CHAPITRE ST- LAURENT, MAI 2011	75
ANNEXE C	
AFFICHE PRÉSENTÉE DANS LE CADRE DU CONGRÈS DU BIOMED, AVRIL 2011.....	76
BIBLIOGRAPHIE.....	77

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Ontogenèse de l'ostéoblaste	5
1.2 Remodelage osseux	7
1.3 Mécanisme d'action suspecté pour expliquer les effets de l'atrazine chez les amphibiens	14
2.1 Carte du bassin versant de la rivière Yamaska illustrant l'emplacement des 6 sites de pêche du ouaouaron (<i>R. catesbeiana</i>)	23
3.1 Caractérisation des populations	32
3.2 Évaluation du nombre de lignes d'arrêt de croissance (LACs).....	33
3.3 Morphologie osseuse de la phalange et du fémur de <i>R. catesbeiana</i>	35
3.4 Analyse BV/TV de la portion corticale du fémur	36
3.5 Analyse BV/TV de la portion corticale de la phalange	37
3.6 Analyse BV/TV de la portion trabéculaire de la phalange	38
3.7 Dosages sériques des marqueurs du métabolisme osseux	40
3.8 Cytotoxicité de l'atrazine évaluée par essai MTT	42
3.9 Cytotoxicité du metolachlor évaluée par coloration au crystal violet	43
3.10 Cytotoxicité de l'endosulfan évaluée par coloration au crystal violet	44
3.11 Analyse de la mortalité par cytométrie en flux	46
3.12 Proportion des cellules vivantes suite à un traitement à l'endosulfan	47
3.13 Détails du mécanisme de toxicité de l'endosulfan en cytofluorométrie, par marquage à la sonde H ₂ DCFDA	48

3.14	Analyse de la production de ROS	49
3.15	Analyse du débalancement du potentiel mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)	51
3.16	Analyse de la proportion de cellules avec un potentiel mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) adéquat versus dépolarisées	52
3.17	Effet protecteur de la vitamine E lors d'un traitement à l'endosulfan	53
3.18	Effet protecteur de la N-acétyl-cystéine (NAC) lors d'un traitement à l'endosulfan	54
3.19	Effet protecteur de la vitamine C lors d'un traitement à l'endosulfan	55

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	acide désoxyribonucléique
ALPase	phosphatase alcaline
AMP-5'	adénosine monophosphate 5'
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adénosine triphosphate
BEB	bordure en brosse
BMP	protéines osseuses morphogénétiques
BV/TV	volume osseux
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	hydroxyapatite
Ca^{2+}	calcium
CaCl_2	dichlorure de calcium
CIPA	Comité institutionnel de protection des animaux de l'Université du Québec à Montréal
CL ₅₀	concentration létale à 50 pourcents
CYP19	cytochrome P450 19
DCFH	dichlorofluoresceine
DMEM-F12	<i>Dulbecco's modified Eagle medium / nutrient mix F12</i>
DMSO	diméthylsulfoxyde
EtOH	éthanol

FB	sérum bovin foetal
FCCP	carbonylcyanide-4-trifluoromethoxyphenylhydrazone
GABA	acide γ -aminobutyrique
GH	hormone de croissance
H2DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
IGFs	facteurs de croissance à l'insuline
IL-10	interleukine 10
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
KCl	chlorure de potassium
KH ₂ PO ₄	Phosphate de monopotassium
LAC	ligne d'arrêt de croissance
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MgCl ₂ .6H ₂ O	hexahydrate de chlorure de magnésium
MS222	tricaïne methanesulphonate
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5- diphényltétrazolium
Na ₂ HPO ₄	Disodium hydrogen phosphate
NAC	N-acétyl-cystéine
NaCl	chlorure de sodium
NaHCO ₃	bicarbonate de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>

OPG	ostéoprotégérine
Osx	ostérix
p,p'-DDE	Dichlorodiphenyldichloroethylene
PBS	tampon phosphate salin
PI	iodure de propidium
PNP	p-nitrophénol
PNPP	p-nitrophényl phosphate hexahydrate
PO ₄ ⁻	phosphate
POP	pesticide organique persistant
Ppm	partie par million
PSI	photosystème I
PSII	photosystème II
PTH	parathormone
RA	acide rétinoïque
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand</i>
ROH	rétinol
ROS	<i>dérivés réactifs de l'oxygène</i>
Runx2	protéines à domaine runt
SDS	sodium dodecyl sulfate
SVL	longueur museau-cloaque
TGF-β	facteurs de croissance transformant bêta
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-α</i>

LISTE DES SYMBOLES

α	alpha
cm^2	centimètre carré
$^\circ$	degré
$^\circ\text{C}$	degré Celcius
g	gramme
kV	kilovolt
μ	micro
μL	microlitre
μm	micromètre
mL	millilitre
mM	millimolaire
M	molaire
$\Delta\Psi\text{m}$	potentiel mitochondrial
%	pourcent

RÉSUMÉ

L'exploitation des terres à des fins agricoles entraîne la présence de nombreux contaminants dans les milieux naturels, ce qui peut nuire à la faune qu'on y retrouve. Nous avons émis l'hypothèse que la présence de contaminants agricoles aurait un impact sur le métabolisme osseux du ouaouaron (*Rana catesbeiana*), puisque des difformités au niveau des pattes avaient auparavant été observées chez certains individus. Les grenouilles ont été capturées à l'été 2008 en six sites situés aux abords de la rivière Yamaska et choisis selon un gradient d'activité agricole. Elles ont par la suite été disséquées et leurs fémurs et phalanges ont été analysés à l'aide d'une technique d'imagerie numérique, grâce à l'appareil *Skyscan 1172*. Les phalanges des individus ont été analysées en histologie afin d'estimer leur âge par squelettechronologie. Une analyse sérique des principaux marqueurs du métabolisme osseux a aussi été effectuée.

Nos résultats ont démontré que l'activité de la phosphatase alcaline augmentait en fonction du gradient d'exploitation agricole, supposant une atteinte hépatique. Aussi, les ouaouarons provenant du site de plus forte activité agricole présentaient un volume osseux réduit au niveau de la portion trabéculaire de la phalange, ainsi que de la portion corticale du fémur. De plus, les grenouilles capturées à ce site étaient significativement plus jeunes.

Nous avons aussi voulu vérifier l'impact de certains pesticides au niveau cellulaire, en utilisant la lignée ostéoblastique murine MC3T3-E1 et la lignée ostéoblastique humaine MG-63. Il s'est avéré que l'atrazine et le métolachlore n'étaient pas cytotoxiques pour les cellules aux concentrations utilisées. Par contre, l'endosulfan, un pesticide organochloré, a été démontré cytotoxique, sa CL_{50} ayant été mesurée à $42,4\mu\text{M}$. Nous avons par la suite tenté de documenter son mécanisme de toxicité par des mesures au cytofluoromètre. Nous avons pu démontrer par un marquage aux sondes PI et Annexine V que l'endosulfan induisait l'apoptose et la nécrose. De plus, le potentiel mitochondrial subit une dépolarisation forte et rapide après traitement à l'endosulfan, ce qui a été mesuré grâce à la sonde JC-1. Bien que l'apoptose soit induite par l'endosulfan et que le potentiel mitochondrial chute, nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence la production de ROS par marquage à la sonde H2DCFDA. Par contre, l'ajout de trois antioxydants différents, soit la vitamine C, la vitamine E et la N-acétyl-cystéine au milieu de culture a significativement réduit la mortalité, ce qui laisse présumer que la production de ROS serait à la base du mécanisme de toxicité de ce pesticide, mais que le marquage au H2DCFDA n'aurait pu le révéler.

Le métabolisme osseux est souvent ignoré lors d'études toxicologiques. Ce projet ayant permis de révéler l'impact de contaminants agricoles sur le métabolisme osseux du ouaouaron ainsi que sur des cellules ostéoblastiques indique que cet aspect ne devrait pas être négligé lors de futures études.

Mots clés : ostéoblaste, apoptose, endosulfan, ouaouaron, pesticides.

PROBLÉMATIQUE

En raison de nombreuses actions anthropiques, les milieux n'ont fait que se dégrader au cours des dernières années. Puisque nous faisons partie de ces environnements, il est devenu essentiel de se questionner quant à leur réel état. En ce sens, au fil des ans, nous nous sommes dotés d'indicateurs pour juger de la santé d'un milieu, comme la présence ou l'absence de certaines espèces sensibles, appelées sentinelles, ou leur état de santé. Parmi ces espèces sentinelles, le ouaouaron (*Rana catesbeiana*), une espèce de grenouille, représente un bon modèle d'étude par ses nombreuses caractéristiques : cycle de vie aquatique, longue durée de vie permettant des études d'exposition chronique, taille appréciable permettant de réaliser différents tests. De ce fait, le ouaouaron est devenu l'objet de bon nombre d'études, car de nombreuses anomalies ont été retrouvées chez les individus ayant évolué dans des zones jugées polluées, dont des malformations des pattes postérieures, des désordres hormonaux et autres.

Si des anomalies au niveau des pattes des ouaouarons provenant de milieux aquatiques contaminés ont été observées, il est possible que le métabolisme osseux des individus soit altéré. Il serait aussi tout à fait logique de croire que d'autres organismes évoluant dans le même milieu soient affectés.

Le présent projet avait donc pour but de mettre en évidence les effets d'une exposition aux contaminants environnementaux, principalement agricoles, sur le métabolisme osseux du ouaouaron. Un volet *in vivo* visait à observer les effets plus globaux d'une batterie de contaminants sur ce métabolisme osseux. Cependant, bien que ce volet permette de mettre en évidence des conséquences de l'exposition à des contaminants, il ne permet pas de déterminer s'il s'agit d'effets directs ou indirects, ou encore quel contaminant en particulier est le responsable.

Parallèlement, il est intéressant de s'attarder aux mécanismes d'action précis de divers pesticides sur la survie des ostéoblastes. Pour ce faire, les cellules issues de

lignées ont été traitées avec des pesticides ciblés. Afin de répondre à ces questions, le volet *in vitro* a été développé, où, en traitant uniquement les cellules osseuses que sont les ostéoblastes, nous voulions étudier la nature de l'effet. De plus, à partir d'analyses d'échantillons d'eaux prélevées sur le terrain, dans le milieu de capture des ouaouarons, les principaux contaminants retrouvés ont été ciblés, et alors utilisés pour traiter les cellules et juger de leurs effets.

Un pesticide attire principalement l'attention depuis quelques années, puisqu'il s'agit du dernier pesticide organochloré toujours en utilisation à travers le monde : l'endosulfan. Ce pesticide fait actuellement l'objet de bon nombre de discussions et est en voie d'être ajouté à la convention de Stockholm sur la liste des pesticides organiques persistants (POPs). Comme il a été démontré que certains pesticides de cette classe induisaient une altération du métabolisme osseux chez plusieurs espèces animales (Sonne, Dietz *et al.*, 2004; Lundberg, Jenssen *et al.*, 2007), il est probable que l'endosulfan affecte aussi le métabolisme osseux.

Le premier objectif consistait à révéler une altération du métabolisme osseux chez les ouaouarons provenant de sites contaminés. L'ensemble des sites d'échantillonnage sont situés en bordure de la rivière Yamaska, soit une rivière où l'on a détecté un plus grand nombre de pesticides différents par rapport à d'autres rivières québécoises¹. Les individus témoins ont été capturés à l'été 2008 dans une zone éloignée de toutes zones agricoles ou industrielles, et où les analyses d'eaux respectent les normes environnementales. Un autre site a été choisi pour sa proximité des zones agricoles susceptibles de déverser des polluants, et dont les échantillons d'eau ont révélé la présence de nombreux contaminants dont l'atrazine, le métolachlor, le dimethenamide et le dicamba (Spear, Boily *et al.*, 2009). Le poids, la taille et l'âge des individus capturés ont été notés, et une imagerie des fémurs et des phalanges a été obtenue grâce à un microtomographe Skyscan 1172, ce qui permettait de visualiser

¹ http://www.qc.ec.gc.ca/csl/inf/inf044_f.html

l'architecture générale de l'os et de déterminer le volume osseux. Le second objectif consistait à traiter des cultures cellulaires d'ostéoblastes avec des contaminants. À partir des données de terrain, certains contaminants ont été sélectionnés afin d'exercer des tests *in vitro* en exposant directement les cellules à ces contaminants. Les effets engendrés par ceux-ci ont été mesurés par des essais de viabilité.

En somme, cette étude se voulait tout à fait originale et intéressante puisqu'elle visait à révéler les impacts d'une foule de contaminants sur les fonctions des ostéoblastes du ovaouaron, ce qui constituait une intéressante avenue de recherche. En effet, si quelques études se sont consacrées aux impacts de contaminants sur le métabolisme osseux, comme l'effet des dioxines chez la souris (Korkalainen, Kallio *et al.*, 2009), l'effet du p,p'-DDE chez la grenououille *Rana temporaria* (Lundberg, Jenssen *et al.*, 2007), ou celui du benzo(a)pyrène sur des cellules d'une lignée ostéoblastique humaine (Tsai, Yang *et al.*, 2004), très peu d'études se sont consacrées aux impacts de contaminants agricoles sur des ostéoblastes de toutes espèces confondues.

CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1. Tissu osseux

1.1.1. Système squelettique

Le système squelettique est constitué des os et du cartilage. Il occupe deux fonctions majeures. La première, plutôt mécanique, en est une de protection et de support des organes vitaux de même que de points d'attache des muscles du corps. La deuxième fonction en est une métabolique, puisque l'os sert de réserve d'ions calcium (Ca^{2+}) et phosphate (PO_4^-) nécessaires au maintien de l'homéostasie (Hadjidakis et Androulakis, 2006).

1.1.2. L'os

L'os est une structure complexe et dynamique. À l'image des autres tissus conjonctifs, des cellules spécialisées sont dispersées à l'intérieur d'une matrice riche en constituants intercellulaires. Cependant, la matrice osseuse, appelée ostéoïde, est différente des autres tissus conjonctifs par sa composition, qui comprend environ 25% d'eau, 25% de fibres protéiques comme le collagène et 50% de cristaux minéraux, principalement d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Tortora, 2003; Hadjidakis et Androulakis, 2006). Selon la proportion de ces éléments, deux types d'os peuvent être distingués : l'os cortical (ou compact) et l'os trabéculaire (ou spongieux) (Hadjidakis et Androulakis, 2006). L'os cortical, qui représente environ 80% du squelette, constitue majoritairement le corps des os longs (Holz, Sheu *et al.*, 2007). Il est plus dense et compact, présente un faible taux de remodelage et est résistant aux torsions (Hadjidakis et Androulakis, 2006). Pour sa part, l'os trabéculaire est majoritairement situé au centre des extrémités des os longs et dans les vertèbres. Il présente un taux de remodelage élevé, est moins dense et plus élastique (Holz, Sheu *et al.*, 2007).

1.1.3. Ostéoblastes et formation osseuse

Les ostéoblastes sont des cellules qui, une fois activées, sont responsables de la synthèse de la matrice osseuse et du contrôle de la minéralisation de cette dernière. Elles sont issues de cellules mésenchymateuses pluripotentes (figure 1.1), les mêmes dont proviennent les fibroblastes, les adipocytes, les cellules musculaires et les chondroblastes (Kierszenbaum, 2006). Leur différenciation est régie par différents facteurs de croissance, comme les protéines osseuses morphogénétiques (BMP) et les facteurs de croissance transformant (TGF- β), puis par des facteurs de transcription tels les protéines à domaine runt (Runx2) et ostérix (Osx) qui assurent la différenciation des cellules pluripotentes en cellules ostéoprogénitrices. Sous l'action d'autres facteurs circulants, soit la parathormone (PTH), la vitamine D et les facteurs de croissance IGFs (*Insulin-like Growth Factors*), ainsi que de facteurs de transcription (Runx2, Osx et c-fos), la cellule ostéoprogénitrice se différencie en pré-ostéoblaste. Ce dernier sera activé en ostéoblaste mature via les facteurs circulants PTH et des glucocorticoïdes ainsi que via les facteurs de transcription Runx2 et Osx, avant de s'ancrer dans la matrice et de devenir ostéocyte (Holz, Sheu *et al.*, 2007).

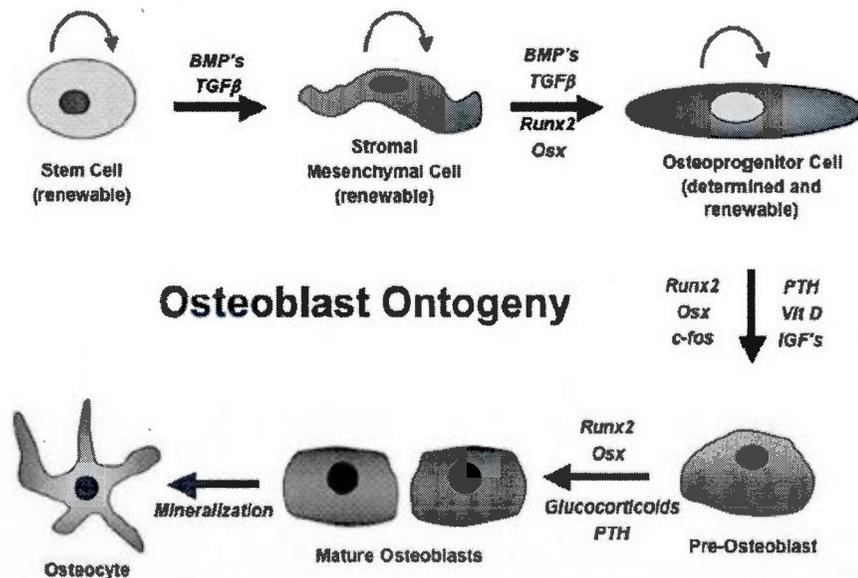


Figure 1.1 Ontogenèse de l'ostéoblaste. La différenciation de l'ostéoblaste à partir d'une cellule souche est régulée par de nombreux facteurs circulants et facteurs de transcription (Holz, Sheu *et al.*, 2007).

1.1.4. Ostéoclastes et résorption osseuse

L'ostéoclaste est une cellule géante, multinucléée, dérivé des cellules souches hématopoïétiques. Une fois différencié, il est impliqué dans le processus de résorption osseuse visant à remplacer l'os vieillissant. L'ostéoclaste possède une structure ainsi que des éléments fonctionnels caractéristiques pour accomplir cette fonction : une quantité importante de mitochondries, d'appareil de Golgi et de vésicules remplies d'enzymes lysosomiales permettant la dégradation de la partie protéique de la matrice (collagène, protéoglycanes, etc) (Cross, Mercer *et al.*, 1995; Hadjidakis et Androulakis, 2006). Il s'attache à la surface de l'endoste, la couche interne de l'os, par sa bordure en brosse, via des intégrines spécifiques $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ qui se lient à des éléments protéiques spécifiques de la matrice. La bordure en brosse (BEB) de l'ostéoclaste, avec ses nombreux replis, favorise l'exocytose des enzymes lysosomiales dans un espace appelé compartiment de résorption osseuse. De plus, la BEB comporte un grand nombre de pompes à protons qui permet l'acidification du compartiment de résorption osseuse, et ainsi la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite et l'activation des enzymes lysosomiales, comme la collagénase. La résorption de l'os peut alors débuter (Vaananen, Zhao *et al.*, 2000).

1.1.5. Remodelage osseux

L'intégrité du squelette ainsi que l'équilibre calcique du corps sont maintenus grâce au remodelage constant de l'os par les ostéoblastes et les ostéoclastes, ce processus impliquant trois phases principales : résorption, inversion, formation (Raisz, 1999) (figure 1.2).

La phase de résorption osseuse commence par la migration de pré-ostéoclastes au lieu de résorption, où, sous l'action de différents facteurs sécrétés par les ostéoblastes, ils se différencieront en ostéoclastes matures et commenceront la digestion de la matrice osseuse, créant éventuellement une lacune de résorption. L'ostéoclaste meurt ensuite

par apoptose. Lors de la phase d'inversion, des pré-ostéoblastes peuplent peu à peu la lacune de résorption, avant de se différencier en ostéoblastes matures et d'entreprendre la formation de la matrice. La phase de formation implique l'activation des ostéoblastes qui sécrètent une nouvelle matrice osseuse au niveau de la lacune de résorption, laquelle sera ensuite minéralisée. L'ostéoblaste vieillissant s'ancre dans la matrice, et devient ostéocyte (Marie et Halbout, 2008).

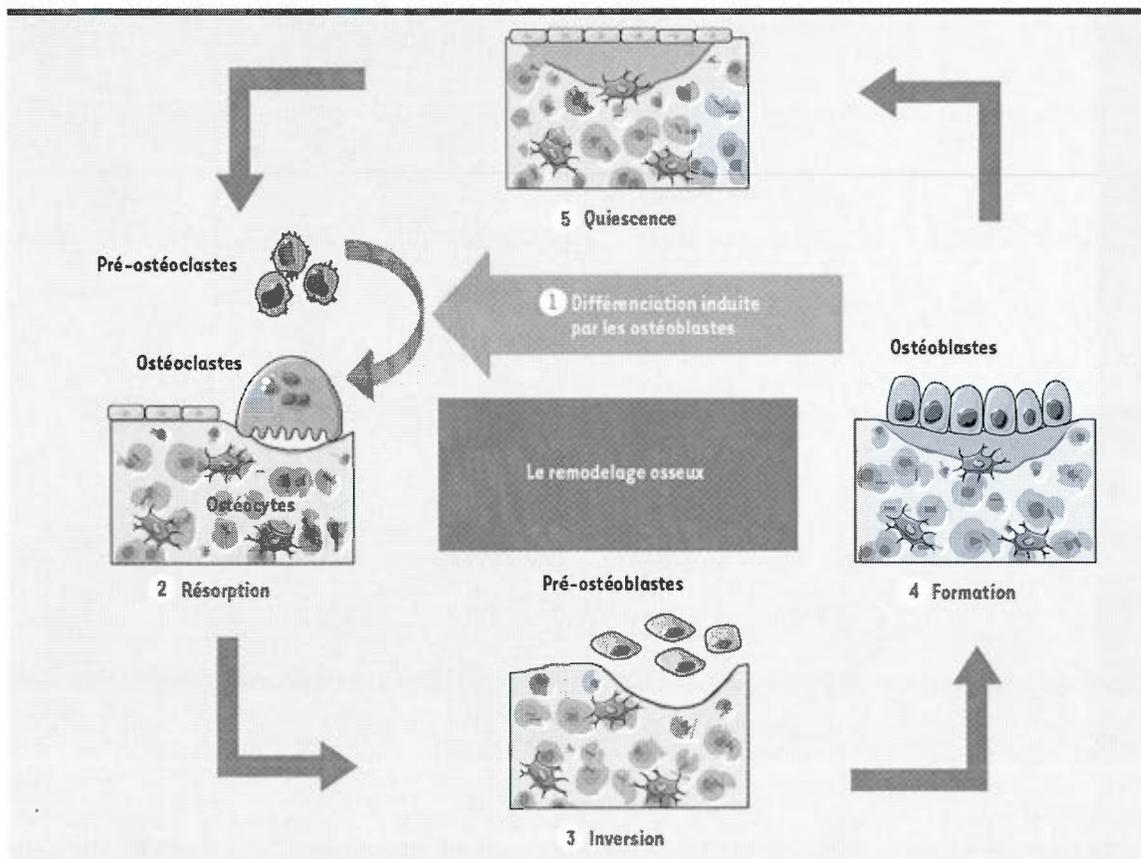


Figure 1.2 Remodelage osseux. Le processus complexe du remodelage osseux commence par la migration de pré-ostéoclastes puis par leur différenciation en ostéoclastes induite par les ostéoblastes, ce qui mène à la résorption de l'os. Suite à cette phase, il y a migration de pré-ostéoblastes dans la lacune de résorption, puis différenciation en ostéoblastes matures qui amorcent la phase de formation osseuse, permettant ainsi de maintenir l'intégrité de l'os (Marie et Halbout, 2008).

1.1.6. Régulation du remodelage osseux

La régulation des cellules osseuses est assurée par un grand nombre de facteurs hormonaux et locaux. La protéine transmembranaire RANKL (*Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*) est exprimée à la surface des ostéoblastes et de ses précurseurs. Sa liaison au récepteur RANK de la surface des ostéoclastes déclenche plusieurs voies de signalisation cellulaire menant à une activation du facteur de transcription NF- κ B. Cette liaison de RANKL à son récepteur permet aussi l'expression de gènes régulateurs de la différenciation, la survie et l'activité des ostéoclastes.

La liaison RANK/RANKL peut être inhibée par l'antagoniste ostéoprotégérine (OPG), qui est une molécule soluble capable de se fixer au RANKL, empêchant ainsi sa liaison au récepteur RANK. La liaison de OPG, produite par les ostéoblastes et les cellules stromales, au RANKL inhibe ainsi la différenciation et l'activité des ostéoclastes, de même que leur survie. L'ostéoclastogenèse est donc régulée par le système RANKL/OPG, deux molécules exprimées par les ostéoblastes (Marie et Halbout, 2008).

Plusieurs facteurs hormonaux peuvent moduler l'expression de RANKL et de OPG par les ostéoblastes, contrôlant ainsi le remodelage osseux et permettant d'ajuster la calcémie. Parmi les acteurs de régulation systémique, la parathormone (PTH) est sans doute une des hormones les plus importantes. Elle favorise la résorption osseuse en plus de permettre une plus grande réabsorption calcique au niveau des tubules rénaux. Elle permet donc la production de RANKL en plus de diminuer celle d'OPG (Tableau 1) (Hadjidakis et Androulakis, 2006). La 1,25(OH)₂ vitamine D₃ a un double effet, permettant à la fois une absorption intestinale de phosphate et de calcium, et stimulant la production de RANKL. L'hormone de croissance (GH), en agissant sur la production systémique et locale d'« insulin-like growth factor » (IGF) peut stimuler autant la formation que la résorption osseuse (Raisz, 1999). Un autre élément

régulateur important est la présence de glucocorticoïdes. Ces derniers sont essentiels à la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes, mais ont toutefois un effet inhibiteur sur l'activation des ostéoblastes. De plus, les glucocorticoïdes augmentent la sensibilité des cellules osseuses aux régulateurs et assurent le recrutement des ostéoclastes. Finalement, l'œstrogène assure un rôle majeur en diminuant la réponse des pré-ostéoclastes au RANKL, inhibant ainsi la formation d'ostéoclastes et la résorption osseuse, en plus de contribuer à la prolifération des ostéoblastes et à l'inhibition de leur apoptose. L'hormone régule aussi à la hausse la production d'OPG, d'IGFs et de TGF- β et contribue à la synthèse des protéines osseuses morphogénétiques, de récepteurs hormonaux et de facteurs de transcription (Hadjidakis et Androulakis, 2006).

Bon nombre de facteurs locaux ont un effet régulateur. Le « *macrophage colony-stimulating factor* » (M-CSF), en se liant à son récepteur c-Fms des cellules pré-ostéoclastiques, est un acteur essentiel au développement des ostéoclastes. D'autres cytokines telles l'interleukine 10 (IL-10) et le « *tumor necrosis factor- α* » (TNF- α) agissent soit en augmentant la production de M-CSF ou l'expression de RANKL (Hadjidakis et Androulakis, 2006). Notons aussi la prostaglandine E₂, promouvant l'expression d'OPG et réprimant celle de RANKL, ce qui se traduit par un effet diminuant la résorption (Raisz, 1999).

Tableau I. Influence des hormones et cytokines impliquées dans le métabolisme osseux sur le système de régulation RANKL/OPG.

	RANKL	OPG
Transforming growth factor- β ⁵⁸	—	↑
Parathyroid hormone ⁵⁹	↑	↓
1,25(OH) ₂ vitamin D ₃ ⁶⁰	↑	—
Glucocorticoïds ⁶¹	↑	↓
Estrogen ⁶²	—	↑
Basic fibroblast growth factor 2 ⁶³	↑	↓
Prostaglandin E ₂ ⁶⁴	↓	↑

Tiré de (Hadjidakis et Androulakis, 2006).

1.1.7. Métabolisme osseux amphibien

Très peu d'études portant sur le métabolisme osseux amphibien ont été menées. (Felisbino et Carvalho, 2001; Moriishi, Shibata *et al.*, 2005; Miura, Hanaoka *et al.*, 2008). Cependant, tout porte à croire que les mêmes principes établis chez le mammifère au niveau de la régulation et des types cellulaires s'appliquent.

1.1.8. Contaminants et métabolisme osseux

Deux études ont abordé l'effet de contaminants sur le métabolisme osseux. L'étude de Sonne *et al.* (2004) a comparé les crânes d'ours polaires (*Ursus maritimus*) non exposés aux organochlorés (ayant vécu entre 1892-1932) avec des crânes d'ours polaires modernes (ayant vécu entre 1966-2002) y ayant été exposés. Il a établi une forte corrélation entre la perte de densité minérale osseuse et l'apparition des pesticides organochlorés, laissant croire à une action de cette classe de pesticides sur la formation osseuse. L'équipe de Lundberg *et al.* (2007) a testé les effets du p,p'-DDE sur le tissu osseux de grenouilles communes européennes (*Rana temporaria*) par injections du pesticide, et a observé une diminution significative de la densité minérale osseuse de la portion diaphysaire du fémur.

1.2. Problématique environnementale

1.2.1. Le ouaouaron (*Rana catesbeiana*)

Le ouaouaron, *Rana catesbeiana*, est une espèce indigène d'Amérique du Nord. Il fut introduit avec succès dans de nombreux pays pour des raisons de consommation humaine, à titre d'animal de compagnie, ou comme agent biologique de contrôle d'espèces nuisibles (Lever, 2003).

Dans son ensemble, la population de ouaouarons au Québec, tout comme celle mondiale, n'est actuellement pas en danger et s'accroît annuellement. En raison de sa longue durée de vie (environ 9 ans), de son mode de vie complètement aquatique, et de

son niveau trophique élevé, *R. catesbeiana* est un bon candidat aux études environnementales d'exposition chronique aux xénobiotiques. Aussi, sa grande taille permet de pouvoir prélever une bonne quantité de sang sans nuire à sa survie, en plus de pouvoir effectuer des analyses de biomarqueurs (Spear, Boily *et al.*, 2009).

1.2.2. Effets observés chez la grenouille

De nombreuses populations d'amphibiens ont subi un déclin important depuis la fin du 20^e siècle (Blaustein, 1994; Stuart, Chanson *et al.*, 2004; Nyström, Hansson *et al.*, 2007). On estime même que près du tiers des espèces sont actuellement en voie d'extinction (Mccallum, 2009). Parmi les causes suspectées, notons la destruction d'habitats, les maladies, l'introduction d'espèces exogènes compétitrices, les changements climatiques, la pollution chimique et la pollution liée à l'utilisation de pesticides dans l'agriculture (Beebee et Griffiths, 2005).

Si l'utilisation de pesticides est visée comme étant une cause de la diminution des populations animales, c'est d'autant plus vrai en ce qui concerne les espèces d'amphibiens que celles de mammifères ou d'oiseaux, par exemple. En effet, en raison de la structure de leur peau conçue pour permettre les échanges gazeux, d'eau et d'électrolytes avec l'environnement aquatique, les amphibiens sont généralement plus sensibles aux xénobiotiques que les espèces des autres taxons (Quaranta, Bellantuono *et al.*, 2009). Plusieurs exemples de la littérature relient d'ailleurs l'utilisation de pesticides à la diminution de la taille de populations d'amphibiens (Sparling, Fellers *et al.*, 2001; Davidson, 2004; Relyea, 2009).

L'usage des pesticides est aussi associé à la présence d'anomalies et de malformations chez plusieurs espèces de grenouilles. Celles-ci peuvent aller de la présence en surnombre de membres ou de segments de membres comme des pattes, des phalanges ou des doigts (polymélie, polyphalangie, polydactylie) à la réduction ou l'absence d'un segment d'un membre (phocomélie, ectromélie, ectrodactylie) ou de plusieurs membres (amélie). Des membres peuvent aussi être complètement formés, mais présenter

d'importantes difformités (Meteyer, Kati Loeffler *et al.*, 2000). Si cette problématique est répandue mondialement, des cas d'ectromélie et d'ectrodactylie ont été répertoriés au Québec, dans des zones de haute activité agricole de la vallée du St-Laurent, chez 3 espèces de grenouilles dont *R. catesbeiana* (Ouellet, Bonin *et al.*, 1997).

1.2.3. Principaux contaminants agricoles

La présente section porte sur les principaux contaminants agricoles ayant été retrouvés aux sites d'études de la rivière Yamaska, selon l'étude menée par Spear *et al.* (2009). L'endosulfan, quoique non répertorié dans les eaux de la Yamaska au moment de l'échantillonnage est tout de même abordé, un bon nombre de ses effets répertoriés pouvant avoir une incidence sur l'intégrité du métabolisme osseux (Jones, Hammond *et al.*, 2009).

1.2.3.1. Atrazine

L'atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-*s*-triazine) est un herbicide de la famille des triazines largement utilisé pour contrôler la prolifération des « mauvaises herbes » (Giddings, 2005; Casarett, Doull *et al.*, 2008). Chez les espèces cibles, l'atrazine agit en entrant en compétition avec la plastoquinone pour l'acceptation des électrons à la sortie du photosystème II (PSII). Ce faisant, le transport d'électrons jusqu'au photosystème I (PSI) est perturbé, la réduction des intermédiaires ne pouvant plus avoir lieu. Lorsque toutes les chlorophylles du PSII sont réduites, il n'y a plus de scission des molécules d'eau, ce qui détruit le gradient de protons et ainsi, la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) cesse. Éventuellement, la fixation du CO₂ est impossible, ce qui entraînera la mort de la plante (Taiz, 2006).

Cependant, bien que l'atrazine soit utilisé à titre d'herbicide, un réel débat existe présentement quant à ses effets potentiels sur la faune, particulièrement chez les amphibiens. En effet, depuis la fin des années 1990, une série d'études ont été réalisées et ont tenté de démontrer un lien entre l'exposition à l'atrazine et la démasculinisation de

certaines espèces d'amphibiens. Certaines études, principalement réalisées par l'équipe du docteur Tyrone B. Hayes, ont démontré qu'une exposition à une aussi faible concentration que 0,1ppm d'atrazine pouvait engendrer des anomalies gonadiques, soit des gonades multiples ou l'hermaphrodisme (ovaires et testicules), chez la grenouille africaine *Xenopus laevis* (Hayes, Collins *et al.*, 2002) et un retard de développement des gonades ou l'hermaphrodisme chez la grenouille léopard *Rana pipiens* (Hayes, Haston *et al.*, 2003). Notons aussi qu'une exposition à 0,1 ppm d'atrazine a résulté en une réduction de la largeur du larynx chez *X. laevis* (Hayes, Collins *et al.*, 2002).

Suite à ces études, les auteurs ont proposé que les effets de l'atrazine étaient attribuables à sa capacité d'agir à titre de perturbateur endocrinien, plus précisément en induisant l'activité de l'aromatase (cytochrome P450 19 (CYP19)), l'enzyme responsable de la conversion de la testostérone en estradiol (Hayes, Stuart *et al.*, 2006; Hayes, 2009) (Figure 1.3). Ce mode d'action de l'atrazine avait d'ailleurs été évoqué lors d'études précédentes, notamment en démontrant que l'atrazine induisait une augmentation de l'activité aromatase de 2,5 fois chez la lignée cellulaire humaine H295R (cellules de carcinome adrénocorticales) (Sanderson, Seinen *et al.*, 2000) ainsi qu'une augmentation de plus de 2 fois dans les cellules de granulosa humaine (Holloway, Anger *et al.*, 2008). Une autre expérience avait permis de comprendre que l'induction de l'aromatase se fait via l'inhibition de la phosphodiesterase qui est l'enzyme responsable de l'hydrolyse de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) en adénosine monophosphate 5' (AMP-5'). Une inhibition de la phosphodiesterase entraîne une augmentation de la concentration d'AMPC, et ultimement une induction de l'aromatase (Roberge, Hakk *et al.*, 2004).

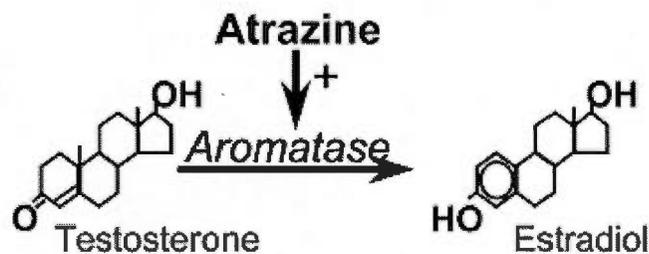


Figure 1.3 Mécanisme d'action suspecté pour expliquer les effets de l'atrazine chez les amphibiens. L'atrazine provoque une induction de l'aromatase, enzyme responsable de la conversion de la testostérone en estradiol. Cette induction résulte en une forte production d'estradiol, donc en une « démasculinisation » des individus mâles.

Une induction de l'activité aromatase par l'atrazine pourrait avoir des conséquences sur le métabolisme osseux. En effet, comme l'aromatase est responsable de la conversion de la testostérone en estradiol, l'induction de l'aromatase provoque une surproduction d'œstrogène. L'œstrogène étant un acteur de la régulation osseuse favorisant la formation via l'augmentation de la production d'OPG (voir la section 1.1.6), sa présence en concentration anormalement élevée devrait avoir une influence sur l'équilibre du métabolisme osseux.

Bien que les résultats de ces études paraissent justes, de nombreux autres chercheurs sont pourtant en désaccord. En effet, diverses équipes ont tenté de reproduire ces résultats, autant au niveau du mode d'action suspecté de l'atrazine que de ses effets œstrogéniques proprement dits, mais sans succès (Carr, Gentles *et al.*, 2003; Coady, Murphy *et al.*, 2004; Hecker, Giesy *et al.*, 2004; Hecker, Kim *et al.*, 2005; Hecker, Park *et al.*, 2005; Du Preez, Kunene *et al.*, 2008; Renner, 2008; Solomon, Carr *et al.*, 2008; Eldridge, Stevens *et al.*, 2009; Solomon, 2009). Ces expériences ayant été menées par plusieurs équipes indépendantes et sur plusieurs espèces, elles sont fortement à considérer.

1.2.3.2. Endosulfan

L'endosulfan est un insecticide organochloré. Il exerce sa toxicité chez l'insecte en bloquant les canaux à chlorures via une action antagoniste envers le neurotransmetteur qu'est l'acide γ -aminobutyrique (GABA). Une telle inhibition entraîne une hyperexcitabilité neuronale et potentiellement des convulsions (Wallace H., 2001).

En raison de sa structure, l'endosulfan est capable de lier le récepteur de l'œstrogène et d'activer la transcription des gènes qu'il contrôle. Pour ces raisons, l'endosulfan est considéré comme perturbateur endocrinien (Casarett, Doull *et al.*, 2008).

Plusieurs études ont pu démontrer sa toxicité sur des espèces non ciblées. En effet, l'endosulfan à une concentration de 10^{-5} M aurait un impact sur le pouvoir de synthèse des cellules adrénérgiques *in vitro* chez *X. laevis* et *R. catesbeiana*, ce qui se traduirait par une faible production de corticostérone. Aussi, à des concentrations pouvant potentiellement être retrouvées en nature (0,5 – 700 ppb), l'endosulfan cause un taux élevé de mortalité des larves de plusieurs espèces d'amphibien, dont *R. catesbeiana* (Jones, Hammond *et al.*, 2009). Au niveau du métabolisme osseux, une étude réalisée chez le poussin a permis d'observer une augmentation du nombre de trabécules dans la cavité médullaire. Une augmentation de l'activité phosphatase alcaline sérique a aussi eu lieu, et découlerait probablement d'une action hépatotoxique de l'endosulfan (Garg, Pal *et al.*, 2004).

Comme des effets directs de l'endosulfan sur le métabolisme osseux ont été observés, entre autres une augmentation du nombre de trabécules, et que ce pesticide a un effet oestrogénique, il serait logique de s'attendre à ce que l'endosulfan ait un effet marqué sur le métabolisme osseux du ouaouaron.

1.2.3.3. La classe des Chloroacétamides

Métolachlore

Le métolachlore est un des herbicides les plus appliqués dans les champs d'Amérique du Nord et d'Europe, plus particulièrement ceux de maïs, pour prévenir le développement des espèces végétales non désirées. Le seul énantiomère phytotoxique, la forme S-métolachlore, agit en inhibant la synthèse des acides gras à très longue chaîne chez la plante, ce qui engendre un déséquilibre de la composition lipidique de la membrane, et une perte de rigidité et de perméabilité de la membrane (Valloton, Moser *et al.*, 2008).

En plus de ses effets directs et ciblés sur la croissance des végétaux, l'herbicide est aussi suspecté de posséder un impact négatif sur la santé de plusieurs espèces animales. Entre autre, une étude menée sur une population humaine du Maryland semble associer l'exposition à de faibles concentrations de métolachlore à une incidence plus élevée de développer un cancer chez l'enfant, plus précisément une leucémie ou un cancer des os (Thorpe et Shirmohammadi, 2005). De plus, une expérience réalisée sur la grenouille africaine, *Xenopus laevis*, a pu démontrer que la dégradation du métolachlore dans l'environnement par photodégradation lui faisait perdre de la toxicité, mais par contre augmenter son potentiel tératogène (Osano, Admiraal *et al.*, 2002).

Dimethenamide

Le dimethenamide est un herbicide de la classe des chloroacétamides employé principalement sur les cultures de maïs et de soya, où il est utilisé à titre d'inhibiteur de la division cellulaire (Wallace H., 2001). Une étude aurait aussi démontré une tendance du dimethenamide à induire des adénomes ou des carcinomes hépatocellulaires (Dearfield, Mccarroll *et al.*, 1999).

Les principaux résultats de ces études peuvent laisser transparaître une perturbation potentielle du métabolisme osseux par les pesticides de la classe des chloroacétamides.

1.2.3.4. Dicamba

Le dicamba est un herbicide régulateur de croissance qui agit en mimant l'action de l'auxine, entraînant une croissance anormale. En plus de ces effets ciblés sur la plante, le dicamba est inhibiteur de l'acétylcholinestérase chez le rat, une enzyme essentielle à la transmission nerveuse, et aurait aussi des effets inhibiteurs sur des enzymes hépatiques impliquées dans la détoxification de composés étrangers (Drzewicz, Gehringer *et al.*, 2005). L'activité mitochondriale est aussi affectée par l'exposition au dicamba, ce dernier provoquant une augmentation de la perméabilité aux protons de la membrane interne, mais aussi une forte inhibition des complexes rédox (Peixoto, Vicente *et al.*, 2003).

Puisque l'activité mitochondriale est affectée par une exposition au dicamba, et que cette activité est inhérente à tous les types cellulaires, il serait normal de s'attendre à ce que ce pesticide ait entre autres un effet négatif au niveau du métabolisme des cellules osseuses.

1.2.4. **Perturbateurs de l'activité aromatasase**

Tel que mentionné à la section 1.2.3.1., l'aromatase (cytochrome P450 19 (CYP19)) est essentielle à la stéroïdogénèse, en catalysant l'étape de la conversion de la testostérone (androgène) en estradiol (œstrogène). L'œstrogène étant impliqué dans la régulation du métabolisme osseux, une induction ou une inhibition de son activité peut altérer la structure de l'os. Non seulement l'atrazine peut-elle induire l'activité aromatasase (section 1.2.3.1.), une expérience réalisée sur des cellules de carcinomes humain ont permis de démontrer l'induction de l'aromatase par les pesticides métolachlore et endosulfan (Holloway, Anger *et al.*, 2008). Une exposition à ces contaminants pourrait donc résulter en un déséquilibre du métabolisme osseux.

1.2.5. Perturbateurs de la synthèse des rétinoïdes

Les rétinoïdes constituent un groupe de molécules endogènes ou synthétiques similaire à la principale forme de vitamine A transportée dans le sang : le rétinol (ROH) (Bérubé, Boily *et al.*, 2005). Le ROH est transformé en acide rétinoïque (RA) sous l'action de la rétinaldéhyde déshydrogénase, ce qui lui permet d'être transportée au noyau et d'initier la transcription des gènes cibles (Spoorendonk, Peterson-Maduro *et al.*, 2008). Chez les mammifères et les oiseaux, un déséquilibre des rétinoïdes est associé à des troubles multiples, dont l'inhibition de la spermatogenèse, des lésions de la peau, une plus grande susceptibilité aux maladies, des problèmes dans le développement embryonnaire et des difformités (Sporn, Roberts *et al.*, 1994).

L'acide rétinoïque est impliqué dans la formation endochondrale de l'os, processus par lequel un tissu s'apparentant au cartilage est d'abord formé par la maturation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes, pour ensuite être remplacé par un os et de la moelle. Lors de ce processus, l'acide rétinoïque stimule la maturation des chondrocytes en plus d'agir au niveau du promoteur du collagène. De plus, un surplus comme un déficit de RA est associé à des anomalies du squelette (Adams, Cohen *et al.*, 2007). Un déficit en vitamine A engendre d'ailleurs une diminution de l'activité phosphatase alcaline de l'os, ce qui peut résulter en une altération de l'architecture osseuse (Zile, Ahrens *et al.*, 1973).

L'étude réalisée par Bérubé, Boily *et al.* (2005) a suggéré une perturbation de l'homéostasie des rétinoïdes chez *R. catesbeiana* due à l'exposition aux contaminants agricoles retrouvés dans la rivière Yamaska. Ces contaminants agissant sur le métabolisme des rétinoïdes, et les rétinoïdes étant impliqués dans le métabolisme osseux, il serait plausible de constater une altération de l'architecture osseuse chez les ouaouarons de la rivière Yamaska.

1.2.6. Apoptose

Les contaminants agricoles comme les pesticides sont souvent répertoriés comme ayant la capacité d'induire l'apoptose. Ce mécanisme de mort cellulaire, où la cellule bourgeonne, sa chromatine se condense et son ADN se fragmente avant d'être phagocytée, peut être déclenché par deux voies principales : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La voie extrinsèque fait appel à des récepteurs de mort situés à la surface de la cellule, comme les récepteurs Fas ou les récepteurs TNF (*tumor necrosis factor*). La liaison d'un ligand de la mort à l'un de ces récepteurs déclenche une cascade de caspases dont les signaux convergeront vers la mitochondrie, entraînant la libération du cytochrome c. La présence de cytochrome c activera la caspase 9, qui à son tour activera la caspase 3 pour finalement lancer l'apoptose.

La voie intrinsèque est plutôt déclenchée par la mitochondrie. Différents signaux apoptotiques provoquent une perte de potentiel mitochondrial, ce qui entraînera la libération du cytochrome c, puis l'activation des caspases 9 et 3, et finalement, l'apoptose.

La cellule qui entre en apoptose présentera ses phospholipides phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la membrane, permettant ainsi le recrutement de phagocytes et ultimement, la digestion cellulaire (Israels et Israels, 1999; Jin et El-Deiry, 2005; Papaliagkas, Anogianaki *et al.*, 2007).

1.3. Hypothèses et objectifs

Comme des anomalies ont été remarquées au niveau des pattes des grenouilles dans les zones de forte intensité agricole et comme certains pesticides sont connus pour avoir des effets pouvant affecter directement ou indirectement l'os, nous émettons l'hypothèse que le métabolisme osseux soit affecté chez les ouaouarons de sites avec une forte activité agricole. D'ailleurs, une différence significative a été rapportée

entre la longueur des os, la longueur de l'individu ainsi que la masse des ouaouarons retrouvés dans les zones de forte intensité agricole, ces paramètres y étant moins élevés (Spear, Boily *et al.*, 2009). Ainsi, il est supposé que l'architecture générale de l'os, définie par des paramètres tels que la forme, la porosité et la densité minérale osseuse, soit affectée.

L'architecture étant altérée, il est considéré que des changements au niveau des fonctions des cellules osseuses soient perceptibles.

Le présent projet aura donc pour but de mettre en évidence les effets de contaminants environnementaux sur le métabolisme osseux du ouaouaron. L'étude se divisera en deux volets principaux, soient un volet *in vivo* et un *in vitro*. Le volet *in vivo* permettra d'observer les effets plus globaux d'une batterie de contaminants sur le métabolisme osseux du ouaouaron. Cependant, bien que ce volet permette de mettre en évidence des conséquences de l'exposition à des contaminants, il ne permet pas de déterminer s'il s'agit d'effets directs ou indirects, ou encore quel contaminant en particulier est le responsable. Afin de répondre à ces questions, le volet *in vitro* sera développé, où, en traitant uniquement les ostéoblastes, il sera possible d'étudier la nature de l'effet. De plus, à partir d'analyses d'échantillons d'eaux prélevées sur le terrain, dans le milieu de capture des ouaouarons, les principaux contaminants retrouvés pourront être ciblés, et alors utilisés pour traiter les cellules et juger de leurs effets.

Objectifs généraux :

- a) *Vérifier s'il y a altération du métabolisme osseux chez le ouaouaron exposé à une batterie de contaminants agricoles en bordure de la rivière Yamaska.*
- b) *Évaluer adéquatement l'âge des individus*

Objectifs spécifiques :

- a) *Vérifier l'impact de contaminants agricoles ciblés sur l'architecture générale de l'os à l'aide du microtomographe Skyscan 1172, au niveau du fémur et des phalanges, en fonction de l'âge des individus*
- b) *Exposer directement des cellules issues de lignées ostéoblastiques humaine et murine aux principaux contaminants agricoles ciblés et déterminer s'ils ont un effet par des essais de viabilité cellulaire.*

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Protocole de terrain et évaluation de l'âge

2.1.1. Sites et méthode de capture

Six sites ont été choisis en bordure de la rivière Yamaska (figure 2.1), en fonction de l'intensité de l'activité agricole y étant pratiquée (Spear, Boily *et al.*, 2009). Un gradient d'intensité agricole est donc bien défini entre les sites, un site présentant une forte activité agricole (Rivière Noire [5]), trois sites à l'intensité agricole modérée (Rivière Pot-au-Beurre [2], Réservoir Choinière [3] et Farnham [4]) et deux sites ayant une faible activité agricole (Deborah Stairs [1] et Lac Boivin [6]).

Selon un protocole de terrain conforme aux normes du comité institutionnel de protection des animaux (CIPA) de l'Université du Québec à Montréal ainsi qu'à celles du ministère des Ressources naturelles et de la faune, les grenouilles ont été capturées à raison d'un maximum de 30 grenouilles par site. De ce nombre, seulement 16 grenouilles ont été euthanasiées dans le but d'exercer des analyses biochimiques, génétiques, cellulaires et autres. Cependant, pour toutes les grenouilles, des manipulations ont été réalisées pour obtenir les différents paramètres morphométriques (longueur, masse, sexe, etc) et une prise de sang (0,5mL à 2,0mL) a été effectuée dans l'artère fémorale, à l'aide d'une seringue héparinée.

Les individus ont été capturés entre 21h00 et 2h00, et ont été repérés principalement par leur chant, puis ils ont été fixés un par un à l'aide d'une lampe de poche avant d'être attrapés à main nue ou avec un filet. Les ouaouarons capturés ont été conservés dans des contenants de plastique remplis de l'eau de la rivière, dans le couvercle desquels sont percés des trous d'aération. Un laboratoire de terrain a été installé le lendemain matin afin de pratiquer les manipulations sur les individus de façon adéquate. Les manipulations ont été faites après avoir anesthésiées les grenouilles en

les plaçant dans un bassin d'eau contenant 0,1% de MS222 (tricaïne methanesulphonate) tamponnée par 0,2% de NaHCO_3 . L'euthanasie des ouaouarons sélectionnés a été effectuée par sectionnement de la colonne vertébrale au niveau des vertèbres cervicales. La pêche et les manipulations ont été effectuées dans une période ne dépassant pas 16 heures.

La cohorte des individus de 2008 a été ciblée pour les analyses.

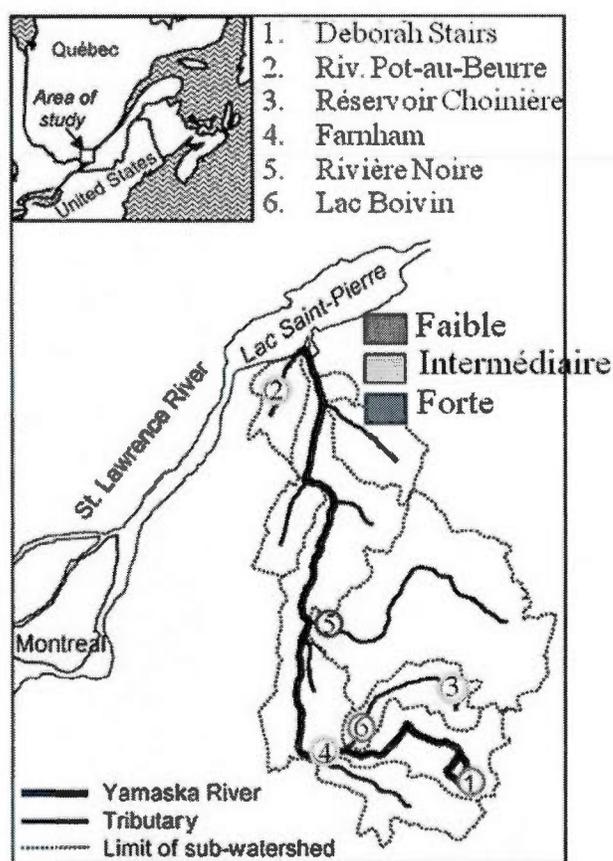


Figure 2.1 Carte du bassin versant de la rivière Yamaska illustrant l'emplacement des 6 sites de pêche du ouaouaron (*R. catesbeiana*) Tirée de Spear *et al.*, 2009.

2.1.2. Évaluation de l'âge

Squelettochronologie :

La 3^e phalange du 4^e doigt de la patte arrière du ouaouaron a été coupée et plongée dans une solution de paraformaldéhyde à 4% (dans un tampon phosphate salin, PBS :

0.10g/L CaCl₂, 0.20g/L KCl, 0.20g/L KH₂PO₄, 0.10g/L MgCl₂.6H₂O, 8g/L NaCl, 1.44g/L Na₂HPO₄, pH=7.4) pour une période d'environ 24 heures. L'os a été par la suite rincé 3 fois dans du PBS durant 24 heures, puis conservé dans une solution d'éthanol à 70%.

Nous avons procédé ensuite à la décalcification en plongeant la phalange dans une solution d'acide formique (0,1% citrate de sodium, 22,5% acide formique) durant 24 heures. Suit la déshydratation et l'enrobage à la paraffine : des bains successifs de 24 heures de 70% EtOH, 80% EtOH, 95% EtOH, 95% EtOH, 100% EtOH, 100% EtOH, 50% EtOH 50% xylène, 100% xylènes, 100% xylènes et une nuit d'infiltration dans un bain de paraffine. L'os a alors été coupé à une épaisseur de 20µm à l'aide d'un microtome (Microm HM 360, Thermo Scientific, lame d'acier inoxydable de Feather) avant d'être coloré au bleu alcian-hématoxyline ; le tissu a été déparaffiné, puis hydraté, coloré au bleu d'alcian-hématoxyline durant 30 minutes et plongé dans une solution de fuscine-éosine pour 3 minutes avant d'être rincé à l'eau. Finalement, l'os a été placé entre lame et lamelle et observé au microscope dans le but de compter le nombre de lignes d'arrêt de croissance (LAC) qui correspondent à l'âge de l'individu (Leclair et Castanet, 1987; Spear, Boily *et al.*, 2009).

2.1.3. Évaluation de l'architecture osseuse et analyses sériques

Les os (fémur et phalange) ont été prélevés et un maximum de chair a été retiré. Ensuite, l'étape de fixation a débuté en recouvrant l'os d'une solution de paraformaldéhyde à 4% dans un tampon PBS pour une période d'environ 24 heures. Après la période de fixation, l'os a été enveloppé dans un papier de marque *Kimwipe*, puis humecté de tampon PBS. L'os a finalement été placé à la verticale à l'intérieur du tube allant dans le microtomographe *Skyscan 1172* (Skyscan, Kartuizersweg 3B, Belgique). Les os ont été numérisés à 70 kilovolts (kV) avec un filtre 0.5 mm aluminium (Al), une résolution de 5 µm³ pour les phalanges, et de 12 µm³ pour les

fémurs, une rotation de 180° avec un incrément de rotation de 0,5°. Les images brutes ont été reconstruites avec le logiciel NRecon (Skyscan, Aartselaar, Belgique), et analysées avec le logiciel CTAn (Skyscan, Aartselaar, Belgique).

Des indices sur l'homéostasie minérale et le métabolisme énergétique des grenouilles ont été déterminés en dosant les ions calcium et phosphore, ainsi que le glucose des échantillons sériques. Les kits colorimétriques pour la phosphatase alcaline, le calcium, le phosphore et le glucose sont de BioAssay Systems (Hayward, CA, USA).

2.2. Cultures cellulaires des ostéoblastes

Les cellules de la lignée MG63 sont issues d'ostéosarcome humain et sont distribuées par l' « American Type Culture Collection » (ATCC, Rockville, MD). Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture DMEM-F12 sans phénol (Sigma Aldrich) auquel a été ajouté 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (PAA), 100 unités/mL de pénicilline, 100µg/mL de streptomycine (Gibco), 2mM de glutamine et 0,25µg/mL de fungizone (Gibco).

La lignée cellulaire MC3T3-E1 est une lignée pré-ostéoblastique issue de calvaria de souris distribuée par l' « American Type Culture Collection » (ATCC, Rockville, MD). Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture α -MEM avec phénol auquel a été ajouté 10% de FBS, 100 unités/mL de pénicilline, 100µg/mL de streptomycine et 2mM de glutamine et 0,25µg/mL de fungizone (Gibco).

À confluence, les cellules ont été séparées à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA (0,05%-0,02%) (Invitrogen), etensemencées à raison de 3000 cellules/cm² dans des plaques de 6, 12, 24 ou 96 puits (Sarstedt). Les plaques ont alors été placées pour un minimum de 5 jours à 37°C, dans un incubateur à 5% CO₂, avec une atmosphère humide contrôlée.

2.2.1. Essais *in vitro*

- Expositions des cellules MG-63 et MC3T3-E1 aux polluants ciblés

Les pesticides atrazine et metolachlor ont été les principaux répertoriés aux sites d'échantillonnage en 2008. Dans le but de vérifier les mêmes tendances que lors d'une exposition *in vivo*, ces mêmes contaminants ont été utilisés. De plus, le pesticide organochloré endosulfan a été utilisé puisqu'une atteinte du métabolisme osseux par ce composé était suspectée. L'étude *in vitro* a porté sur l'effet des contaminants sur des fonctions générales des cellules (viabilité), mesuré par essais au 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) (plaques 96 puits) et coloration au crystal violet (plaques 24 puits). Finalement, les mécanismes par lesquels l'endosulfan agit sur la viabilité ont été étudiés par cytométrie en flux (traitements en plaques de 12 puits).

- i. Évaluation de la viabilité cellulaire par essai MTT

L'essai MTT est une mesure de l'activité mitochondriale, qui renseigne sur la viabilité des cellules. La mitochondrie transforme le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) en cristaux de formazan de couleur violette. Une lecture d'absorbance à 575 nm permet de quantifier l'activité mitochondriale, et donc la survie des cellules.

Un volume de 20 μ L de solution MTT (5mg/mL, Sigma) dans l'eau a été ajouté à 200 μ L de milieu de culture, dans une plaque de 96 puits. La plaque a été mise à incuber à 37°C pour une période d'entre 2 et 4 heures de la fin du traitement des cellules avec les polluants ciblés, jusqu'à l'apparition de cristaux violets au fond des puits. Le milieu de culture a alors été retiré des puits par aspiration, puis une quantité de 200 μ L de solvant diméthylsulfoxyde (DMSO) a été ajoutée dans chacun des puits, et la plaque a été mise à incuber entre 5 minutes et 60 minutes, dans le but de solubiliser les cristaux. Une lecture d'absorbance a ensuite été prise à 575 nm, et la viabilité des cellules a été évaluée. Les résultats sont exprimés en activité MTT relative, soit en pourcentage de la valeur de la condition témoin sans pesticide.

ii. Évaluation de la viabilité cellulaire par coloration au crystal violet

Le crystal violet est un colorant de protéines. Après traitement, dans une plaque de 24 puits, le milieu de culture a été retiré et on a procédé à un lavage avec 250 μ L de PBS à température pièce. Ensuite, 500 μ L d'une solution de crystal violet (2g/L dans éthanol 2%, City Chemicals) ont été ajoutés durant 15 minutes. Après la période d'incubation, le colorant a été aspiré et les puits ont été rincés en immergeant la plaque dans un bassin d'eau jusqu'à ce que l'eau soit claire. On a ensuite solubilisé le colorant à l'aide 500 μ L d'une solution de « sodium dodecyl sulfate » (SDS) 1%, puis une lecture d'absorbance a été prise à 575nm. Les résultats sont présentés en pourcentage de la valeur du témoin sans pesticide.

iii. Antioxydants

Les cellules de la lignée MG-63 ont été amenées à une confluence d'environ 70% en plaques de 24 puits. Elles ont ensuite été exposées à différentes concentrations d'endosulfan pour une période de 24 heures. Dans le but de vérifier si le potentiel toxique du pesticide est lié à une action oxydante, trois antioxydants, la vitamine E (0,2mM, Sigma), la vitamine C (0.2mM, Sigma) et la N-acetyl-cysteine (NAC) (2mM, Sigma), ont été ajoutés aux milieux d'incubation. La survie des cellules a par la suite été évaluée par coloration au crystal violet.

2.2.2. Cytométrie en flux

Les cellules ont été amenées à confluence et ensuite traitées avec différentes concentrations d'endosulfan. Après la période de traitement, le milieu a été retiré et les cellules ont été décollées par ajout d'une solution de trypsine-EDTA (0,0125%-0,005%, Invitrogen) pour 5 minutes. Après la période d'incubation, 1 mL de milieu DMEM-F12 contenant 20% de FBS a été ajouté, et les cellules ont été récoltées par aspiration-rejet à l'aide d'une pipette P-1000. Les cellules ont alors été versées dans

un tube, puis culottées par centrifugation à 1200 rpm durant 10 minutes, avant d'être resuspendues pour le marquage avec une sonde.

Évaluation du mode de mort cellulaire par utilisation des sondes Iodure de propidium (PI) et de l'Annexine V

Le principe de la sonde veut que le PI marque l'ADN lorsqu'il y a perte d'intégrité membranaire, signe de nécrose ou d'apoptose tardive (Rieger, Nelson *et al.*). L'annexine V est un colorant qui marque les phospholipides phosphatidylsérine lorsqu'ils sont localisés sur le feuillet externe de la membrane, ce qui représente un des premiers signes d'apoptose (Coxon, Duggan *et al.*, 2011). Le PI est un colorant de vie/mort. Les cellules viables excluent le colorant alors que les cellules endommagées y sont perméables. Le double marquage permet de différencier les cellules vivantes des cellules nécrotiques et des cellules apoptotiques à différents stades (précoce, tardif).

Après que les cellules aient été culottées, elles ont été incubées dans 100µL d'une solution contenant 1µL de PI (1mg/mL, Invitrogen. Ex./Ém. : 488-540/617 nm) et 0,5µL d'Annexine V-Fluorescein (Invitrogen, Ex./Ém. : 488/518 nm) dans du tampon d'incubation (10mM HEPES, 140mM NaCl, 2,5mM CaCl₂, pH=7,4) pour 15 minutes. Ensuite, 500µL de tampon ont été ajoutés, et l'échantillon a été analysé au cytofluoromètre.

Mesure de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) avec la sonde H2DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)

La sonde H2DCFDA entre dans la cellule où, sous l'action d'estérases intracellulaires, ses groupements acétate sont clivés. Le dichlorofluoresceine (DCFH) ainsi formé se voit oxydé par le H₂O₂ présent dans la cellule et sa fluorescence peut être mesurée aux longueurs d'onde d'excitation de 492-495 nm et d'émission de 517-527 nm (Eruslanov et Kusmartsev, 2010).

Les cellules culottées ont été resuspendues après traitement dans 1mL de PBS. 4 μ L H₂O₂ 3% ont été ajoutés à la condition témoin positif. Ensuite, 10 μ L de la sonde H2DCFDA (5mg/mL, Invitrogen) ont été ajoutés pour 15 minutes et les tubes ont préservés à l'abri de la lumière. Les échantillons ont par la suite été analysés au cytofluoromètre.

Mesure du potentiel mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)

La sonde JC-1(5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) s'accumule dans la mitochondrie en fonction du potentiel de celle-ci, et devient rouge fluorescent. À l'inverse, lorsqu'il y a dépolarisation mitochondrial, le colorant ne peut s'accumuler, et il demeure vert. Le ratio de l'intensité de fluorescence rouge/vert indique alors l'état du potentiel mitochondrial.

Après traitements, les cellules culottées ont resuspendues dans 1mL de PBS chaud. Ensuite, 5 μ L d'une solution de JC-1 (400 μ M dans DMSO, Invitrogen) ont été ajoutés, puis les cellules ont été incubées 15 minutes, en les protégeant de la lumière. Un témoin positif a été effectué par l'ajout de 5 μ L de FCCP (carbonylcyanide-4-trifluoromethoxyphenylhydrazone, 400 μ M) dans l'un des tubes, le FCCP étant un ionophore à protons qui perturbe le gradient protonique et entraîne ainsi la dépolarisation mitochondriale. Les échantillons ont par la suite été analysés au cytofluoromètre par la mesure de la fluorescence aux longueurs d'onde d'excitation de 514-529 nm et d'émission de 590 nm

2.3. Analyses statistiques

Après avoir testé la normalité des distributions et l'hétérogénéité des variances par un test de Bartlett, les résultats ont été analysés par un test de T lorsque qu'il y avait seulement deux groupes de données. Le test de Dunnett à comparaisons multiples a

été utilisé lorsque deux groupes de données ou plus devaient être comparés à un groupe témoin. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

CHAPITRE III : RÉSULTATS

3.1 Le volet in vivo : grenouilles

Des difformités au niveau des pattes des ouaouarons évoluant en milieux agricoles ayant été observées et comme certains pesticides sont connus pour avoir des effets pouvant affecter directement ou indirectement l'os, nous avons voulu vérifier l'état du métabolisme osseux de ces grenouilles selon l'intensité de l'agriculture pratiquée dans leurs milieux de vie.

3.1.1 Paramètres morphométriques et estimation de l'âge

Des ouaouarons provenant de 6 sites différents, choisis selon un gradient d'exploitation agricole (faible, intermédiaire, forte), ont été capturés à l'été 2008. Les différents paramètres morphométriques ainsi que l'âge des individus ont été mesurés et sont présentés à la figure 3.1.

En regardant les quatre paramètres que sont la longueur totale (du museau au bout des pattes), la longueur museau-cloaque (SVL), le poids et l'âge, il apparaît que le site Lac Boivin semble être un bon site de référence. Les tests statistiques ont donc majoritairement été faits avec Lac Boivin à titre de référence.

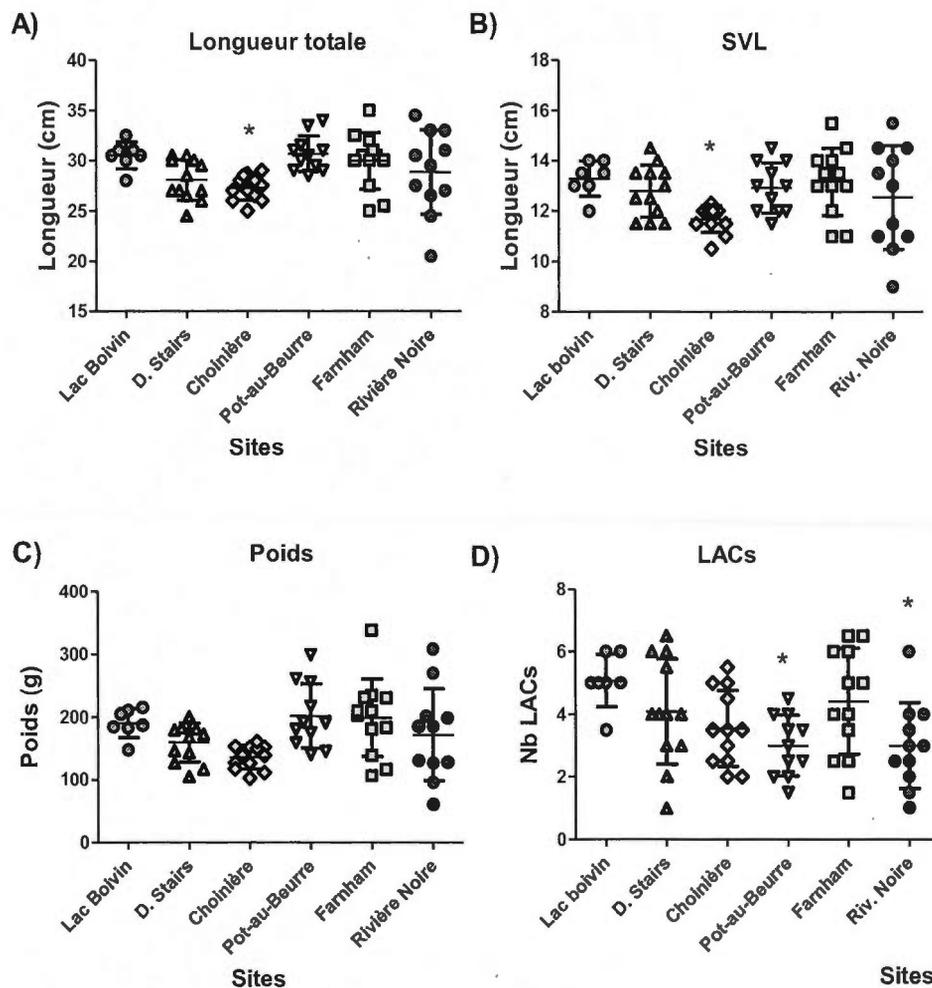


Figure 3.1 Caractérisation des populations. Les ouaouarons provenant des 6 sites à l'étude ont été capturés à l'été 2008, puis mesurés et pesés. L'estimation de l'âge par squelettechronologie a été exercée sur la 3^e phalange du 4^e doigt de la patte arrière droite. (A) Longueur totale (cm), (B) SVL (cm), (C) Poids (g), (D) Nombre de lignes d'arrêt de croissance (LACs). Lac Boivin : n=7, D. Stairs : n=12, Rés. Choinière : n=12, Farnham : n=12, Pot-au-Beurre : n=11, Rivière noire : n=11. Dunnnett par rapport à Lac Boivin : *p<0.05

La longueur totale des individus (du museau au bout des pattes) ainsi que la longueur museau-cloaque (SVL) ont été comparées à la valeur du site Lac Boivin (figure 3.1 a-b). Il en ressort que la longueur des individus n'est pas influencée par le gradient de contamination agricole, le site Rivière noire n'étant pas différent de Lac Boivin, ni

d'aucun autre site référence, ni d'un site intermédiaire. Cependant, le site d'intensité intermédiaire d'exploitation agricole Réservoir Choinière est différent du site Boivin au niveau de la longueur, autant pour la longueur totale que la longueur museau-cloaque, les ouaouarons

Le poids des individus a aussi été comparé entre les sites, et il n'apparaît pas de différence significative entre les valeurs d'aucun d'entre eux.

Nous avons aussi procédé à une estimation de l'âge par squelettochronologie sur la 3^e phalange du 4^e doigt de la patte arrière droite du ouaouaron, une ligne d'arrêt de croissance (LAC) correspondant à une année de vie (figure 3.1-d et 3.2). Nous pouvons constater que les grenouilles provenant du site de forte intensité agricole Rivière Noire sont significativement plus jeunes. Il en va de même pour les grenouilles capturées au site intermédiaire Pot-au-Beurre.

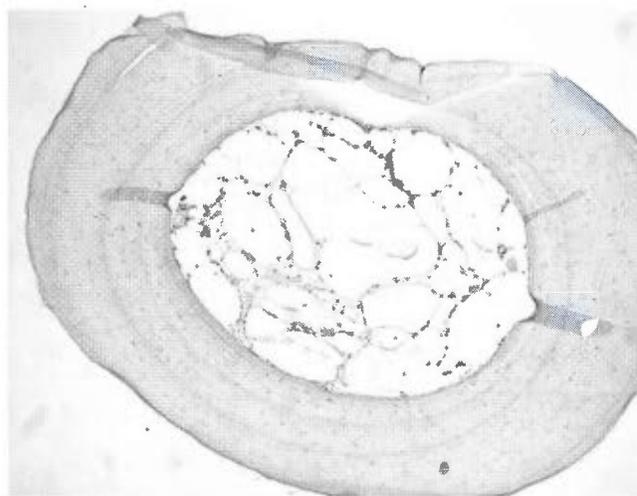


Figure 3.2 Évaluation du nombre de lignes d'arrêt de croissance (LACs). La 3^e phalange du 4^e doigt de la patte arrière droite d'un ouaouaron a été disséquée, puis fixée, décalcifiée, déshydratée, et enrobée à la paraffine avant d'être coupée à une épaisseur de 5 μ M et colorée au bleu alcian-hématoxyline. La coupe présentée est d'un individu de 5 LACs.

À la lumière de ces résultats, nous avons voulu vérifier s'il existait des liens entre les paramètres morphométriques mesurés et le nombre de LACs. Les résultats sont

présentés au Tableau II. Il en ressort que les paramètres longueur totale et longueur museau-cloaque sont proportionnelles à l'âge des individus. Cette tendance est présente à tous les sites, mis à part au site Réservoir Choinière.

Quant au poids, il ne semble pas varier en fonction de l'âge de la grenouille, puisque seulement la moitié des sites affichent une corrélation positive et significative entre le poids et le nombre de LACs.

Tableau II. Régressions linéaires entre les différents paramètres morphométriques des ouaouarons. Les ouaouarons provenant des 6 sites à l'étude ont été capturés à l'été 2008, puis mesurés et pesés. L'estimation de l'âge par squelettechronologie a été exercée sur la 3^e phalange du 4^e doigt de la patte arrière droite. *Lac Boivin* : n=7, *D. Stairs* : n=12, *Rés. Choinière* : n=12, *Farnham* : n=12, *Pot-au-Beurre* : n=11, *Rivière noire* : n=11. NS : non-significatif, *r* : coefficient de régression, *P*-value : valeur de l'analyse statistique.

		LAC	
		r	P -value
Lac Boivin	Long. Totale	0.595	0.0424
	SVL	0.661	0.0261
	Poids	0.521	NS
Deborah Stairs	Long. Totale	0.519	0.0082
	SVL	0.713	0.0006
	Poids	0.611	0.0027
Réservoir Choinière	Long. Totale	0.290	NS
	SVL	0.057	NS
	Poids	0.000	NS
Farham	Long. Totale	0.754	0.0003
	SVL	0.796	0.0001
	Poids	0.661	0.0013
Pot-au-Beurre	Long. Totale	0.379	0.0439
	SVL	0.449	0.0241
	Poids	0.169	NS
Rivière Noire	Long. Totale	0.713	0.0011
	SVL	0.764	0.0004
	Poids	0.754	0.05

3.1.2 Appréciation qualitative de la morphologie osseuse

Nous avons noté quelques différences quant à la morphologie osseuse du ouaouaron, en comparaison avec le modèle souris avec lequel nous travaillons habituellement. D'abord, nous avons trouvé étonnant de remarquer qu'il n'y avait pas de portion trabéculaire dans le fémur et le tibia de la grenouille, mais seulement dans les phalanges des individus (figure 3.3). Aussi, une plaque de croissance bien définie n'a pas non plus été retrouvée.

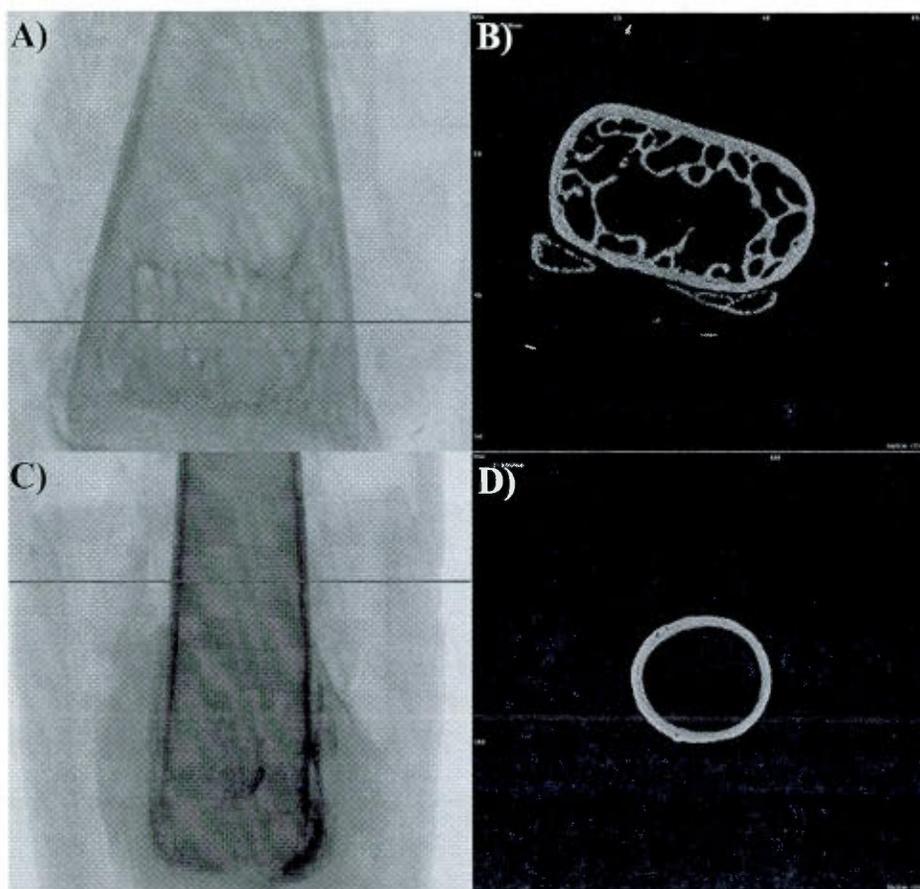


Figure 3.3 Morphologie osseuse de la phalange et du fémur de *R. catesbeiana*.

Les os ont été numérisés à l'aide du microtomographe Skyscan 1172 à 70kV, filtre 0,5mm aluminium, une résolution de $12\mu\text{m}^3$, rotation 180° et incrément de rotation de $0,5^\circ$. Les images présentées ont été reconstruites avec le logiciel NRecon. A) Image de la 3^e phalange du 4^e doigt de la patte arrière droite. B) Image en coupe de la portion trabéculaire de la 3^e phalange du 4^e doigt de la patte arrière droite. C) Image d'une portion du fémur droit. D) Image en coupe de la portion corticale du fémur droit.

3.1.3 Volume osseux

Nous avons voulu vérifier si le volume osseux des ouaouarons capturés en 2008 aux abords de la rivière Yamaska variait selon le gradient de contamination agricole. Les analyses ont été effectuées sur trois portions d'os différentes, soit les portions trabéculaire et corticale de la phalange, et la portion corticale du fémur.

La figure 3.4 présente les résultats de volumes osseux (BV/TV) en fonction du site, pour la portion corticale du fémur. Nous constatons que les grenouilles provenant du site Rivière Noire ont un volume osseux significativement plus faible que celles provenant du Lac Boivin, et qu'il en va de même pour les ouaouarons capturés à Pot-au-Beurre et au Réservoir Choinière.

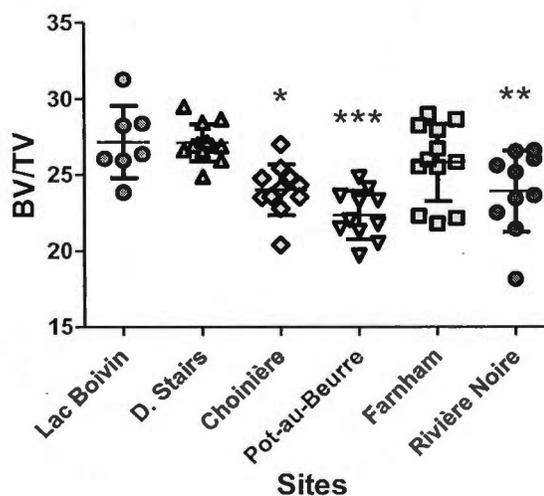


Figure 3.4 Analyse BV/TV de la portion corticale du fémur. Les fémurs droit des ouaouarons de la cohorte 2008 ont été disséqués, puis fixés dans une solution de paraformaldéhyde. Les os ont été numérisés à l'aide du microtomographe Skyscan 1172 à 70kV, filtre 0,5mm aluminium, une résolution de $12\mu\text{m}^3$, rotation 180° et incrément de rotation de $0,5^\circ$. Les images brutes ont été reconstruites avec le logiciel NRecon, et ont été analysées avec le logiciel CTAn. Dunnett par rapport à Lac Boivin : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Les résultats d'analyse BV/TV de la portion corticale de la phalange sont présentés à la figure 9. Les tendances relevées pour la portion corticale du fémur ne sont pas

retrouvées dans la phalange. En effet, le seul site qui affiche une différence de volume osseux est le site de faible intensité agricole Deborah Stairs. Les sites Rivière Noire et Pot-au-Beurre semblent avoir un volume osseux réduit, mais cette tendance n'est pas significative.

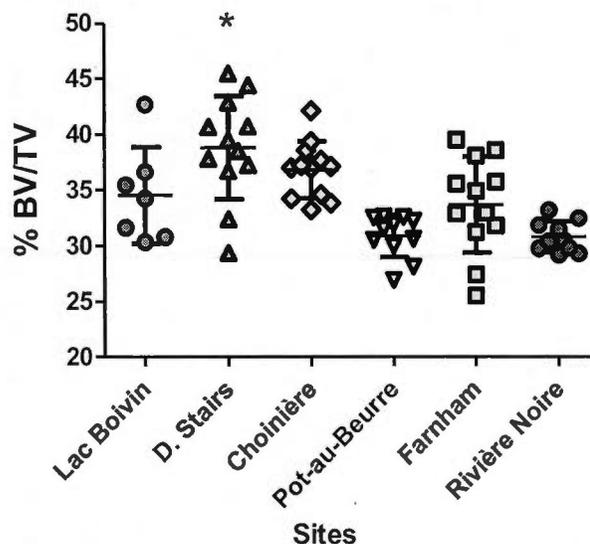


Figure 3.5 Analyse BV/TV de la portion corticale de la phalange. La 3^e phalange du 4^e doigt de la patte arrière droite des ouaouarons de la cohorte 2008 a été disséquée, puis fixée dans une solution de paraformaldéhyde. Les os ont été numérisés à l'aide du microtomographe Skyscan 1172 à 70kV, filtre 0,5mm aluminium, une résolution de $12\mu\text{m}^3$, rotation 180° et incrément de rotation de $0,5^\circ$. Les images brutes ont été reconstruites avec le logiciel NRecon, et ont été analysées avec le logiciel CTAn. Dunnett par rapport à Lac Boivin : * $p < 0.05$.

Finalement, le volume osseux de la portion trabéculaire des phalanges des ouaouarons ont été analysés (figure 10). Les grenouilles provenant de Rivière Noire, le site ayant la plus forte exploitation agricole, ont un plus faible volume osseux que les grenouilles provenant du site de référence. Aussi, les grenouilles provenant du site intermédiaire Réservoir Choinière affichent un volume osseux réduit.

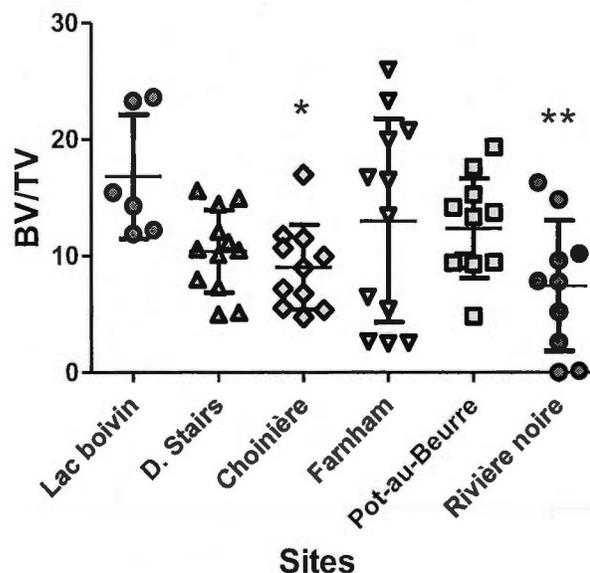


Figure 3.6 Analyse BV/TV de la portion trabéculaire de la phalange. La 3^e phalange du 4^e doigt de la patte arrière droite des ouaouarons de la cohorte 2008 a été disséquée, puis fixée dans une solution de paraformaldéhyde. Les os ont été numérisés à l'aide du microtomographe Skyscan 1172 à 70kV, filtre 0,5mm aluminium, une résolution de $12\mu\text{m}^3$, rotation 180° et incrément de rotation de $0,5^\circ$. Les images brutes ont été reconstruites avec le logiciel NRecon, et ont été analysées avec le logiciel CTAn. Dunnett par rapport à Lac Boivin : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Afin de vérifier si les différences significatives de volumes osseux étaient bien attribuables à la contamination agricole, et non simplement à des différences entre les populations présentes aux six sites, nous avons voulu normaliser les résultats par rapport aux paramètres morphométriques ainsi que par rapport à l'âge des ouaouarons. Pour ce faire, nous avons effectué des régressions linéaires entre les BV/TV mesurés par analyses microtomographiques et les paramètres longueur totale, longueur museau-cloaque ainsi que l'âge, estimée par squelettochronologie.

Les résultats obtenus des différentes régressions effectuées n'indiquent pas de tendance entre les paramètres mesurés (tableau III).

Tableau III. Régressions linéaires entre le volume osseux et le nombre de lignes d'arrêt de croissance (LACs), la longueur museau-cloaque (SVL) et la longueur totale des ouaouarons capturés en 2008, aux six sites, pour 3 portions d'os. NS : non significatif, r : coefficient de régression, P : valeur de l'analyse statistique

		Trabéculaire phalange		Cortical phalange		Cortical fémur	
		BV/TV		BV/TV		BV/TV	
		r	P	r	P	r	P
Lac Boivin	LACs	0,2794	NS	0,1013	NS	0,2664	NS
	SVL	0,2222	NS	0,07566	NS	0,005781	NS
	Long. Totale	0,3209	NS	0,06589	NS	0,001833	NS
Deborah Stairs	LACs	0,0007591	NS	0,05394	NS	0,336	0,0482
	SVL	0,05211	NS	0,007387	NS	0,08921	NS
	Long. Totale	0,2139	NS	0,2309	NS	0,1208	NS
Réservoir Choinière	LACs	0,1865	NS	0,2631	NS	0,003728	NS
	SVL	0,06816	NS	0,2068	NS	0,4493	0,024
	Long. Totale	0,03129	NS	0,008672	NS	0,1736	NS
Farnham	LACs	0,4742	0,0133	0,1268	NS	0,4262	0,0214
	SVL	0,5912	0,0035	0,0414	NS	0,1922	NS
	Long. Totale	0,5721	0,0044	0,03805	NS	0,1464	NS
Pot-au-Beurre	LACs	0,03035	NS	0,0004348	NS	0,211	NS
	SVL	0,001601	NS	0,002634	NS	0,2759	NS
	Long. Totale	0,5547	0,0085	0,06122	NS	0,3039	NS
Rivière Noire	LACs	0,7995	0,0005	0,006008	NS	0,5815	0,0103
	SVL	0,6044	0,0081	0,02032	NS	0,5533	0,0136
	Long. Totale	0,6398	0,0055	0,06759	NS	0,6362	0,0057

3.1.4 Analyses sériques

Nous avons analysé différents marqueurs sériques du métabolisme osseux, marqueurs qui peuvent refléter une atteinte de l'intégrité de celui-ci (figure 3.7).

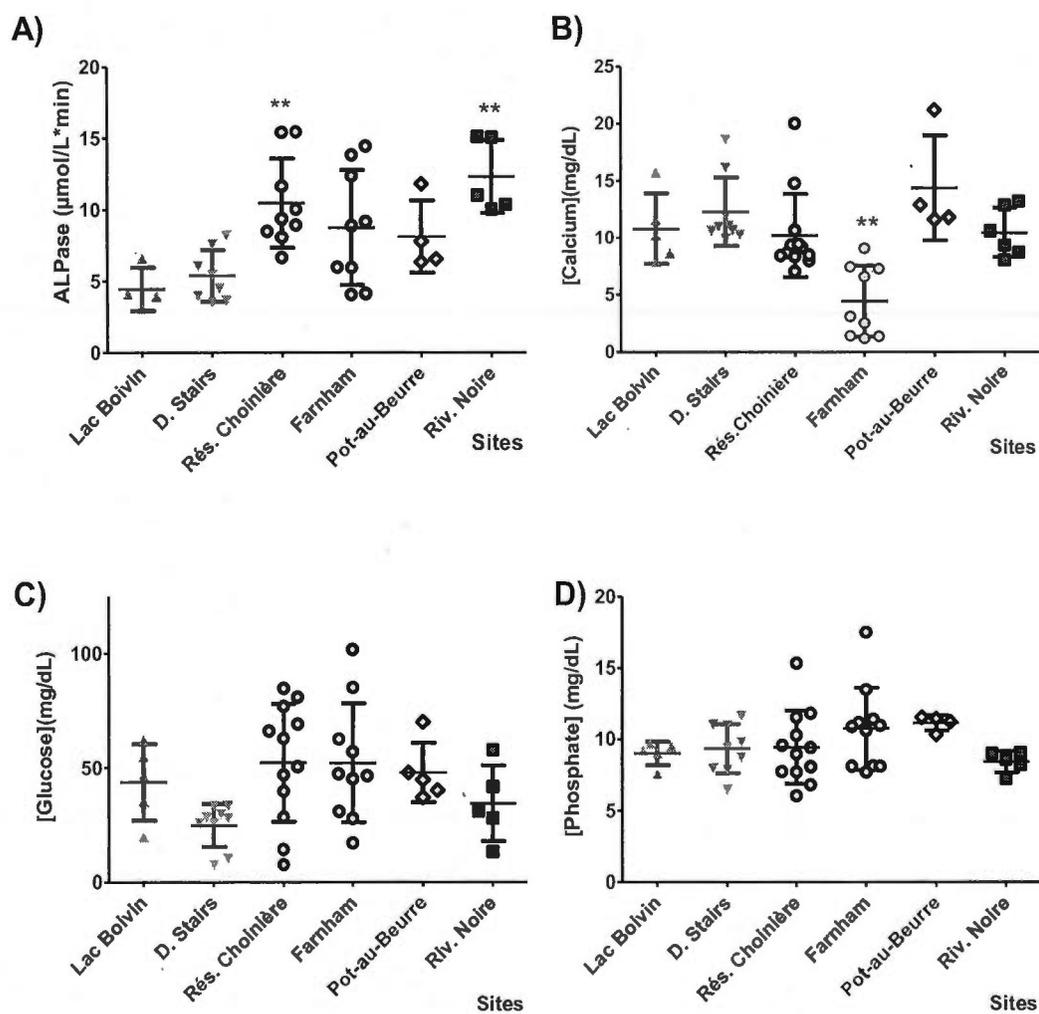


Figure 3.7 Dosages sériques des marqueurs du métabolisme osseux. Les différents marqueurs du métabolisme osseux ont été mesurés chez les individus capturés en 2008 à l'aide de kits colorimétriques (BioAssay Systems). (A) Activité de la phosphatase alcaline (ALPase). (B) Mesure du calcium (C) Mesure du glucose. (D) Mesure du phosphate. Dunnett par rapport à Lac Boivin : **p<0.01.

Par rapport aux sites de référence Lac Boivin et Deborah Stairs, l'activité de l'ALPase est environ deux fois plus élevée aux sites d'exploitation agricole intermédiaire Farnham et Pot-au-Beurre, et environ 2,5 fois plus élevée au site intermédiaire Réservoir Choinière et à celui de plus forte intensité agricole Rivière Noire.

La concentration sérique en calcium est légèrement plus basse au site Farnham, mais est en général assez stable.

Les concentrations sériques de glucose et de phosphate ne diffèrent pas entre les sites.

3.2 Le volet in vitro : les lignées cellulaires ostéoblastiques

Après avoir répertorié les principaux contaminants retrouvés aux sites d'étude, nous avons voulu vérifier leurs effets au niveau cellulaire.

3.2.1 Étude de la cytotoxicité

Nous avons d'abord évalué le caractère cytotoxique de l'atrazine et du metolachlor sur des cellules issues des lignées ostéoblastiques MC3T3 et MG-63, respectivement. Nous avons démontré que la viabilité des cellules n'était pas affectée suite à une incubation de 48 heures (figures 12 et 13).

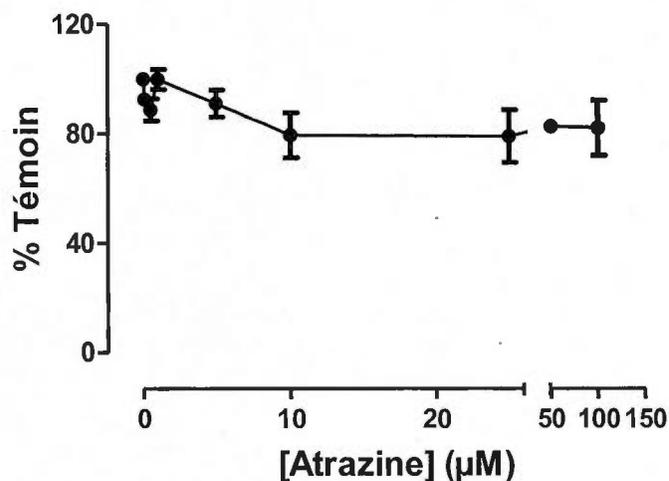


Figure 3.8 Cytotoxicité de l'atrazine évaluée par essai MTT. Les cellules de la lignée MC3T3-E1 ont été cultivées dans des plaques de 96 puits jusqu'à confluence d'environ 75%. Elles ont ensuite été exposées à des concentrations d'atrazine allant de 0 à 100µM durant 48 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport à la condition témoin (0µM). Les valeurs présentes sont les moyennes \pm erreur moyenne de 3 expériences indépendantes.

Nous avons commencé notre étude en travaillant avec la lignée MC3T3-E1, mais comme nous voulions inclure la cytométrie en flux lors de nos analyses ultérieures, nous avons changé de modèle cellulaire pour un modèle plus adéquat : la lignée MG-63. En effet, comme les ostéoblastes sont des cellules adhérentes et que nous avons besoin de les resuspendre pour les faire passer au cytofluoromètre, les cellules MC3T3-E1 n'étaient pas un bon choix, ces dernières se détachant difficilement, et majoritairement en agrégats

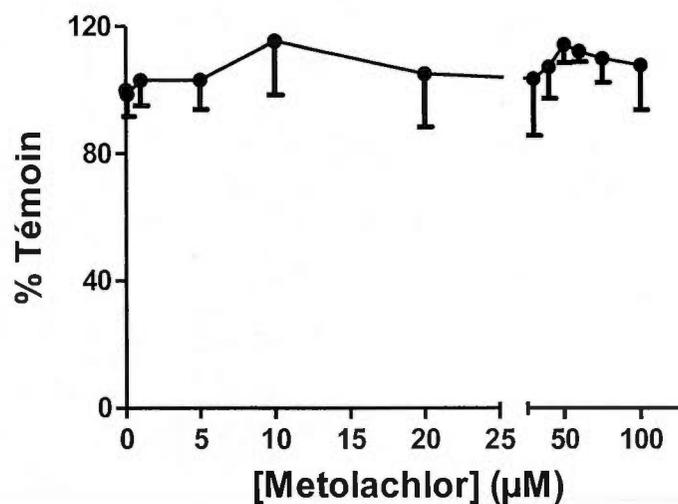


Figure 3.9 Cytotoxicité du metolachlor évaluée par coloration au crystal violet. Les cellules de la lignée MG-63 ont été cultivées dans des plaques de 96 puits jusqu'à confluence d'environ 75%. Elles ont ensuite été exposées à des concentrations de metolachlor allant de 0 à 100µM durant 24heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport à la condition témoin (0µM). Les valeurs présentes sont les moyennes ± erreur moyenne de 2 expériences indépendantes.

Nous avons ensuite évalué le caractère cytotoxique de l'endosulfan sur des cellules issues de la lignée ostéoblastique MG-63, suite à un traitement de 24 heures. Nous avons démontré que la viabilité décroît en fonction de l'augmentation de la concentration de pesticide, et cette relation se présente sous la forme d'une courbe dose-réponse classique (figure 3.10). L'analyse de la courbe de survie a permis d'évaluer la CL_{50} à 42,4µM.

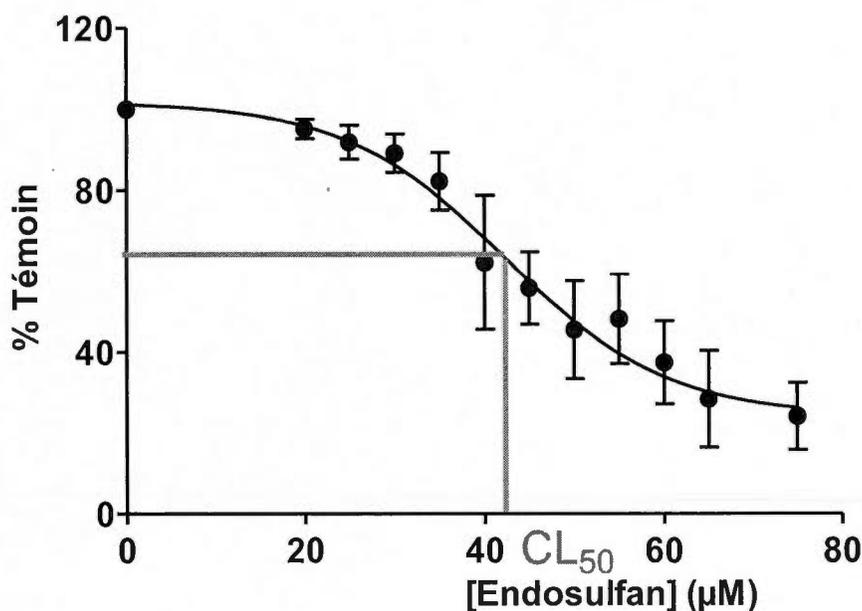


Figure 3.10 Cytotoxicité de l'endosulfan évaluée par coloration au crystal violet. Les cellules de la lignée MG-63 ont été cultivées dans des plaques de 24 puits jusqu'à confluence d'environ 75%. Elles ont ensuite été exposées à des concentrations d'endosulfan allant de 0 à 75µM durant 24 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport à la condition témoin (0µM). Les valeurs présentes sont les moyennes ± erreur moyenne de 3 expériences indépendantes. La CL₅₀ est évaluée à 42,4 µM.

3.2.2 Étude du mécanisme de toxicité de l'endosulfan

Suite aux observations quant au caractère cytotoxique de l'endosulfan, nous avons voulu documenter son mécanisme de toxicité par cytométrie en flux. Ces résultats ont fait l'objet d'une affiche qui a été présentée lors du congrès du BIOMED en avril 2011 (ANNEXE 3)

3.2.2.1 Détermination du mode de mort cellulaire

Nous avons d'abord utilisé les sondes Iodure de propidium (PI) et Annexine V afin de vérifier si le pesticide entraîne la mort via nécrose ou apoptose. Le PI sera exclu des cellules dont l'intégrité de la membrane plasmique est conservée, une caractéristique

des cellules en apoptose précoce (Rieger, Nelson *et al.*, 2011). L'Annexine V se lie spécifiquement à la phosphatidylsérine qui est relocalisée au feuillet externe de la membrane plasmique des cellules en apoptose (Coxon, Duggan *et al.*, 2011).

Le PI entre dans la cellule et marque l'ADN des cellules nécrotiques, alors que l'Annexine V marque les cellules apoptotiques. Ainsi, les cellules négatives pour le marquage PI et Annexine V (Figure 3.11, BG) sont les cellules viables. Les cellules positives pour le marquage PI et négatives pour Annexine V sont dites nécrotiques (HG), les cellules négatives pour le PI et positives pour Annexine V (BD) sont en apoptose précoce, alors que les cellules doubles positives (HD) sont perçues comme étant en apoptose tardive.

Nous avons exposé les cellules MG-63 à des concentrations d'endosulfan allant de 0 à 75 μ M pour des périodes de 3h, 6h ou 9h, puis les avons marquées à l'aide des sondes PI et Annexine V pour analyses au cytofluoromètre.

La figure 3.11 présente les résultats du marquage PI/Annexine V suite à un traitement de 6 heures à 75 μ M d'endosulfan. Nous pouvons remarquer la présence de cellules dans tous les quadrants, soit des cellules viables, des cellules en apoptose précoce et des cellules en apoptose tardive allant vers la nécrose.

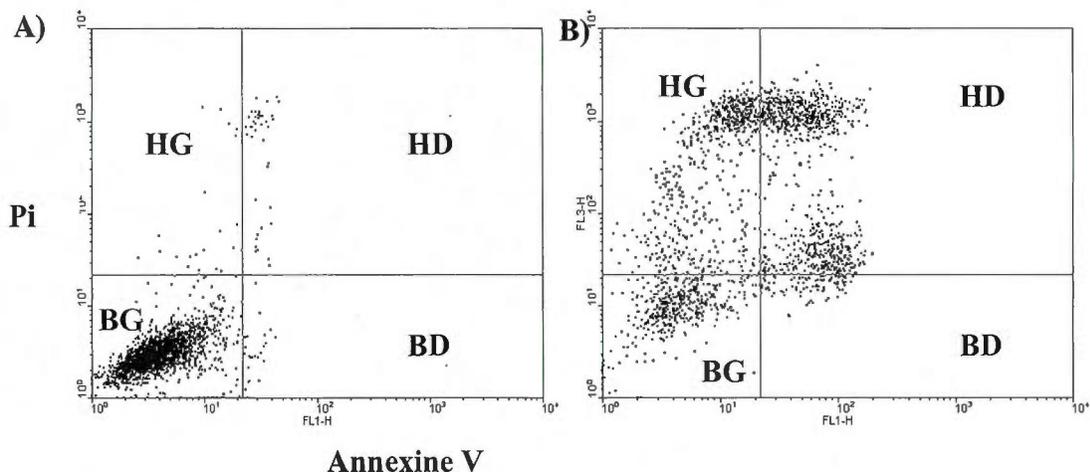


Figure 3.11 Analyse de la mortalité par cytométrie en flux. Les cellules MG-63 ont été traitées avec différentes concentrations d'endosulfan pour 3h, 6h ou 9h, puis marquées à l'aide des sondes Annexine V et iodure de propidium (PI) pour analyse en cytométrie en flux. A) Témoin sans endosulfan, 6 heures. B) Traitement 75 μ M, 6 heures. BG: cellules vivantes, BD: cellules en apoptose précoce, HG: cellules en nécrose, HD: cellules en apoptose tardive.

Comme nous pouvons voir à la figure 3.12, l'action de l'endosulfan au niveau de la survie des ostéoblastes est perceptible après la plus courte période de traitement, soit 3 heures, à la concentration la plus élevée. Bien que l'effet ne soit statistiquement significatif qu'aux plus fortes concentrations, l'effet de l'endosulfan tend à être dépendant de la concentration du pesticide, une augmentation de celle-ci entraînant une diminution de la proportion de cellules viables. L'action du pesticide semble aussi être temps-dépendant, la plus forte période de traitement présentant la plus faible proportion de cellules viables.

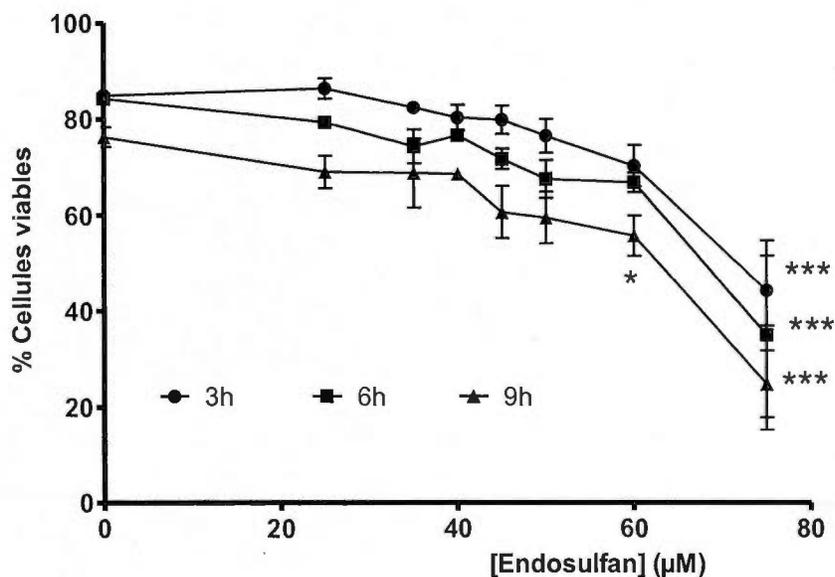


Figure 3.12 Proportion des cellules vivantes suite à un traitement à l'endosulfan.

Les cellules MG-63 ont été traitées avec différentes concentrations d'endosulfan pour 3h, 6h ou 9h, puis marquées à l'aide des sondes Annexine V et iodure de propidium (PI) pour analyse en cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules viables, soit les cellules se retrouvant dans le quadrant BG. Les valeurs sont les moyennes \pm erreur moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes. Dunnett: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

À la figure 3.13, nous pouvons apprécier les portions de mortalité attribuables à la nécrose et à l'apoptose. Au temps le plus court, l'apoptose et la nécrose sont en proportions similaires (figure 3.13-A), mais l'augmentation du temps de traitement favorise l'apoptose (figures 3.13-B et C).

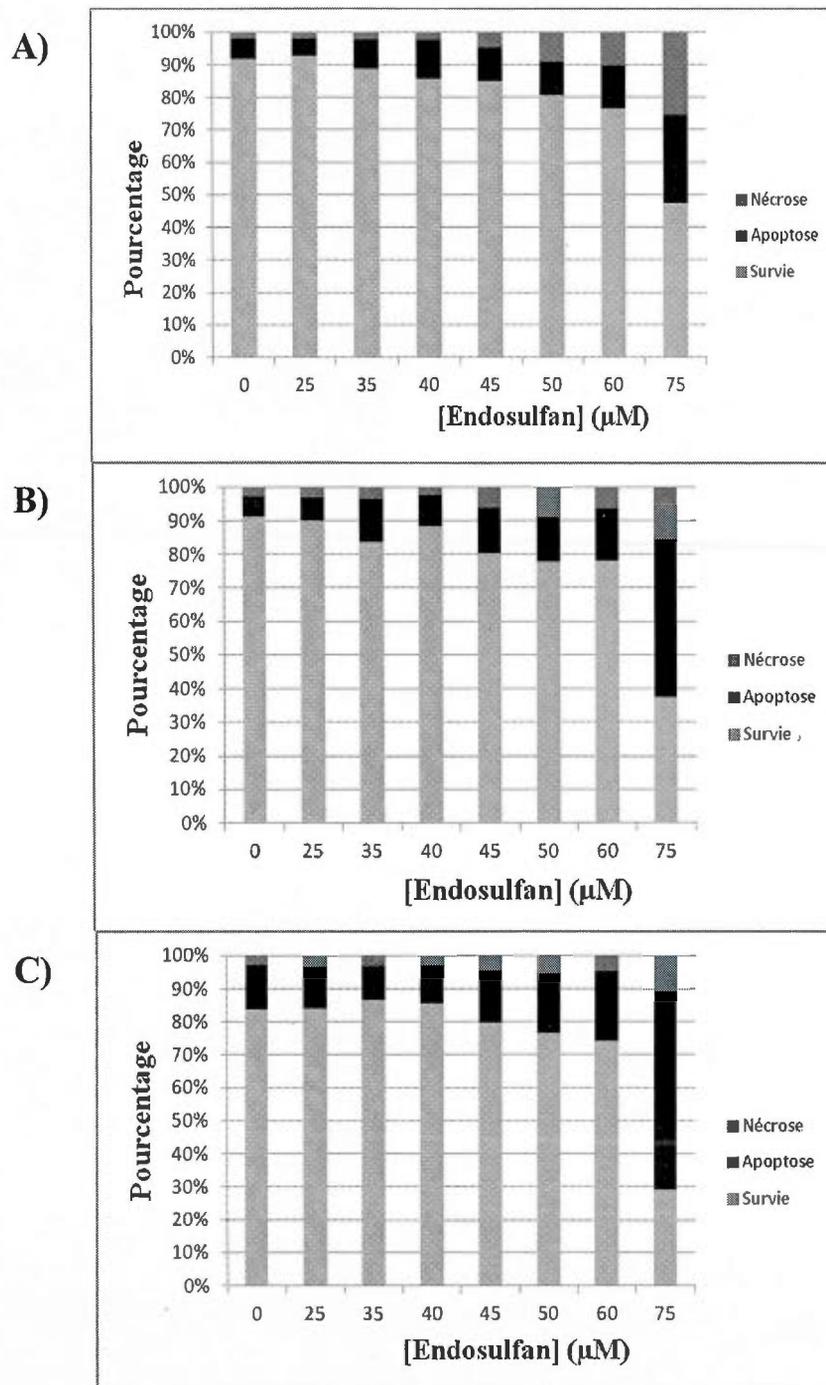


Figure 3.13 Détails du mécanisme de toxicité de l'endosulfan en cytofluorométrie, par marquage à la sonde H_2DCFDA . A) Traitement de 3 heures à l'endosulfan. B) Traitement de 6 heures à l'endosulfan. C) Traitement de 9 heures à l'endosulfan.

3.2.2.2 Évaluation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Nous avons voulu vérifier si la production de ROS par l'endosulfan était à la base de son mécanisme de toxicité, comme une mortalité via nécrose et apoptose lui était associée. Pour ce faire, les cellules traitées à l'endosulfan durant une période de 15 minutes à 9 heures, pour des concentrations allant de 0 à 75 μ M d'endosulfan ont été marquées à l'aide de la sonde H2DCFDA (Figure 3.14).

Le peroxyde d'hydrogène a été utilisé à titre de témoin positif (Figure 3.14-B). On remarque un déplacement du pic de fluorescence vers la droite, c'est-à-dire qu'un plus grand nombre de cellules possèdent une grande quantité de ROS. Le traitement à l'endosulfan a plutôt engendré une augmentation du pic associé à l'autofluorescence (à gauche du pic principal) (Figure 3.14-C). Il est à noter que les figures choisies sont représentatives des résultats obtenus aux autres temps, même aux temps les plus courts, et pour au moins 3 expériences indépendantes.

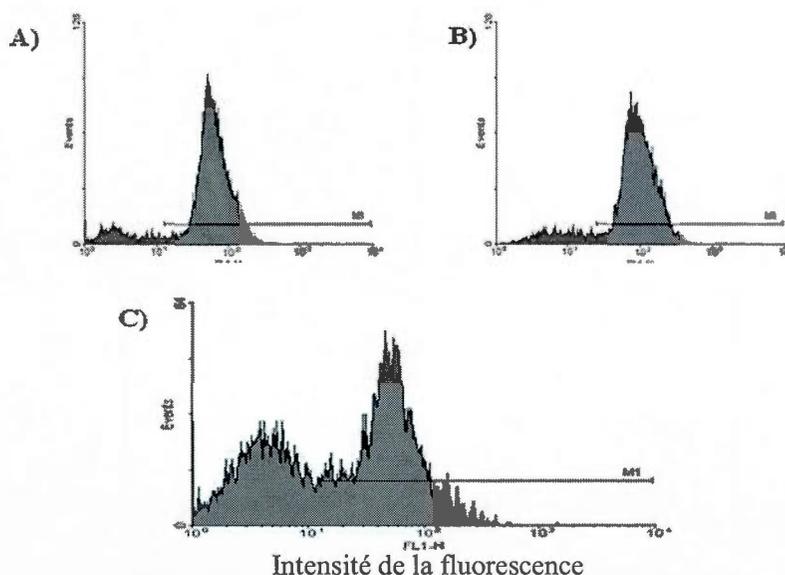


Figure 3.14 Analyse de la production de ROS. Les cellules ont été marquées à l'aide de la sonde DCFDA (Invitrogen). A) Témoin sans endosulfan, 6 heures. B) Témoin positif avec ajout de peroxyde d'hydrogène, 6 heures. C) Traitement 50 μ M endosulfan, 6 heures. L'intensité de la fluorescence a été mesurée pour un total de 10 000 cellules ou désigné « events ».

3.2.2.3 Évaluation du potentiel mitochondrial

Nous avons finalement voulu vérifier l'état du potentiel mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) suite à un traitement à l'endosulfan, sachant qu'un débalancement de $\Delta\Psi_m$ peut mener à une libération du cytochrome c, et ainsi déclencher la voie intrinsèque de l'apoptose. Les cellules MG-63 ont été soumises à un traitement allant de 0 à 75 μ M d'endosulfan pour une période de 3h à 9 h, puis marquées à l'aide de la sonde JC-1. Le FCCP était utilisé à titre de témoin positif du débalancement de $\Delta\Psi_m$ (Figure 3.15).

La sonde JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) s'accumule dans la mitochondrie en fonction du potentiel de celle-ci, et devient rouge fluorescent. À l'inverse, lorsqu'il y a dépolarisation mitochondriale, le colorant ne peut s'accumuler, et il demeure vert. Le ratio de l'intensité de fluorescence rouge/vert indique alors l'état du potentiel mitochondrial.

Nous avons marqué les cellules à l'aide de la sonde JC-1 et les avons analysés en cytométrie en flux. À la figure 3.15-A, nous remarquons qu'il y a deux populations distinctes de cellules, bien qu'elles n'aient pas été exposées à l'endosulfan. L'ajout d'un témoin positif, le FCCP, provoque une dépolarisation mitochondriale, et donc un plus grand nombre d'événements cellulaires de fluorescence verte (figure 3.15-B). Ce témoin FCCP permet par la suite de départager les populations dont le potentiel mitochondrial est adéquat (fluorescence rouge), de celles ayant subi une dépolarisation mitochondriale. Nous pouvons par la suite voir que l'augmentation de la concentration d'endosulfan ainsi que le temps de traitement provoquent un changement du ratio rouge/vert, un traitement à 60 μ M d'endosulfan durant 6 heures entraînant une dépolarisation mitochondriale quasi complète (figure 3.15-D).

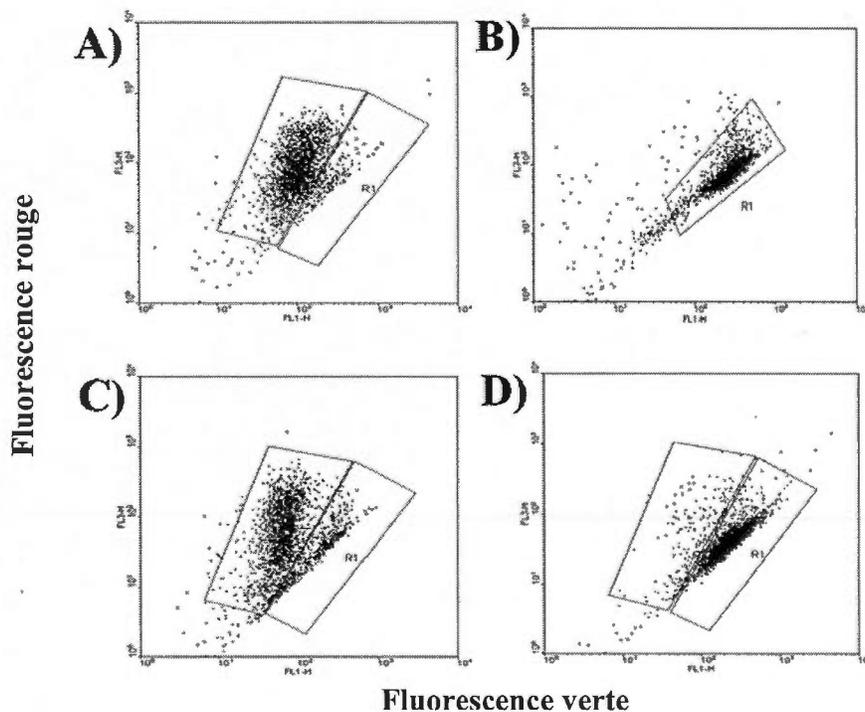


Figure 3.15 Analyse du débalancement du potentiel mitochondrial ($\Delta\Psi_m$). Les cellules traitées durant 3h, 6h ou 9h ont été marquées à l'aide de la sonde JC-1 pour analyses par cytométrie en flux. A) Témoin sans endosulfan, 6 heures B) Témoin positif avec ajout de FCCP. C) Traitement 25 μ M d'endosulfan, 9h. D) Traitement 60 μ M d'endosulfan, 6h.

L'analyse par cytométrie en flux (Figure 3.16) a révélé une atteinte significative du $\Delta\Psi_m$ pour une concentration de 50 μ M après le plus court temps de traitement. Cette atteinte devient significative après 6 heures pour une concentration de seulement 25 μ M du pesticide, et représente une perte d'environ 25% du $\Delta\Psi_m$ de la condition témoin.

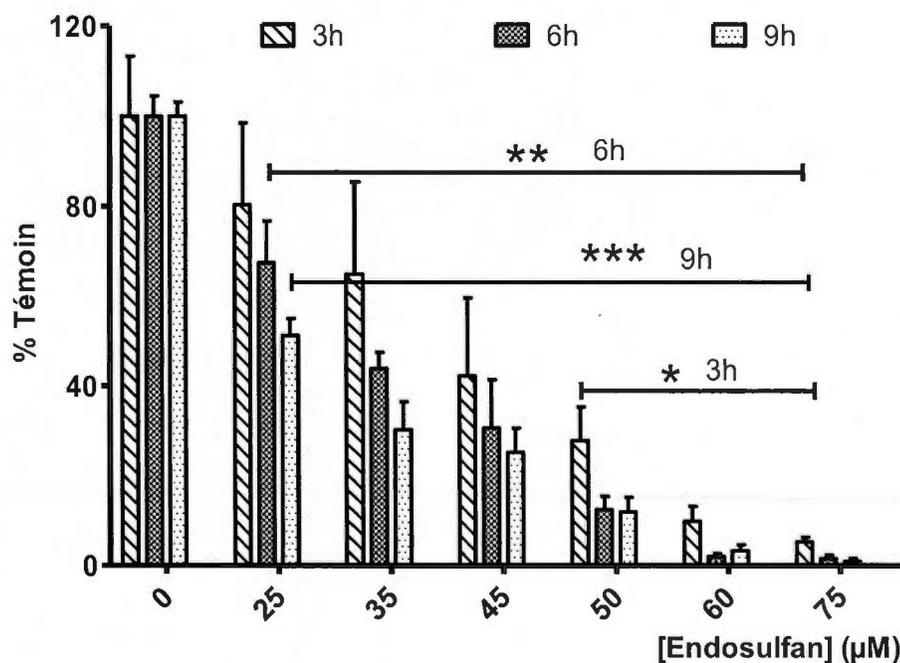


Figure 3.16 Analyse de la proportion de cellules avec un potentiel mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) adéquat versus dépolarisées. Les cellules MG-63 ont été exposées à des concentrations de 0 à 75 μM d'endosulfan pour une période de 3h, 6h ou 9h, puis marquées à l'aide de la sonde JC-1. Les résultats sont présentés en pourcentage du témoin (0 μM) de la proportion de cellules avec un potentiel mitochondrial adéquat versus dépolarisées. Les valeurs sont les moyennes \pm erreur moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes. Dunnett: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.2.2.4 Endosulfan et la protection obtenue avec des antioxydants

Comme la production de ROS n'a pu être démontrée, mais qu'il y avait des signes d'apoptose révélés par un marquage PI/Annexine V et une chute importante du potentiel mitochondrial après exposition à l'endosulfan, nous avons voulu vérifier si des antioxydants pouvaient avoir un effet protecteur.

Pour ce faire, les cellules MG-63 ont été soumises à un traitement à l'endosulfan à des concentrations allant de 0 à 75 μM auxquelles était ajoutée une concentration de

0,2mM d' α -tocophérol (vitamine E), de 0,2mM d'acide ascorbique (vitamine C), ou de 2mM de N-acétyl-cystéine (NAC).

L'ajout de 0,2mM de vitamine E a eu un effet protecteur sur la mortalité entraînée par un traitement à l'endosulfan (figure 3.17). En effet, aux concentrations de 50 μ M et 60 μ M du pesticide, la présence de vitamine E a diminué la mortalité d'environ 25%. Cette concentration de vitamine E n'a toutefois pas eu d'effet protecteur à la plus forte concentration du pesticide.

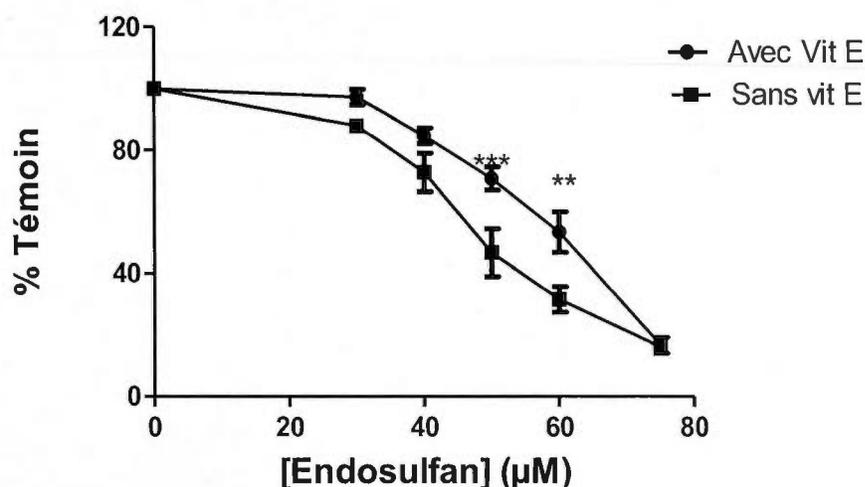


Figure 3.17 Effet protecteur de la vitamine E lors d'un traitement à l'endosulfan. Les cellules MG-63 ont été exposées à des concentrations de 0 à 75 μ M d'endosulfan pour une période de 24h en combinaison avec 0,2mM de vitamine E. À la fin du traitement, les cellules sont colorées au crystal violet pour analyse de la survie. Les résultats sont présentés en pourcentage du témoin sans endosulfan. Les valeurs sont les moyennes \pm erreur moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes. Bonferroni: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Le traitement avec 2mM NAC a diminué la mortalité causée par la présence d'endosulfan à la deuxième plus faible concentration du pesticide, soit 40 μ M, ainsi que pour les concentrations 50 μ M et 60 μ M (figure 3.18). Toutefois la concentration

de 2mM de NAC n'a cependant pas eu d'effet protecteur pour la concentration la plus élevée du pesticide.

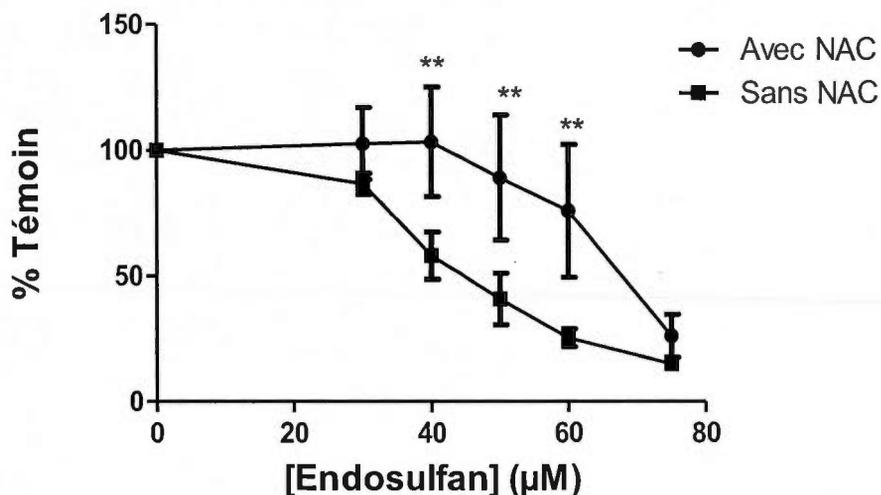


Figure 3.18 Effet protecteur de N-acétyl-cystéine (NAC) lors d'un traitement à l'endosulfan. Les cellules MG-63 ont été exposées à des concentrations de 0 à 75µM d'endosulfan pour une période de 24h en combinaison avec 2mM de NAC. À la fin du traitement, les cellules ont été colorées au crystal violet pour analyse de la survie. Les résultats sont présentés en pourcentage du témoin sans endosulfan. Les valeurs sont les moyennes \pm erreur moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes. Bonferroni: **p<0.01.

La présence de 0,2mM de vitamine C en combinaison avec différentes concentrations d'endosulfan a aussi eu un effet protecteur significatif aux concentrations intermédiaires du pesticide, soit 50 et 60µM (figure 3.19). Cette concentration d'antioxydant n'a toutefois pas été suffisante pour diminuer la mortalité entraînée par la plus forte concentration du pesticide.

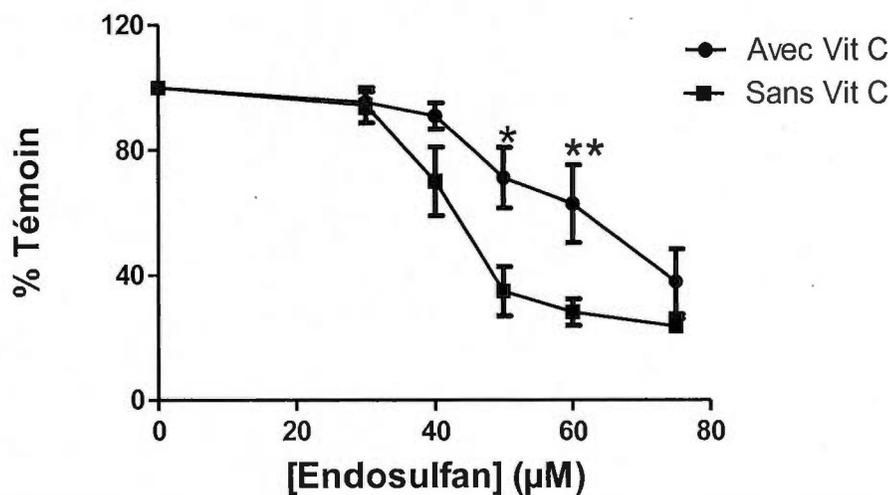


Figure 3.19 Effet protecteur de la vitamine C lors d'un traitement à l'endosulfan. Les cellules MG-63 ont été exposées à des concentrations de 0 à 75µM d'endosulfan pour une période de 24h en combinaison avec 0,2mM de vitamine C. À la fin du traitement, les cellules ont été colorées au crystal violet pour analyse de la survie. Les résultats sont présentés en pourcentage du témoin sans endosulfan. Les valeurs sont les moyennes \pm erreur moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes. Bonferroni: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

CHAPITRE IV : DISCUSSION

L'utilisation des terres à des fins agricoles entraîne la présence de nombreux contaminants dans les milieux naturels. Cette présence est lourde de conséquences pour la faune évoluant dans ces milieux. Notamment, de nombreuses anomalies ont été retrouvées chez le ouaouaron (*Rana catesbeiana*) évoluant dans des zones jugées polluées, dont des malformations des pattes postérieures, des désordres hormonaux et autres (Ouellet, Bonin *et al.*, 1997; Bérubé, Boily *et al.*, 2005). Comme des malformations du squelette ont pu être observées, l'hypothèse selon laquelle les contaminants agricoles puissent affecter le métabolisme osseux a été émise.

De ce fait, des ouaouarons provenant de six sites choisis selon un gradient d'activité agricole (faible, modérée, élevée) aux abords de la rivière Yamaska ont été capturés au début de l'été 2008. Les fémurs et phalanges des individus ont été disséqués, puis analysés à l'aide d'une technique d'imagerie. Les sérums ont aussi été analysés pour vérifier l'état de différents marqueurs du métabolisme osseux.

Les eaux aux six sites ont été analysées pour vérifier les concentrations en pesticides (voir l'annexe 1). Deux pesticides y ont été retrouvés en plus grande concentration : l'atrazine et le métolachlore. Ces deux pesticides ont été utilisés lors d'études *in vitro* pour vérifier leurs effets au niveau cellulaire lors de leur exposition à des cellules ostéoblastiques. N'ayant pas été en mesure de maintenir des cultures de cellules primaires d'ostéoblastes de ouaouaron, nous avons utilisé des lignées commerciales murine et humaine.

De plus, un autre pesticide non retrouvé aux sites de l'étude a été ciblé : l'endosulfan. Ce dernier fait actuellement l'objet d'un grand nombre de recherches, étant l'un des derniers pesticides organochlorés encore en utilisation. Les effets d'autres pesticides

de cette classe au niveau du métabolisme osseux ayant été démontrés, nous avons voulu vérifier l'action de l'endosulfan à ce niveau.

4.1 Influence de contaminants agricoles sur le métabolisme osseux du ouaouaron (*Rana catesbeiana*) évoluant aux abords de la rivière Yamaska

Très peu d'études ont été réalisées quant à l'influence de contaminants sur le métabolisme osseux des grenouilles (Lundberg, Jenssen *et al.*, 2007). Nous agissons donc à titre de précurseurs : c'est pourquoi la plupart des points de discussion ne pourront être vérifiés avec la littérature.

Afin de vérifier si la présence de contaminants agricoles pouvait influencer le métabolisme osseux du ouaouaron, nous avons d'abord voulu caractériser les populations retrouvées aux différents sites quant à leurs paramètres morphométriques. La figure 3.1 présente ces résultats. La longueur totale des grenouilles ainsi que la longueur museau-cloaque ne varie pas en fonction de l'intensité agricole. Le poids des individus est comparable entre les sites. La population du site référence Réservoir Choinière, soit un site où l'activité agricole est intermédiaire, apparaît significativement moins longue. Nous avons choisi le site Lac Boivin à titre de site référence. Bien que le site Deborah Stairs apparaisse adéquat, les analyses BV/TV présentées aux figures 8 à 10 ont semé le doute quant à sa validité à titre de site référence, la valeur de la portion corticale étant significativement plus haute et la population semblant moins homogène. Ainsi, ces paramètres tendent à indiquer que les groupes de ouaouarons échantillonnés aux différents sites, à l'exception du Réservoir Choinière, sont comparables, indiquant que la disponibilité des ressources et la croissance des individus doivent être sensiblement la même pour tous les sites.

Puisque l'âge des individus est généralement un paramètre important lors des études du métabolisme osseux chez les mammifères, nous souhaitons pouvoir le déterminer chez le ouaouaron afin de pouvoir mieux analyser les paramètres osseux à l'étude. Toutefois, l'âge estimé par le décompte du nombre de lignes d'arrêt de croissance

(LACs) s'avère significativement moins élevé au site intermédiaire Pot-au-Beurre et au site d'intensité agricole élevée Rivière Noire. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Spear, Boily *et al.* (2009), qui ont aussi pu démontrer que les grenouilles provenant du site de plus forte intensité agricole en 2004 étaient significativement plus jeunes. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces différences au niveau de l'âge des individus, et nos hypothèses rejoignent celles émises par les auteurs: fuite des individus les plus âgés ou mort des individus les plus âgés.

Nous avons voulu vérifier les liens entre le nombre de LACs et les différents paramètres morphométriques. Le tableau II montre les résultats des régressions linéaires. Il existe une relation positive et significative entre l'âge, estimé par le décompte des LACs, et la longueur totale et la longueur museau-cloaque des individus. Ceci suggère que les ouaouarons seraient en croissance constante tout au long de leur vie.

Le poids ne semble toutefois pas être relié à l'âge, ces deux paramètres ayant une corrélation significative seulement à la moitié des sites. Comme la longueur des individus varie en fonction de l'âge, nous nous serions attendus à observer une corrélation entre le poids et l'âge, une grenouille plus longue ayant de plus longs os, et donc potentiellement une plus grande masse.

Le site Réservoir Choinière apparaît différent des autres. Le nombre de LACs de ses individus n'est lié en rien aux paramètres morphométriques de ces derniers.

Il est à noter que la méthode d'estimation de l'âge peut causer un important biais lors de nos analyses. En effet, puisque l'os subit de la résorption, la première LAC a tendance à se résorber au fil du temps : après une seule période d'hibernation, elle peut être résorbée en partie, mais peut complètement disparaître après 3 ou 4 périodes d'hibernation (McCreary, Pearl *et al.*, 2008). De plus, des communications avec les auteurs de Spear, Boily *et al.* (2009) ont confirmé nos observations selon lesquelles l'âge du ouaouaron est complexe à mesurer. Ayant utilisé une méthode de coupe et de

coloration légèrement différente, nous arrivons toutefois aux mêmes conclusions : la qualité des coupes est inégale entre les sites, mais aussi à l'intérieur d'un même site. L'os est souvent déchiré, ou la coloration est inégale entre les coupes, étant tantôt très foncée et tantôt trop pâle. La phalange du ouaouaron est aussi caractérisée par un nombre important de lamelles qui peuvent facilement être confondues avec des LACs. Ces facteurs créent donc une grande imprécision au niveau de l'estimation de l'âge, l'âge pouvant être sous-estimé dans les cas où des LACs auraient été résorbées ou lorsque le tissu est mal déployé sur la lame, mais pouvant aussi être surestimé lorsque des lamelles sont prises pour des LACs. L'importance de la sous-estimation par rapport à la surestimation n'est pas simple à déterminer, ce qui ne permet pas de corriger le biais lors de l'estimation. Cela fait donc en sorte de remettre en question la validité de l'âge comme moyen de comparaison des autres paramètres entre les individus. Il aurait été intéressant de travailler avec des coupes de fémur en parallèle afin de valider les observations effectuées sur les coupes de phalange.

L'analyse du volume osseux (BV/TV) de la portion corticale du fémur (figure 3.4) a révélé une diminution significative du volume osseux des grenouilles provenant des sites d'activité agricole intermédiaire Réservoir Choinière et Pot-au-Beurre, ainsi qu'au site d'activité agricole élevée Rivière Noire, lorsque comparés au site Lac Boivin. Le volume osseux de la portion corticale de la phalange ne diffère pas entre les sites (figure 3.5), mis à part pour le site référence Deborah Stairs, raison pour laquelle nous avons décidé d'établir nos analyses statistiques en fonction du site Lac Boivin uniquement. Finalement, le volume de la portion trabéculaire de la phalange est significativement diminué au site Rivière Noire (figure 3.6), et il en va de même pour la valeur du site Réservoir Choinière.

Nous nous attendions à remarquer des différences au niveau du volume osseux en fonction du gradient d'exploitation agricole. En effet, des contaminants retrouvés sur

les lieux comme l'atrazine et le métolachlore sont perçus comme des inducteurs de l'activité aromatase (Hayes, Case *et al.*, 2006; Holloway, Anger *et al.*, 2008; Hayes, 2009), ce qui pourrait engendrer une augmentation de la formation osseuse. Aussi, l'étude de Bérubé, Boily *et al.* (2005) laissait supposer une perturbation de l'homéostasie des rétinoïdes, et une telle perturbation, que ce soit un surplus ou une diminution, pourrait affecter le métabolisme osseux, (Adams, Cohen *et al.*, 2007). La diminution du volume osseux observée au site le plus contaminé est probablement due à la présence et à l'interaction d'une foule de contaminants. De plus, tous les pesticides n'ont pas été mesurés aux sites d'études. En effet, les pesticides organochlorés, comme l'endosulfan et le DDT, n'ont pas été mesurés. Une étude menée par Lundberg *et al.* (2007) laissait supposer une diminution de la densité osseuse chez *Rana temporaria* après exposition au métabolite du DDT, le *p,p'*-DDE. La présence de ce métabolite dans l'environnement aquatique aurait donc pu diminuer le volume osseux chez *R. catesbeiana*.

Comme la portion trabéculaire de l'os est un site d'activité métabolique plus intense que la portion corticale, nous nous attendions à remarquer des différences principalement à ce niveau. Toutefois, nous avons aussi pu observer une variation dans le volume osseux de la portion corticale des fémurs.

Afin de vérifier si les effets observés au niveau de la diminution du volume osseux étaient attribuable à la gradation de contamination agricole, nous avons voulu normaliser nos résultats en fonction d'un paramètre morphométrique. Nous avons alors établi des corrélations entre le BV/TV et le nombre de LACs, la longueur museau-cloaque et la longueur totale des individus (tableau III). De telles corrélations se sont avérées non significatives dans la plupart des cas. Parfois, la relation entre le BV/TV et le paramètre morphométrique est positive, parfois elle est négative. Aucune réelle tendance n'a pu être tirée d'un tel exercice.

Or, comme le BV/TV ne semble pas en lien avec la longueur ni avec l'âge des individus, tenter de les regrouper en classes pour nos analyses n'apporterait pas d'informations supplémentaires. Lors du congrès du Chapitre St-Laurent en mai 2011, nous avons présenté une affiche en regroupant les individus en classes de longueur totale (ANNEXE 2), et nous remarquons ainsi des différences supplémentaires au niveau du volume osseux. Il s'avère que ce n'était probablement pas une bonne façon de faire.

Nous avons aussi effectué des analyses sériques de différents marqueurs du métabolisme osseux chez les ouaouarons provenant des six sites (figure 3.7). L'activité ALPase a augmenté en fonction de la contamination agricole. Le dosage de l'activité ALPase sérique est un dosage de l'activité de toutes ses isoformes (Magnusson, Larsson *et al.*, 1998), donc autant l'ALPase hépatique que celle de l'os. L'augmentation de l'activité ALPasique observée est donc peut-être attribuable à une atteinte hépatique.

Le fait que la concentration de calcium ne semble pas diminuer en fonction du gradient d'activité agricole indique que les fonctions rénales sont normales, et que le métabolisme de la vitamine D n'est pas altéré. Cependant, le rein possède une grande capacité de compensation, et il faudrait une grave atteinte rénale pour qu'elle soit reflétée au niveau sérique (Casarett, Doull *et al.* 2008).

Finalement, les concentrations de glucose et de phosphate ne sont pas modifiées par le gradient d'exploitation agricole, indiquant que le métabolisme général des individus n'est pas altéré.

4.2 Atrazine et métolachlore : évaluation de la cytotoxicité

Les résultats présentés à la figure 3.8 ont démontré qu'il n'y avait pas d'effet de l'atrazine (ATZ) aux concentrations utilisées sur la survie des cellules ostéoblastiques issues de la lignée MC3T3-E1, suite à un traitement de 48 heures.

La cytotoxicité de l'atrazine a été montrée chez quelques types cellulaires : une concentration de 10 μ M d'ATZ réduit significativement l'activité MTT des cellules de la lignée de fibroblastes humains DET 551 suite à un traitement de 48 heures (Manske, Beltz *et al.*, 2004), une CL₅₀ évaluée à 249 μ M pour les cellules intestinales Caco-2 après un traitement de 6 jours (Olejnik, Marecik *et al.*, 2010). Cependant, bien que l'ATZ soit cytotoxique pour quelques types cellulaires, la majorité des études menées n'a pas été en mesure de prouver le caractère cytotoxique de l'atrazine (Olejnik, Marecik *et al.*, 2010).

Nonobstant la potentielle cytotoxicité de l'ATZ, ce pesticide est reconnu pour avoir une activité oestrogénique, induisant l'activité de l'aromatase (cytochrome P19) (Hayes, Stuart *et al.* 2006; Hayes 2009). Comme l'os possède une activité aromatase, on peut s'imaginer que la présence d'ATZ dans le milieu de culture pourrait favoriser cette activité. Une plus grande concentration d'oestrogène et ainsi protéger les ostéoblastes de la potentielle toxicité du pesticide.

Le métolachlore ne s'est pas avéré cytotoxique sur les cellules MG-63 suite à un traitement de 24 heures à des concentrations allant de 0 à 100 μ M (figure 3.9). La cytotoxicité de ce pesticide a été évaluée chez d'autres lignées cellulaires, et la valeur de CL₅₀ obtenue était largement supérieure aux concentrations que nous avons utilisées. En effet, les cellules hépatiques HepG2 présentent une CL₅₀ de 815 μ M pour un traitement de 4 heures (Kale, Miranda *et al.*, 2008), et une CL₅₀ de 431 μ M pour un traitement de 24 heures (Dierickx, 1999).

4.3 Endosulfan : cytotoxicité et mécanisme d'action

La cytotoxicité de l'endosulfan a été évaluée sur les cellules ostéoblastiques de la lignée humaine MG-63 (Figure 3.10). Nos résultats indiquent que l'endosulfan est toxique pour les cellules ostéoblastiques humaines avec une CL_{50} de $42,4\mu\text{M}$. Les cellules MG-63 ont une sensibilité assez comparable à celle des cellules hépatiques de la lignée humaine HepG2 dont la CL_{50} a été déterminée à $49,37\mu\text{M}$, mais après une période de traitement de 48 heures. Ces deux types cellulaires sont deux fois plus sensibles que les cellules de la lignée HeLa ($86\mu\text{M}$) (Sohn, Kwon *et al.*, 2004).

Nous avons voulu étudier le mécanisme par lequel l'endosulfan entraîne la mort cellulaire, à savoir s'il s'agit plus d'apoptose ou de nécrose. En effet, l'endosulfan a été identifié comme un agent capable de déclencher l'apoptose chez certains types cellulaires comme les leucocytes et autres cellules immunitaires (Kannan, Holcombe *et al.*, 2000), mais est perçu comme un inhibiteur d'apoptose chez les kératinocytes, où il diminue les ratios des caspases 3 et 7 (Antherieu, Ledirac *et al.*, 2007).

La figure 3.11 démontre que l'endosulfan entraîne autant l'apoptose que la nécrose chez les cellules MG-63, mais dans des proportions difficilement mesurables. En effet, la distinction entre les nuages d'apoptose précoce, d'apoptose tardive et de nécrose n'est pas simple à effectuer, puisque les nuages chevauchent plusieurs quadrants. C'est pour cette raison que nous nous sommes d'abord intéressés à la proportion de cellules viables (figure 3.12). Nous pouvons par contre constater que la nécrose est plus importante au temps le plus court (3 heures) pour ensuite laisser s'installer l'apoptose (6 heures et 9 heures), ce qui est en accord avec la théorie voulant que l'apoptose soit le résultat d'une cascade d'événements (figure 3.13). L'apoptose augmente aussi en fonction de la concentration d'endosulfan.

La diminution de la viabilité est significative après seulement 3 heures de traitement à $75\mu\text{M}$ d'endosulfan, mais elle est apparente aux concentrations intermédiaires. Cette mortalité expliquée en partie par l'apoptose est en accord avec les résultats de Kannan

(2000). En effet, ce dernier a pu démontrer, à l'aide d'un marquage à l'annexine V-FITC, que l'endosulfan induisait fortement l'apoptose chez les cellules immunitaires de la lignée Jurkat-7. Après 12 heures de traitement, environ 71% des cellules exposées à 100 μ M d'endosulfan étaient apoptotiques. Toutefois, il aurait été intéressant de retrouver dans l'article de Kannan une valeur de CL_{50} de l'endosulfan sur les cellules Jurkat-7 afin de vérifier la signification d'un traitement à 100 μ M en termes de cytotoxicité.

Les cellules MG-63 affichent cependant une sensibilité plus grande que les Jurkat-7. En effet, bien que ce ne soit pas uniquement de l'apoptose, après 6 heures, la survie ne se chiffre qu'à 40%, donc environ 60% de cellules en processus d'apoptose ou de nécrose, pour un traitement à 75 μ M d'endosulfan. Après 9 heures de traitement à 75 μ M, cette valeur chute à environ 25% après 9 heures, soit 75% en voie de mortalité.

Une des voies principale de l'apoptose est la voie intrinsèque, où des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) sont produits et viennent affecter le potentiel mitochondrial ($\Delta\Psi_m$). Le déséquilibre du $\Delta\Psi_m$ mène à la libération du cytochrome C, qui à son tour active la caspase 9. Une cascade de caspases s'en suit pour finalement mener à l'apoptose (Kroemer, 1999).

Puisque des signes d'apoptose ont été démontrés, nous avons vérifié si l'endosulfan entraînait la production de ROS à l'aide de la sonde H2DCFDA. À la figure 3.14, nous pouvons constater l'absence de production de ROS. Les résultats présentés le sont pour un temps assez long, soit 6 heures, mais des résultats similaires ont été obtenus après seulement 30 minutes de traitement à l'endosulfan. Toutefois, la qualité du marquage des cellules avec la sonde et la réactivité de la sonde ont été confirmées en utilisant un traitement au peroxyde d'hydrogène. Ce traitement permet d'observer un déplacement vers la droite de la fluorescence, confirmant ainsi la validité de notre protocole pour la mesure de la production de ROS par l'endosulfan. Les résultats

obtenus suite au traitement à l'endosulfan laissent présager une augmentation de l'autofluorescence. Toutefois, l'analyse de ces cellules en frais de taille et de complexité indique que ce sont des cellules mortes. Cependant, nous croyons qu'il soit possible qu'il existe une sous-population mineure productrice de ROS, mais qu'elle ne soit pas perceptible à travers toute cette mortalité.

Ce résultat va à l'encontre des effets observés lors d'une étude menée par Antherieu, Ledirac *et al.* (2007) sur des kératinocytes humains issus de la lignée HaCaT, ses résultats indiquant une production de ROS durant les 48 heures suivant une exposition à 50 μ M d'endosulfan, aussi mesurée à l'aide de la sonde H₂DCFDA. Cependant, d'autres auteurs ont soutenus les effets oxydants de l'endosulfan par des mesures indirectes, comme par l'activité d'enzymes impliquées lors du stress oxydatifs (peroxydation des lipides, concentration de glutathion, activité de superoxyde dismutase et catalase) (Kannan et Jain, 2003; Pal, Ahmed *et al.*, 2009).

Puisque le $\Delta\Psi_m$ est perçu comme une des premières cibles de l'endosulfan, plus précisément comme un inhibiteur de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (Da Silva, Soares *et al.*, 1998) nous avons voulu vérifier si le potentiel mitochondrial des cellules MG-63 était affecté par la présence d'endosulfan. Généralement, une atteinte du $\Delta\Psi_m$ entraîne la production de ROS, ce qui provoque la libération du cytochrome C, et ultimement déclenche l'apoptose (Zamzami, Susin *et al.*, 1996).

Les figures 19 et 20 illustrent les effets de l'endosulfan sur le $\Delta\Psi_m$. L'encadrement des populations cellulaires est dicté par la condition FCCP, le témoin positif, et permet de valider l'efficacité de la technique. On constate que l'effet est prononcé et assez rapide : après 3 heures, 50 μ M d'endosulfan sont suffisants pour induire une dépolarisation mitochondriale significative. Nos résultats indiquent que l'endosulfan induit une perturbation du potentiel mitochondrial et que l'amplitude de la perturbation dépend de la concentration et du temps d'incubation. Ces résultats sont similaires aux résultats de l'étude menée sur les cellules de la lignée Jurkat-7, où

l'effet de 50 μ M d'endosulfan était aussi perceptible après 3 heures de traitement, effet démontré par un marquage à la sonde DiOC₆(3). Environ 25% des cellules Jurkat-7 traitées à 50 μ M d'endosulfan durant 3 heures affichaient un potentiel altéré (Kannan, Holcombe *et al.*, 2000), ce qui est inférieur aux résultats observés avec les cellules MG-63. En effet, pour les mêmes conditions de traitement, nos résultats indiquent que seulement 25% des cellules présentent un potentiel similaire aux cellules de la condition témoin, soit qu'environ 75% des cellules ont un potentiel mitochondrial perturbé.

Comme nous avons été capables de démontrer que l'endosulfan puisse entraîner l'apoptose, et que son action sur la mitochondrie est forte et rapide, nous nous attendions à ce qu'il y ait eu production de ROS. Cependant, comme nous n'avons pas été en mesure de la mettre en évidence par un marquage H₂DCFDA, nous avons voulu vérifier cette potentielle présence de ROS par des traitements à l'endosulfan conjugué à des antioxydants.

L'ajout de 0,2mM de vitamine E (figure 3.17) diminue la mortalité de 24 et 21% respectivement aux concentrations de 50 μ M et 60 μ M d'endosulfan. La vitamine E, ou α -tocophérol, est reconnue pour son pouvoir antioxydant. Il agit comme « éboueur » de radicaux peroxy, le groupe hydroxyl du tocophérol réagissant avec eux pour former un lipide hydroperoxide et un radical tocophéryl qui sera bientôt réduit à son état initial (Traber et Stevens, 2011).

L'effet protecteur de 0,1mM et 0,2mM de vitamine E vis-à-vis de l'endosulfan a été démontré *in vitro* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La plus faible concentration de vitamine E utilisée a été suffisante pour réduire fortement l'inhibition de croissance entraînée par 100 μ M d'endosulfan chez la levure (Sohn, Kwon *et al.*, 2004). Cet effet protecteur semble lié à l'effet antioxydant de la vitamine E, puisque Sohn, Kwon *et al.*, (2004) ont aussi démontré que l'ajout de vitamine E

puisse significativement lever l'effet inhibiteur de l'endosulfan sur la respiration cellulaire.

Une étude *in vivo* exercée chez le rat a aussi démontré que la présence de α -tocophérol en combinaison avec la présence d'acide ascorbique réduisait l'effet de l'endosulfan sur différents marqueurs de stress oxydatif (peroxydation des lipides, concentration de glutathion, activité de superoxyde dismutase et catalase) (Pal, Ahmed *et al.*, 2009).

L'effet de 2mM de NAC a aussi été évalué en présence de différentes concentrations d'endosulfan (figure 3.18). Le NAC protège la cellule de bien des façons, puisqu'il est source de thiols et précurseur de glutathion. Il agit aussi comme éboueur de ROS en interagissant avec les peroxydes et radicaux $\text{OH}\cdot$ (Zafarullah, Li *et al.*, 2003). Nos résultats ont démontré que 2mM de NAC diminue la mortalité des cellules MG63 en présence de 50 μM et 60 μM d'endosulfan, pour une période de 24 heures. Une étude menée par (Ahmed, Tripathi *et al.*, 2008) sur des cellules sanguines mononucléaires périphériques humaines a démontré une augmentation de la survie cellulaire après coexposition à des concentrations allant de 10 μM à 100 μM d'endosulfan et à seulement 20 μM de NAC. De même, Antherieu, Ledirac *et al.* (2007) a montré qu'une concentration de 10mM de NAC diminuait l'inhibition de prolifération causée par des concentrations d'endosulfan entre 10 μM et 50 μM chez les cellules issues de la lignée de kératinocytes humaine HaCat. Aussi, la production de ROS a été engendrée suite à un traitement à 25 μM d'endosulfan pour 24heures, et la coexposition à 10mM de NAC a bloqué cet effet (Ledirac, Antherieu *et al.*, 2005).

Nous avons utilisé un troisième agent antioxydant, soit la vitamine C ou acide ascorbique, afin de vérifier si les effets néfastes de l'endosulfan n'étaient pas attribuables à sa capacité d'engendrer la production de ROS. La vitamine C exerce son pouvoir antioxydant en agissant premièrement comme éboueur de ROS, mais

aussi en ayant le potentiel de réduire les radicaux hydroperoxydes des lipides à travers le cycle de la vitamine E (Traber et Stevens, 2011).

L'ajout de 0,2mM de vitamine C a permis de réduire la mortalité d'environ 35% aux concentrations de 50 μ M et 60 μ M d'endosulfan (figure 3.19). Une étude réalisée avec des levures *S. cerevisiae* coexposées à l'endosulfan et à la vitamine C est arrivée à une conclusion différente. En effet, même avec l'ajout de 0,4mM d'acide ascorbique, une concentration de 100 μ M d'endosulfan était suffisante pour inhiber fortement la croissance de la levure (Sohn, Kwon *et al.*, 2004). La vitamine C a toutefois agi à titre d'agent protecteur lors d'études *in vivo* chez le rat, où il a été démontré qu'elle réduisait la peroxydation des lipides au cerveau (Zervos, Nikolaidis *et al.*, 2011) en plus de diminuer la présence de marqueurs de stress oxydatifs lorsqu'utilisée en combinaison avec la vitamine E (Pal, Ahmed *et al.*, 2009).

Puisque les trois agents antioxydants utilisés ont eu un effet protecteur contre l'action de l'endosulfan sur les cellules ostéoblastiques MG-63, tout porte à croire que l'endosulfan puisse exercer son action via la production de ROS. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de mettre cette production de ROS en évidence par le marquage à la sonde H2DCFDA. L'étude de Antherieu, Ledirac *et al.* (2007) sur les cellules HaCat avait montré une production maximale de ROS après 30 minutes de traitement à 50 μ M d'endosulfan. Bien que nous ayons fait un traitement aussi court, le temps de manipulations ultérieur dû au fait que les cellules MG-63 soient adhérentes et qu'il faille les resuspendre avant de procéder au marquage nous a peut-être empêché de voir la production de ROS.

Il faut aussi noter que bien que les agents antioxydants utilisés aient diminué la mortalité des cellules exposées à l'endosulfan, la protection assurée n'était pas complète. Ceci suggère que les antioxydants ont peut-être protégé les cellules de l'apoptose, mais n'ont pas permis d'empêcher la mort par nécrose.

CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'exploitation des terres à des fins agricoles entraîne la présence de nombreux contaminants dans les milieux naturels, ce qui peut nuire à la faune présente. Nos résultats ont indiqué que l'activité sérique de la phosphatase alcaline était augmentée en fonction du gradient d'exploitation agricole, suggérant probablement une atteinte hépatique, ce qui serait en accord avec l'hépatotoxicité reconnue pour plusieurs contaminants.

Notre étude a aussi permis de démontrer que le volume osseux de la portion trabéculaire de la phalange ainsi que de la portion corticale du fémur des ouaouarons provenant du site de plus forte activité agricole était significativement plus faible qu'au site de référence. Toutefois, nous avons relevé que l'âge des grenouilles provenant du site le plus contaminé était aussi plus bas par rapport au site référence. Chez les mammifères, le volume osseux s'accroît rapidement après la naissance, atteignant un maximum peu après la puberté. Par la suite, le volume osseux décroît graduellement avec l'âge. Si le même profil osseux s'observe chez la grenouille, les ouaouarons des sites Rivière Noire et Pot-au-beurre étant moins âgés auraient dû présenter des volumes osseux supérieurs à ceux des individus des sites de référence, ce qui n'est pas le cas. Ainsi, il est possible que les différences observées au niveau des volumes osseux soient plus importantes que les valeurs que nous avons obtenues. Afin de déterminer le profil osseux du ouaouaron avec l'âge, nous avons tenté d'établir des corrélations. Nous n'avons cependant pas été en mesure d'établir de liens entre le volume osseux et l'âge des individus, ce qui aurait permis de normaliser nos résultats par rapport à un paramètre inhérent à l'espèce, limitant ainsi l'effet de population. La méthode d'estimation de l'âge par squelettochronologie a toutefois

certaines limites, et peut causer un biais dans l'analyse de nos résultats. Il aurait été intéressant d'avoir un plus grand effectif à chacun des sites afin de rendre les analyses statistiques plus robustes. Aussi, étant donné que le présent projet s'inscrit dans le cadre du « Projet ouaouarons » qui est en branle depuis 2004, élargir la recherche sur quelques années permettrait de mieux comprendre l'état de la situation.

Sachant que les individus évoluant en milieux agricoles sont exposés à une soupe de contaminants variés, et que ces contaminants peuvent interagir les uns entre les autres, nous avons voulu étudier *in vitro* l'impact des contaminants les plus retrouvés au niveau cellulaire. N'ayant pas été en mesure d'établir une culture primaire d'ostéoblastes de ouaouaron, et puisqu'il n'existe pas de lignées commerciales d'ostéoblastes de grenouille, nous avons utilisé la lignée ostéoblastique murine MC3T3-E1 et la lignée ostéoblastique humaine MG-63.

Nos traitements *in vitro* ont démontré que l'atrazine n'était pas cytotoxique pour les cellules MC3T3-E1 pour le temps et les concentrations utilisées. Cependant, comme l'atrazine a été reconnu comme cytotoxique que dans peu d'études, et que c'est principalement son pouvoir d'induction de l'activité aromatasase qui lui vaut autant d'attention, il aurait été intéressant de vérifier l'activité de cette enzyme suite au traitement. Nous aurions aussi pu vérifier l'induction de la synthèse du CYP19 par RT-PCR.

Les effets de l'endosulfan, un pesticide organochloré faisant l'objet d'études afin d'être classé à titre de pesticide organique persistant, ont été étudiés. Les cellules de la lignée ostéoblastique MG-63 ont été traitées, et la CL_{50} a été chiffrée à $42,4\mu\text{M}$. Nous avons par la suite documenté le mécanisme par lequel l'endosulfan exerce sa toxicité. Il apparaît que ce pesticide induit l'apoptose et la nécrose, et nos résultats indiquent aussi que le potentiel mitochondrial subit une dépolarisation forte et rapide après exposition à l'endosulfan. Ayant mis en évidence l'apoptose comme mécanisme

de mortalité, apoptose qui pourrait être déclenchée suite à la dépolariation mitochondriale, nous avons évalué la potentielle production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Nous n'avons cependant pas été en mesure de démontrer la production de ROS par analyses au cytofluoromètre, mais nous avons démontré que l'utilisation de trois antioxydants différents, soit l'acide ascorbique (vitamine C), l' α -tocophérol (vitamine E) et le N-acétyl-cystéine (NAC), diminuaient la mortalité. Ces derniers résultats renforcent l'idée que l'endosulfan puisse causer la mort des ostéoblastes en engendrant préalablement la production de ROS.

À la lumière de ces résultats, nous croyons pouvoir maintenir l'hypothèse de départ suggérant que la présence de contaminants agricoles influence le métabolisme osseux du ouaouaron. Cependant, il nous a été difficile de statuer, puisque nous n'avons pu normaliser nos résultats par rapport à un paramètre propre à l'espèce, comme l'âge. De plus, le fait que nos trois sites de faible activité agricole ne soient pas toujours comparable soulève quelques questions quant à la classification des sites.

Par contre, il est indéniable que l'endosulfan ait un impact sur la survie des cellules ostéoblastiques, et nous croyons que sa capacité à engendrer la production de ROS serait à la base de son mécanisme de toxicité.

Le métabolisme osseux est très peu considéré dans les études écotoxicologiques. Or, cette étude a su démontrer que la présence de contaminants agricoles dans l'environnement pouvait affecter ce métabolisme. Cet aspect devrait donc être considéré lors de futures études toxicologiques en milieux agricoles, autant sur des espèces d'amphibiens, de petits mammifères et d'oiseaux, ces derniers pouvant tous être exposés à une batterie de contaminants agricoles.

ANNEXE A

**CONCENTRATION ($\mu\text{g/L}$) DES PESTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS
DANS LES SITES ÉCHANTILLONNÉS LE 7 JUILLET 2008**

Sites →	Deborah Stairs	Lac Boivin	Réservoir Choinière	Rivière Pot-au- Beurre	Yamaska (Farnham)	Rivière Noire
Pesticides						
Clopyralide	0,03	0,03	0,03	ND	0,03	0,03
Dicamba	0,03	0,03	0,03	ND	0,05	0,04
Mécoprop	0,01	0,01	0,01	ND	0,01	0,01
MCPA	0,01	0,01	0,01	ND	0,01	0,05
Dichlorprop	0,03	0,03	0,03	ND	0,03	0,03
2,4-D	0,02	0,02	0,02	ND	0,02	0,02
Bromoxynil	0,02	0,02	0,02	ND	0,02	0,02
Triclopyr	0,02	0,02	0,02	ND	0,02	0,02
Fénoprop (Silvex)	0,01	0,01	0,01	ND	0,01	0,01
MCPB	0,01	0,01	0,01	ND	0,01	0,01
2,4,5-T	0,01	0,01	0,01	ND	0,01	0,01
2,4-DB	0,02	0,02	0,02	ND	0,02	0,02
Bentazone	0,04	0,04	0,04	ND	0,04	0,09
Piclorame	0,02	0,02	0,02	ND	0,02	0,02

Myclobutanil	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Azinphos-méthyl	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Phosalone	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Diméthénamide	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Méthidathion	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
1-naphtol	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Bendiocarbe	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Glyphosate	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,22
AMPA	0,20	0,20	0,20	0,20	1,4	0,20

■ Faible intensité agricole

■ Intensité agricole intermédiaire

■ Forte intensité agricole

Les chiffres en noir représentent la limite de détection de la méthode, Les chiffres en gras indiquent une mesure qui dépasse cette limite. ND : non détectable.

ANNEXE B

AFFICHE PRÉSENTÉE DANS LE CADRE DU COLLOQUE DU CHAPITRE ST-LAURENT, MAI 2011

IMPACT DE CONTAMINANTS AGRICOLES SUR LE MÉTABOLISME OSSEUX DU OUAOUARON (RANA CATESBEIANA)

ARSENEAU V.*, BOILY M., SPEAR P., MOREAU R*.

*Laboratoire du métabolisme osseux, Centre de recherche TOXEN, Département des sciences biologiques, UQAM



INTRODUCTION

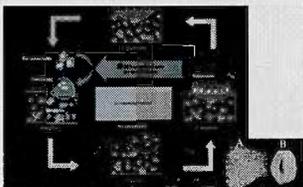


Figure 1. Le remodelage osseux. Figure 2. Os trabéculaire (A) et cortical (B).

Les animaux vivant en milieu agricole sont exposés à une batterie de contaminants qui peuvent avoir de nombreuses conséquences sur la santé et le développement de ceux-ci. Parmi ces animaux, le ouaouaron (Rana catesbeiana) est perçu comme une espèce sentinelle en raison de ses caractéristiques de vie (longité, cycle de vie entièrement aquatique, espérance de vie élevée). Des individus présentant des différences au niveau des parties squelette (pharyngées, laryngées) sont observés. Comme la croissance et le métabolisme osseux du ouaouaron peuvent être affectés par la présence de contaminants à des sites.

Ce processus est complexe et dynamique qui assure le remodelage osseux (figure 1). Ce processus est divisé en six phases et est assuré par deux types cellulaires, l'ostéoclaste étant responsable de la formation de foyers et l'ostéoblaste assurant sa réparation. L'activité osseuse est donc divisée en deux activités : la résorption et la formation. La formation osseuse est assurée par deux facteurs hormonaux, il est suspecté que des contaminants puissent interférer et ainsi altérer ces facteurs.

Il existe deux types d'os, soit l'os cortical et l'os trabéculaire (figure 2). L'os cortical est majoritairement réparti dans le corps des animaux, est dense et compact et présente un faible taux de remodelage. Pour sa part, l'os trabéculaire est majoritairement réparti aux extrémités des os longs et dans les vertèbres, est moins dense et plus élastique, et présente un taux de remodelage élevé.

Des indices sur l'activité métabolique et le métabolisme énergétique des granulocytes peuvent être déterminés en dosant les ions calcium et phosphore, ainsi que le glucose des échantillons sériques.

HYPOTHÈSES

La croissance et le métabolisme osseux du ouaouaron seront affectés par la présence de contaminants provenant de l'activité agricole, et les effets seront perceptibles au niveau de la portion trabéculaire de l'os et des paramètres sériques.

OBJECTIFS

- Vérifier l'architecture générale des phalanges d'individus provenant de milieux différents ou de ce qui est traité à l'activité agricole.
- Vérifier les concentrations des paramètres sériques révélant de potentiels altérations au métabolisme osseux.

ÉCHANTILLONNAGE ET ANALYSES

Les granulocytes ont été capturés à l'été 2008 dans six sites répartis en fonction de la région (Yamoussoukro, Abidjan, Bouaké, Koudougou, Gagnoa, Sassandra, Daloa). Les paramètres morphométriques des individus ont été mesurés et une prise de sang a été effectuée. Les échantillons cytochimiques de sang et la présence de plus de 50 pesticides différents ont aussi été analysés. Des analyses sériques ont été effectuées grâce à des kits colorimétriques pour la phosphatase alcaline (ALPase), le calcium, le phosphore et le glucose (BioMérieux/Systèmes).

Les phalanges étant des os comportant une portion trabéculaire et une portion corticale ont été sectionnés et fixés dans une solution de paraformaldéhyde (4%). Elles ont ensuite été analysées par une technique d'imagerie basée à l'aide du microscopie SynGene 1172. Les os ont été numérisés à 700V avec un filtre 0.5 mm Al, une résolution de 15 µm, une rotation de 150° avec un mouvement de rotation de 0.2°. Les images brutes sont reconstruites avec le logiciel Nikon, et sont analysées avec le logiciel CIVI (SynGene, Arturimex, Belgique). Le volume osseux (BVTV) est ainsi calculé.



Figure 3. Carte de la région Yamoussoukro.

RÉSULTATS

Tableau 1. Concentration des pesticides totalisés retrouvés aux sites (µg/l) en 7 juillet 2008.

	Abidjan	Bouaké	Daloa	Gagnoa	Koudougou	Yamoussoukro
Alcaloïde	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63
Atrazine	0.00	0.02	0.15	0.37	0.18	0.81
Méthaldéride	0.01	0.02	0.04	0.19	0.05	0.11

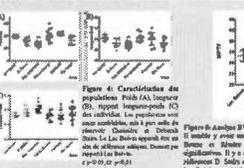


Figure 4. Caractéristiques de la population (A) (rapport BVTV) et (B) (rapport sérique) des individus. Les populations sont représentées par les lettres A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z.



Figure 5. Analyse BVTV de la portion trabéculaire des phalanges. (A) Pour tous les individus. (B) Rapport de BVTV par la longueur. (C) Pour les individus à une longueur < 50 mm. (D) Pour les individus à une longueur > 50 mm.

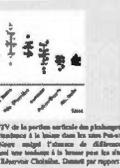


Figure 6. Analyse BVTV de la portion corticale des phalanges. (A) Pour tous les individus. (B) Rapport de BVTV par la longueur. (C) Pour les individus à une longueur < 50 mm. (D) Pour les individus à une longueur > 50 mm.

RÉSULTATS

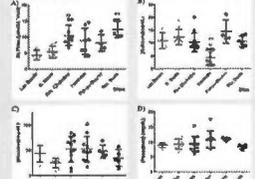


Figure 7. Dosages sériques des marqueurs du métabolisme osseux. (A) Activité de la phosphatase alcaline (ALPase), (B) Niveau de calcium, (C) Niveau de phosphore, (D) Niveau de glucose. L'analyse ALPase a été réalisée à l'aide de kits de l'entreprise de l'industrie agricole. Les dosages des paramètres sériques (calcium, phosphore et glucose) ont été réalisés par chimie.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La partie corticale des phalanges des ouaouarons provenant du site le plus contaminé possédait un volume osseux qui tend à être réduit par rapport aux individus provenant de sites où l'activité agricole est plus faible. La portion trabéculaire a aussi un volume osseux réduit par la présence de contaminants au site et faisait semble être plus prononcé pour les individus de petite taille.

Une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline sérique a pu être observée. L'activité mesurée pourrait correspondre à l'activité osseuse qu'à l'activité hépatique, nous croyons que nos observations sont davantage le reflet d'une activité hépatique.

En perspective, dans le but de mieux comprendre les effets observés sur la structure de l'os, il est primordial d'arriver à mieux caractériser nos populations. À cet effet, il faudrait identifier des sites de référence, où l'impact de l'activité agricole sur le métabolisme osseux, aussi, il pourrait être intéressant de tester des cellules osseuses de ouaouaron in vitro avec les principaux contaminants retrouvés aux sites afin de documenter le mécanisme à la base des effets observés.

RÉFÉRENCES

BAUDOUIN, D. & L. LAFONTAINE. 2009. "The Toxicology of Amphibians and Reptiles." *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 1-10.
 LAFONTAINE, D. & L. LAFONTAINE. 2009. "The Toxicology of Amphibians and Reptiles." *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 1-10.
 LAFONTAINE, D. & L. LAFONTAINE. 2009. "The Toxicology of Amphibians and Reptiles." *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 1-10.

ANNEXE C

AFFICHE PRÉSENTÉE DANS LE CADRE DU CONGRÈS DU BIOMED,
AVRIL 2011



INFLUENCE DE L'ENDOSULFAN SUR LA SURVIE D'UNE LIGNÉE OSTÉOBLASTIQUE (MG63)

ARSENEAU V., SPEAR P., MOREAU R.

*Laboratoire du métabolisme osseux, Centre BioMed, Département des sciences biologiques, UQAM.

INTRODUCTION

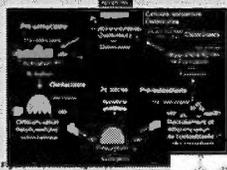


Figure 1. Endosulfan.

L'os est une structure complexe et dynamique qui subit un remodelage constant (Figure 1). Ce processus débute en six phases et débute par deux types cellulaires, l'ostéoblaste étant responsable de la formation de l'os et l'ostéoclaste exerçant sa résorption. L'équilibre établi entre ces deux activités permet le maintien de la calcémie et de l'intégrité du squelette, et son déséquilibre peut mener à des anomalies osseuses. L'endosulfan (Figure 2) est un pesticide organochlore largement répandu mondialement qui à l'instar des autres pesticides de cette classe, est persistant dans l'environnement^{1,2}. Sa toxicité a été étudiée sur plusieurs types cellulaires, et il se voit perçu comme un agent capable d'augmenter la production de cytokines osseux de l'ostéoblaste (OPG)^{3,4} et a été démontré que certains pesticides organochlores induisaient une altération du métabolisme osseux chez plusieurs espèces animales^{5,6}.

HYPOTHÈSES

L'endosulfan entraînera une mortalité des cellules issues d'une lignée ostéoblastique et cette mortalité serait due à la production de ROS.

OBJECTIFS

- Vérifier les effets de l'endosulfan sur la survie des ostéoblastes en utilisant un modèle cellulaire bien caractérisé.
- Déterminer si la production de ROS par l'endosulfan est à la base de son mécanisme de toxicité.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Expérience 1 : On a cultivé des cellules MG63 dans des plaques de 24 puits dans du milieu DMEM/F12 contenant 10% de serum fetal bovine (FBS) jusqu'à confluence de 80%. Les cellules ont ensuite été lavées avec du sérum défibriné et incubées pendant 24 heures. À la fin du traitement, le contenu est retiré et les cellules analysées dans une solution de crystal violet afin de compter l'ADN.

Expérience 2 : Les cellules MG63 sont cultivées dans des plaques de 24 puits dans du milieu DMEM/F12 à 10% FBS jusqu'à confluence de 80%. Le milieu de culture est alors remplacé par du milieu contenant différentes concentrations d'endosulfan. Après le passage de 48 heures (24, 48 ou 96 h), le milieu est retiré et les cellules analysées avec un réactif à base d'antibiotique (DAPI) de manière post-traitement à l'aide d'une sonde spécifique.

RÉSULTATS

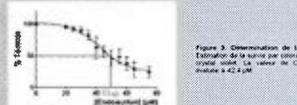


Figure 3. Détermination de la CC₅₀ (Concentration de la survie par incubation au cristal violet). La valeur de CC₅₀ est égale à 42,4 µM.

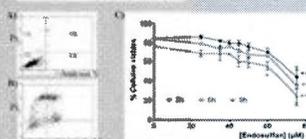


Figure 4. Analyse de l'effet de l'endosulfan sur la production de ROS. Les cellules ont été incubées à l'aide des milieux de culture en présence de 0 µM Endosulfan (●), 10 µM Endosulfan (○), 20 µM Endosulfan (□). Les cellules ont été analysées avec un réactif à base d'antibiotique (DAPI) de manière post-traitement à l'aide d'une sonde spécifique.

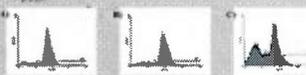


Figure 5. Analyse de la production de ROS. Les cellules ont été incubées à l'aide des milieux de culture en présence de 0 µM Endosulfan (●), 10 µM Endosulfan (○), 20 µM Endosulfan (□). Les cellules ont été analysées avec un réactif à base d'antibiotique (DAPI) de manière post-traitement à l'aide d'une sonde spécifique.

RÉSULTATS

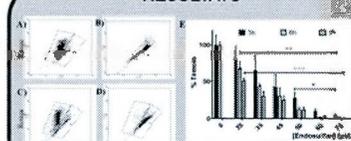


Figure 6. Analyse de déclin du potentiel membranaire (Δψ_m). Les cellules ont été incubées à l'aide du milieu de culture en présence de 0 µM Endosulfan (A), 10 µM Endosulfan (B), 20 µM Endosulfan (C), 40 µM Endosulfan (D). Les cellules ont été analysées avec un réactif à base d'antibiotique (DAPI) de manière post-traitement à l'aide d'une sonde spécifique.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'endosulfan entraîne la mort des ostéoblastes en fonction de la concentration et du temps d'exposition. Des signes de mort cellulaire ont été observés, mais les propriétés dans lesquelles les deux mécanismes agissent restent à déterminer. L'endosulfan perturbe peut-être la production de ROS, mais la mort cellulaire pourrait être due à un effondrement du potentiel membranaire. Le déclenchement de la voie intrinsèque de l'apoptose par endosulfan est suspect.

En perspective, afin de comprendre les mécanismes d'action de l'endosulfan, l'activité des cytokines 1 et 2 pourra être étudiée par Western blot. La détection de cytochrome c pourra aussi être déterminée. L'emploi d'un inhibiteur spécifique des caspases permettra de mieux comprendre par quelle voie l'endosulfan entraîne l'apoptose.

RÉFÉRENCES

1. BIRNBAUM, L. S. et al. 1997. Endosulfan: a persistent and toxic organochlorine pesticide. *Environmental Health Perspectives* 105: 117-121.

2. BIRNBAUM, L. S. et al. 2002. Toxicity of endosulfan to the developing rat brain. *Environmental Health Perspectives* 110: 117-121.

3. BIRNBAUM, L. S. et al. 2003. Endosulfan-induced osteoporosis in the rat. *Environmental Health Perspectives* 111: 117-121.

4. BIRNBAUM, L. S. et al. 2004. Endosulfan-induced osteoporosis in the rat. *Environmental Health Perspectives* 112: 117-121.

5. BIRNBAUM, L. S. et al. 2005. Endosulfan-induced osteoporosis in the rat. *Environmental Health Perspectives* 113: 117-121.

6. BIRNBAUM, L. S. et al. 2006. Endosulfan-induced osteoporosis in the rat. *Environmental Health Perspectives* 114: 117-121.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS, S. L., A. J. COHEN, *et al.* (2007). "Integration of Signaling Pathways Regulating Chondrocyte Differentiation During Endochondral Bone Formation." *Journal of Cellular Physiology* **213**(3): 635-641.
- AHMED, T., A. K. TRIPATHI, *et al.* (2008). "Endosulfan-Induced Apoptosis and Glutathione Depletion in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Attenuation by N-Acetylcysteine." *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **22**(5): 299-304.
- ANTHERIEU, S., N. LEDIRAC, *et al.* (2007). "Endosulfan Decreases Cell Growth and Apoptosis in Human Hacat Keratinocytes: Partial Ros-Dependent Erk1/2 Mechanism." *Journal of Cellular Physiology* **213**(1): 177-186.
- BEEBEE, T. J. C. *et al.* A. GRIFFITHS (2005). "The Amphibian Decline Crisis: A Watershed for Conservation Biology?" *Biological Conservation* **125**(3): 271-285.
- BÉRUBÉ, V. E., M. H. BOILY, *et al.* (2005). "Plasma Retinoid Profile in Bullfrogs, *Rana Catesbeiana*, in Relation to Agricultural Intensity of Sub-Watersheds in the Yamaska River Drainage Basin, Québec, Canada." *Aquatic Toxicology* **71**(2): 109-120.
- BLAUSTEIN, A. R. (1994). "Chicken Little or Nero's Fiddle? A Perspective on Declining Amphibian Populations." *Herpetologica* **50**(1): 85-97.
- CARR, J. A., A. GENTLES, *et al.* (2003). "Response of Larval *Xenopus Laevis* to Atrazine: Assessment of Growth, Metamorphosis, and Gonadal and Laryngeal Morphology." *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**(2): 396-405.
- CASARETT, L. J., J. DOULL, *et al.* (2008). *Casarett and Doull's Toxicology : The Basic Science of Poisons*. New York, McGraw-Hill.
- COADY, K. K., M. B. MURPHY, *et al.* (2004). "Effects of Atrazine on Metamorphosis, Growth, and Gonadal Development in the Green Frog (*Rana clamitans*)." *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues* **67**(12): 941 - 957.
- COXON, K. M., J. DUGGAN, *et al.* (2011). Purification of Annexin V and Its Use in the Detection of Apoptotic Cells #. *T Cancer Cell Culture*. **731**: 293-308.
- CROSS, P. C., R. MERCER, *et al.* (1995). *Ultrastructure Cellulaire Et Tissulaire: Approche Fonctionnelle*, Bruxelles, De Boeck.
- DA SILVA, E. M., A. M. V. M. SOARES, *et al.* (1998). "The Use of the Mitochondrial Transmembrane Electric Potential as an Effective Biosensor in Ecotoxicological Research." *Chemosphere* **36**(10): 2375-2390.

- DAVIDSON, C. (2004). "Declining Downwind: Amphibian Population Declines in California and Historical Pesticide Use." *Ecological Applications* **14**(6): 1892-1902.
- DEARFIELD, K. L., N. E. MCCARROLL, *et al.* (1999). "A Survey of Epa/Opp and Open Literature on Selected Pesticide Chemicals: II. Mutagenicity and Carcinogenicity of Selected Chloroacetanilides and Related Compounds." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **443**(1-2): 183-221.
- DIERICKX, P. J. (1999). "Glutathione-Dependent Cytotoxicity of the Chloroacetanilide Herbicides Alachlor, Metolachlor, and Propachlor in Rat and Human Hepatoma-Derived Cultured Cells." *Cell Biology and Toxicology* **15**(5): 325-332.
- DRZEWICZ, P., P. GEHRINGER, *et al.* (2005). "Radiolytic Degradation of the Herbicide Dicamba for Environmental Protection." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **48**(3): 311-322.
- DU PREEZ, L. H., N. KUNENE, *et al.* (2008). "Reproduction, Larval Growth, and Reproductive Development in African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*) Exposed to Atrazine." *Chemosphere* **71**(3): 546-552.
- ELDRIDGE, J. C., J. T. STEVENS, *et al.* (2009). Atrazine Interaction with Estrogen Expression Systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 196*: 1-14.
- ERUSLANOV, E. et S. KUSMARTSEV (2010). "Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry." *Methods Mol Biol* **594**: 57-72.
- FELISBINO, S. et H. CARVALHO (2001). "Growth Cartilage Calcification and Formation of Bone Trabeculae Are Late and Dissociated Events in the Endochondral Ossification of *Rana catesbeiana*." *Cell and Tissue Research* **306**(2): 319-323.
- GARG, U. K., A. K. PAL, *et al.* (2004). "Pathophysiological Effects of Chronic Toxicity with Synthetic Pyrethroid, Organophosphate and Chlorinated Pesticides on Bone Health of Broiler Chicks." *Toxicol Pathol* **32**(3): 364-369.
- GIDDINGS, J. M. (2005). Atrazine in North American Surface Waters: A Probabilistic Aquatic Ecological Risk Assessment, SETAC.
- HADJIDAKIS, D. J. et I. I. ANDROULAKIS (2006). "Bone Remodeling." *Annals of the New York Academy of Sciences* **1092**(Women's Health and Disease: Gynecologic, Endocrine, and Reproductive Issues): 385-396.
- HAYES, T., K. HASTON, *et al.* (2003). "Atrazine-Induced Hermaphroditism at 0.1 Ppb in American Leopard Frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and Field Evidence." *Environmental Health Perspectives* **111**(4): 568-575.
- HAYES, T. B. (2009). "There Is No Denying This: Defusing the Confusion About Atrazine." *BioScience* **54**(12): 1138-1149.

- HAYES, T. B., P. CASE, *et al.* (2006). "Pesticide Mixtures, Endocrine Disruption, and Amphibian Declines: Are We Underestimating the Impact?" *Environ Health Perspect* **114 Suppl 1**: 40-50.
- HAYES, T. B., A. COLLINS, *et al.* (2002). "Hermaphroditic, Demasculinized Frogs after Exposure to the Herbicide Atrazine at Low Ecologically Relevant Doses." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99(8)**: 5476-5480.
- HAYES, T. B., A. A. STUART, *et al.* (2006). "Characterization of Atrazine-Induced Gonadal Malformations in African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*) and Comparisons with Effects of an Androgen Antagonist (Cyproterone Acetate) and Exogenous Estrogen (17 β -Estradiol): Support for the Demasculinization/Feminization Hypothesis." *Environ Health Perspect* **114(S-1)**.
- HECKER, M., J. P. GIESY, *et al.* (2004). "Plasma Sex Steroid Concentrations and Gonadal Aromatase Activities in African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*) from South Africa." *Environmental Toxicology and Chemistry* **23(8)**: 1996-2007.
- HECKER, M., W. J. KIM, *et al.* (2005). "Plasma Concentrations of Estradiol and Testosterone, Gonadal Aromatase Activity and Ultrastructure of the Testis in *Xenopus laevis* Exposed to Estradiol or Atrazine." *Aquatic Toxicology* **72(4)**: 383-396.
- HECKER, M., J.-W. PARK, *et al.* (2005). "Effects of Atrazine on Cyp19 Gene Expression and Aromatase Activity in Testes and on Plasma Sex Steroid Concentrations of Male African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*)." *Toxicol. Sci.* **86(2)**: 273-280.
- HOLLOWAY, A. C., D. A. ANGER, *et al.* (2008). "Atrazine-Induced Changes in Aromatase Activity in Estrogen Sensitive Target Tissues." *Journal of Applied Toxicology* **28(3)**: 260-270.
- HOLZ, J. D., T. J. SHEU, *et al.* (2007). "Environmental Agents Affect Skeletal Growth and Development." *Birth Defects Res C Embryo Today* **81(1)**: 41-50.
- ISRAELS, L. G. et E. D. ISRAELS (1999). "Apoptosis." *The Oncologist* **4(4)**: 332-339.
- JIN, Z. et W. S. EL-DEIRY (2005). "Overview of Cell Death Signaling Pathways." *Cancer Biology & Therapy* **4(2)**: 139-163.
- JONES, D. K., J. I. HAMMOND, *et al.* (2009). "Very Highly Toxic Effects of Endosulfan across Nine Species of Tadpoles: Lag Effects and Family-Level Sensitivity." *Environmental Toxicology and Chemistry* **28(9)**: 1939-1945.
- KALE, V. M., S. R. MIRANDA, *et al.* (2008). "Comparative Cytotoxicity of Alachlor, Acetochlor, and Metolachlor Herbicides in Isolated Rat and Cryopreserved Human Hepatocytes." *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **22(1)**: 41-50.
- KANNAN, K., R. F. HOLCOMBE, *et al.* (2000). "Evidence for the Induction of Apoptosis by Endosulfan in a Human T-Cell Leukemic Line." *Molecular and Cellular Biochemistry* **205(1-2)**: 53-66.

- KANNAN, K. et S. K. JAIN (2003). "Oxygen Radical Generation and Endosulfan Toxicity in Jurkat T-Cells." *Molecular and Cellular Biochemistry* **247**(1): 1-7.
- KIERSZENBAUM, A. L. (2006). *Histologie Et Biologie Cellulaire: Une Introduction À L'anatomie Pathologique*, Bruxelles, De Boeck.
- KORKALAINEN, M., E. KALLIO, *et al.* (2009). "Dioxins Interfere with Differentiation of Osteoblasts and Osteoclasts." *Bone* **44**(6): 1134-1142.
- KROEMER, G. (1999). Mitochondrial Control of Apoptosis: An Overview. *Biochemical Society Symposium*. **66**: 1-15.
- LECLAIR, R. et J. CASTANET (1987). "A Skeletochronological Assessment of Age and Growth in the Frog *Rana Pipiens* Schreber (Amphibia, Anura) from Southwestern Quebec." *Copeia* **1987**: 361-369.
- LEDIRAC, N., S. ANThERIEU, *et al.* (2005). "Effects of Organochlorine Insecticides on Map Kinase Pathways in Human Hacat Keratinocytes: Key Role of Reactive Oxygen Species." *Toxicological Sciences* **86**(2): 444-452.
- LEVER, C. (2003). *Naturalized Reptiles and Amphibians of the World* Oxford University Press: 318
- LUNDBERG, R., B. M. JENSSSEN, *et al.* (2007). "Effects of Short-Term Exposure to the Ddt Metabolite P,P'-Dde on Bone Tissue in Male Common Frog (*Rana Temporaria*)." *J Toxicol Environ Health A* **70**(7): 614-9.
- MAGNUSSON, P., L. LARSSON, *et al.* (1998). "Differences of Bone Alkaline Phosphatase Isoforms in Metastatic Bone Disease and Discrepant Effects of Clodronate on Different Skeletal Sites Indicated by the Location of Pain." *Clinical Chemistry* **44**(8): 1621-1628.
- MANSKE, M. K., L. A. BELTZ, *et al.* (2004). "Low-Level Atrazine Exposure Decreases Cell Proliferation in Human Fibroblasts." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **46**(4): 438-444.
- MARIE, P. et HALBOUT, P (2008). "Opg/Rankl: Role and Therapeutic Target in Osteoporosis." *OPG/RANKL: Implication et cible thérapeutique dans l'ostéoporose* **24**(1): 105-109.
- MCCALLUM, M. L. (2009). "Amphibian Decline or Extinction? Current Declines Dwarf Background Extinction Rate." *Journal of Herpetology* **41**(3): 483-491.
- MCCREARY, B., C. A. PEARL, *et al.* (2008). "A Protocol for Aging Anurans Using Skeletochronology " U.S. GEOLOGICAL SURVEY, Open-File Report 2008-1209, 44 pages.
- METEYER, C. U., I. KATI LOEFFLER, *et al.* (2000). "Hind Limb Malformations in Free-Living Northern Leopard Frogs (*Rana Pipiens*) from Maine, Minnesota, and Vermont Suggest Multiple Etiologies." *Teratology* **62**(3): 151-171.
- MIURA, S., K. HANAOKA, *et al.* (2008). "Skeletogenesis in *Xenopus Tropicalis*: Characteristic Bone Development in an Anuran Amphibian." *Bone* **43**(5): 901-909.

- MORIISHI, T., Y. SHIBATA, *et al.* (2005). "Expression Profile of *Xenopus* Banded Hedgehog, a Homolog of Mouse Indian Hedgehog, Is Related to the Late Development of Endochondral Ossification in *Xenopus laevis*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **328**(4): 867-873.
- NYSTRÖM, P., J. HANSSON, *et al.* (2007). "A Documented Amphibian Decline over 40 Years: Possible Causes and Implications for Species Recovery." *Biological Conservation* **138**(3-4): 399-411.
- OLEJNIK, A., R. MARECIK, *et al.* (2010). "In Vitro Studies on Atrazine Effects on Human Intestinal Cells." *Water, Air, & Soil Pollution* **213**(1): 401-411.
- OSANO, O., W. ADMIRAAL, *et al.* (2002). "Developmental Disorders in Embryos of the Frog *Xenopus laevis* Induced by Chloroacetanilide Herbicides and Their Degradation Products." *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**(2): 375-379.
- OUELLET, M., J. BONIN, *et al.* (1997). "Hindlimb Deformities (Ectromelia, Ectrodactyly) in Free-Living Anurans from Agricultural Habitats." *J Wildl Dis* **33**(1): 95-104.
- PAL, R., T. AHMED, *et al.* (2009). "Protective Effects of Different Antioxidants against Endosulfan-Induced Oxidative Stress and Immunotoxicity in Albino Rats." *Indian Journal of Experimental Biology* **47**(9): 723-729.
- PAPALIAGKAS, V., A. ANOGIANAKI, *et al.* (2007). "The Proteins and the Mechanisms of Apoptosis: A Mini-Review of the Fundamentals." *Hippokratia* **11**(3): 108-113.
- PEIXOTO, F., J. A. F. VICENTE, *et al.* (2003). "The Herbicide Dicamba (2-Methoxy-3,6-Dichlorobenzoic Acid) Interacts with Mitochondrial Bioenergetic Functions." *Archives of Toxicology* **77**(7): 403-409.
- QUARANTA, A., V. BELLANTUONO, *et al.* (2009). "Why Amphibians Are More Sensitive Than Mammals to Xenobiotics." *PLoS ONE* **4**(11): e7699.
- RAISZ, L. G. (1999). "Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling." *Clin Chem* **45**(8): 1353-1358.
- RELYEA, R. (2009). "A Cocktail of Contaminants: How Mixtures of Pesticides at Low Concentrations Affect Aquatic Communities." *Oecologia* **159**(2): 363-376.
- RENNER, R. (2008). "Atrazine Effects in *Xenopus* Aren't Reproducible." *Environ Sci Technol* **42**(10): 3491-3.
- RIEGER, A. M., K. L. NELSON, *et al.* (2011). "Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay for Accurate Assessment of Cell Death." *J Vis Exp*(50): e2597.
- ROBERGE, M., H. HAKK, *et al.* (2004). "Atrazine Is a Competitive Inhibitor of Phosphodiesterase but Does Not Affect the Estrogen Receptor." *Toxicology Letters* **154**(1-2): 61-68.

- SANDERSON, J. T., W. SEINEN, *et al.* (2000). "2-Chloro-S-Triazine Herbicides Induce Aromatase (Cyp19) Activity in H295r Human Adrenocortical Carcinoma Cells: A Novel Mechanism for Estrogenicity?" *Toxicol. Sci.* **54**(1): 121-127.
- SOHN, H.-Y., C.-S. KWON, *et al.* (2004). "Induction of Oxidative Stress by Endosulfan and Protective Effect of Lipid-Soluble Antioxidants against Endosulfan-Induced Oxidative Damage." *Toxicology Letters* **151**(2): 357-365.
- SOLOMON, K. R. (2009). "Is Atrazine a Potent Endocrine Disruptor Chemical?" *Environmental Science & Technology* **43**(9): 2993-2993.
- SOLOMON, K. R., J. A. CARR, *et al.* (2008). "Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles: A Critical Review." *Critical Reviews in Toxicology* **38**(9): 721-772.
- SONNE, C., R. DIETZ, *et al.* (2004). "Is Bone Mineral Composition Disrupted by Organochlorines in East Greenland Polar Bears (*Ursus Maritimus*)?" *Environmental Health Perspectives* **112**(17): 1711-1716.
- SPARLING, D. W., G. M. FELLERS, *et al.* (2001). "Pesticides and Amphibian Population Declines in California, USA." *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(7): 1591-1595.
- SPEAR, P. A., M. BOILY, *et al.* (2009). "Study Design, Water Quality, Morphometrics and Age of the Bullfrog, *Rana Catesbeiana*, in Sub-Watersheds of the Yamaska River Drainage Basin, Québec, Canada." *Aquatic Toxicology* **91**(2): 110-117.
- SPOORENDONK, K. M., J. PETERSON-MADURO, *et al.* (2008). "Retinoic Acid and Cyp26b1 Are Critical Regulators of Osteogenesis in the Axial Skeleton." *Development* **135**(22): 3765-3774.
- SPORN, M. B., A. B. ROBERTS, *et al.* (1994). "The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine." *Biochemical Education* **22**(1): 56-56.
- STUART, S. N., J. S. CHANSON, *et al.* (2004). "Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide." *Science* **306**(5702): 1783-1786.
- TAIZ, L. (2006). *Plant Physiology*. Sunderland, Mass. : Sinauer Associates.
- THORPE, N. et A. SHIRMOHAMMADI (2005). "Herbicides and Nitrates in Groundwater of Maryland and Childhood Cancers: A Geographic Information Systems Approach." *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews* **23**(2): 261 - 278.
- TORTORA, G. J. (2003). *Principles of Anatomy and Physiology*. New York, Wiley.
- TRABER, M. G. et J. F. STEVENS (2011). "Vitamins C and E: Beneficial Effects from a Mechanistic Perspective." *Free Radical Biology and Medicine* **51**(5): 1000-1013.
- TSAI, K. S., R. S. YANG, *et al.* (2004). "Benzo[a]Pyrene Regulates Osteoblast Proliferation through an Estrogen Receptor-Related Cyclooxygenase-2 Pathway." *Chem Res Toxicol* **17**(5): 679-84.

- VAANANEN, H., H. ZHAO, *et al.* (2000). "The Cell Biology of Osteoclast Function." *J Cell Sci* **113**(3): 377-381.
- VALLOTTON, N., D. MOSER, *et al.* (2008). "S-Metolachlor Pulse Exposure on the Alga *Scenedesmus Vacuolatus*: Effects During Exposure and the Subsequent Recovery." *Chemosphere* **73**(3): 395-400.
- WALLACE H., A. (2001). *Principles and Methods of Toxicology*, CRC.
- ZAFARULLAH, M., W. Q. LI, *et al.* (2003). "Molecular Mechanisms of N-Acetylcysteine Actions." *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**(1): 6-20.
- ZAMZAMI, N., S. A. SUSIN, *et al.* (1996). "Mitochondrial Control of Nuclear Apoptosis." *The Journal of Experimental Medicine* **183**(4): 1533-1544.
- ZERVOS, I., E. NIKOLAIDIS, *et al.* (2011). "Endosulfan-Induced Lipid Peroxidation in Rat Brain and Its Effect on T-Pa and Pai-1: Ameliorating Effect of Vitamins C and E." *J Toxicol Sci.* **36**(4): 423-33.
- ZILE, M., H. AHRENS, *et al.* (1973). "Vitamin a and Bone Metabolism in the Rat." *J. Nutr.* **103**(2): 308-313.