

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR  
SYLVIE RICARD

TOXICITÉ DU CADMIUM CHEZ LES TÊTARDS  
DE LA GRENOUILLE VERTE (*RANA CLAMITANS*, LATREILLE)

AVRIL 1993

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## RÉSUMÉ

L'objectif de cette recherche est d'évaluer la sensibilité des têtards de grenouille verte (*Rana clamitans*, Latreille) à l'exposition au cadmium en déterminant la concentration létale (CL50) et en caractérisant les effets sublétaux par l'observation de plusieurs paramètres.

Des têtards de grenouille verte ont été prélevés dans un plan d'eau des environs de Trois-Rivières et ont été placés dans une solution d'eau reconstituée pour une période d'acclimatation de 7 jours au laboratoire. Les têtards ont ensuite été soumis à des solutions de cadmium lors de deux séries d'expérimentations. D'une part, ils ont été soumis à un test exploratoire suivi d'un test léthal comportant 6 concentrations de cadmium. D'autre part, ils ont été exposés à des concentrations sublétales de 1 et 5 ppm de cadmium pendant 15 jours et 33 jours ainsi qu'à 1 ppm de cadmium pendant 25 jours. Les paramètres observés lors des tests sublétaux étaient la valeur d'hématocrite, la numération des érythrocytes, la formule sanguine, la morphologie érythrocytaire, l'histologie descriptive hépatique et rénale, l'épaisseur de l'épithélium filamenteux des branchies, l'indice hépato-somatique, l'indice néphro-somatique ainsi que l'accumulation du cadmium dans divers tissus.

Les résultats de l'analyse probit effectuée à partir des données du test létal montrent que la CL50 se chiffre à environ 52 ppm suite à une exposition au cadmium d'une durée de 24 heures. Ces résultats suggèrent que les têtards de grenouille verte sont assez résistants au cadmium comparativement à d'autres espèces d'amphibiens sous forme larvaire.

Les principaux résultats obtenus lors des tests sublétaux montrent que l'exposition au cadmium provoque une diminution de la valeur d'hématocrite, un arrondissement des érythrocytes, une augmentation de la surface érythrocytaire ainsi qu'une augmentation de la proportion d'érythrocytes en voie de dégénérescence et de thrombocytes dans la circulation sanguine. L'hypothèse la plus plausible pouvant expliquer l'apparition de ces effets hématologiques est que le cadmium provoque une anémie régénérative par hémolyse. Les affections pathologiques hépatiques sont principalement une vacuolisation cellulaire, probablement lipidique, et une nécrose des hépatocytes. La néphropathie observée consiste en une vacuolisation des cellules tubulaires accompagnée de l'augmentation des granulations acidophiles intracytoplasmiques. Par ailleurs, aucun changement quantitatif pouvant être lié à l'exposition au cadmium n'a été noté au niveau de l'épaisseur des filaments branchiaux. Les analyses de concentration tissulaire montrent que le cadmium s'accumule préférentiellement dans le foie et que le facteur de bioconcentration s'élève à 3,41 après 25

jours d'exposition à 1 ppm de cadmium.

Selon les résultats obtenus, les têtards de grenouille verte présenteraient des caractéristiques intéressantes de bioindicateur. En effet, ils seraient à la fois résistants et posséderaient des paramètres sensibles aux perturbations de leur milieu.

Les paramètres les plus sensibles parmi ceux qui ont été étudiés seraient l'excentricité érythrocytaire, la proportion de thrombocytes et la proportion d'érythrocytes en dégénérescence dans la circulation sanguine. La combinaison des paramètres d'excentricité érythrocytaire et d'accumulation de cadmium dans les reins est celle discriminant le plus efficacement les groupes d'individus exposés au cadmium.

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent particulièrement à mon directeur de thèse, Dr Raymond Leclair Jr, ainsi qu'à mon co-directeur, Dr Raynald Gareau, pour leurs judicieux conseils, leur soutien constant et la méthodologie scientifique qu'ils m'ont permis d'acquérir et de développer.

Je suis redevable aussi à Monsieur LeRoy Pazdernik pour son apport considérable lors de l'utilisation des appareils de spectrophotométrie d'absorption atomique et à Monsieur Rogath Gagnon pour son expertise de pathologiste mise à contribution lors de l'observation des coupes histologiques.

Je remercie également l'équipe du laboratoire de pathologie du Centre hospitalier Sainte-Marie dont Monsieur Marc Giguère, Madame Carole Guillemette, Monsieur Jean-Noël Paquin, Madame Suzanne Meunier et Madame Danielle Gélinas pour leur assistance technique lors de l'application des méthodes histochimiques et du montage des lames histologiques ainsi que pour la gentillesse et la patience qu'ils ont manifestées à mon égard.

Je me dois également de souligner l'aide technique apportée par Monsieur René Perreault lors des expérimentations en laboratoire.

Enfin, des remerciements particuliers sont dédiés au Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) du Gouvernement du Québec ainsi qu'à l'Université du Québec à Trois-Rivières (bourse Intervention Spéciale) pour le soutien financier qu'ils ont apporté à cette recherche.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ . . . . .	i
REMERCIEMENTS . . . . .	iv
TABLE DES MATIÈRES . . . . .	vi
LISTE DES TABLEAUX . . . . .	x
LISTE DES FIGURES . . . . .	xii

### CHAPITRES

1. INTRODUCTION . . . . .	1
2. GÉNÉRALITÉS . . . . .	8
2.1 Présence du cadmium dans l'environnement . . . . .	8
2.2 Cellules hématologiques et hématopoïèse chez les anoures . . . . .	10
2.2.1 Érythropoïèse . . . . .	12
2.2.2 Leucopoïèse . . . . .	13
2.3 Description de l'histologie hépatique . . . . .	14
2.4 Description des principales lésions hépatiques . . . . .	14
2.5 Description de l'histologie rénale . . . . .	16
2.6 Description de l'histologie branchiale . . . . .	17
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES . . . . .	19
3.1 Animaux et médium chimique . . . . .	19
3.2 Test exploratoire et test létal . . . . .	23

3.3	Tests sublétaux . . . . .	23
3.3.1	Paramètres hématologiques . . . . .	26
3.3.1.1	Morphologie érythrocytaire . . . . .	26
3.3.1.2	Formule sanguine . . . . .	27
3.3.1.3	Valeur d'hématocrite . . . . .	28
3.3.1.4	Numération des érythrocytes . . . . .	28
3.3.2	Histologie . . . . .	29
3.3.2.1	Histologies hépatique et rénale . . . . .	29
3.3.2.2	Histologie branchiale . . . . .	30
3.3.3	Analyses des concentrations tissulaires de cadmium . . . . .	31
3.3.4	Facteur de bioconcentration . . . . .	32
3.4	Analyses statistiques . . . . .	33
4.	RÉSULTATS . . . . .	34
4.1	Caractéristiques physico-chimiques des solutions . . . . .	34
4.2	Concentration létale (CL50) . . . . .	36
4.2.1	Test exploratoire . . . . .	36
4.2.2	Test léthal . . . . .	38
4.3	Mortalités lors des tests sublétaux . . . . .	40
4.4	Paramètres sanguins . . . . .	40
4.4.1	Description des cellules hématologiques . . . . .	42
4.4.1.1	Érythrocytes . . . . .	42
4.4.1.2	Leucocytes . . . . .	44
4.4.1.3	Thrombocytes . . . . .	45
4.4.2	Valeur d'hématocrite . . . . .	45

4.4.3	Numération des érythrocytes . . . . .	47
4.4.4	Morphologie des érythrocytes . . . . .	48
4.4.5	Formule sanguine . . . . .	56
4.5	Histologie . . . . .	65
4.5.1	Histologie hépatique . . . . .	65
4.5.1.1	Individus témoins . . . . .	65
4.5.1.2	Individus exposés au cadmium .	67
4.5.1.3	Autres méthodes histochimiques (APS, huile rouge et Gram) . .	71
4.5.2	Histologie rénale . . . . .	73
4.5.2.1	Individus témoins . . . . .	73
4.5.2.2	Individus exposés au cadmium .	75
4.5.3	Histologie branchiale . . . . .	78
4.6	Indices somatiques . . . . .	82
4.6.1	Indice hépato-somatique . . . . .	82
4.6.2	Indice néphro-somatique . . . . .	82
4.7	Accumulation du cadmium dans les tissus . . . .	85
4.8	Facteur de bioconcentration . . . . .	87
4.9	Corrélations entre les effets hématologiques et l'accumulation du cadmium dans les tissus . .	87
4.10	Pouvoir discriminant des paramètres . . . . .	90
5.	DISCUSSION . . . . .	92
5.1	Physico-chimie des solutions . . . . .	92
5.2	Concentration létale . . . . .	93

5.3	Effets délétères observés suite aux expositions sublétales . . . . .	95
5.3.1	Paramètres hématologiques . . . . .	95
5.3.1.1	Normalité des témoins . . . . .	95
5.3.1.2	Symptômes anémiques . . . . .	98
5.3.1.3	Formule leucocytaire . . . . .	106
5.3.2	Histologie . . . . .	108
5.3.2.1	Histologie hépatique . . . . .	108
5.3.2.2	Histologie rénale . . . . .	111
5.3.2.3	Histologie branchiale . . . . .	113
5.4	Indices somatiques . . . . .	114
5.5	Bioconcentration . . . . .	115
	CONCLUSION . . . . .	118
	BIBLIOGRAPHIE . . . . .	121
	ANNEXE I. Méthodes histochimiques employées . . . . .	137
	ANNEXE II. Abréviations utilisées . . . . .	140

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1	Paramètres physico-chimiques mesurés et méthodes utilisées . . . . .	22
2	Masse et stade de développement des têtards utilisés dans les tests létaux et sublétaux . . .	24
3	Caractéristiques physico-chimiques des solutions lors des tests létaux et sublétaux . . . . .	35
4	Concentrations de cadmium calculées et mesurées dans les solutions pendant les différents tests .	37
5	Concentration létale (CL50) pour les têtards de grenouille verte ( <i>Rana clamitans</i> ) et différentes espèces d'anoures exposés au cadmium . . . . .	39
6	Résultats des analyses de variance effectuées entre les paramètres morphologiques des érythrocytes et les concentrations de cadmium . . . . .	53
7	Proportion des cellules hématologiques dans le sang des têtards exposés au cadmium pendant 15 jours .	59
8	Épaisseur de l'épithélium des filaments branchiaux chez les têtards exposés pendant 15 jours et 33 jours à des solutions de cadmium . . . . .	81
9	Coefficients de corrélation de Pearson entre les paramètres hématologiques et la concentration de cadmium dans les tissus . . . . .	89

Tableau

Page

10	Résultats des analyses discriminantes effectuées selon différentes combinaisons de paramètres . . .	91
----	--	----

## LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1	Mortalités enregistrées lors du test sublétal #1 chez les têtards exposés au cadmium pendant 33 jours . . . . .	41
2	Cellules hématologiques des têtards de grenouille verte . . . . .	43
3	Valeur d'hématocrite chez les têtards exposés au cadmium pendant 24 heures, 15 jours et 33 jours .	46
4	Corrélation entre la largeur des érythrocytes et le stade de développement des têtards exposés au cadmium pendant 15 jours . . . . .	49
5	Corrélation entre la surface des érythrocytes et le stade de développement des têtards exposés au cadmium pendant 15 jours . . . . .	50
6	Corrélation entre l'excentricité des érythrocytes et le stade de développement des têtards exposés au cadmium pendant 15 jours . . . . .	51
7	Variation temporelle de l'excentricité des érythrocytes chez les têtards exposés à 1 ppm de cadmium . . . . .	55
8	Variation temporelle de la surface érythrocytaire chez les têtards exposés à 1 ppm de cadmium . . .	57

Figure		Page
9	Variation temporelle de la proportion d'érythrocytes en dégénérescence dans le sang des têtards exposés à 1 ppm de cadmium . . . . .	61
10	Variation temporelle de la proportion de thrombocytes dans le sang des têtards exposés à 1 ppm de cadmium . . . . .	63
11	Portion de frottis sanguin observé chez a) un têtard témoin après 15 jours d'exposition à l'eau reconstituée, montrant des érythrocytes de forme ovoïde; b) chez un têtard exposé à 5 ppm de cadmium pendant 15 jours, montrant des érythrocytes arrondis; et c) chez un têtard anémique exposé à 1 ppm pendant 25 jours, montrant une forte proportion d'érythrocytes en dégénérescence . . . . .	64
12	Histologie du foie normal . . . . .	66
13	Stase hépatique située dans la région péri-portale observée chez un têtard témoin exposé à l'eau reconstituée pendant 33 jours . . . . .	68
14	Histologie du foie chez un têtard exposé à 1 ppm de cadmium pendant 15 jours montrant une perturbation de l'architecture travéculaire causée par la déformation des hépatocytes . . . . .	70
15	Zone de nécrose dans le foie d'un têtard exposé à 5 ppm de cadmium pendant 33 jours . . . . .	72

Figure		Page
16	Histologie du rein normal . . . . .	74
17	Glomérule turgescent observé dans le rein d'un têtard exposé à 5 ppm de cadmium pendant 33 jours	76
18	Histologie du rein chez un têtard exposé à 5 ppm de cadmium pendant 15 jours . . . . .	77
19	Histologie branchiale chez un têtard . . . . .	80
20	Indice hépato-somatique et proportion d'eau dans le foie chez les têtards exposés au cadmium pendant 15 jours . . . . .	83
21	Indice néphro-somatique et proportion d'eau dans les reins chez les têtards exposés au cadmium pendant 15 jours . . . . .	84
22	Concentration tissulaire moyenne de cadmium chez les têtards exposés à 1 ppm et à 5 ppm pendant 15 jours . . . . .	86
23	Évolution du facteur de bioconcentration (FBC) en fonction du temps chez les têtards exposés à 1 ppm de cadmium . . . . .	88

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

L'intérêt que suscite la pollution des écosystèmes par les métaux lourds s'est manifesté originellement suite aux tragédies survenues au Japon au début des années 1950, notamment celle de la contamination par le mercure à Minamata et de la pollution par le cadmium sur les rives de la rivière Jinzu (Korte, 1983; Léonard, 1990). Depuis ce temps, cette préoccupation s'est considérablement accrue, entraînant parallèlement le développement de techniques de biomonitoring toujours plus sensibles et plus simples dans le but de détecter une contamination environnementale le plus précocement possible.

De cette effervescence d'études toxicologiques émerge une panoplie de travaux extrêmement diversifiés visant à identifier des paramètres biologiques susceptibles d'évaluer la qualité de l'environnement, allant de l'observation des modifications physiologiques rénales chez les lapins (Axelsson et Piscator, 1966) aux changements éthologiques chez les daphnies (McNaught et Drake, 1991). Parmi cette kyrielle d'études, dont une bonne partie est basée sur les organismes aquatiques et plus particulièrement sur la faune ichthyenne (Coombs, 1979), quelques rares travaux traitent des effets des polluants sur les amphibiens.

L'hypothèse d'un déclin global des populations d'amphibiens formulée récemment révèle l'importance d'utiliser ces vertébrés dans les programmes de biomonitoring (Tyler, 1991; Wake et al., 1991). Cet intérêt est rehaussé par le fait que les amphibiens semblent posséder des caractéristiques biologiques et morphologiques faisant d'eux d'excellents bioindicateurs. Les têtards, en particulier, sont considérés comme étant sensibles à divers types de polluants (Greenhouse, 1976; Jayaprakash et Madhyastha, 1987; Strick et al., 1990) et sont qualifiés d'excellents accumulateurs de métaux lourds (Hall et Mulhern, 1984). De plus, les têtards sont régio-spécifiques, ce qui nous permet d'assumer que l'accumulation de polluants dans ces organismes est représentative de la contamination locale. Or, la capacité de bioaccumuler suffisamment les polluants et la sédentarité relative des individus au sein de leur habitat sont deux caractéristiques importantes que devrait posséder un bon bioindicateur (Cossa, 1989). Les têtards bénéficient également d'un régime alimentaire simple, principalement des microphytophytes (Jenssen, 1967), et d'une uniformité de taille et d'âge qui permettent de réduire la variabilité des données causée par la biomagnification et par les différences inter-individuelles. De plus, l'utilisation des têtards présente plusieurs avantages dans l'évaluation de la toxicité des polluants: ils sont peu dispendieux, peuvent être obtenus en grand nombre pendant la période de reproduction, sont d'excellents représentants de la vie aquatique et sont les

équivalents des stades embryonnaires des vertébrés supérieurs (Cooke, 1981). Malgré toutes ces considérations, quelques études seulement traitent de l'utilisation des amphibiens comme bioindicateurs (Giannetti *et al.*, 1990; Strick *et al.*, 1990; Steele *et al.*, 1991).

La présente recherche s'inscrit dans la problématique de développement de bioindicateurs en milieu aquatique, représentatifs du groupe des amphibiens, en caractérisant sous plusieurs aspects la sensibilité à un xénobiotique d'une espèce amphibienne en phase larvaire.

Parmi les espèces amphibiennes retrouvées au Québec, la grenouille verte (*Rana clamitans*) fut choisie pour la réalisation de cette étude en raison de la taille des têtards et de leur disponibilité. En effet, les têtards de cette espèce demeurent de 2 à 3 ans sous forme larvaire (Cook, 1984) et atteignent ainsi des dimensions facilitant les manipulations lors des prélèvements. En milieu naturel, cette caractéristique signifie un allongement de la période de résidence dans les eaux polluées, entraînant une bioaccumulation plus importante et augmentant ainsi le pouvoir de détection des contaminants lors des analyses. De plus, cette espèce offre l'avantage d'être commune et largement distribuée au Canada et aux États-Unis (Cook, 1984; Leclair, 1985).

Les paramètres utilisés pour évaluer la réponse des têtards au contaminant ont été choisis en raison de leur sensibilité, de leur valeur diagnostique et de la facilité avec laquelle les résultats semblaient pouvoir être obtenus ou interprétés.

Plusieurs études ont démontré la grande sensibilité des paramètres hématologiques à la dégradation de la qualité de l'eau (Garofano et Hirshfield, 1982; Sjöbeck et al., 1984; Gill et Pant, 1986; Hose et al., 1987; Hardig et al., 1988; Hughes et Nemcsók, 1988; Szubartowska et al., 1990). Les réponses les plus fréquemment observées suite à l'exposition de poissons ou d'amphibiens aux substances toxiques sont un changement dans la formule leucocytaire et l'apparition de symptômes anémiques manifestés par une diminution du nombre d'érythrocytes, de la valeur d'hématocrite et du contenu en hémoglobine (Larsson et al., 1976; Garofano et Hirshfield, 1982; Sjöbeck et al., 1984; Hilmy et al., 1986; El-Domiaty, 1987; Hardig et al., 1988; Strick et al., 1990; Szubartowska et al., 1990). Un autre symptôme anémique, la modification de la surface érythrocytaire, a également été observé en réponse à une exposition au cadmium (Plum, 1951; Berlin et Friberg, 1960). Ce paramètre ainsi que l'excentricité érythrocytaire, utilisés par Szubartowska et al. (1990) pour évaluer les effets du Foschlor chez *Rana esculenta* L., se sont révélés de sensibles indicateurs de stress toxique. Considérant que les paramètres morphométriques pouvaient facilement être mesurés sur les

érythrocytes à partir d'un frottis sanguin et que le volume de sang individuel dont nous pouvions disposer pour les analyses était assez réduit (quelques dizaines de microlitres), les paramètres hématologiques que nous avons conservés afin d'évaluer les effets du cadmium chez *R. clamitans* sont la proportion relative des cellules hématologiques (comprenant la formule leucocytaire), la valeur d'hématocrite ainsi que la numération et l'analyse morphologique des érythrocytes.

L'interprétation des effets hématologiques a été complétée par l'étude histologique des deux organes hématopoiétiques majeurs chez les têtards soit le foie et le rein. Cet examen nous renseigne sur la nature des dommages cellulaires accompagnant les manifestations externes et systémiques de l'empoisonnement. Afin d'ajouter encore à la complémentarité de cette analyse et de mieux connaître la distribution du métal dans les tissus, les variations des indices hépato- et néphro-somatiques ainsi que les concentrations de cadmium contenu dans le foie, les reins, les muscles et les intestins des têtards ont été déterminées.

L'examen pathologique des branchies revêt également une valeur diagnostique considérable. En effet, les branchies constituent un organe cible prioritaire puisqu'elles sont directement en contact avec le toxique dissous. Chez les poissons exposés au cadmium, les modifications histologiques branchiales les plus

fréquemment observées sont un soulèvement de l'épithélium lamellaire ainsi que l'hypertrophie et l'hyperplasie des cellules épithéliales et acidophiles (Versteeg et Giesy, 1986; Gill et al., 1988; Oronsaye, 1989). Cependant, peu d'auteurs (McDonald et al., 1991; Morin et Walsh, 1991) ont employé des paramètres quantitatifs tels la distance inter-lamellaire, l'épaisseur de l'épithélium lamellaire et la densité des cellules à mucus et à chlorure afin de décrire les altérations structurales des branchies. Pour la présente étude, l'utilisation de paramètres quantitatifs a été privilégiée à l'observation histologique qualitative puisqu'elle permet d'amenuiser la subjectivité lors du diagnostic. Les paramètres quantitatifs ont donc été mesurés lors de l'examen histopathologique des branchies chez *R. clamitans* afin de vérifier si, à l'instar des poissons, les têtards présentent une altération de la structure branchiale suite à l'exposition au cadmium.

Les objectifs de cette recherche sont donc d'évaluer la sensibilité des têtards de grenouille verte (*R. clamitans*) au cadmium, un métal lourd très toxique, en déterminant la concentration létale (CL50) et en caractérisant les effets sublétaux du cadmium par l'observation de paramètres hématologiques et histologiques. Nous évaluons également la capacité de bioconcentration de ces organismes en quantifiant le cadmium absorbé dans différentes parties corporelles. De

façon sous-jacente, cette étude permet d'accroître les connaissances concernant les effets des polluants sur l'herpétofaune et pourrait conduire à une meilleure évaluation des conséquences démographiques de la pollution sur les populations d'amphibiens.

## CHAPITRE II

### GÉNÉRALITÉS

#### 2.1 Présence du cadmium dans l'environnement

Contenu dans la croûte terrestre dans une proportion de 0,15 à 0,2  $\mu\text{g/g}$  (Peterson et Alloway, 1979), le cadmium se distribue de façon ubiquiste dans la plupart des formations géologiques. Classé avec le zinc et le mercure parmi les éléments du groupe IIB du tableau périodique, le cadmium possède des caractéristiques chimiques ressemblant à celles du zinc. Il se rencontre donc principalement dans les gisements de zinc sous forme de sulfure ou d'oxyde. La sphalérite ( $\text{ZnS}$ ), par exemple, contient de 0,2 à 0,4% de cadmium sous forme de greenockite ( $\text{CdS}$ ). Il est présent également dans les dépôts phosphatés, dans le charbon et dans les combustibles fossiles.

Suite à l'érosion des dépôts cadmifères, le cadmium se retrouve dans le milieu aquatique sous forme de sels solubles, associé le plus souvent aux sulfates ( $\text{CdSO}_4$ ), au chlore ( $\text{CdCl}_2$ ) ou aux nitrates ( $\text{CdNO}_3$ ). De façon naturelle, la concentration de cadmium dans le milieu aquatique est généralement faible ( $<< 0,01$  ppm) sauf à proximité des gisements de cadmium (Boyle et Jonasson, 1979).

La production mondiale de cadmium est dérivée des procédés

d'extraction du zinc surtout, mais aussi du plomb et du cuivre (Aylett, 1979). Au Québec, en 1987 et 1988, la production de cadmium totalisait environ 210 tonnes métriques extraites dans trois régions: la Montérégie, le Nord-du-Québec et l'Abitibi-Témiscamingue (Ministère de l'Énergie et des Ressources, 1988). Le cadmium est utilisé principalement dans l'électroplaquage, mais il entre également dans la fabrication de pigments, de piles électriques (Ni-Cd), de céramiques et d'alliages avec le cuivre, le plomb, l'aluminium, l'argent et le nickel (Goulet et Laliberté, 1982).

À une faible présence naturelle dans l'environnement s'ajoute donc un apport anthropogénique marqué provenant de nombreuses sources dont l'exploitation des mines de zinc et des fonderies, la production et l'enfouissement de produits manufacturés contenant du cadmium, la combustion de charbon et d'huile, l'enfouissement et l'incinération de boues résiduelles provenant de l'épuration d'eaux usées industrielles ou domestiques ainsi que la production et l'épandage de fertilisants phosphatés (Boyle et Jonasson, 1979; Hutton, 1983).

Au Québec, la contamination de l'environnement aquatique par le cadmium a été observée principalement dans le nord du bassin de la rivière des Outaouais, sis dans une région minière très active: l'Abitibi. Une contamination par le cadmium est

également signalée dans les bassins des rivières Saint-François, Châteauguay, Richelieu et Yamaska. De plus, selon les études consultées (Goulet et Laliberté, 1982; Désilets et Langlois, 1989), le cadmium est détecté principalement dans les sédiments et les composantes biologiques alors qu'il ne se retrouve qu'à l'état de traces dans le milieu aqueux.

Ce portrait, bien qu'incomplet, montre que les têtards d'amphibiens peuvent être exposés à des concentrations de cadmium dans plusieurs milieux aquatiques du Québec, par l'entremise surtout du processus de biomagnification. Selon Freda (1991), par exemple, les espèces d'amphibiens se reproduisant dans les étangs temporaires sont particulièrement susceptibles d'être soumises à des concentrations élevées de métaux dont le cadmium. L'application de fertilisants phosphatés et l'épandage de boues résiduelles dans les champs peuvent être une source de cadmium dans ces étangs formés par le ruissellement des eaux. Ces métaux sont mobilisés par une augmentation du pH qui, dans les étangs temporaires, atteint des niveaux élevés lors de la fonte des neiges (Freda, 1991).

## **2.2 Cellules hématologiques et hématopoïèse chez les anoues**

Le sang des amphibiens est composé de plasma dans lequel baignent des érythrocytes nucléés, des thrombocytes et des

leucocytes (globules blancs). Ces derniers se subdivisent en deux catégories: les mononucléés (lymphocytes et monocytes) et les granulocytes (basophiles, neutrophiles et éosinophiles) (Foxon, 1964).

Chez les anoures, le site de formation des cellules hématologiques change au cours du développement de l'animal. Pendant l'embryogénèse, l'hématopoïèse s'effectue dans des îlots cellulaires du mésenchyme alors qu'au cours du développement larvaire les cellules hématologiques sont produites principalement par les reins et le foie (Foxon, 1964). Dans une étude effectuée chez *Rana catesbeiana*, Broyles et al. (1981) ont démontré que la contribution relative de ces sites à l'érythropoïèse change pendant la période larvaire, les reins, plus actifs chez les jeunes stades, cèdent graduellement leur place au foie. Chez la grenouille juvénile, le foie est le principal site d'érythropoïèse et est remplacé par la rate au cours de la maturation (Broyles et al., 1981). Chez l'adulte, la rate occupe une place prédominante surtout dans l'érythropoïèse alors que les reins et la paroi intestinale contribuent principalement à la formation de granulocytes (Foxon, 1964). De plus, à la métamorphose et après le réveil printanier, la moelle des os longs devient un site majeur d'érythropoïèse.

Toutes les cellules sanguines des anoures originent d'une même

cellule souche appelée hémoblaste lymphoïde ou hémocytoblaste. Généralement, la maturation de cellules en érythrocytes et en thrombocytes s'effectue dans les sinus sanguins alors que la formation des leucocytes s'accomplit extravasculairement (Foxon, 1964; Jordan, 1965).

### 2.2.1 Érythropoïèse

Chez les anoures, Jordan (1965) mentionne que les érythroblastes, dérivant de la maturation d'hémoblastes lymphoïdes par production d'hémoglobine, se multiplient intravasculairement par division mitotique. Les cellules filles engendrées s'allongent ensuite pour acquérir la forme ovale typique des érythrocytes matures. Il existe, chez les anoures comme chez les humains, plusieurs stades érythrocytaires possédant des caractéristiques spécifiques résultant de changements morphologiques selon leur degré de maturation. Aucune description des stades érythrocytaires chez les têtards n'a été trouvée dans la littérature. Toutefois, dans la description de ces différents stades cellulaires faite à partir de sang humain (Ross *et al.*, 1989), on retrouve d'abord le proérythroblaste caractérisé par un gros noyau et un cytoplasme basophile dû à la présence d'une grande quantité de ribosomes libres (dont la fonction est de synthétiser l'hémoglobine). L'érythroblaste basophile, qui succède au proérythroblaste, possède un cytoplasme plus basophile que

celui de son prédécesseur en raison de l'augmentation du nombre de ribosomes. Avec la synthèse d'hémoglobine, le cytoplasme passe graduellement du bleu au rouge suite à l'application des méthodes histochimiques classiques; la cellule porte successivement le nom d'érythroblaste polychromatophile puis de normoblaste alors qu'elle acquiert l'aspect d'un érythrocyte ayant un cytoplasme rouge pâle. Cette coloration s'intensifie alors que la concentration en hémoglobine s'accroît et la cellule prend la forme définitive de l'érythrocyte.

Outre les érythroblastes en mitose, les différents types d'érythroblastes en maturation et les érythrocytes matures, on peut observer occasionnellement, dans la circulation sanguine des têtards, des érythroplastides (érythrocytes sans noyaux) et des cellules en dégénérescence (Jordan, 1965).

### **2.2.2 Leucopoïèse**

Mise à part l'énumération de sites de leucopoïèse qui peuvent être variables selon les stades de développement des amphibiens et les espèces, aucune description des processus de maturation des leucocytes chez les anoues ne fut trouvée dans la littérature.

Cependant, la description de ces processus faite chez l'humain (Ross *et al.*, 1989) montre que le précurseur des granulocytes,

appelé promyélocyte, est caractérisé par un noyau faiblement éosinophile de forme arrondie entouré d'un cytoplasme faiblement basophile dans lequel sont disséminés quelques petits granules. Par la suite, ces précurseurs se différencient pour former des basophiles, des neutrophiles ou des éosinophiles et différentes appellations leur sont attribuées selon leur degré de différenciation et le type de granulocyte qu'ils formeront.

### **2.3 Description de l'histologie hépatique**

Le foie des amphibiens est composé d'hépatocytes agencés en lames hépatiques d'une ou deux cellules d'épaisseur formant un réseau enchevêtré. Les canalicules biliaires parcourent les lames hépatiques entre les faces d'accolement des hépatocytes et se jettent dans les canaux biliaires. Ces travées parenchymateuses sont séparées par les sinusoides dans lesquels circulent les cellules sanguines (Porter, 1972).

### **2.4 Description des principales lésions hépatiques**

Les lésions hépatocytaires peuvent être réversibles ou irréversibles. La première catégorie comprend des altérations telles la clarification cellulaire, la ballonnisation et la

formation de granules cytoplasmiques. Les lésions cellulaires irréversibles englobent les différents types de nécroses et les lésions par surcharge (Martin et Feldman, 1983).

La clarification cellulaire est diagnostiquée lorsque la cellule présente une tuméfaction probablement due à une imbibition oedémateuse ou plasmatique produisant un éclaircissement du cytoplasme. Le noyau conserve un aspect normal ou légèrement densifié et demeure en position centrale. Le glycogène est peu abondant ou absent.

La ballonnisation présente des altérations communes à la clarification mais plus prononcées: le volume cellulaire atteint trois à quatre fois la normale. Les réactions tinctoriales des graisses et du glycogène sont négatives. Dans certains cas d'intoxication, des microvacuoles contenant des protéines sériques ou des produits injectés sont formées dans les hépatocytes et conduisent à la clarification et à la ballonnisation (Martin et Feldmann, 1983).

Les cellules normales ou clarifiées peuvent être le siège de modifications cytoplasmiques granuleuses. Ces granulations, souvent éosinophiles, peuvent originer de l'accumulation de glycogène ou de l'entassement des organites dans un cytoplasme oedémateux. Elles peuvent également correspondre à des mitochondries géantes, à des dépôts biliaires ou protéiques

anormaux, à des lipofuscines, ou à des vacuoles autophagiques dont la fonction est de débarrasser la cellule de ses constituants altérés.

Les caractéristiques de la cellule nécrotique sont généralement un cytoplasme très dense, homogène ou finement granité avec un noyau dense, homogène, rétracté et pycnotique.

Les lésions par surcharge résultent d'une perturbation fonctionnelle et comprennent la stéatose qui résulte d'un excès de lipides et la cholestase qui est une accumulation de bile dans le foie. La stéatose est macro-vacuolaire lorsque le globule lipidique occupe toute la cellule, repoussant les organites et le noyau en périphérie. Elle est microvacuolaire lorsque les gouttelettes lipidiques demeurent petites et nombreuses (Martin et Feldmann, 1983).

## **2.5 Description de l'histologie rénale**

Chez les amphibiens, une paire de reins pronéphriques apparaissent lors du développement embryonnaire. Ils dégénèrent peu avant la métamorphose et sont remplacés par des reins mésonéphriques. Ces reins mésonéphriques, d'un type relativement primitif, ont pour fonction principale l'excrétion de l'eau et de l'ammoniac. Leur vascularisation provient de

plusieurs artères rénales qui se divisent pour former d'innombrables groupements de capillaires appelés glomérules. Chaque glomérule est entouré par l'élargissement de l'extrémité proximale d'un tubule rénal pour former la capsule de Bowman ou capsule glomérulaire. Ce complexe comprenant la capsule et le glomérule se nomme un corpuscule rénal ou corps de Malpighi et constitue le site de filtration majeur. Le sang des capillaires est filtré dans le glomérule et le filtrat est récolté dans la capsule glomérulaire et passe dans le tubule proximal. Le tubule se prolonge latéralement parmi un enchevêtrement capillaire et transporte l'urine jusqu'au tube collecteur (Porter, 1972; Duellman et Trueb, 1986).

## **2.6 Description de l'histologie branchiale**

Les larves aquatiques d'anoures possèdent des branchies internes qui se développent dans deux chambres atriales recouvertes d'un épithélium. Dans chaque chambre, les filaments branchiaux sont supportés par quatre arcs cératobranchiaux, unis les uns aux autres à chaque extrémité pour constituer une structure en forme de panier. Les branchies n'étant pas externes, un mécanisme particulier permet à l'animal de pomper l'eau par la bouche, de la filtrer et de la rejeter par un spiracle (Duellman et Trueb, 1986).

À défaut de bénéficier d'une description plus précise de

l'histologie des branchies chez les têtards, nous présentons dans les quelques lignes qui suivent l'histologie branchiale des téléostéens. Chez ces poissons, chaque branchie est composée de deux rangées de filaments branchiaux, chacun d'eux sous-tendant plusieurs lamelles. L'arc branchial est couvert de cellules épithéliales pavimenteuses et de cellules muqueuses (Morrison, 1988). Dans la région interlamellaire des filaments, plusieurs cellules à mucus et des cellules acidophiles sont généralement présentes en groupes et débouchent dans une crypte apicale commune. Les cellules muqueuses sécrètent le mucus alors que les cellules acidophiles interviennent dans la régulation osmotique en excrétant les chlorures de sodium et de potassium. Les lamelles branchiales sont tapissées de deux couches de cellules épithéliales entre lesquelles se trouvent quelques cellules muqueuses et de rares cellules acidophiles. Cet épithélium est limité par une membrane basale et est supporté par des cellules en pilastre formant un réseau d'anastomoses à l'intérieur duquel circule le sang.

Mentionnons ici que les observations qui ont été faites chez les têtards et qui seront présentées dans les résultats montrent, contrairement aux poissons, un arrangement structural asymétrique des filaments branchiaux. Cette constatation est venue restreindre la diversité des mesures concernant les affections branchiales potentiellement causées par le cadmium.

## CHAPITRE III

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les expérimentations se sont échelonnées sur deux étés consécutifs. A l'été 1990, un test exploratoire et un test d'exposition sublétales ont été effectués alors que l'année suivante étaient réalisés un test léthal ainsi qu'un second test d'exposition sublétales.

#### 3.1 Animaux et médium chimique

Des têtards de grenouille verte (*R. clamitans*) ont été capturés aux printemps 1990 et 1991 dans un plan d'eau des environs de Trois-Rivières. Ce petit lac, formé dans une sablière abandonnée, est maintenu en eau par l'affleurement de la nappe phréatique et alimenté par la pluie et la fonte des neiges. Selon l'analyse d'échantillons d'eau par les techniques décrites plus loin, le cadmium n'était pas présent en concentration détectable dans cet étang.

À l'arrivée au laboratoire, les têtards étaient placés dans des bassins de verre (25 cm X 16 cm X 16 cm) contenant 3,5 L d'eau reconstituée. Pour le test exploratoire et le test subléthal effectués à l'été 1990, l'eau reconstituée était préparée selon

la méthode, légèrement modifiée, de Broyles *et al.* (1981) en ajoutant à chaque litre d'eau déionisée les sels suivants : 1,25 g NaCl; 1,25 g KCl; 0,73 g CaCl<sub>2</sub>. Comme un problème de mortalités excessives était survenu lors de ces expérimentations, la préparation d'eau reconstituée utilisée pour les tests subséquents fut modifiée. Ainsi, pour la seconde série d'expérimentations, l'eau reconstituée était préparée selon les recommandations du Carolina Biological Supply Company (Anon.) en incorporant 3,5 g NaCl, 0,05 g KCl, 0,1 g CaCl<sub>2</sub> et 0,2 g NaHCO<sub>3</sub> dans chaque litre d'eau déionisée.

Après une période d'acclimatation de 7 jours en laboratoire, les organismes ont été soumis à des solutions de cadmium préparées en ajoutant du chlorure de cadmium (CdCl<sub>2</sub>) à l'eau reconstituée. Pour les tests réalisés lors du premier été, l'eau était complètement renouvelée tous les deux jours alors que, pour la deuxième série d'expérimentations, la moitié du volume d'eau insalubre de chaque bac était remplacée journallement. Cette modification méthodologique avait été apportée dans le but d'augmenter le taux de survie des organismes: le fait de ne changer que la moitié du volume de solution permettait de ne pas manipuler les têtards pendant cette opération et de réduire le stress subi par les organismes inhérent aux changements physico-chimiques du milieu.

Quotidiennement, les têtards étaient alimentés d'épinards bouillis à raison de 0,5 g/têtard, et les fèces, la nourriture non consommée ainsi que, le cas échéant, les organismes morts étaient retirés des bassins.

Les bassins étaient installés sur un comptoir de métal dont l'eau de la cuvette formée par l'un des côtés était réfrigérée par un système de serpentín. Cette installation permettait de conserver une température d'environ 18 °C aidant à réduire les problèmes de contamination bactériologique dans le milieu aquatique. De plus, les bassins étaient placés sous des conditions de photopériode contrôlée (16h/8h) dans une pièce thermostatée. Dans chacun d'eux, une aération constante était assurée à l'aide de tubes munis de fractionneurs d'air et reliés à une pompe à débit régulier. Les paramètres physico-chimiques (pH, oxygène dissous, température, conductivité) et la teneur en cadmium des solutions étaient déterminés périodiquement selon diverses méthodes (tableau 1). Lorsque cette dernière analyse n'était pas effectuée immédiatement après la prise des échantillons d'eau, ceux-ci étaient préservés en y ajoutant 0,5 mL d'acide nitrique concentrée ( $\text{HNO}_3$ ) par 100 mL de solution.

Tableau 1

Paramètres physico-chimiques mesurés et méthodes utilisées.

PARAMÈTRE	MÉTHODE ET PRÉCISION	
	TEST EXPLORATOIRE TEST SUBLÉTAL #1	TEST LÉTAL TEST SUBLÉTAL #2
Température	Hydrolab modèle Surveyor II ( $\pm 0,025$ °C)	pH mètre Modèle HI8424 ( $\pm 0,5$ °C)
pH	Hydrolab modèle Surveyor II ( $\pm 0,005$ unité pH)	pH mètre Modèle HI8424 ( $\pm 0,005$ unité pH)
Conductivité	Hydrolab modèle Surveyor II ( $\pm 0,005$ mMho/cm)	Conductivimètre YSI Modèle 33 ( $\pm 0,05$ mMho/cm)
Oxygène dissous	Hydrolab modèle Surveyor II ( $\pm 0,005$ mg/L)	Oxymètre ( $\pm 0,05$ mg/L)
Saturation en oxygène dissous	Nomogramme (Wetzel, 1983) ( $\pm 0,5\%$ )	Nomogramme (Wetzel, 1983) ( $\pm 0,5\%$ )
Concentration en cadmium	Spectrophotomètre d'absorption atomique (SAA) avec flamme Modèle Varian	SAA avec flamme Modèle Varian

### **3.2 Test exploratoire et test léthal**

Afin de choisir les concentrations sublétales auxquelles devaient être exposés les têtards, un test léthal précédé d'un test exploratoire (Anon., 1989) furent réalisés. Le test exploratoire, d'une durée de 96 heures, a été effectué afin de situer de façon approximative la CL50. Cent vingt têtards (tableau 2), à raison de 8 par bassin, étaient exposés à 5 concentrations réparties exponentiellement soit le contrôle et les concentrations de 1, 10, 50 et 100 ppm (mg Cd L<sup>-1</sup>).

Le test léthal permettait ensuite de préciser la valeur de CL50 obtenue. Lors de ce test, 84 têtards (tableau 2), distribués dans 14 bassins, furent exposés pendant 96 heures à sept concentrations réparties algébriquement: le contrôle et les concentrations de 15, 30, 40, 50, 60 et 75 ppm.

### **3.3 Test sublétaux**

Lors du premier test sublétal, d'une durée de 33 jours, 144 têtards (tableau 2) étaient répartis dans 18 bassins et exposés à trois concentrations soit le contrôle, 1 et 5 ppm (environ 2% et 10% de la CL50-24 heures, respectivement).

Tableau 2

Masse et stade de développement des têtards utilisés dans les tests létaux et sublétaux.

TEST	n	Masse (g) (moyenne ± écart type)	Stade de développement (moyenne ± écart type) <sup>a</sup>
Exploratoire <sup>b</sup>	120	2,79 ± 0,57	36,4 ± 2,4
Létal <sup>c</sup>	84	4,82 ± 1,49	39,1 ± 2,6
Sublétal #1 <sup>b</sup>	144	2,79 ± 0,55	36,2 ± 2,5
Sublétal #2 <sup>d</sup>			
Exposition 15 jours	30	2,86 ± 1,03	38,2 ± 5,1
Exposition 25 jours	20	2,40 ± 1,29	33,7 ± 4,1

<sup>a</sup>Principales étapes du développement correspondant aux stades définis par Gosner (1960):

Stades 1 à 21:	Phase embryonnaire
22 à 25:	Régression des branchies externes
26 à 30:	Apparition et progression des bourgeons des membres postérieurs
31 à 35:	Délimitation graduelle de l'ébauche des 5 doigts
36 à 38:	Différenciation et allongement des doigts
39:	Apparition de tubercules subarticulaires aux doigts
40:	Doigts avec tubercules subarticulaires évidents et pièce cloacale encore présente
41:	Disparition de la pièce cloacale
42:	Émergence des membres avant
43 à 45:	Développement graduel de la bouche

<sup>b</sup>Masse et stade de développement mesurés après la période d'acclimatation sur tous les individus.

<sup>c</sup>Masse et stade de développement mesurés à la fin du test sur les témoins seulement (n = 12).

<sup>d</sup>Masse et stade de développement mesurés à la fin du test sur tous les individus.

À trois périodes soit après 24 heures, 15 jours et à la fin de l'exposition, des têtards étaient sacrifiés afin de recueillir le matériel biologique nécessaire aux analyses histologiques et hématologiques. Les têtards étaient d'abord anesthésiés dans une solution de tricaine méthanesulfonate (MS-222) (Sigma Chemical Co.) 1% p/v pendant environ 3 minutes. La masse et le stade de développement (Gosner, 1960) des têtards étaient déterminés. On pratiquait ensuite une ponction cardiaque avec un capillaire contenant 5  $\mu$ L d'héparine, un anticoagulant, afin de recueillir quelques dizaines de  $\mu$ L de sang. Un frottis était immédiatement préparé, séché à l'air puis coloré par l'application de la méthode histochimique de Wright et le reste de l'échantillon sanguin servait à la détermination de la valeur d'hématocrite et à la numération des globules rouges. Les tissus (branchies, foie et reins) servant aux analyses histologiques ont ensuite été prélevés et fixés dans une préparation de formol 10%.

Lors du deuxième test sublétal, 2 réplicats de 5 têtards (tableau 2) étaient exposés pendant 15 jours à chaque concentration de cadmium: le témoin, 1 et 5 ppm (total de 30 têtards). De plus, une expérience était réalisée parallèlement dans le but d'évaluer l'évolution temporelle des affections. Vingt têtards (tableau 2) étaient placés dans 4 bassins contenant une solution de 1 ppm et cinq têtards, choisis aléatoirement, ont été retirés aux jours 5, 10, 20 et 25.

À la fin de chaque période d'exposition, on procédait à l'anesthésie, à la détermination du stade de développement et à la pesée des têtards tel que décrit précédemment. Une ponction cardiaque était ensuite effectuée avec un capillaire ne contenant pas d'anticoagulant et un frottis était réalisé, séché à l'air puis coloré par l'application de la procédure tinctoriale de Wright. Lors du premier test, l'utilisation de tubes avec anticoagulant avait fourni des globules rouges à morphologie affectée. On prélevait ensuite les tissus servant à l'analyse des concentrations tissulaires de cadmium: le foie sans la vésicule biliaire, les reins, le tractus digestif et une portion des muscles caudaux. Chaque partie du têtard ainsi que les restes étaient placés individuellement dans des éprouvettes préalablement pesées. Le poids frais de chaque partie était déterminé puis les tubes étaient séchés à 105 °C (Smiley et Kessler, 1979) pendant environ 24 heures et pesés de nouveau afin de déterminer le poids sec.

### **3.3.1 Paramètres hématologiques**

#### **3.3.1.1 Morphologie érythrocytaire**

Selon une méthode adaptée de Matson (1990), pour chaque individu, la longueur (A) et la largeur (B) de 50 érythrocytes, choisis aléatoirement, ont été mesurées à l'aide d'une règle micrométrique oculaire lors de l'observation au

microscope photonique. L'aire de chaque cellule ( $\mu\text{m}^2$ ) a été calculée en utilisant l'équation (1) de l'ellipse où a et b représentent respectivement les demi-axes majeur et mineur.

$$\text{Aire} = \pi ab = \pi \frac{A}{2} \frac{B}{2} \quad (1)$$

Le rapport de ces mesures (A/B) permettait de quantifier la forme des cellules (indice d'excentricité).

### 3.3.1.2 Formule sanguine

Pour déterminer les proportions relatives de leucocytes, de thrombocytes et d'érythrocytes, 500 cellules ont été identifiées et catégorisées dans ces trois grands groupes en parcourant le frottis sanguin. Lors de cette classification, les érythrocytes étaient affectés dans trois sous-groupes: les érythrocytes matures, les érythroblastes et les érythrocytes en dégénérescence. L'appellation d'érythroblaste regroupe toutes les formes d'érythrocytes immatures décrites à la section 2.2.1. Les érythroblastes se reconnaissent, selon la description faite par Szubartowska et al. (1990), à leur forme arrondie, à leur cytoplasme basophile et à leur noyau proéminent alors que les érythrocytes en dégénérescence étaient identifiés par leur allure plissée et rabougrie. Par la suite, 100 leucocytes étaient classifiés dans leur catégorie respective (lymphocytes, monocytes, neutrophiles, éosinophiles ou basophiles) selon les descriptions faites par Rouf (1969) et Jordan (1965). Dans le

cadre de notre étude, nous avons regroupé les différentes catégories de précurseurs de leucocytes observés sur les frottis sanguins par la dénomination de progranulocyte. De plus, on notait la présence ou l'absence de cellules en mitose en parcourant une fois, transversalement, la lame du frottis sanguin.

#### 3.3.1.3 Valeur d'hématocrite

Le capillaire contenant le sang de l'animal était centrifugé puis on mesurait la proportion volumique relative qu'occupent les globules rouges dans le sang (en mm/mm). Cette valeur était ensuite corrigée pour enlever l'effet de dilution de l'anticoagulant.

#### 3.3.1.4 Numération des érythrocytes

Pour effectuer la numération des érythrocytes, 20  $\mu\text{L}$  de sang étaient mis en suspension dans 10 mL de solution diluante, déjà préparée et calibrée dans les contenants Unopettes®. L'intromission de cette suspension dans un hématimètre Spencer permettait d'évaluer la concentration de cellules sanguines par unité de volume de solution. La moyenne de deux réplicats était ensuite exprimée en terme de nombre de globules rouges par  $\mu\text{L}$  de sang.

### 3.3.2 Histologie

Les pièces histologiques du foie, des reins et des branchies étaient déshydratées, paraffinées, coupées au microtome en sections d'environ 5  $\mu\text{m}$  puis montées sur des lames de microscopie. Elles étaient ensuite colorées au HPS (Hémalun-Phloxine-Safran) selon la procédure généralement employée au laboratoire de pathologie du Centre hospitalier Sainte-Marie de Trois-Rivières (annexe I).

#### 3.3.2.1 Histologies hépatique et rénale

Les pathologies hépatiques et rénales ont été diagnostiquées en collaboration avec le Dr Rogath Gagnon, pathologiste et professeur de biologie médicale au département de chimie-biologie de l'Université du Québec à Trois-Rivières. Cent quarante coupes histologiques, à raison de 10 par concentration et par période (à l'arrivée au laboratoire + 3 concentrations X 2 périodes) pour le foie et les reins, ont été colorées au HPS. Afin de préciser les causes d'affections notées suite à une première série d'observations, des techniques histochimiques supplémentaires, appliquées sur une trentaine d'individus, sont venues compléter les colorations au HPS. Une analyse fluoroscopique, effectuée sur chaque coupe, constituait également une aide diagnostique puisque certains constituants chimiques ou biologiques (groupes de composés,

bactéries, etc.) présentent des caractéristiques d'auto-fluorescence.

La méthode à l'acide périodique-Schiff (APS), dont la procédure est présentée à l'annexe I, permettait de révéler la présence de composés appartenant aux groupes des mucoprotéines neutres et des polysaccharides comme le glycogène (Canter et Jollès, 1969). La réaction à l'APS précédée d'une digestion au moyen de la diastase du malt, une enzyme dégradant le glycogène, permettait de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse de la présence de glycogène par comparaison avec des coupes n'ayant pas subi l'action de la préparation enzymatique. La coloration à l'huile rouge O, réalisée à partir d'échantillons fixés au formol puis congelés et coupés au microtome à congélation, permettait de révéler l'accumulation de lipides (Hould, 1984). De plus, des colorations Gram (Case et Johnson, 1984) effectuées sur quelques individus permettaient de détecter la présence de bactéries dans les tissus.

#### 3.3.2.2 Histologie branchiale

L'analyse histologique des branchies devait comporter le dénombrement des cellules acidophiles et des cellules à mucus ainsi que la mesure de l'épaisseur épithéliale au niveau des lamelles branchiales. Toutefois, l'organisation et l'implantation des lamelles présentaient, contrairement à la

morphologie branchiale généralement observée chez les poissons (Bertin, 1958; Morrison, 1988), un aspect plutôt irrégulier et asymétrique. Or, comme les cellules acidophiles et à mucus n'étaient présentes en nombre suffisant qu'au niveau des lamelles et comme leur quantification requérait une mesure de longueur d'épithélium, ces paramètres furent abandonnés. Cependant, nous avons conservé la mesure de l'épaisseur de l'épithélium qui a été prise sur les filaments plutôt que sur les lamelles secondaires.

L'épaisseur de l'épithélium fut mesuré à des intervalles d'environ 0,2 mm à l'aide d'une échelle micrométrique oculaire. Cent mesures ont été effectuées sur plusieurs filaments branchiaux différents pour cinq têtards par concentration et par période. Ce paramètre mesurait, perpendiculairement aux filaments, la distance entre la membrane basale et la limite extérieure des cellules épithéliales.

### **3.3.3 Analyses des concentrations tissulaires de cadmium**

Les échantillons de tissu à analyser ont été digérés en ajoutant 2 mL de HNO<sub>3</sub> concentrée dans chaque éprouvette sauf dans le cas des gros échantillons tels les restes corporels pour lesquels le volume d'acide ajouté était doublé. Après une digestion partielle d'environ 24 heures, les résidus graisseux étaient oxydés en ajoutant 1 mL de peroxyde d'hydrogène 30% et

la digestion était complétée en chauffant les tubes dans un bain-marie jusqu'à ce que les solutions deviennent limpides (Borg et al., 1981). Les solutions étaient ensuite diluées avec de l'eau distillée dans un volume de 10 mL, précisé en déterminant la densité de la solution et sa masse totale. Toutes ces étapes étaient effectuées directement dans les éprouvettes initiales afin de réduire les risques de contamination lors des manipulations. Pour chaque série d'échantillons, l'absence de cadmium dans les solutions de digestion et de dilution utilisées (HNO<sub>3</sub> + peroxyde + eau distillée) était vérifiée.

Les analyses de teneurs en cadmium ont été faites à l'aide d'un appareil de spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) avec flamme (modèle Varian) selon la méthode de la courbe standard. Les échantillons dont la concentration était sous la limite de détection pour cet appareil ont été analysés avec un appareil de SAA sans flamme muni d'un four au graphite et d'un système de correction de bruit de fond au deutérium.

#### **3.3.4 Facteur de bioconcentration**

Pour chaque période d'exposition, le facteur de bioconcentration moyen fut calculé selon la formule donnée par Taylor (1983):

$$\text{Facteur de bioconcentration (FBC)} = \frac{CE - CT}{CS}$$

où CE et CT représentent respectivement les concentrations de cadmium (exprimées en poids frais) dans les têtards exposés au cadmium et dans les têtards témoins alors que CS est la concentration de cadmium dans la solution.

### **3.4 Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel de traitements statistiques SPSS (Statistical Package for Social Science) (Nei *et al.*, 1975). L'analyse probit (Finney, 1971) était utilisée pour déterminer la concentration létale (CL50). Les autres analyses effectuées comprennent des régressions linéaires, des tests d'égalité des moyennes (ANOVA ou test de Kruskal-Wallis) suivis de tests de comparaisons multiples (test de Student-Newman-Keuls), des corrélations de Pearson et des analyses discriminantes (Zar, 1984; Legendre et Legendre, 1984). Avant l'utilisation de tests paramétriques, nous avons vérifié la normalité des variables par un test de Kolmogorov-Smirnov. De plus, l'homocédasticité des variables, prémisses de l'utilisation de l'analyse de variance (ANOVA), était vérifiée par le test de Bartlett. Les résultats étaient considérés comme significatifs lorsque  $P \leq 0,05$ .

## CHAPITRE IV

### RÉSULTATS

#### 4.1 Caractéristiques physico-chimiques des solutions

Les caractéristiques physico-chimiques des solutions, enregistrées pendant les tests létaux et sublétaux, sont présentées au tableau 3. Les données montrent une augmentation de la basicité de 5,6 - 5,9 unités pH à 8,0 - 8,4 unités pH entre les expérimentations réalisées à l'été 1990 et celles effectuées à l'été 1991. La teneur en oxygène dissous et le pourcentage de saturation en oxygène montrent également une augmentation de leurs valeurs entre les deux séries d'expérimentations.

La température moyenne enregistrée lors des tests exploratoire et sublétal #1 (18,4 et 19,1 °C) était légèrement plus élevée comparativement aux tests réalisés à l'été suivant (17,4 et 18,2 °C) alors que la conductivité moyenne semble relativement constante (de 5,7 à 6,2 mMho cm<sup>-1</sup>).

Des tests d'égalité des moyennes suivis de tests de comparaisons multiples (Student-Newman-Keuls) ont été effectués afin de vérifier la constance des caractéristiques physico-chimiques des solutions contenues dans les différents bassins

Tableau 3

Caractéristiques physico-chimiques des solutions lors des tests létaux et sublétaux.

TEST	Température (°C)	pH	Conductivité (mMho cm <sup>-1</sup> )	O.D. <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	SAT-O.D. <sup>a</sup> (%)
Exploratoire <sup>b</sup>	18,4 ± 0,3 (27)	5,6 ± 0,1 (27)	6,2 ± 1,7 (27)	4,1 ± 0,8 (25)	43,2 ± 9,0 (25)
Létal <sup>c</sup>	17,4 ± 0,5 (56)	8,0 ± 0,1 (56)	6,2 ± 0,2 (42)	7,3 ± 1,0 (27)	75,5 ± 10,6 (27)
Subléta1 #1 <sup>b</sup>	19,1 ± 1,0 (144)	5,9 ± 0,2 (144)	6,1 ± 0,3 (144)	4,8 ± 0,8 (144)	51,3 ± 7,9 (144)
Subléta1 #2 <sup>c</sup>	18,2 ± 0,9 (94)	8,4 ± 0,2 (94)	5,7 ± 0,5 (94)	8,3 ± 0,8 (78)	87,8 ± 8,6 (78)

Moyennes ± écarts types (n).

<sup>a</sup>Abréviations: O.D.: Oxygène dissous; SAT-O.D.: Saturation en oxygène dissous.

<sup>b</sup>Eau reconstituée préparée selon la méthode de Broyles *et al.* (1981).

<sup>c</sup>Eau reconstituée préparée selon la méthode du Carolina Biological Supply Company (Anon.).

lors d'une expérimentation donnée. Des différences significatives ont été observées dans seulement un cas: lors du test sublétal #1, le bassin 18 présentait une conductivité significativement différente des autres bassins. Les données issues de ce bassin n'ont cependant pas été écartées puisque cet écart n'était pas observé pour les 4 autres paramètres.

Le tableau 4 montre les concentrations moyennes de cadmium mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique avec flamme par rapport aux concentrations attendues. Les deux séries de valeurs correspondent assez bien avec un écart maximal de 20% dans le cas des solutions de 1 ppm des tests exploratoire et sublétal #1.

## **4.2 Concentration létale (CL50)**

### **4.2.1 Test exploratoire**

L'analyse probit effectuée sur les données du test exploratoire après 96 heures d'exposition donne une valeur de CL50 grossièrement estimée à 31,7 ppm (I.C. 95% = 21,6-43,6).

L'écart entre les concentrations utilisées lors de ce test se reflète dans le patron de mortalités enregistrées. Déjà après 48 heures, tous les têtards exposés à 100 ppm étaient morts.

Tableau 4

Concentrations de cadmium calculées et mesurées dans les solutions pendant les différents tests.

TEST	CONCENTRATION		
	CALCULÉE (ppm)	MESURÉE (ppm)	(n)
Exploratoire	0	0	(2)
	1	0,8 ± 0,1	(2)
	10	9,2 ± 0,2	(2)
	50	48,9 ± 0,7	(2)
	100	91,4	(1)
Létal	0	0	(2)
	15	14,3 ± 0,2	(2)
	30	28,4 ± 0,5	(2)
	40	36,1 ± 1,1	(2)
	50	47,8 ± 0,9	(2)
	60	54,3 ± 0,7	(2)
	75	72,5 ± 0,9	(2)
Sublétal #1	0	0	(8)
	1	0,8 ± 0,1	(6)
	5	4,6 ± 0,2	(9)
Sublétal #2	0	0	(5)
	1	1,0 ± 0,2	(6)
	5	4,7 ± 0,8	(5)

Après 96 heures, la moitié des individus exposés à 50 ppm étaient morts alors que les autres montraient des signes importants de détérioration (dépigmentation, perte de motilité). À cette période, seulement 3 létalités étaient enregistrées chez les têtards exposés à 10 ppm alors que les témoins et les individus exposés à 1 ppm étaient tous vivants et semblaient s'alimenter normalement.

#### **4.2.2 Test létal**

Les résultats des analyses probit du test létal, présentés au tableau 5, montrent que la CL50, pour les têtards de grenouille verte exposés au cadmium, passe de 51,9 ppm à 29,0 ppm après 24 et 96 heures d'exposition respectivement. La diminution rapide de la valeur de CL50 pendant les deux premiers jours traduit l'évolution du nombre de mortalités qui fut maximal après 24 heures et 48 heures d'exposition (27 et 23 mortalités respectivement) alors que seulement 5 létalités furent enregistrées pour les deux autres périodes. Après 96 heures d'exposition, aucun têtard n'avait survécu aux concentrations de 75, 60, 50 et 40 ppm alors qu'ils étaient tous vivants dans les bassins ne contenant que de l'eau reconstituée (témoins) ou 15 ppm de cadmium. La concentration de 30 ppm était intermédiaire avec un décompte de 7 mortalités parmi les douze têtards exposés.

Tableau 5

Concentration létale (CL50) pour les têtards de grenouille verte (*Rana clamitans*) et différentes espèces d'anoures exposés au cadmium.

Espèce et stade de développement	CL50 (I.C. 95%) <sup>a</sup> en ppm selon la durée de l'exposition			
	24 h	48 h	72 h	96 h
<i>Rana clamitans</i> <sup>b</sup> Têtards (4,82 g)	51,9 (44,4-62,2)	31,4 (25,0-36,0)	28,2 (21,8-32,5)	29,0 (18,8-32,0)
<i>Microhyla ornata</i> <sup>c</sup> Têtards (âge 1 sem.)	2,62 (2,4-2,8)	2,48 (2,0-2,8)	1,96 (1,8-2,2)	1,58 (1,4-1,8)
Têtards (âge 4 sem.)	2,78 (2,4-3,0)	2,66 (2,2-2,8)	2,23 (1,8-2,6)	1,81 (1,4-2,0)
<i>Bufo melanostictus</i> <sup>d</sup> Têtards (0,1 g)	22,42 (20,19-24,3)	19,81 (17,39-29,15)	11,91 (9,99-13,95)	8,18 (6,96-9,53)
<i>Rana cyanophlyctis</i> <sup>e</sup> Mâles adultes (12,9 g)	---	250,0 (241,8-258,4)	146,0 (254,5-266,5)	75,0 (70,0-80,3)
Femelles adultes (22,7 g)	---	200,0 (179,5-222,8)	192,0 (177,2-208,0)	56,6 (51,9-61,6)

<sup>a</sup>Pour *Microhyla ornata*, les données entre parenthèses représentent l'étendue.

<sup>b</sup>Résultats du test létal de la présente étude.

<sup>c</sup>Jayaprakash et Madhyastha (1987).

<sup>d</sup>Khangarot et Ray (1987)

<sup>e</sup>Mudgal et Patil (1985).

Les valeurs de concentration létale pour *R. clamitans* sont supérieures aux valeurs retrouvées dans la littérature pour des têtards d'autres espèces mais sont largement inférieures aux valeurs de CL50 obtenues chez des amphibiens adultes exposés au cadmium (tableau 5).

#### **4.3 Mortalités lors des tests sublétaux**

Lors du test sublétal #1, un taux élevé de mortalités (18,3%), réparties uniformément entre les concentrations, est survenu chez les têtards pendant toute la durée de l'exposition (33 jours). Les premières mortalités ont été observées au premier jour d'exposition et se sont poursuivies jusqu'au 25e jour de façon assez régulière (figure 1). Lors du deuxième test sublétal, aucune mortalité ne fut enregistrée. Cependant, quelques signes discrets de détérioration furent constatés chez les individus exposés à 5 ppm; ceux-ci semblaient s'alimenter moins que leurs congénères, et quelques-uns présentaient une légère dépigmentation de la peau.

#### **4.4 Paramètres sanguins**

Les données prises à partir des frottis sanguins réalisés lors du premier test sublétal n'ont pas été conservées puisque

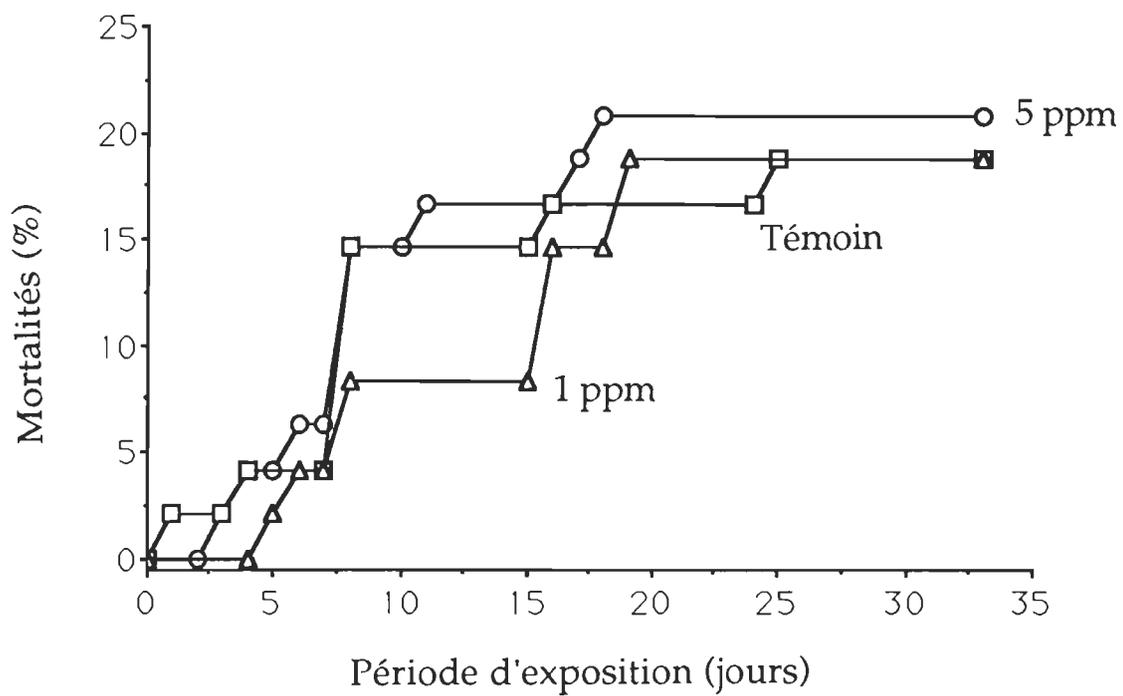


Fig. 1. Mortalités enregistrées lors du test subléthal #1 chez les têtards exposés au cadmium pendant 33 jours.

l'intégrité morphologique des globules rouges a été affectée chez tous les groupes y compris le groupe témoin par un facteur que nous n'avons pu mettre en évidence. Les données concernant la détermination des valeurs d'hématocrite et la numération des érythrocytes lors du premier test ont toutefois été retenues. Les descriptions cellulaires ainsi que les résultats de la morphométrie érythrocytaire et de la formule sanguine correspondent donc aux données recueillies lors du deuxième test sublétal alors que les valeurs d'hématocrite et les données de numération des érythrocytes proviennent du premier test sublétal.

#### 4.4.1 Description des cellules hématologiques

##### 4.4.1.1 Érythrocytes

Les érythrocytes observés (50/individus) dans le sang des têtards témoins de *R. clamitans* (n=10; stade selon Gosner =  $38,6 \pm 5,4$ ; masse =  $3,16 \pm 1,25$  g) sont elliptiques avec un axe majeur mesurant en moyenne  $20,1 \pm 1,0$   $\mu\text{m}$  et un axe mineur de  $12,9 \pm 1,0$   $\mu\text{m}$ . La surface érythrocytaire couvre  $202,8 \pm 18,4$   $\mu\text{m}^2$  avec un indice d'excentricité moyen de  $1,58 \pm 0,16$ . Leur cytoplasme est légèrement éosinophile alors que le noyau, situé généralement au centre de la cellule, se colore en bleu foncé suite à l'application de la méthode histochimique de Wright (figure 2). Les rares érythroplastides observés, outre

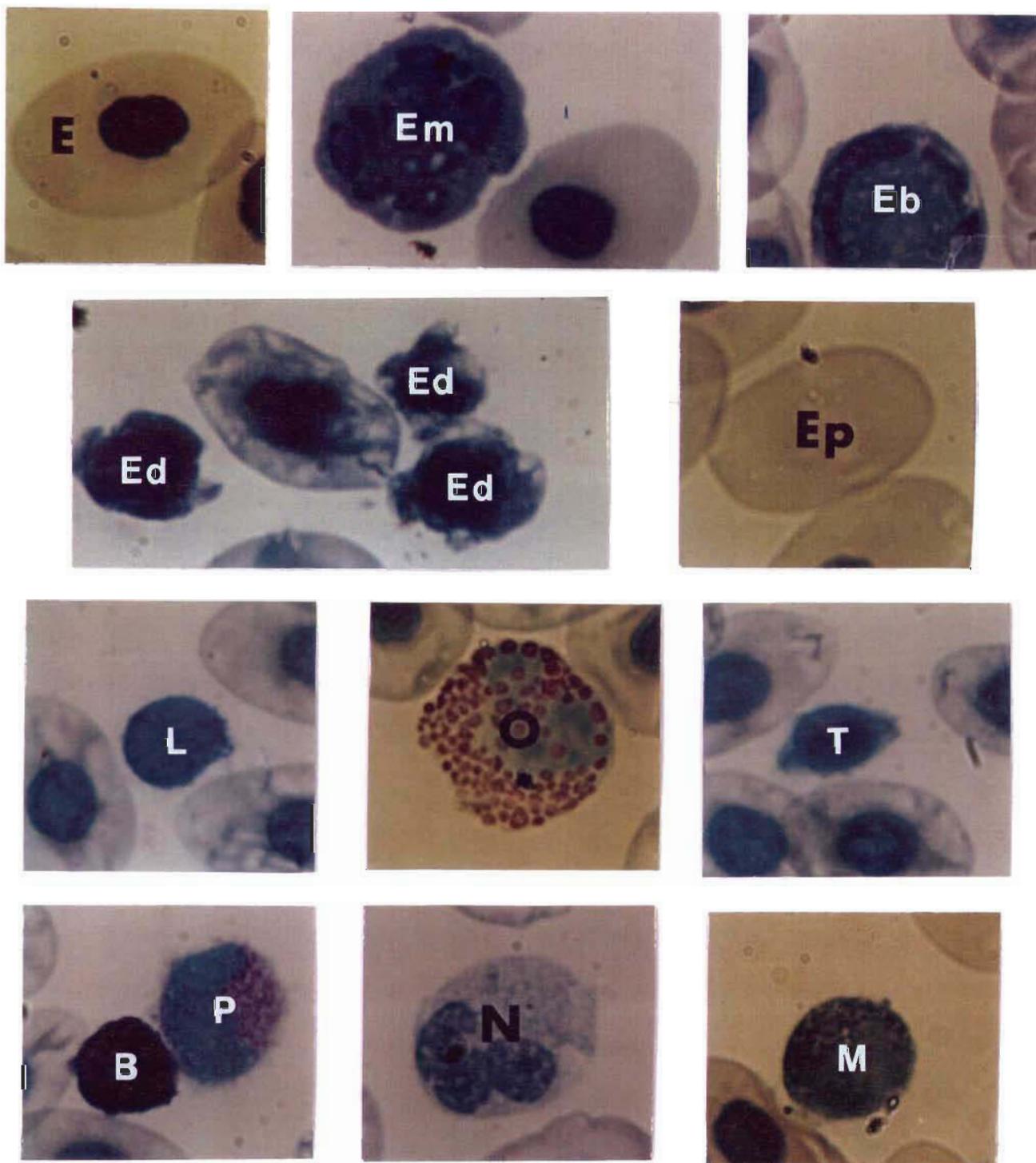


Fig. 2. Cellules hématologiques des têtards de grenouille verte: Érythroblaste (Eb), Érythroblaste en mitose (Em), Érythrocyte (E), Érythrocyte en dégénérescence (Ed), Érythroplastide (Ep), Basophile (B), Éosinophile (O), Lymphocyte (L), Monocyte (M), Neutrophile (N), Progranulocyte (P), Thrombocyte (T). Coloration de Wright (1000 X).

le fait qu'ils étaient anucléés, possédaient les mêmes caractéristiques que les érythrocytes. Les érythroblastes étaient caractérisés par leur forme arrondie, leur cytoplasme basophile et leur noyau plus volumineux que celui des érythrocytes matures. Outre ces cellules, des érythroblastes en mitose et des érythrocytes en dégénérescence ont également été observés chez certains individus (figure 2).

#### 4.4.1.2 Leucocytes

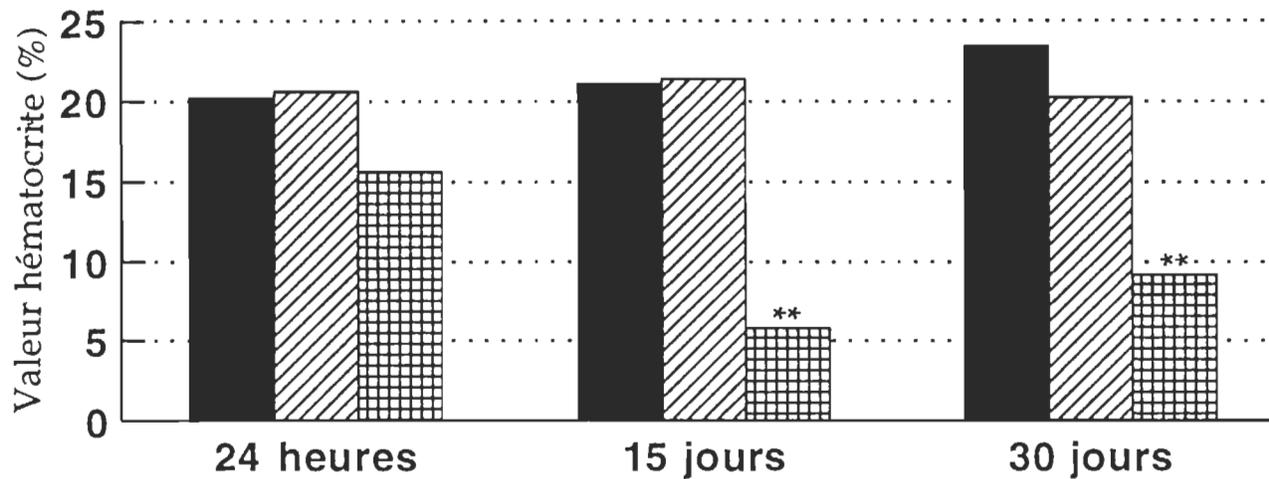
Les lymphocytes observés chez les têtards de grenouille verte ressemblent généralement à de petites sphères possédant un noyau proéminent entouré d'une mince couche de cytoplasme basophile (coloré en bleu foncé sous l'action du colorant de Wright). Les monocytes ont l'apparence de gros lymphocytes mais possèdent un cytoplasme finement granulaire avec un noyau réniforme et excentrique occupant environ la moitié de la cellule. Quant aux éosinophiles, ils possèdent un noyau polymorphe, difficilement visible sous les granules éosinophiles sphériques contenus dans le cytoplasme. Les basophiles sont de petites cellules dont le noyau, masqué par les nombreux granules bleus ou violets, est indistinguable. Les neutrophiles possèdent un noyau polylobé, habituellement excentrique, avec un cytoplasme contenant de très fins granules neutrophiles (figure 2).

#### 4.4.1.3 Thrombocytes

Les thrombocytes ont l'apparence de petits lymphocytes légèrement modifiés: leur noyau est de forme ovoïde et plus condensé, leur cytoplasme leur donne généralement une allure fusiforme. La coloration de Wright leur confère une couleur cytoplasmique bleu pâle et une couleur nucléique bleu foncé. Les thrombocytes forment quelques fois des amas sur les frottis, conséquence de leur fonction dans la coagulation (figure 2).

#### 4.4.2 Valeur d'hématocrite

La figure 3 présente les valeurs d'hématocrite obtenues chez les têtards après 24 heures, 15 jours et 33 jours d'exposition à 0, 1 et 5 ppm. Chez les témoins, les moyennes des valeurs d'hématocrite se situent autour de 20%. Aucune différence significative n'a été notée entre les groupes après 24 heures d'exposition. Cependant, aux deux autres périodes, le cadmium provoquait une diminution significative (ANOVA;  $P < 0,01$ ) de la valeur d'hématocrite chez les têtards exposés à 5 ppm.



	24 heures	15 jours	30 jours
Témoin	20,2 ± 4,2 (8)	21,1 ± 4,8 (6)	23,4 ± 7,2 (9)
1 ppm	20,6 ± 2,7 (6)	21,4 ± 6,9 (7)	20,2 ± 7,6 (9)
5 ppm	15,6 ± 2,1 (4)	5,8 ± 0,5 (5)	9,2 ± 2,2 (9)

\*\*P < 0,01



Fig. 3. Valeur d'hématocrite chez les têtards exposés au cadmium pendant 24 heures, 15 jours et 33 jours. Moyennes ± écarts types (n).

#### 4.4.3 Numération des érythrocytes

Le dénombrement des érythrocytes effectué chez les témoins après 24 heures d'exposition donne une moyenne et un écart type de  $315\,160 \pm 39\,450$  cellules/ $\mu\text{L}$  (n=5).

Après 15 jours d'exposition, les quelques données de numération érythrocytaire (cellules/ $\mu\text{L}$ ) obtenues s'échelonnent de  $281\,700 \pm 65\,350$  (n=4) chez les témoins, à  $202\,750 \pm 61\,870$  (n=5) chez les têtards exposés à 1 ppm de cadmium et à  $123\,030 \pm 107\,790$  (n=3) chez les individus exposés à 5 ppm. L'écart type élevé de ce dernier décompte traduit la grande variabilité des valeurs obtenues chez les têtards observés. Parmi ces trois cas, un avait une concentration d'érythrocytes ( $232\,020/\mu\text{L}$ ) qui se situait près des valeurs observées chez les témoins, alors qu'un autre montrait une numération érythrocytaire ( $120\,590/\mu\text{L}$ ) équivalant à environ la moitié des valeurs témoins, tandis que le troisième individu démontrait une défaillance érythrocytaire marquée ( $16\,480/\mu\text{L}$ ).

Compte tenu du faible nombre d'échantillons obtenus, aucune analyse statistique n'a été effectuée sur ce paramètre. De plus, aucune donnée de numération érythrocytaire n'a été prise après 33 jours d'exposition. En effet, le nombre d'échantillons sanguins prélevés adéquatement étant très faible et le volume de sang étant généralement insuffisant pour

réaliser l'analyse de l'hématocrite et la numération des érythrocytes sur le même échantillon, tous les échantillons de sang furent conservés pour déterminer l'hématocrite dans le but d'augmenter le nombre de degrés de liberté des tests statistiques effectués sur ce paramètre.

#### **4.4.4 Morphologie des érythrocytes**

Pour chaque individu, la surface, la longueur, la largeur et l'excentricité érythrocytaires moyens furent calculés à partir des mesures prises sur 50 cellules. Dans un premier temps, des analyses de régression entre ces moyennes et le stade de développement des têtards ont été effectuées pour les individus du groupe témoin dans le but de vérifier les variations naturelles de ces paramètres pendant le développement. Les résultats de ces analyses montrent que la largeur ( $R = -0,83$ ;  $F = 17,13$ ;  $P < 0,05$ ) et l'aire ( $R = -0,68$ ;  $F = 6,79$ ;  $P < 0,05$ ) érythrocytaires moyennes décroissent avec l'évolution du développement (figures 4 et 5: témoin) alors que l'excentricité des érythrocytes ( $R = 0,68$ ;  $F = 6,74$ ;  $P < 0,05$ ) augmente avec l'évolution du développement (figure 6: témoin). La longueur des érythrocytes n'est pas significativement corrélée avec le développement ( $R = 0,08$ ;  $F = 0,06$ ;  $P > 0,05$ ). Ces résultats servaient à choisir l'analyse de variance adéquate (ANOVA avec variable concomitante ou ANOVA avec test de comparaisons multiples) qui allait être utilisée

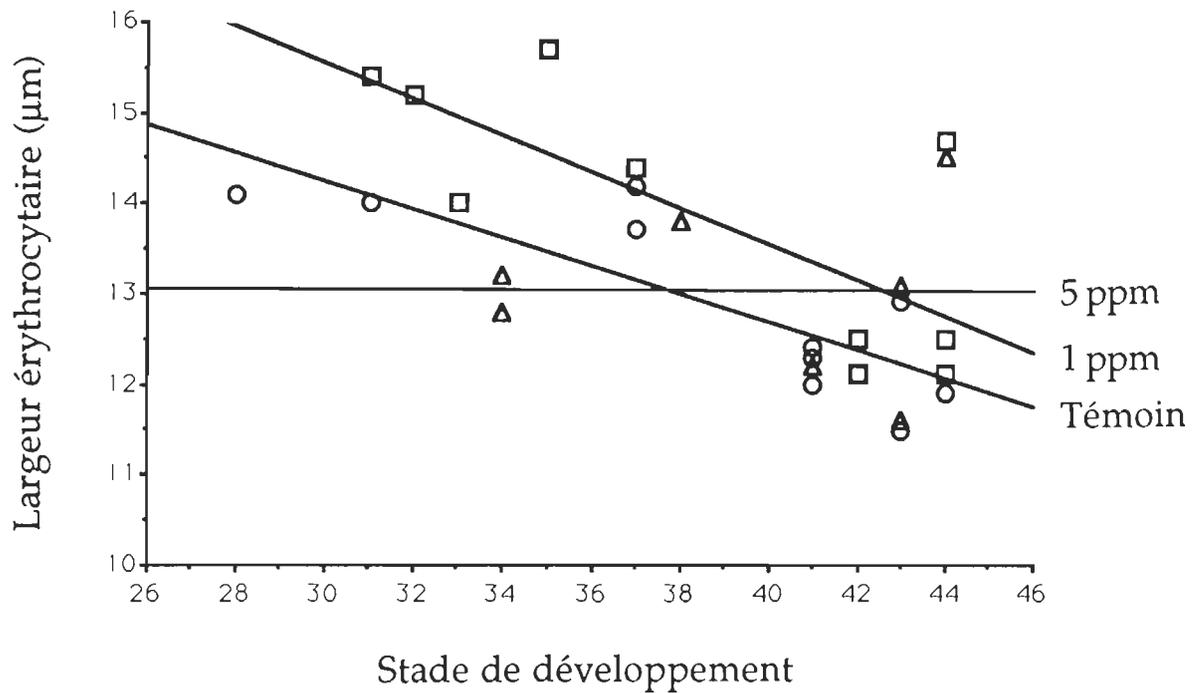


Fig. 4. Corrélation entre la largeur des érythrocytes et le stade de développement des têtards exposés au cadmium pendant 15 jours. Chaque point représente la largeur érythrocytaire moyenne de 50 érythrocytes. Têtards exposés à l'eau reconstituée (○), à 1 ppm (□) et à 5 ppm (▲) de cadmium.

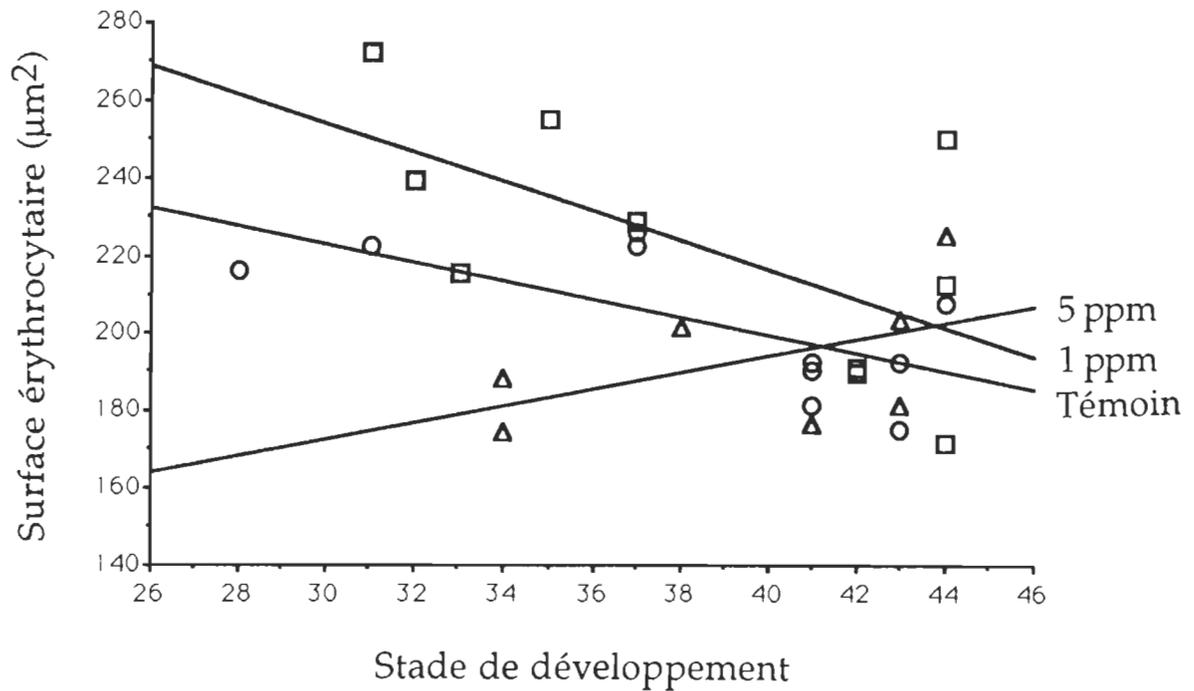


Fig. 5. Corrélation entre la surface des érythrocytes et le stade de développement des têtards exposés au cadmium pendant 15 jours. Chaque point représente la surface érythrocytaire moyenne de 50 érythrocytes. Têtards exposés à l'eau reconstituée (○), à 1 ppm (□) et à 5 ppm (Δ) de cadmium.

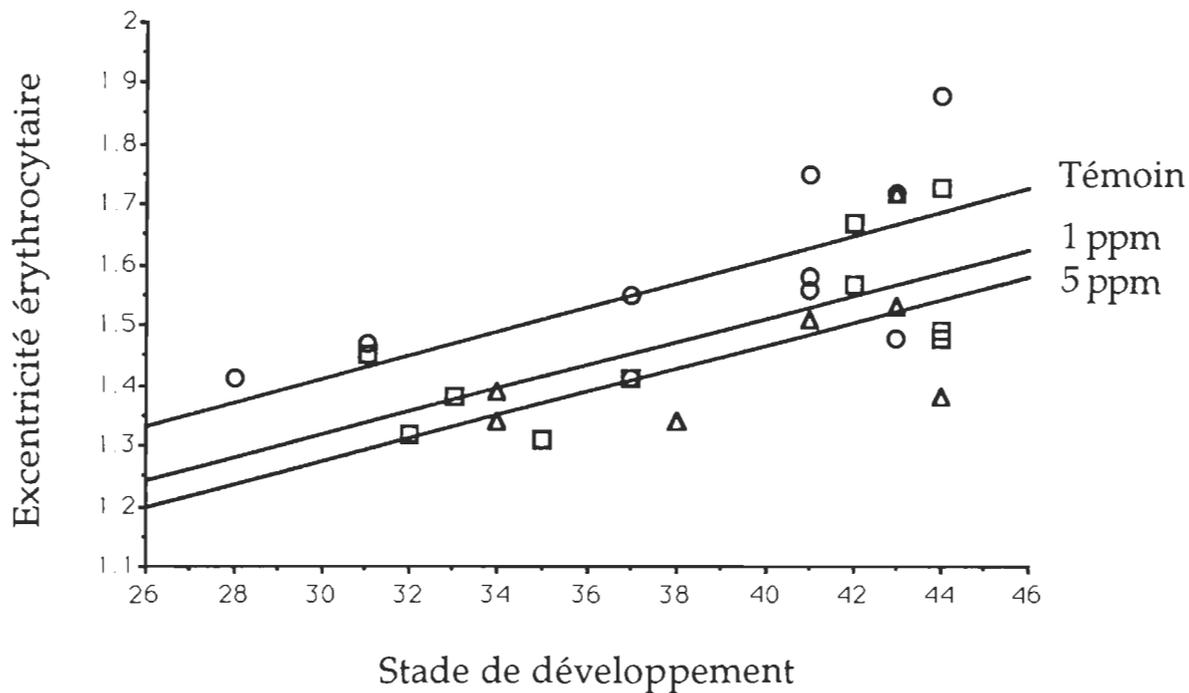


Fig. 6. Corrélation entre l'excentricité des érythrocytes et le stade de développement des têtards exposés au cadmium pendant 15 jours. Chaque point représente le ratio longueur-largeur moyen de 50 érythrocytes. Têtards exposés à l'eau reconstituée (○), à 1 ppm (□) et à 5 ppm (△) de cadmium.

subséquentement pour comparer les groupes d'individus exposés à des concentrations de cadmium différentes.

Un test d'égalité des moyennes (ANOVA) accompagné d'un test de comparaisons multiples (SNK) a été effectué sur les données de longueurs érythrocytaires entre les groupes d'individus exposés au cadmium. Les résultats montrent que les érythrocytes des individus exposés à 5 ppm sont significativement moins longs ( $F=4,37$ ;  $P < 0,05$ ) que ceux des deux autres groupes (tableau 6).

Des analyses de variance incorporant le stade de développement comme variable concomitante ont été effectuées pour évaluer la variation des moyennes de largeur, de surface et d'excentricité érythrocytaires entre les trois groupes d'individus exposés au cadmium (tableau 6). Les résultats montrent que l'exposition au cadmium provoque un arrondissement significatif des érythrocytes ( $F = 3,82$ ;  $P < 0,05$ ) proportionnel à la concentration à laquelle les individus étaient exposés (figure 6). Cependant, les résultats montrent également qu'après avoir enlevé l'effet du stade de développement, l'exposition au cadmium n'altère ni la largeur ( $F = 2,68$ ;  $P > 0,05$ ) ni la surface ( $F = 3,35$ ;  $P > 0,05$ ) des globules rouges.

À l'observation des figures 4 et 5 où sont présentées respectivement les variations de la largeur et de la surface érythrocytaires en fonction du stade de développement, on peut

Tableau 6

Résultats des analyses de variance effectuées entre les paramètres morphologiques des érythrocytes et les concentrations de cadmium.

<u>Variables</u>		Groupes comparés	n	<u>Effet de la concentration</u>		Conclusion
Dépend.	Concom.			F	P	
LONG		T-1-5	27	4,37	0,024	T=1≠5
LARG	STADE	T-1-5	27	2,68	0,090	non sig.
AIRE	STADE	T-1-5	27	3,35	0,053	non sig.
EXCEN	STADE	T-1-5	27	3,82	0,037	sig.
LARG	STADE	T-1	20	4,06	0,060	T=1
AIRE	STADE	T-1	20	6,53	0,021	T≠1

Abréviations: Dépend.: dépendante, Concom.: concomitante, T: groupe témoin, 1: têtards exposés à 1 ppm de cadmium, 5: têtards exposés à 5 ppm de cadmium, sig.: significatif

comprendre pourquoi l'analyse de variance ne peut dégager de tendance globale entre les trois groupes d'individus exposés. En effet, ces représentations graphiques révèlent que, pour chaque paramètre, la droite des individus exposés à 5 ppm ne suit pas la tendance observée entre la droite des témoins et celle des individus exposés à 1 ppm quant à la pente et au déplacement de l'ordonnée à l'origine.

L'analyse de variance avec variable concomitante (stade de développement) a donc été effectuée de nouveau avec la surface et la largeur érythrocytaires en excluant le groupe d'individus exposés à 5 ppm. Les résultats obtenus (tableau 6) montrent qu'il existe une différence significative ( $F = 6,53$ ;  $P < 0,05$ ) entre les témoins et les individus exposés à 1 ppm dans le cas de la surface érythrocytaire seulement.

Les données de variation temporelle de l'indice d'excentricité (figure 7) montrent que l'arrondissement des érythrocytes est plus prononcé au jour 5 (au premier échantillonnage). La forme des globules rouges tend ensuite à se rétablir jusqu'au 15e jour d'exposition environ après quoi elle tend à se stabiliser (20 et 25 jours) sans avoir atteint la normale. Cette stabilisation serait une indication que la différence entre les témoins et les organismes exposés, observée au jour 15, persiste dans le temps.

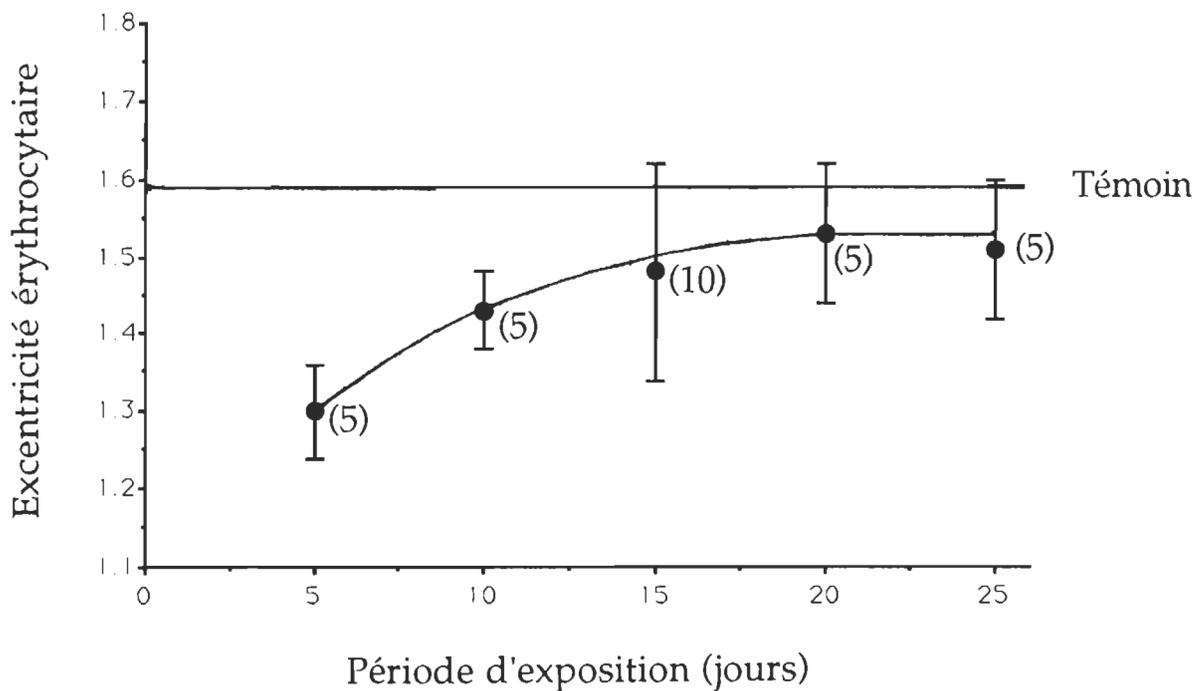


Fig. 7. Variation temporelle de l'excentricité des érythrocytes chez les têtards exposés à 1 ppm de cadmium. • Excentricité moyenne ( $\pm$  écart type) de 50 érythrocytes par têtard calculée pour un groupe d'individus. La ligne horizontale (—) représente l'excentricité érythrocytaire moyenne chez les têtards témoins exposés à l'eau reconstituée pendant 15 jours ( $1,58 \pm 0,16$ ).

Il faut souligner ici que la valeur témoin ne représente qu'un seul groupe de données prises à 15 jours et est considérée comme une moyenne de référence. Cette méthodologie présume une stabilité temporelle des paramètres dans le groupe témoin. Seules des mesures concrètes réalisées aux différentes périodes auraient pu valider cette présomption. Cette remarque prévaut pour toutes les analyses de variation temporelle réalisées sur les paramètres hématologiques.

La variation temporelle de la surface érythrocytaire chez les individus exposés à 1 ppm est représentée à la figure 8. Ces résultats montrent que l'élargissement significatif (tableau 6) des érythrocytes observé à 15 jours entre les témoins et les individus exposés à 1 ppm se manifeste entre le 5e et le 10e jour d'exposition. Cette différence semble persister dans le temps au moins jusqu'au 25e jour.

#### **4.4.5 Formule sanguine**

Des analyses de régression ont été effectuées entre le stade de développement des têtards et les proportions des trois catégories de cellules sanguines soit les érythrocytes, les thrombocytes et les leucocytes chez les individus témoins. Les résultats montrent que les proportions d'érythrocytes ( $R = 0,21$ ;  $P > 0,05$ ), de thrombocytes ( $R = -0,24$ ;  $P > 0,05$ ) et de

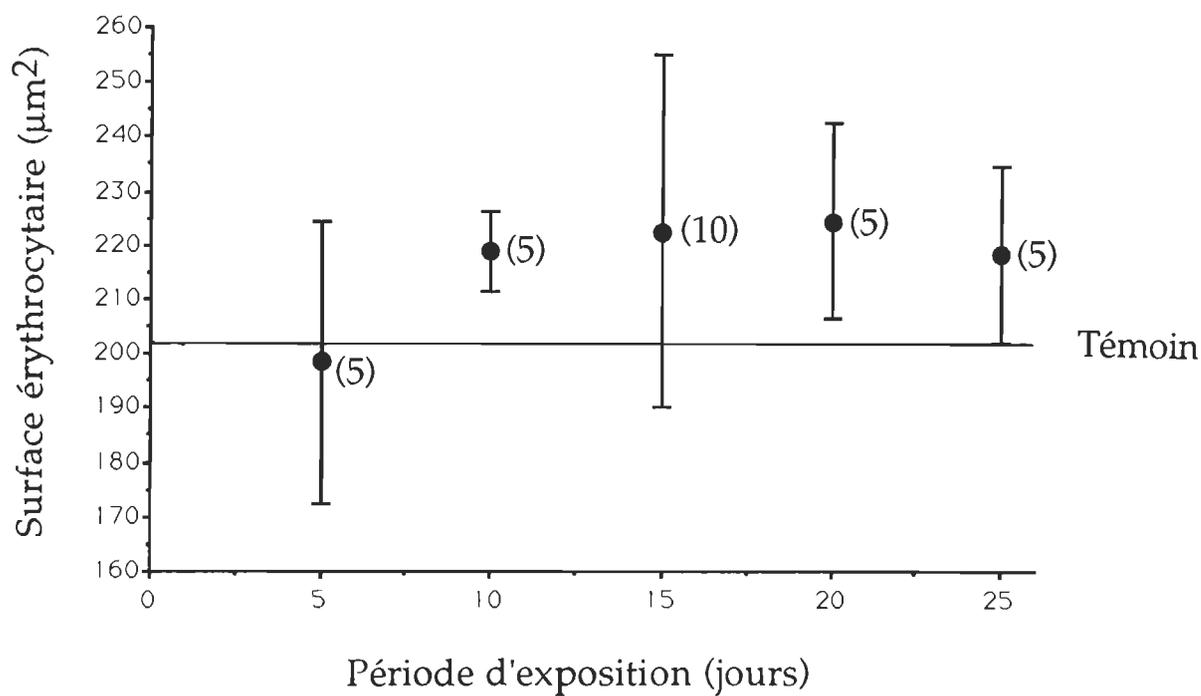


Fig. 8. Variation temporelle de la surface érythrocytaire chez les têtards exposés à 1 ppm de cadmium. • Surface moyenne ( $\pm$  écart type) de 50 érythrocytes par têtard calculée pour un groupe d'individus. La ligne horizontale (—) représente la surface érythrocytaire moyenne chez les têtards témoins exposés à l'eau reconstituée pendant 15 jours ( $202,8 \mu\text{m}^2 \pm 18,4$ ).

leucocytes ( $R = -0,16$ ;  $P > 0,05$ ) n'évoluent pas avec le développement des têtards.

Le tableau 7 présente les proportions relatives des différentes cellules hématologiques identifiées dans le sang des têtards témoins ou exposés au cadmium pendant 15 jours. Chez les témoins, le sang est composé majoritairement d'érythrocytes (95,7%) accompagnés de 1,3% de thrombocytes et de 3,0% de leucocytes. Parmi les érythrocytes, on note une faible proportion d'érythroblastes (1,0%) et d'érythrocytes en dégénérescence (0,2%) alors que les leucocytes sont composés principalement de lymphocytes (87,0% des leucocytes).

Sur chaque paramètre pour lequel le test de Bartlett montrait une homogénéité des variances (LYMPHOS, MONOS, ÉOSINOS), on effectuait une analyse de variance avec test de comparaisons multiples (SNK) alors que le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis était effectué sur les autres paramètres (ÉRYTHROS, BLASTES, DÉGÉS, THROMBOS, LEUCOS, NEUTROS, BASOS, PROGRAS) (voir annexe II pour définitions).

Les résultats de ces analyses montrent que l'exposition au cadmium provoque une augmentation significative (analyse de K-W:  $P < 0,05$ ) de la proportion d'érythrocytes en dégénérescence dans le sang des têtards qui s'élève de 0,2% chez les témoins à 5,3% et 16,6% chez les individus exposés à

Tableau 7

Proportion des cellules hématologiques dans le sang des têtards exposés au cadmium pendant 15 jours. Valeur moyenne et étendue entre parenthèses exprimées en pourcentage.

	TÉMOIN	1 PPM	5 PPM
ÉRYTHROCYTES <sup>a</sup>	95.7	92.3	61.0
BLASTES <sup>b</sup>	1.0 (0-3.9)	6.4 (0-28.7)	9.1 (0.4-51.8)
DÉGÉS <sup>b*</sup>	0.2 (0-0.7)	5.3 (0-13.4)	16.6 (0-60.8)
THROMBOCYTES <sup>a**</sup>	1.3 (0.2-3.4)	2.8 (1.0-7.2)	18.5 (1.5-51.6)
LEUCOCYTES <sup>a</sup>	3.0 (1.8-4.8)	3.9 (1.8-9.4)	20.5 (2.0-55.8)
LYMPHOS <sup>c</sup>	87.0 (79.0-95.0)	82.2 (72.0-91.0)	79.1 (54.0-98.0)
MONOS <sup>c</sup>	1.7 (0.0-3.0)	1.1 (0.0-3.0)	1.0 (0.0-4.0)
ÉOSINOS <sup>c</sup>	1.9 (0.0-7.0)	4.2 (1.0-11.0)	1.9 (0.0-5.0)
NEUTROS <sup>c</sup>	2.7 (0.0-9.0)	3.6 (0.0-15.0)	7.4 (0.0-29.0)
BASOS <sup>c</sup>	3.7 (0.0-11.0)	6.8 (1.0-14.0)	7.1 (0.0-24.0)
PROGRAS <sup>c</sup>	3.0 (0.0-14.0)	2.1 (0.0-6.0)	3.4 (0.0-14.0)

\*Résultat significatif de l'analyse K-W ( $P < 0,05$ ).

\*\*Résultat significatif de l'analyse K-W ( $P < 0,01$ ).

<sup>a</sup>Pourcentage d'érythrocytes, de thrombocytes et de leucocytes pour 500 cellules comptées par individu.

<sup>b</sup>Pourcentage d'érythroblastes ou d'érythrocytes en dégénérescence dans la population d'érythrocytes.

<sup>c</sup>Pourcentage de ce type de leucocytes pour 100 leucocytes classifiés par individu.

1 et à 5 ppm respectivement (tableau 7). Cette exposition a également causé une augmentation significative (analyse de K-W:  $P < 0,01$ ) de la proportion de thrombocytes dans la circulation sanguine des têtards passant de 1,3 % chez les témoins à 2,8% et 18,5% chez les individus exposés à 1 et 5 ppm (tableau 7).

Bien que les proportions des autres éléments ne subissent pas de changement significatif, on remarque que les proportions d'érythroblastes et de leucocytes tendent à augmenter avec la concentration à laquelle les individus étaient exposés. L'augmentation de la proportion de leucocytes serait vraisemblablement causée par un accroissement du nombre de granulocytes (éosinophiles, basophiles et neutrophiles) et de leurs précurseurs (progranulocytes). De plus, les observations qualitatives quant à la présence ou l'absence de cellules mitotiques révèlent qu'au moins une cellule en mitose avait été rencontrée après un examen transversal de la lame du frottis sanguin chez 10% des témoins alors que cette proportion s'élève à 40% chez les individus exposés.

La proportion d'érythrocytes en dégénérescence dans la circulation sanguine des têtards exposés à 1 ppm (figure 9) est semblable, au 5e jour d'exposition (0,1%), à celle des témoins (0,2%). Par contre, elle s'élève à 5,4% au 10e jour pour demeurer relativement stable jusqu'au 20e jour et grimper ensuite à 20,3% au 25e jour.

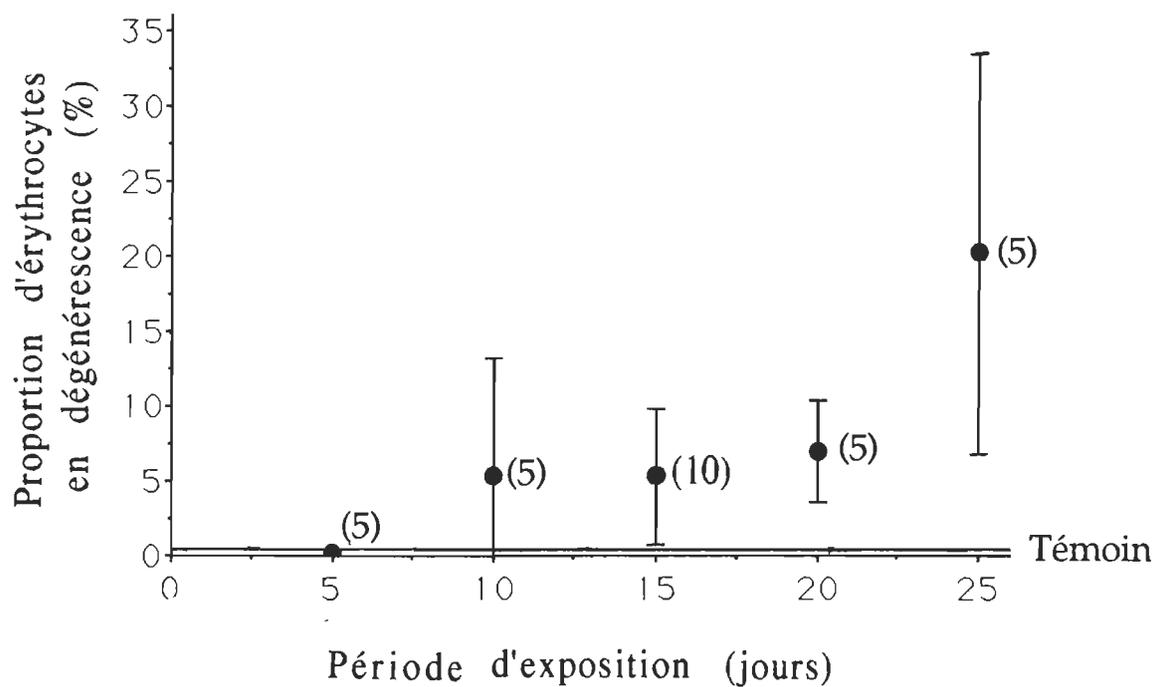


Fig. 9. Variation temporelle de la proportion d'érythrocytes en dégénérescence dans le sang des têtards exposés à 1 ppm de cadmium. • Moyenne ( $\pm$  écart type) calculée à partir d'un groupe de têtards. La ligne horizontale ( $\leftarrow$ ) représente la proportion moyenne d'érythrocytes en dégénérescence chez les têtards témoins exposés à l'eau reconstituée pendant 15 jours ( $0,2\% \pm 0,3$ ).

La variation temporelle de la proportion de thrombocytes (figure 10) montre des valeurs, après 5 et 10 jours d'exposition à 1 ppm, relativement semblables à la valeur moyenne observée chez les témoins (1,3%). Cette proportion s'élève légèrement après 15 et 20 jours d'exposition (2,8%) pour atteindre 6,6% au 25e jour.

Les photographies présentées à la figure 11 montrent l'aspect des frottis sanguins chez un témoin, chez un têtard exposé à 5 ppm pendant 15 jours et chez un autre exposé à 1 ppm pendant 25 jours. Il est facile de distinguer la forme arrondie des globules rouges chez le têtard exposé à 5 ppm comparativement aux érythrocytes observés chez le témoin. L'augmentation relative du nombre d'érythrocytes en dégénérescence chez le têtard exposé à 1 ppm est également notable comparativement au témoin.

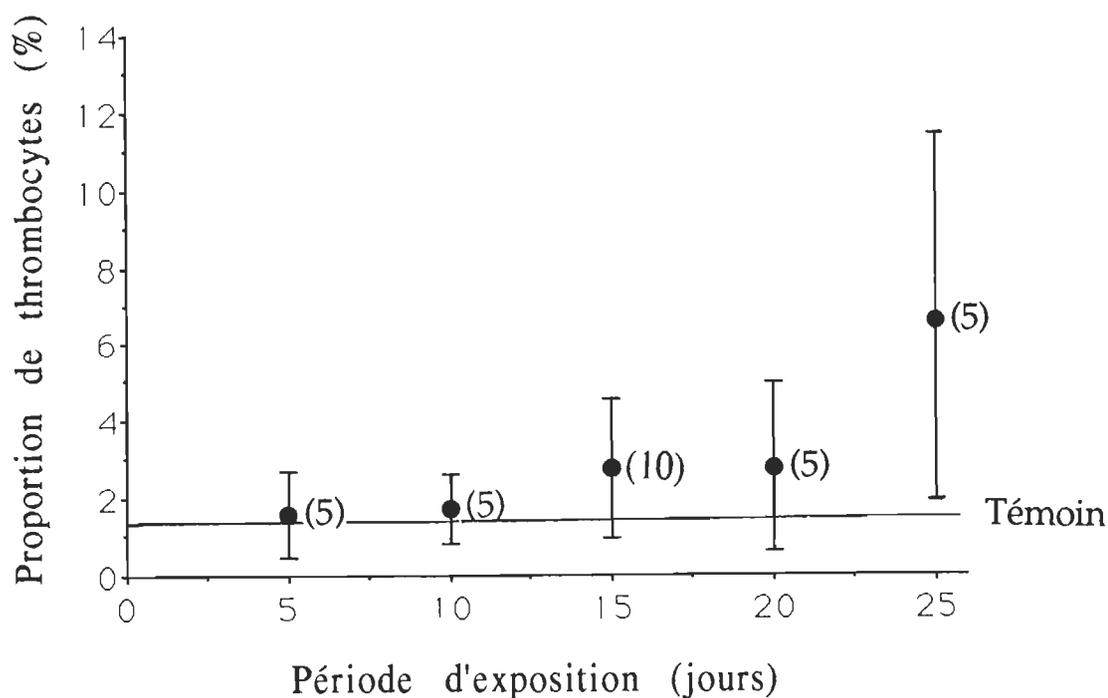


Fig. 10. Variation temporelle de la proportion de thrombocytes dans le sang des têtards exposés à 1 ppm de cadmium. La proportion de thrombocytes, exprimée en pourcentage, représente le nombre de thrombocytes identifiés lors de la classification de 500 cellules sanguines par individu. • Moyenne ( $\pm$  écart type) calculée à partir d'un groupe de têtards. La ligne horizontale (—) représente le pourcentage de thrombocytes moyen chez les têtards témoins exposés à l'eau reconstituée pendant 15 jours ( $1,3\% \pm 1,2$ ).

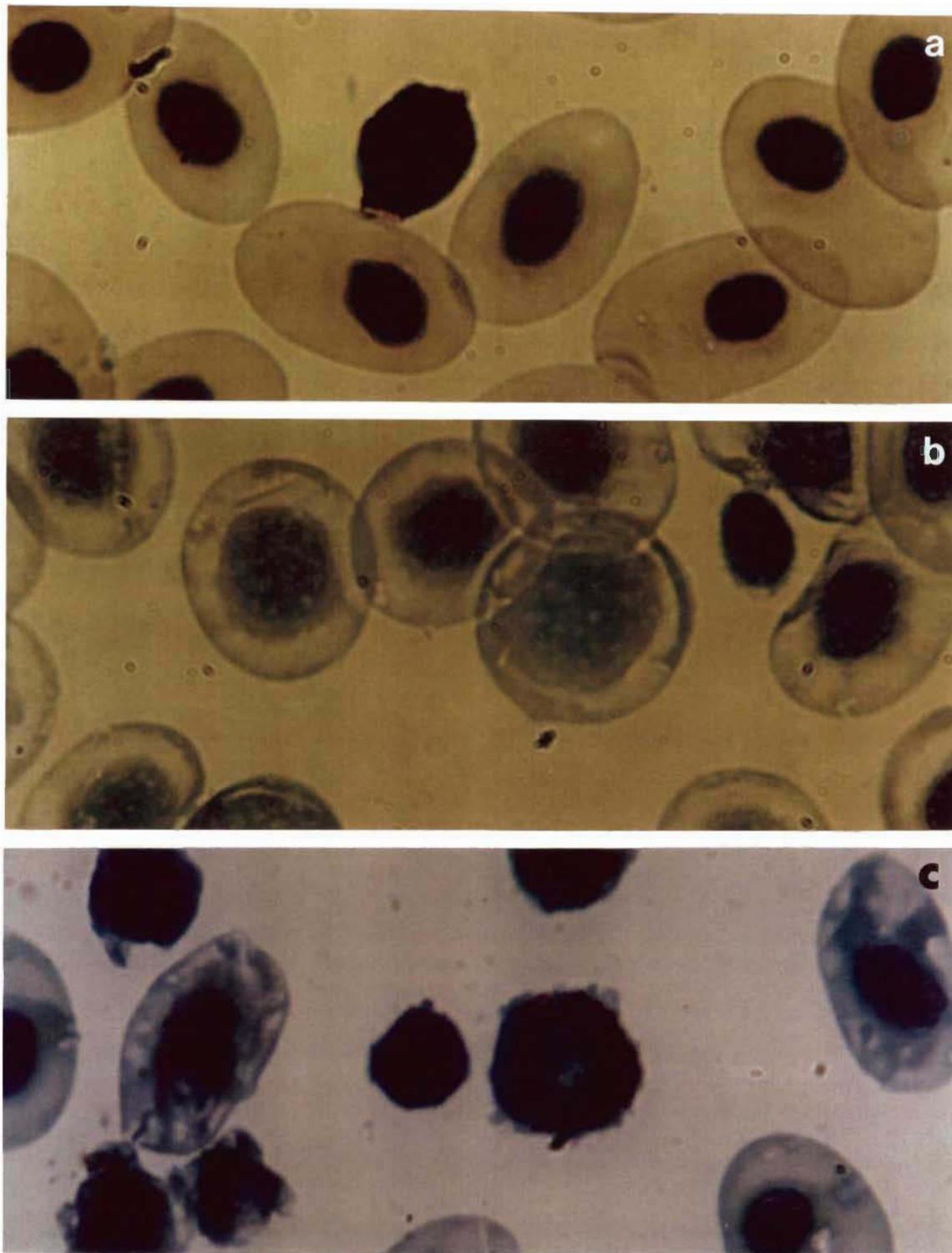


Fig. 11. Portion de frottis sanguin observé chez a) un têtard témoin après 15 jours d'exposition à l'eau reconstituée, montrant des érythrocytes de forme ovoïde; b) chez un têtard exposé à 5 ppm de cadmium pendant 15 jours, montrant des érythrocytes arrondis; et c) chez un têtard anémique exposé à 1 ppm pendant 25 jours, montrant une forte proportion d'érythrocytes en dégénérescence. Coloration de Wright (1000 X).

## 4.5 Histologie

### 4.5.1 Histologie hépatique

#### 4.5.1.1 Individus témoins

L'examen histologique nous a permis de constater que le foie des têtards n'est pas divisé en lobules distincts comme chez la plupart des mammifères. Cependant, de façon virtuelle, la périphérie des lobules est délimitée par les espaces portes et leur centre est occupé par une veine centrolobulaire vers laquelle les sinusoides convergent. Les espaces portes comprennent des canaux lymphatiques ainsi que les constituants de la triade portale soit une veine porte, une artère hépatique et des canaux biliaires (figure 12).

L'observation de la cytologie hépatocytaire des dix têtards sacrifiés immédiatement à l'arrivée au laboratoire constitue la référence pour considérer un foie comme étant normal. Les hépatocytes observés chez ces individus possédaient généralement un noyau excentrique rond ou ovalaire ainsi qu'un cytoplasme finement granulé, sans enclave vacuolaire (figure 12). Cependant, trois de ces têtards montraient, dans certaines régions hépatiques, un cytoplasme cellulaire finement vacuolaire. L'analyse fluoroscopique ne permettait pas de déceler des corps auto-fluorescents sauf dans un cas où le

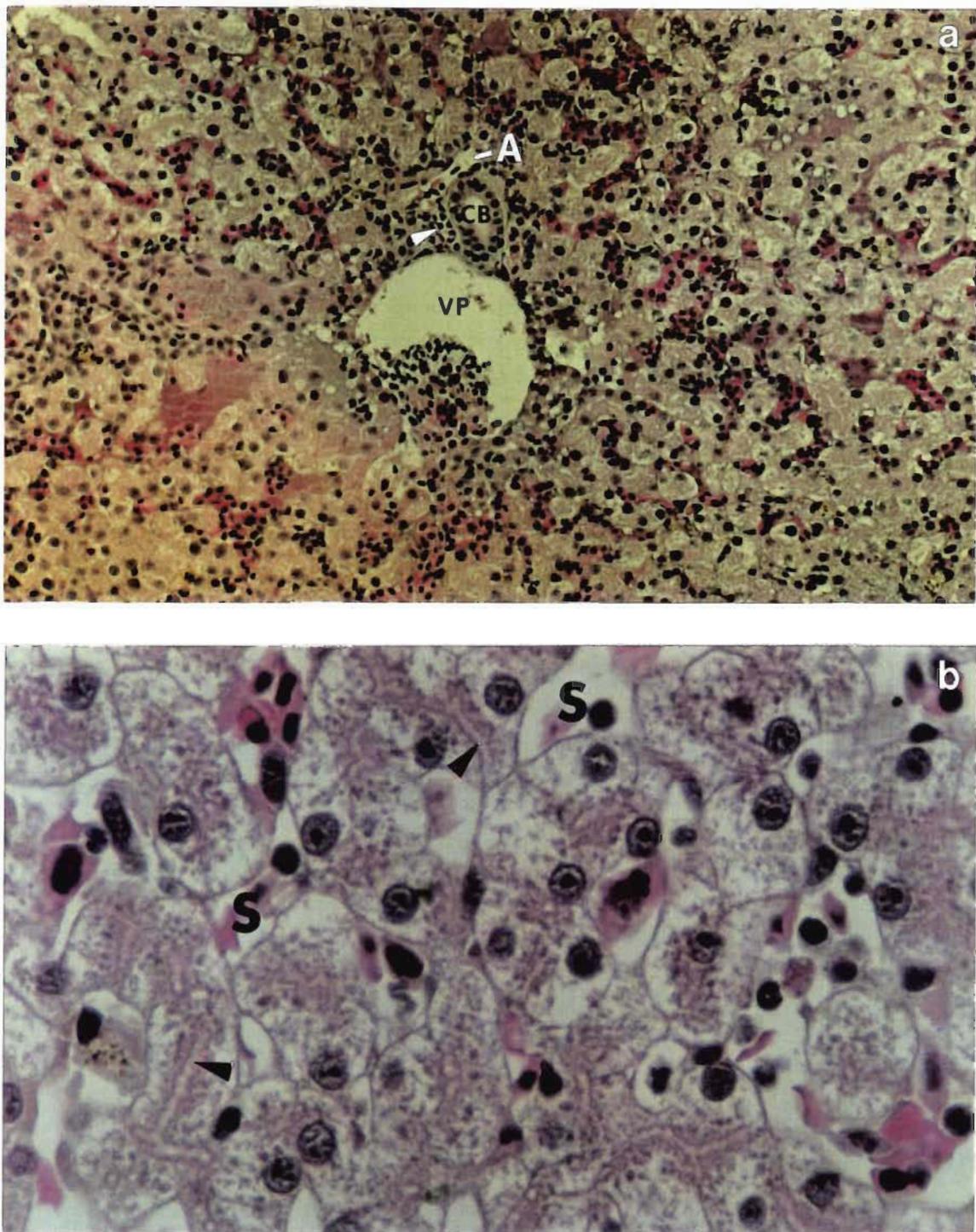


Fig. 12. Histologie du foie normal. a) Espace porte montrant la veine porte (VP), l'artère hépatique (A), un canal biliaire (CB) et un canal lymphatique (>). Coloration au HPS (100 X). b) Lames hépatiques formées de deux rangées d'hépatocytes et séparées les unes des autres par les sinusoides (S). Remarquez les canalicules biliaires cheminant entre les hépatocytes (>). Coloration au HPS (400 X).

matériel cytoplasmique comprenait de fines granulations apparaissant jaunes à la fluorescence.

Chez les têtards exposés à l'eau reconstituée pendant 15 jours, l'analyse histologique du foie révélait, dans 2 cas sur 10, une vacuolisation du cytoplasme légèrement plus importante que chez les témoins sacrifiés à l'arrivée au laboratoire et la présence de corps fluorescents dans le cytoplasme.

Chez les têtards exposés pendant 33 jours à l'eau reconstituée, 2 individus sur 10 présentaient une vacuolisation dans les cellules situées surtout en périphérie de l'organe et possédaient des corps auto-fluorescents intracytoplasmiques. Un autre individu présentait un oedème sinusoidal, affection appelée également stase hépatique, causé généralement par une congestion veineuse (figure 13).

#### 4.5.1.2 Individus exposés au cadmium

Soixante-dix pourcent des individus observés (10) parmi les têtards exposés à 1 ppm de cadmium pendant 15 jours présentaient une vacuolisation du cytoplasme des hépatocytes, plus importante que chez les témoins, et des cristaux jaunes apparaissant à la fluoroscopie, généralement concentrés en périphérie de l'organe et dans la zone centro-lobulaire. Chez deux de ces individus, la vacuolisation était assez importante

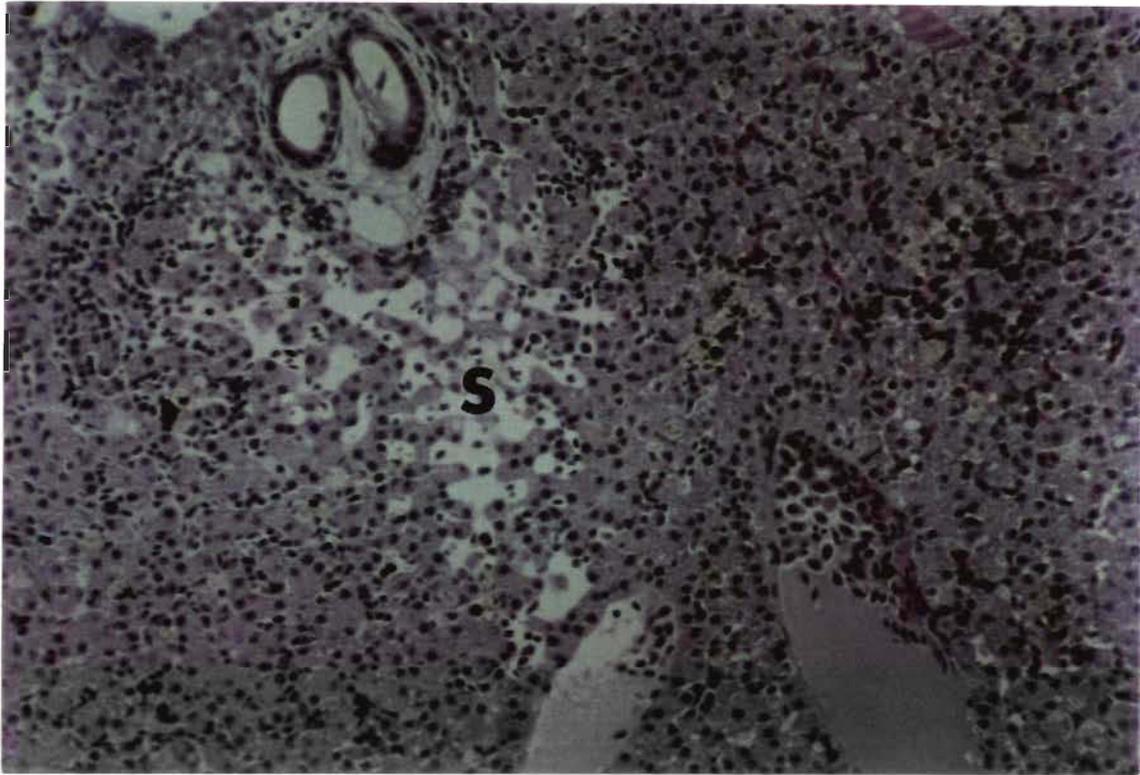


Fig. 13. Stase hépatique située dans la région péri-portale observée chez un têtard témoin exposé à l'eau reconstituée pendant 33 jours. Notez la dilatation importante des sinusoides (S). Coloration au HPS (100 X).

pour causer une perturbation de l'architecture travéculaire (figure 14). Chez un de ces têtards, la vacuolisation et l'altération structurale du parenchyme était accompagnée de la présence de zones de nécrose.

Le cytoplasme des individus exposés pendant 15 jours à 5 ppm présentait une faible vacuolisation ainsi que des corps à fluorescence spontanée dans respectivement cinq et quatre cas sur dix.

Le foie des têtards exposés à 1 ppm pendant 33 jours montrait, chez 4 des 10 têtards autopsiés, des zones de parenchyme dans lesquelles le nombre élevé de cellules nécrosées donnait un aspect mité. Cette affection ressemblait à ce qui avait été noté chez un individu exposé à la même concentration pendant 15 jours. Une légère augmentation de substance non colorable dans la région centro-lobulaire accompagnée d'une légère augmentation du volume cytoplasmique furent notées chez 20% des individus examinés. Un autre individu présentait un parenchyme hépatique dont l'aspect travéculaire était légèrement perturbé, surtout dans la région centro-lobulaire. Cette affection était cependant moins marquée que ce qui avait été observé chez les individus exposés à la même concentration pendant 15 jours.

Après 33 jours d'exposition à 5 ppm, les têtards présentaient, dans 6 cas sur 10, une vacuolisation cellulaire. Un de ces

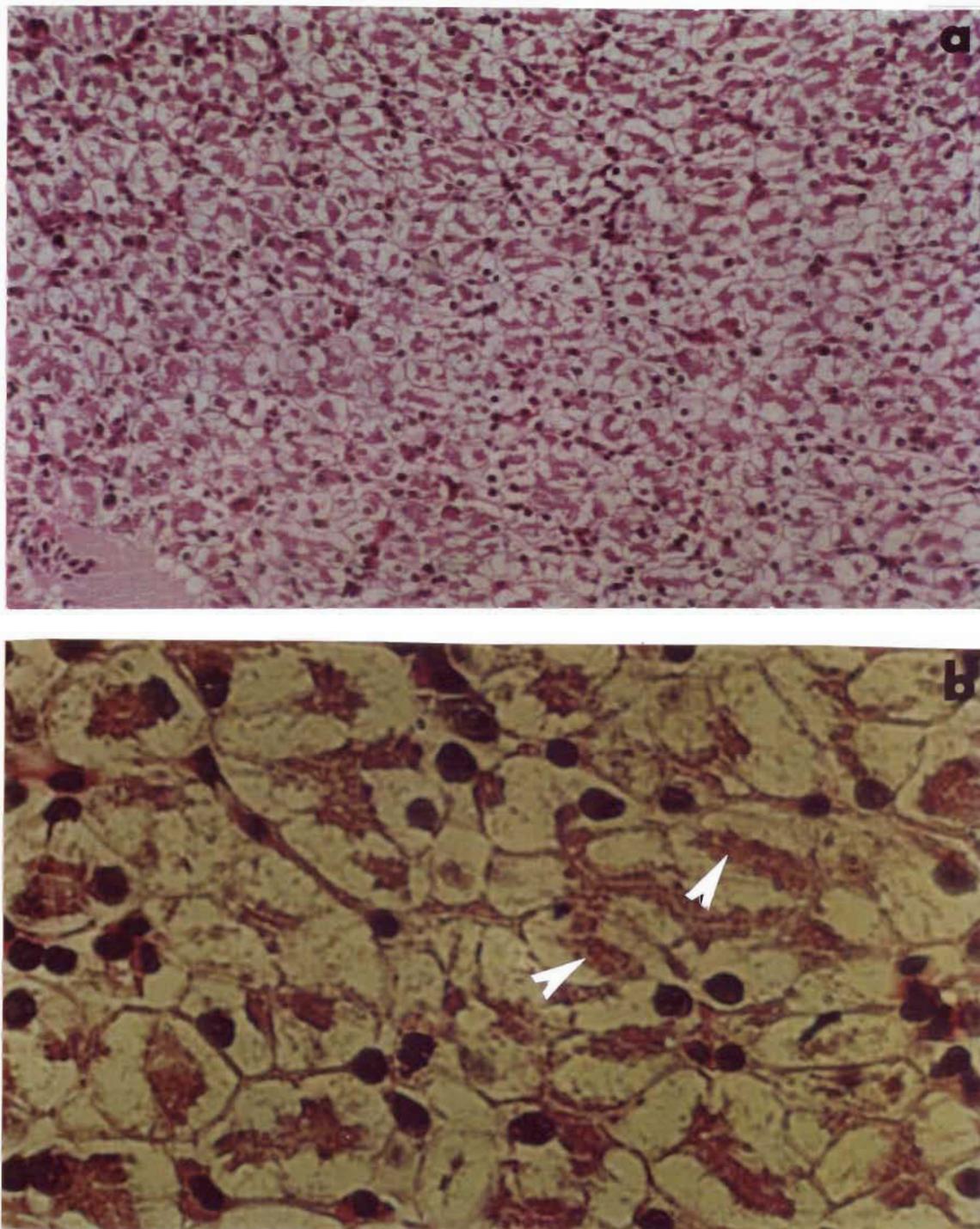


Fig. 14. Histologie du foie chez un têtard exposé à 1 ppm de cadmium pendant 15 jours montrant une perturbation de l'architecture trabéculaire causée par la déformation des hépatocytes. Le cytoplasme des hépatocytes est plus aéré que la normale, les organites cellulaires (>) sont regroupés près des canalicules biliaires. Coloration au HPS. a) 40 X. b) 400 X.

individus présentait également une micro-floculation du cytoplasme des cellules hépatiques situées en périphérie du foie, provoquée probablement par l'aggrégation des organites cellulaires. Dans trois de ces cas, la vacuolisation était accompagnée de la présence de zones de nécroses conduisant à l'obtention d'un aspect parenchymateux mité (figure 15). Également, trois cas sur 10 montraient une dilatation vasculaire couplée à un élargissement des espaces inter-travéculaires diagnostiqué comme étant un oedème. À cette exposition, aucun corps fluorescent n'a été observé chez les individus exposés.

De plus, l'examen post-mortem du foie des têtards exposés au cadmium pendant 33 jours révélait généralement une coloration anormalement pâle parsemée de picots ocres.

#### 4.5.1.3 Autres méthodes histochimiques

(APS, huile rouge et Gram)

La réaction à l'APS pratiquée sur les foies présentant une vacuolisation des hépatocytes ne permettait pas d'affirmer que ces vacuoles contenaient du glycogène: autant les préparations ayant subi une digestion à l'amylase que celles n'y ayant pas été soumises se sont avérées négatives. Par contre, dans quelques cas, la méthode histochimique à l'huile rouge révélait une légère accumulation de lipides. Les

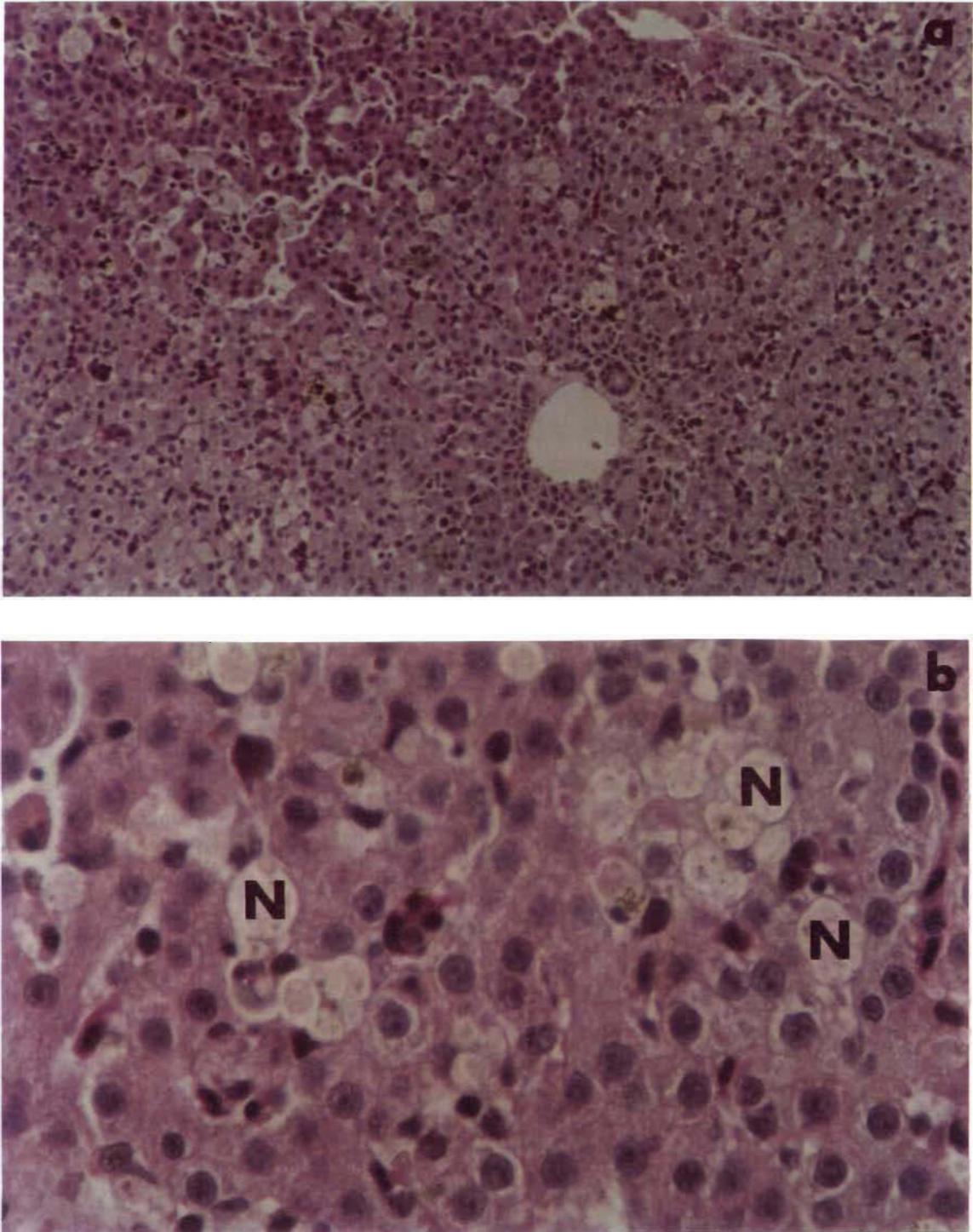


Fig. 15. Zone de nécrose dans le foie d'un têtard exposé à 5 ppm de cadmium pendant 33 jours. Les cellules nécrotiques (N) donnent au parenchyme un aspect mité. Coloration au HPS. a) 40 X. b) 400 X.

colorations Gram n'ont, quant à elles, fourni aucun résultat concluant par rapport à la présence de bactéries dans le parenchyme hépatique.

#### **4.5.2 Histologie rénale**

##### 4.5.2.1 Individus témoins

L'analyse histologique des reins prélevés chez les 10 têtards sacrifiés à l'arrivée au laboratoire montrait quelques glomérules situés en périphérie de l'organe, un parenchyme hématopoïétique dense parsemé de nombreux tubules contournés et de quelques tubes collecteurs. Les tubules présentaient un épithélium cuboidal alors qu'un épithélium plus pavimenteux caractérisait les tubes collecteurs (figure 16). La cytologie des cellules tubulaires ou parenchymateuses ne révélait aucune affection pathologique particulière. Les observations histologiques effectuées chez ces individus constituaient la référence à la normalité utilisée lors des examens subséquents.

Chez les têtards exposés à l'eau reconstituée pendant 15 jours, deux individus parmi les 10 têtards autopsiés présentaient des affections soit une autolyse cellulaire dans un cas et une dilatation microkystique de la lumière des tubules contournés et des tubes collecteurs (stase) dans l'autre cas.

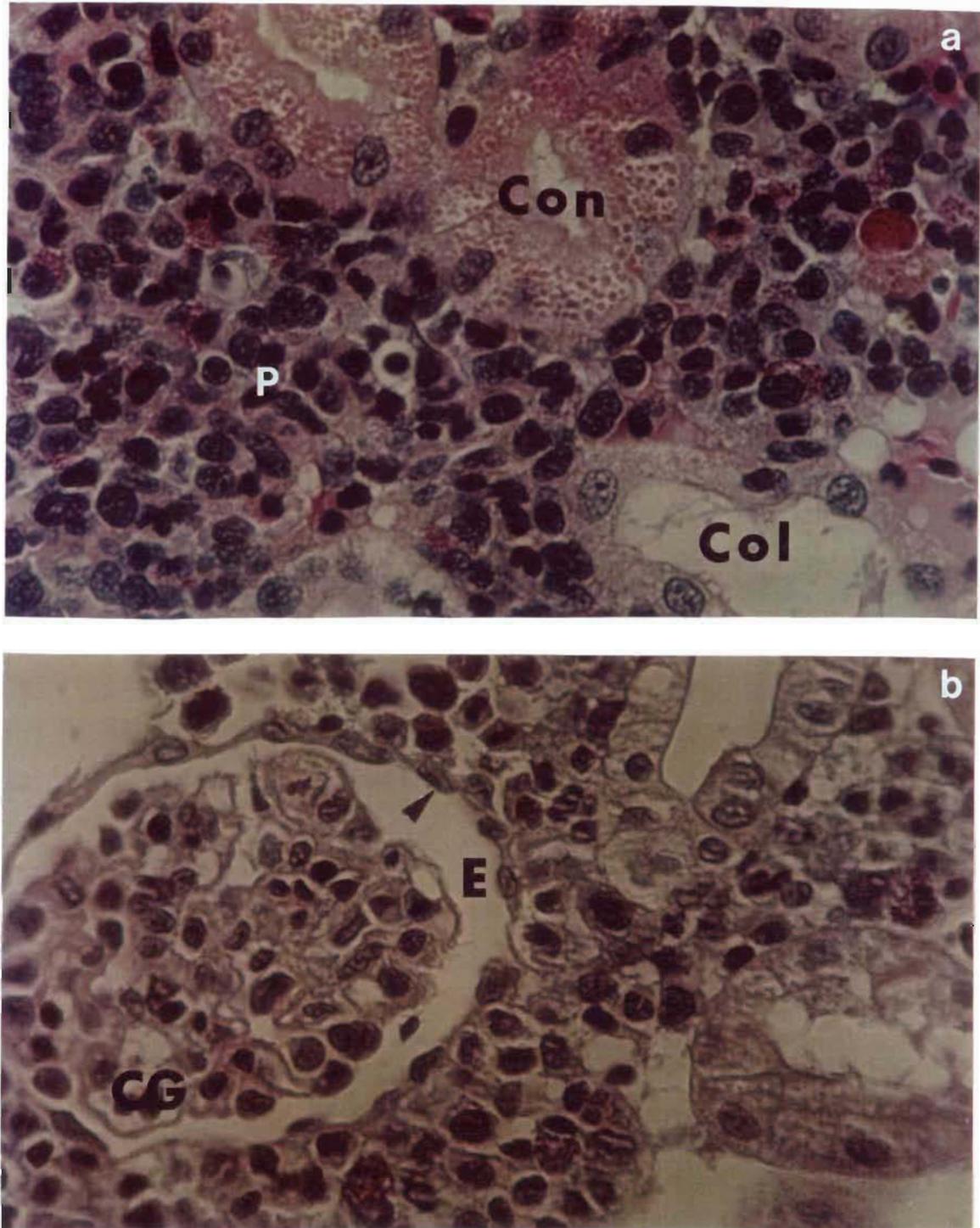


Fig. 16. Histologie du rein normal. a) Parenchyme rénal (P) parsemé de tubes contournés (Con) et de tubes collecteurs (Col). Coloration au HPS (100 X). b) Glomérule composé de sa membrane pariétale (>), de l'espace capsulaire (E) et des capillaires glomérulaires (CG) situé près de tubes contournés et tubes collecteurs. Coloration au HPS (400 X).

Les individus témoins sacrifiés après 33 jours ne présentaient pas de pathologies rénales particulières sauf un individu (10% des individus examinés) qui, à l'instar d'un cas relaté précédemment, montrait une dilatation microkystique des tubules.

#### 4.5.2.2 Individus exposés au cadmium

Les têtards exposés à 1 ppm pendant 15 jours montraient, chez 1 des 10 cas examinés, une fine vacuolisation résultant d'une micro-floculation cytoplasmique des cellules tubulaires. La même proportion d'individus présentait une stase cellulaire au niveau des tubes collecteurs.

Pour les individus exposés à 5 ppm pendant 15 jours, seulement quatre têtards (40%) présentaient des reins sans affections pathologiques décelables à l'examen histologique. Chez ces individus, une légère stase et un glomérule faiblement oedémateux (figure 17) ont été observés mais ces affections ne sont pas considérées comme pathologiques. Les six autres individus montraient une augmentation des granulations acidophiles accompagnée généralement d'une légère vacuolisation dans les cellules des tubules contournés et distaux (figure 18).

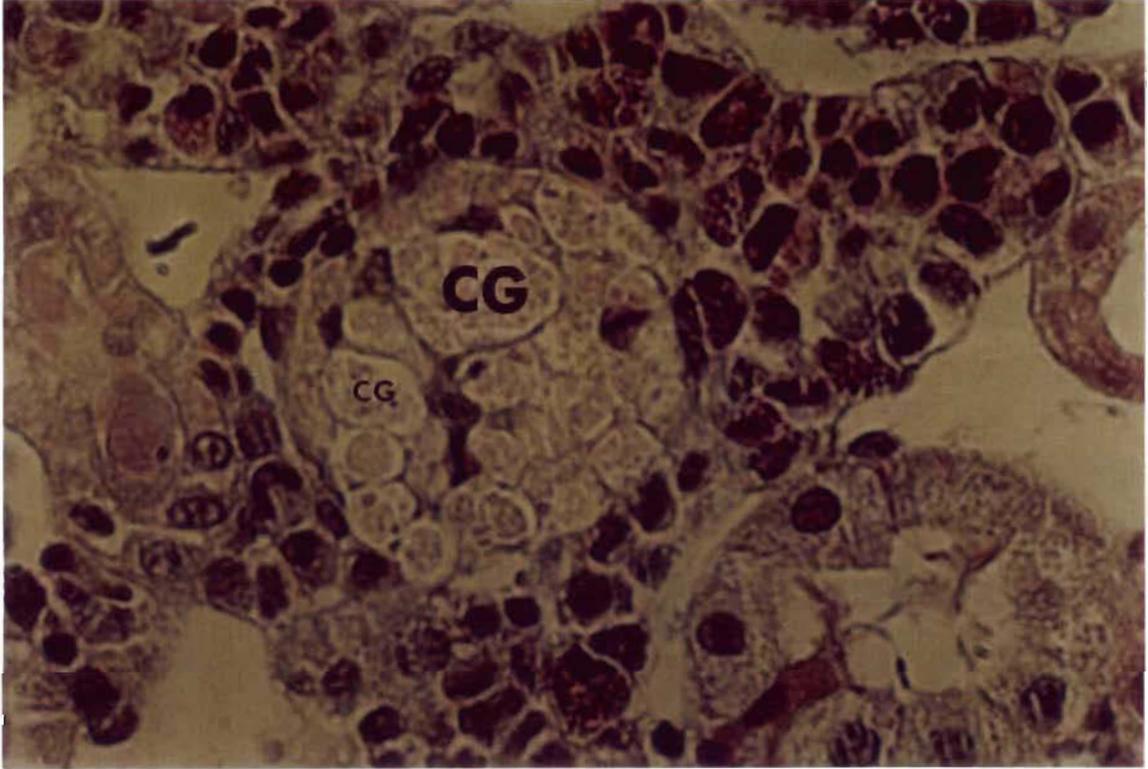


Fig. 17. Glomérule turgescent observé dans le rein d'un têtard exposé à 5 ppm de cadmium pendant 33 jours. Notez la dilatation des capillaires glomérulaires (CG). Coloration au HPS (400 X).

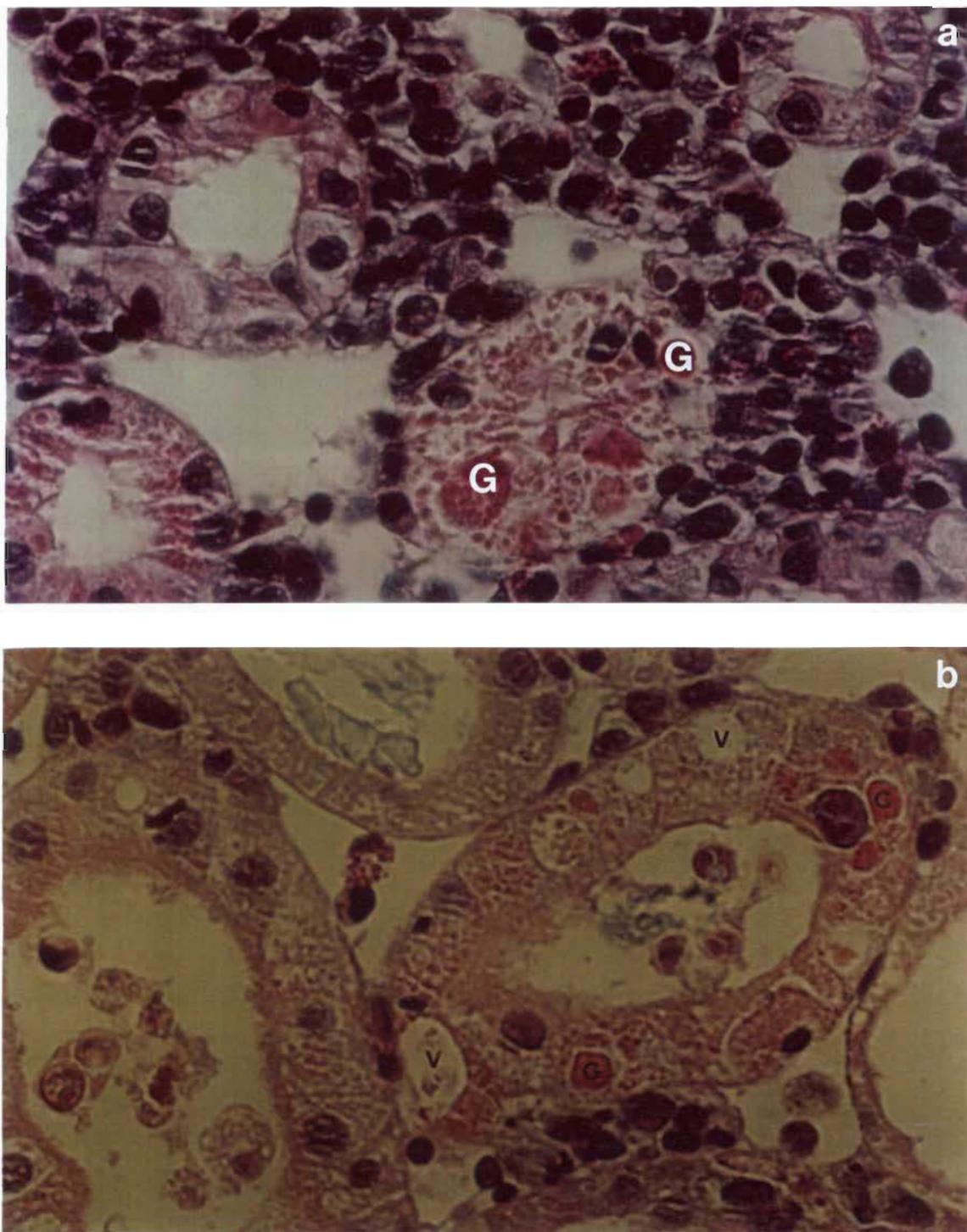


Fig. 18. Histologie du rein chez un têtard exposé à 5 ppm de cadmium pendant 15 jours. a) Les granulations cytoplasmiques (G) dans les cellules des tubes contournés sont plus importantes que chez les témoins. b) Les granulations (G) sont accompagnées de vacuoles cytoplasmiques (V) dans les cellules tubulaires. Coloration au HPS (400 X).

La majorité des têtards exposés à 1 ppm pendant 33 jours avaient, suite à l'examen histologique, des reins semblables à ceux des témoins. Quelques cas de légère turgescence tubulaire, affection non pathologique, ont été observés. Une stase plus importante fut également diagnostiquée chez un autre individu au niveau des tubules contournés et, de façon moins marquée, des tubes collecteurs. L'affection rénale observée chez trois autres individus consistait en une dilatation plus ou moins importante des capillaires glomérulaires.

Quarante pourcent des individus (4) avaient des reins histologiquement comparables à ceux des témoins après une exposition de 33 jours à une concentration de 5 ppm. Trente pourcent des cas présentaient une dilatation des tubes, trop faible cependant pour la qualifier de microkystique. L'examen histologique des reins de trois autres individus révélait la présence excessive de granulations acidophiles dans les cellules des tubules contournés dont un présentait également une dilatation des capillaires glomérulaires (figure 17).

#### **4.5.3 Histologie branchiale**

L'examen histologique des branchies des têtards révélait un arrangement structural différent de ce qui est décrit chez la plupart des poissons (Morrison, 1988).

La structure branchiale observée chez les têtards (figure 19) semblait plutôt correspondre à une disposition des feuilletts en houppe comme chez les lophobranches (Bertin, 1958). Les cellules muqueuses étaient nombreuses et disposées entre les cellules épithéliales des lamelles et des filaments. Les filaments semblaient soutenus, à l'instar des chondrichthyens et des dipneustes (Bertin, 1958), par un tissu caverneux dont les lacunes sont limitées par des fibres conjonctives, élastiques et musculaires lisses. L'épithélium des filaments était limité par une membrane basale (figure 19).

Le tableau 8 montre les résultats des mesures de l'épithélium effectuées sur les filaments branchiaux. L'épaisseur épithéliale des filaments est de  $55,1 \pm 4,2 \mu\text{m}$  chez les témoins exposés pendant 15 jours à l'eau reconstituée alors qu'elle se chiffre à  $49,0 \pm 12,3 \mu\text{m}$  chez les témoins après 33 jours d'exposition. Aucune tendance n'est observée suite à l'exposition des têtards au cadmium. En effet, l'analyse de variance révèle une augmentation significative de l'épaisseur de l'épithélium filamenteux après 15 jours d'exposition à 1 ppm de cadmium ( $61,5 \pm 4,3 \mu\text{m}$ ) alors qu'une exposition à 5 ppm provoquait une réduction de l'épaisseur épithéliale ( $50,8 \pm 6,1 \mu\text{m}$ ) comparativement aux témoins. Après 33 jours d'exposition, l'épithélium filamenteux était d'épaisseur similaire chez les trois groupes de têtards.

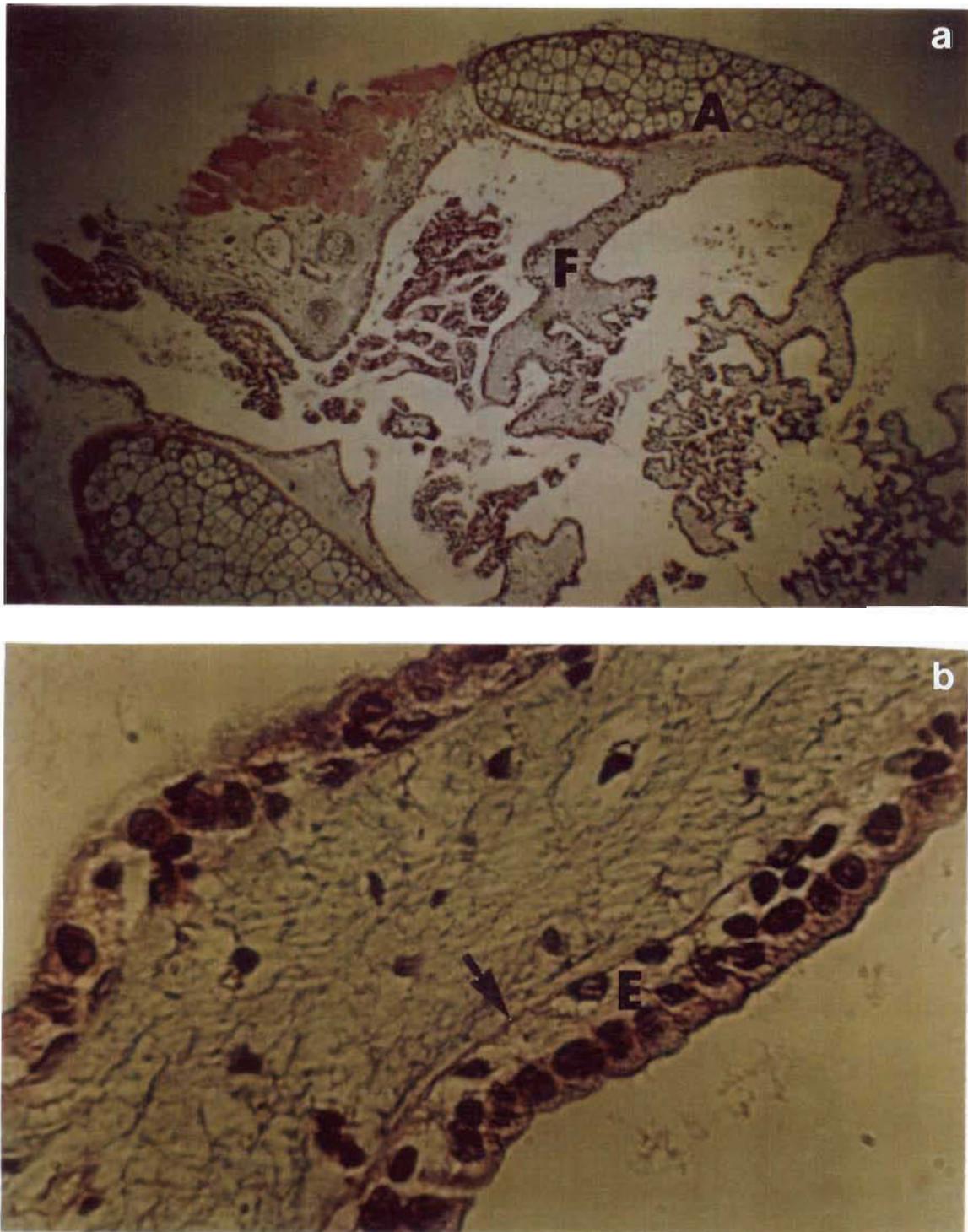


Fig. 19. Histologie branchiale chez un têtard. a) Arrangement des filaments branchiaux (F) autour de l'arc branchial (A) observés en coupe longitudinale. Coloration au HPS (40X). b) Coupe longitudinale d'un filament branchial montrant l'épithélium (E) et sa membrane basale (>). Coloration au HPS (400 X).

Tableau 8

Épaisseur de l'épithélium des filaments branchiaux chez les têtards exposés pendant 15 jours et 33 jours à des solutions de cadmium.  
Moyenne<sup>a</sup> ( $\mu\text{m}$ )  $\pm$  écart type (n).

TEMPS D'EXPOSITION	ÉPAISSEUR DE L'ÉPITHÉLIUM ( $\mu\text{m}$ )		
	TÉMOIN	1 PPM	5 PPM
15 JOURS	55,1 $\pm$ 4,2 (500)	61,5 $\pm$ 4,3 (500)	50,8 $\pm$ 6,1 (500)
33 JOURS	49,0 $\pm$ 12,3 (500)	52,5 $\pm$ 10,2 (500)	51,9 $\pm$ 6,4 (500)

<sup>a</sup>Moyenne calculée sur 100 mesures par têtard pour un groupe de 5 individus.

## 4.6 Indices somatiques

### 4.6.1 Indice hépato-somatique

Les résultats présentés à la figure 20 montrent les variations de l'indice hépato-somatique chez les groupes d'individus après 15 jours d'exposition au cadmium lors du test subléthal #2. Bien qu'une analyse de variance révèle qu'il n'existe aucune différence significative ( $F = 1,14$ ;  $P > 0,05$ ) entre les groupes, la masse relative du foie des individus exposés à 5 ppm semble être inférieure par rapport aux têtards des deux autres groupes. Cette diminution de 15,6% par rapport aux témoins est présente malgré une augmentation de 4,7% du pourcentage d'eau contenue dans le foie.

### 4.6.2 Indice néphro-somatique

Aucune différence significative entre les indices néphro-somatiques moyens des différents groupes n'a pu être décelée par l'analyse de variance ( $F = 0,17$ ;  $P > 0,05$ ). Cependant, les résultats présentés à la figure 21 montrent qu'une tendance similaire à celle de l'indice hépato-somatique, quoique moins prononcée, est observée pour les reins. La masse relative des reins des individus exposés à 5 ppm affiche une baisse de 5,7% par rapport aux témoins alors que le pourcentage d'eau contenue dans ces tissus demeure relativement stable.

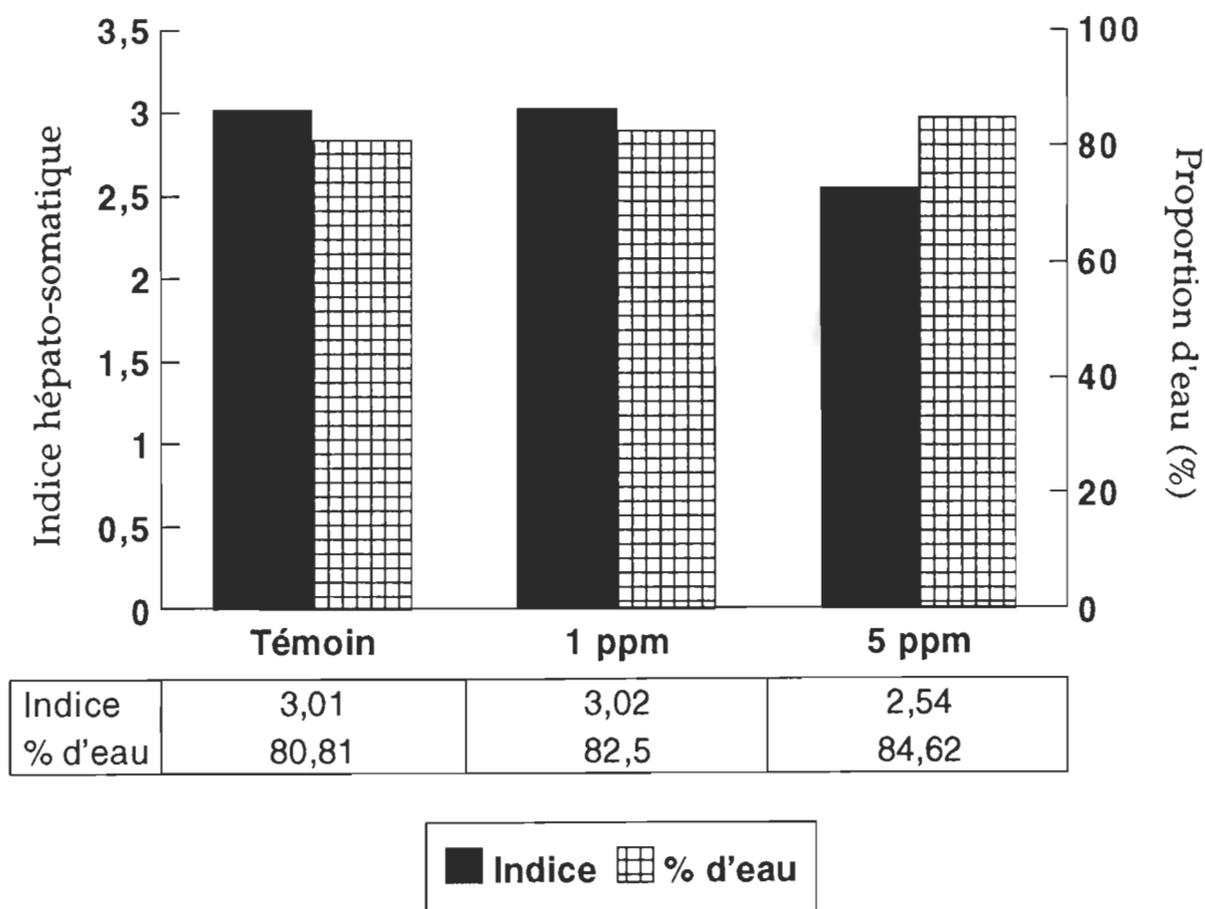


Fig. 20. Indice hépato-somatique et proportion d'eau dans le foie chez les têtards exposés au cadmium pendant 15 jours.

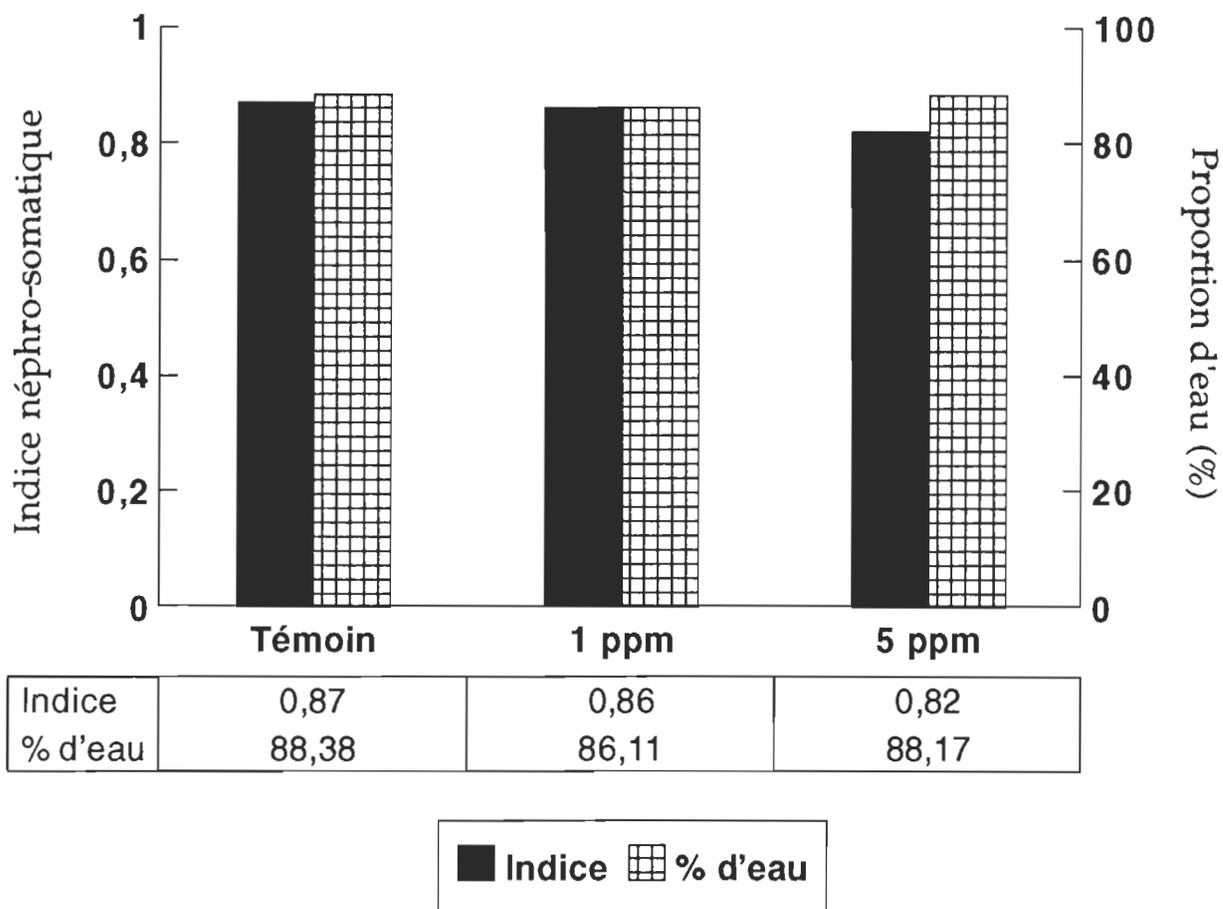
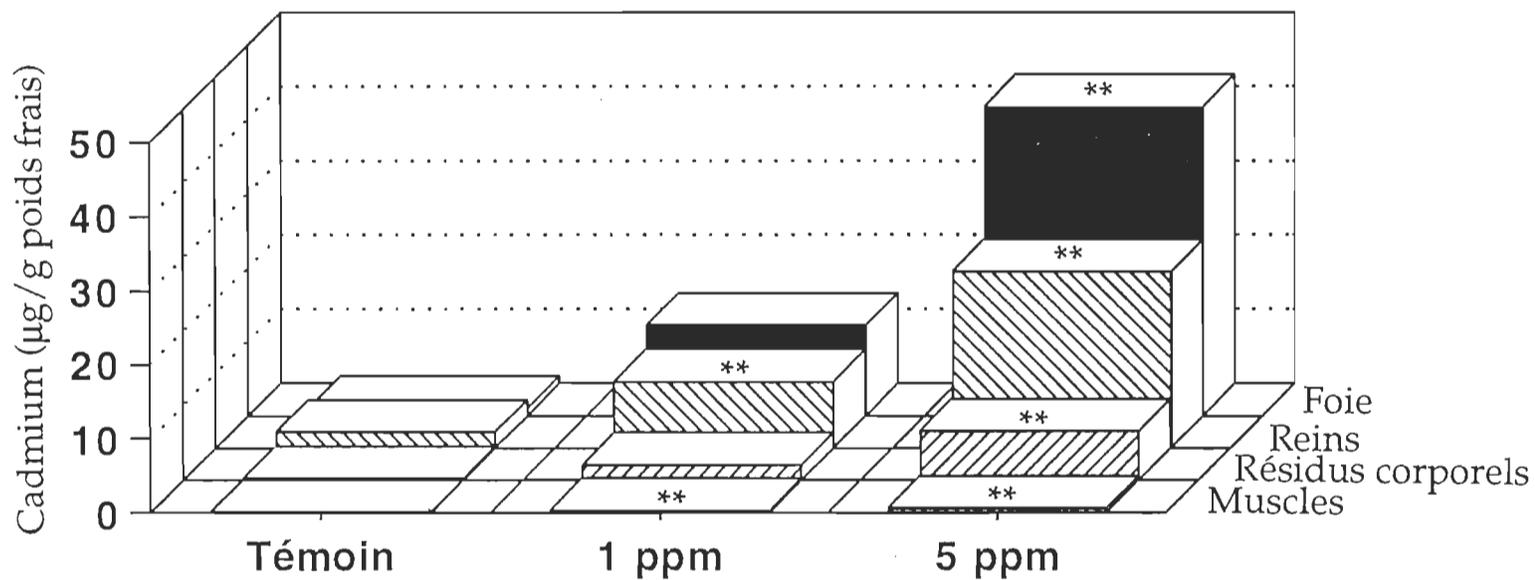


Fig. 21. Indice néphro-somatique et proportion d'eau dans les reins chez les têtards exposés au cadmium pendant 15 jours.

#### 4.7 Accumulation du cadmium dans les tissus

Les têtards exposés au cadmium contenaient de plus fortes concentrations de cadmium que les organismes contrôles et cette accumulation augmentait proportionnellement au degré d'exposition (figure 22). La quantité moyenne de cadmium contenue dans le tractus digestif était de 0,81  $\mu\text{g Cd/g}$  poids frais (pf) pour les témoins, 87  $\mu\text{g Cd/g pf}$  pour les individus exposés à 1 ppm et 986  $\mu\text{g Cd/g pf}$  pour les têtards exposés à 5 ppm. Ces concentrations élevées sont probablement causées par l'eau contaminée non absorbée contenue dans la lumière du tractus digestif. Puisque ces valeurs ne représentent vraisemblablement pas le cadmium métabolisé par l'organisme, le tractus digestif n'est pas comptabilisé lors du calcul de la concentration moyenne de l'organisme entier et sera exclu des analyses subséquentes. Mis à part le tractus digestif, le foie possède la plus grande concentration de cadmium, suivi des reins, des résidus corporels et des muscles. La concentration moyenne de cadmium calculée pour l'organisme entier en excluant le tractus digestif se chiffre à  $0,28 \pm 0,20 \mu\text{g Cd/g}$  poids frais chez les témoins, à  $2,10 \pm 0,69 \mu\text{g Cd/g pf}$  chez les têtards exposés à 1 ppm de cadmium et à  $6,42 \pm 3,75 \mu\text{g Cd/g pf}$  chez les individus exposés à 5 ppm.

Comme les quatre paramètres de concentration ne respectaient pas la condition d'homogénéité des variances, des tests non-



Foie	0,96 ± 0,85 (10)	12,26 ± 5,34 (10)	41,64 ± 22,54 (10)
Reins	2,16 ± 1,68 (10)	8,93 ± 3,34 (10)	23,87 ± 9,90 (10)
Residus	0,27 ± 0,20 (10)	2,05 ± 0,80 (10)	6,68 ± 5,23 (10)
Muscles	0,03 ± 0,04 (10)	0,27 ± 0,30 (10)	0,57 ± 0,27 (10)

\*\*P < 0,001

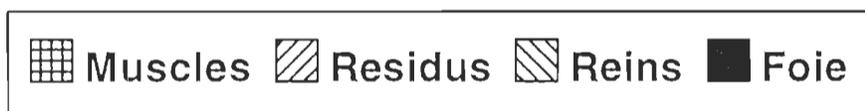


Fig. 22. Concentration tissulaire moyenne de cadmium chez les têtards exposés à 1 ppm et à 5 ppm pendant 15 jours. Moyenne ± écart type (n). Le tractus digestif est exclu du calcul de concentration des résidus corporels.

paramétriques de Kruskal-Wallis ont été réalisés. Pour chaque paramètre, les résultats montrent qu'il existe une différence significative entre les groupes de têtards exposés ( $P < 0,0001$ ).

#### **4.8 Facteur de bioconcentration**

Le calcul des facteurs de bioconcentration pour les individus exposés à 1 ppm (figure 23) donne des valeurs allant de 1,17 après 5 jours d'exposition à 3,41 après 25 jours d'exposition avec une valeur maximale de 3,85 atteinte au 20e jour. Le facteur de bioconcentration calculé pour les têtards exposés à 5 ppm pendant 15 jours est égal à  $2,04 \pm 0,69$ .

#### **4.9 Corrélations entre les effets hématologiques et l'accumulation du cadmium dans les tissus**

Des corrélations de Pearson (tableau 9) ont été calculées entre les paramètres hématologiques et la concentration de cadmium retrouvée dans le foie, les reins, les muscles et l'organisme entier (excluant les intestins). Les résultats montrent que 7 des 14 paramètres sanguins étudiés, particulièrement ceux significativement affectés par le cadmium (la longueur des érythrocytes, la proportion d'érythrocytes en dégénérescence et

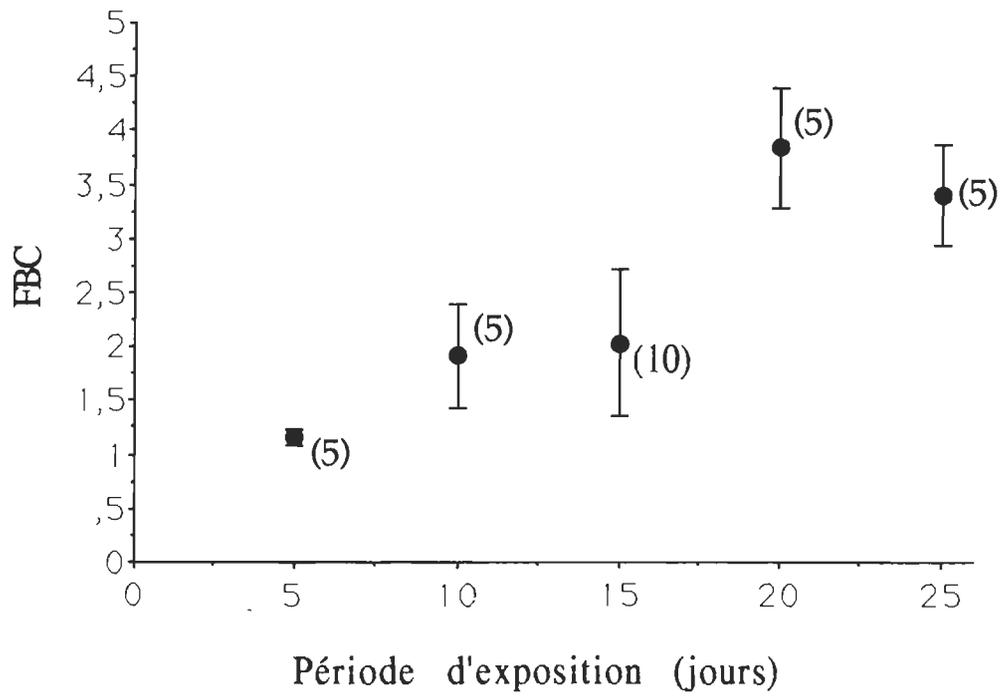


Fig. 23. Évolution du facteur de bioconcentration (FBC) en fonction du temps chez les têtards exposés à 1 ppm de cadmium.

Tableau 9

Coefficients de corrélation de Pearson entre les paramètres hématologiques et la concentration de cadmium dans les tissus.

	FOIE	REINS	MUSCLES	TOTALE <sup>a</sup>
AIRE	-0.2662	-0.2149	0.0718	-0.2191
EXCEN	-0.3564	-0.1361	-0.2672	-0.2653
LONG	-0.5511**	-0.3394	-0.1741	-0.4304*
LARG	-0.0194	-0.0940	0.1473	-0.0436
BLASTES	0.3739*	0.0574	0.3628	0.3413
DÉGÉS	0.8884**	0.2272	0.2399	0.3280
THROMBOS	0.7037**	0.2481	0.2479	0.2222
LEUCOS	0.6439**	0.3166	0.2769	0.2055
LYMPHOS	-0.5506	-0.1316	-0.2082	-0.1642
ÉOSINOS	-0.0193	-0.0985	-0.0789	-0.0974
NEUTROS	0.6092**	0.0267	0.0925	0.1213
BASOS	0.0569	0.3382	0.2653	0.0449
MONOS	-0.2819	-0.1125	0.0784	0.1879
PROGRAS	0.4072*	-0.0871	0.0307	0.2170

<sup>a</sup>Concentration moyenne de cadmium dans l'organisme calculée par sommation mais excluant les intestins.

\*P < 0,05

\*\*P < 0,01

la proportion de thrombocytes), étaient significativement corrélés ( $p < 0,05$ ) avec la concentration de cadmium dans le foie. Toutes les autres concentrations tissulaires, bien qu'augmentant proportionnellement à la concentration du milieu (figure 22), n'étaient pas corrélées avec les paramètres hématologiques excepté pour la concentration de cadmium dans l'organisme entier avec la longueur érythrocytaire ( $P < 0,05$ ).

#### **4.10 Pouvoir discriminant des paramètres**

À la lumière des résultats obtenus précédemment, certains paramètres tels le stade de développement des têtards, la surface et l'excentricité érythrocytaires, la proportion d'érythrocytes en dégénérescence, la proportion de thrombocytes ainsi que la concentration de cadmium dans le foie, les reins et l'organisme entier ont été entrés selon différentes combinaisons dans des analyses discriminantes (tableau 10). Les résultats montrent que les combinaisons ayant le meilleur pouvoir prédictif sont celles impliquant l'excentricité érythrocytaire et la concentration de cadmium dans les reins (92,59% expliqué) ou le stade de développement, l'excentricité et la concentration de cadmium dans le foie (81,48% expliqué).

Résultats des analyses discriminantes effectuées selon différentes combinaisons de paramètres.

PARAMÈTRES <sup>a</sup>	FONCTION 1	FONCTION 2	% EXPLIQUÉ
STADE-EXCEN	STADE	EXCEN	55,56
EXCEN-DÉGÉS	DÉGÉS	EXCEN	59,26
STADE-EXCEN-DÉGÉS	EXCEN	DÉGÉS STADE	66,67
EXCEN-THROMBOS	EXCEN	THROMBOS	55,56
STADE-EXCEN- THROMBOS	THROMBOS	STADE EXCEN	59,26
EXCEN-CCT <sup>b</sup>	CCT	EXCEN	73,08
STADE-EXCEN-CCT <sup>b</sup>	CCT	EXCEN STADE	76,92
EXCEN-CCF	CCF	EXCEN	77,78
STADE-EXCEN-CCF	CCF	EXCEN STADE	81,48
EXCEN-CCR	CCR	EXCEN	92,59
STADE-EXCEN-CCR	CCR	EXCEN STADE	85,19

<sup>a</sup>Les abréviations relatives à ces paramètres sont définies à l'annexe II.

<sup>b</sup>Concentration moyenne de cadmium dans l'organisme calculée par sommation mais excluant les intestins.

## CHAPITRE V

### DISCUSSION

#### 5.1 Physico-chimie des solutions

L'augmentation des valeurs moyennes de pH entre les deux séries d'expérimentation (de 5,6 à 8,4) serait un phénomène probablement dû au changement de méthode pour la préparation de l'eau reconstituée (ajout notamment de  $\text{NaHCO}_3$ ). Par ailleurs, l'amélioration du système d'aération des bassins dans le but de rejoindre les spécifications de l'American Society for Testing and Materials (Anon., 1989), qui recommande entre 60 et 100% de saturation en oxygène dans chaque bassin, est vraisemblablement responsable de l'augmentation de la quantité d'oxygène dissous.

Nous avançons l'hypothèse que les mortalités survenues lors du premier test subléthal sont imputables au stress généré par la manipulation des individus, aux changements brusques des conditions physico-chimiques lors des renouvellements d'eau et peut-être aussi à une composition de l'eau reconstituée mal adaptée aux têtards. Par conséquent, la méthodologie suivie lors de la deuxième série d'expérimentations est beaucoup plus adéquate et est recommandée pour la conservation de têtards en laboratoire.

## 5.2 Concentration létale

Selon les recommandations du American Society for Testing and Materials (Anon., 1989), pour obtenir un test de CL50 valable, aucun groupe d'organismes exposés au cadmium ne devrait subir moins de 37% ou plus de 63% de mortalités. Par conséquent, dans nos résultats, seule la donnée de CL50 obtenue après 24 heures d'exposition devrait être considérée comme fiable et valable.

Les écarts entre la CL50 déterminée pour *R. clamitans* et les valeurs retrouvées dans la littérature pour des têtards et des adultes d'autres espèces d'anoures (tableau 5) pourraient être expliqués par les variations interspécifiques de la sensibilité envers les toxiques, l'âge des individus exposés et les conditions physico-chimiques différentes des milieux d'exposition pendant les tests létaux.

Les variations de CL50 en fonction de l'âge des individus exposés, présentées au tableau 5, corroborent les données obtenues par Freda et McDonald (1990) et par Jayaprakash et Madhyastha (1987) montrant que la tolérance aux métaux lourds augmente avec le stade de développement. Ainsi, les têtards de *Microhyla ornata* (Jayaprakash et Madhyastha, 1987) âgés d'une semaine et de quatre semaines affichaient les valeurs de CL50 les plus faibles (2,62 et 2,78 ppm respectivement pour 24

heures d'exposition) alors que les têtards de *R. clamitans*, âgés d'au moins 1 an, démontraient une valeur de CL50 intermédiaire (51,9 ppm pour 24 heures d'exposition) et que les adultes de l'espèce *Rana cyanophlyctis* (Mudgal et Patil, 1985) présentaient la plus faible sensibilité au cadmium (CL50 = 200-250 ppm pour 48 heures d'exposition). Cet écart marqué entre les têtards et les adultes peut être causé, entre autres, par le fait qu'il existe une différence importante reliée à la voie d'absorption du cadmium entre ces deux phases du développement (les têtards, à l'opposé des adultes, pouvant filtrer l'eau à l'aide de leurs branchies).

Parmi les paramètres physico-chimiques influençant la toxicité des métaux lourds (température, pH, dureté, salinité, etc.), seules les données de température et de pH étaient disponibles dans les quatre études. D'une part, l'augmentation de la température résulte habituellement en un accroissement du taux d'assimilation du cadmium (Coombs, 1979) et rehausse ainsi sa toxicité. Cependant, les données de température enregistrées lors des expérimentations ne permettaient pas de dégager de relation avec les variations de la CL50. D'autre part, le pH influence la toxicité du cadmium: l'acidité induit l'ionisation du métal et augmente sa disponibilité alors que les eaux basiques provoquent une complexation du cadmium avec les colloïdes organiques et inorganiques (Conseil National de la Recherche du Canada, 1979; Miller et Mackay, 1980). Le degré

d'acidité de l'eau est proportionnel à la sensibilité observée chez trois espèces (pH moyen de 6,9 pour *M. ornata*, de 7,4 pour *B. melanostictus* et de 8,0 pour *R. clamitans*), mais les données de CL50 et de pH (7,4 à 7,8) chez *R. cyanophlyctis* ne s'intègrent pas dans ce continuum.

Les différences entre les valeurs de CL50 peuvent donc être attribuées majoritairement aux différences de sensibilité entre les stades de développement et aux variations interspécifiques de tolérance face aux xénobiotiques.

### **5.3 Effets délétères observés suite aux expositions sublétales**

#### **5.3.1 Paramètres hématologiques**

##### 5.3.1.1 Normalité des témoins

Les cellules observées sur les frottis correspondent assez fidèlement aux descriptions faites chez la grenouille léopard par Jordan (1965) et Rouf (1969).

Les valeurs d'hématocrite d'environ 20% enregistrées chez les témoins correspondent assez bien à ce qui a déjà été mesuré chez la grenouille léopard adulte (24,65 % ± 9,57) par Rouf (1969) ainsi que chez *R. esculenta* et *R. catesbeiana* (27,3% et

29,3% respectivement) (Duellman et Trueb, 1986). Le dénombrement des érythrocytes effectué chez les témoins après 24 heures et 15 jours d'exposition donne une moyenne de 315 160 et de 281 700 cellules/ $\mu\text{L}$  respectivement. Bien que légèrement inférieures, ces valeurs sont du même ordre de grandeur que les concentrations d'hématies rapportées pour d'autres ranidés adultes: 408 000 pour *Rana temporaria* et de 324 000 à 800 000 pour *R. esculenta* (Jordan, 1965).

La morphologie érythrocytaire chez les témoins montre des valeurs s'élevant à 20,1 et 12,9  $\mu\text{m}$  pour les axes majeurs et mineurs respectivement et à 202,8  $\mu\text{m}^2$  pour la surface. Szarski et Czopek (1966) rapportent des dimensions d'érythrocytes de 22,5  $\mu\text{m}$  pour l'axe majeur et de 15,0  $\mu\text{m}$  pour l'axe mineur représentant la moyenne de 100 cellules d'une seule grenouille verte à l'âge adulte. En utilisant ces données, l'aire calculée selon la formule de l'ellipse ( $\frac{1}{2}\pi AB$ ) donne un résultat de 265  $\mu\text{m}^2$ . Les érythrocytes matures de *R. temporaria* adulte décrits par Jordan (1965) sont elliptiques avec des diamètres de 18,5 à 21  $\mu\text{m}$  et de 12,5 à 14  $\mu\text{m}$  pour les axes majeurs et mineurs respectivement. Nos données montrent des dimensions érythrocytaires légèrement plus faibles que les données rapportées par Szarski et Czopek (1966) mais demeurent comparables aux données enregistrées chez un autre ranidé adulte.

Les proportions de leucocytes chez les témoins se chiffraient à 3,0% et étaient composées principalement de lymphocytes (87%) et de basophiles (3,7%). Ces résultats rejoignent les résultats mentionnés par Jordan (1965) pour les jeunes adultes *R. esculenta* qui présentent une proportion de lymphocytes de 82,6% et de basophiles de 5,7%. Ils étaient semblables aussi aux résultats de François-Krassowska et Wilczynska (1987), observés chez une espèce de crapaud (*Pelobates fuscus* Laur.) à l'état larvaire, avec les lymphocytes (81,9-93,0%) et les basophiles (1,7-12,8%) constituant la plus grande proportion de leucocytes. Par ailleurs, une proportion de leucocytes de 3% est comparable aux ratios leucocytes/érythrocytes décrits chez les amphibiens adultes par Jordan (1965) qui se chiffraient entre 0,6% et 7,2% selon les espèces.

Les moyennes des paramètres hématologiques sont donc comparables aux valeurs obtenues dans la littérature pour d'autres espèces d'anoures. Les légères différences observées peuvent provenir de différences interspécifiques, développementales ou de variations méthodologiques. À titre d'exemple, la valeur d'hématocrite du sang obtenu par ponction cardiaque peut varier lors du prélèvement à cause de l'entrée de lymphe dans la micropipette.

### 5.3.1.2 Symptômes anémiques

L'observation des paramètres hématologiques a permis de découvrir que l'exposition des têtards au cadmium provoque une anémie. Les effets observés étaient une diminution significative de l'hématocrite à la plus forte concentration de cadmium, une diminution du nombre d'érythrocytes dans la circulation sanguine, une réduction de la longueur érythrocytaire à la plus forte concentration, un arrondissement des érythrocytes proportionnel à la concentration, une augmentation de la surface érythrocytaire observée à la plus faible concentration seulement ainsi qu'une augmentation de la proportion d'érythrocytes en dégénérescence, d'érythroblastes et de cellules en mitose dans la circulation sanguine.

Plusieurs études présentaient des résultats similaires. Hilmy *et al.* (1986), qui ont effectué des expérimentations sur les effets hématologiques du cadmium chez le crapaud *Bufo regularis*, notaient une diminution du nombre de globules rouges, du taux d'hémoglobine et de l'hématocrite ainsi qu'une augmentation du taux de sédimentation des érythrocytes. Ces auteurs émettaient l'hypothèse que l'apparition de ces effets pouvait être associée à quatre causes: 1) une augmentation du volume plasmatique; 2) une réduction de la concentration de cuivre sanguin qui exerce un rôle important dans

l'érythropoïèse; 3) une inhibition de la synthèse de l'hémoglobine; et 4) une carence en fer. Sjöbeck *et al.* (1984) montraient une légère diminution de l'hématocrite, de l'hémoglobine et du nombre d'érythrocytes chez des perchaudes exposées *in situ* à des concentrations de cadmium. Garofano et Hirshfield (1982) ont démontré que les effets du cadmium chez la barbotte consistent en une réduction du nombre d'érythrocytes accompagnée d'une légère augmentation de l'hémoglobine et d'aucun effet sur l'hématocrite. Pour leur part, Larsson *et al.* (1976) notaient que la manifestation des effets du cadmium chez les poissons était constituée d'une diminution de l'hématocrite et de l'hémoglobine aux plus fortes concentrations.

La fonction essentielle des érythrocytes est d'assurer l'apport d'oxygène aux tissus qui s'effectue grâce à l'hémoglobine. À cause de ce rôle primordial attribué à l'hémoglobine, le diagnostic de l'anémie est véritable seulement lorsqu'il y a une diminution de la concentration en hémoglobine en bas de la limite inférieure de la normalité. Une baisse de l'hématocrite, du nombre d'érythrocytes ou du volume globulaire moyen ont une valeur diagnostique restreinte individuellement puisqu'il arrive que la concentration d'hémoglobine demeure constante malgré la variation d'un de ces paramètres. Ainsi, une réduction du nombre d'hématies accompagnée d'une majoration du volume globulaire moyen peut permettre de conserver une

concentration d'hémoglobine normale (Zittoun *et al.*, 1982).

Bien que notre investigation ne considérait pas la concentration en hémoglobine, une attention particulière à la variation simultanée de deux ou plusieurs de ces paramètres pouvait permettre de poser un diagnostic d'anémie. C'est ainsi que nous pouvons avancer que les têtards exposés au cadmium étaient anémiques puisqu'ils affichaient une baisse de l'hématocrite, significative à 5 ppm, accompagnée d'une diminution du nombre d'érythrocytes. Bien que la quantité de données ayant servi aux analyses statistiques ne soit pas très imposante, le diagnostic de l'anémie est renforcé par l'observation qualitative d'un sang relativement clair chez les individus exposés au cadmium lors des ponctions cardiaques. De plus, un phénomène similaire, c'est-à-dire une anémie induite par le cadmium, a déjà été observé lors d'expériences réalisées avec des poissons (Larsson *et al.*, 1976; Sjöbeck *et al.*, 1984; Gill *et Pant*, 1985) et des mammifères (Berlin *et Friberg*, 1960).

Il existe plusieurs types d'anémies associées à des étiologies différentes et pouvant être identifiées grâce à la morphologie et au dénombrement érythrocytaires. En général, l'anémie peut être causée par une diminution de la production d'érythrocytes, par une hémorragie ou par une destruction accélérée des hématies (hémolyse intratissulaire par les macrophages ou

hémolyse intravasculaire). Il existe également des pseudo-anémies par hémodilution lorsque le taux d'hémoglobine semble plus bas à cause d'une augmentation du volume plasmatique (Zittoun *et al.*, 1982).

L'étude de la morphologie des érythrocytes chez les têtards exposés au cadmium révélait entre autres un arrondissement des cellules. Deux hypothèses peuvent expliquer ce changement de forme des hématies.

Premièrement, l'arrondissement des érythrocytes pourrait être le résultat 1) d'une inhibition de production d'hématies dans le foie couplée à une érythropoïèse normale effectuée par les reins, ou 2) d'une stimulation érythropoïétique des reins. En effet, Broyles *et al.* (1981) ont démontré que, chez les têtards de *R. catesbeiana*, il y a un changement de contribution relative de l'érythropoïèse des reins vers le foie au cours du développement. Comme chaque organe érythropoïétique produit un type spécifique de globules rouges, ce phénomène est accompagné par un changement dans la forme des cellules. Si nous supposons que la même succession existe pour les têtards de *R. clamitans*, alors nous pouvons prétendre que les reins, plus actifs lors des premiers stades de développement, produisent les cellules les plus rondes et que les érythrocytes de forme allongée-ovale sont produits par le foie. Donc, selon cette hypothèse, l'arrondissement de la population de globules rouges

pourrait résulter d'une stimulation érythropoïétique des reins ou d'une inhibition érythropoïétique du foie. Les corrélations significatives entre quelques paramètres sanguins affectés par le cadmium et la concentration de cadmium dans le foie (tableau 9) supporte l'hypothèse de l'inhibition érythropoïétique dans le foie.

Une autre hypothèse est que, comme les jeunes érythrocytes (érythroblastes) sont caractérisés par une forme arrondie (Szubartowska et al., 1990), l'apparition de cellules plus rondes reflèterait simplement un processus de renouvellement de la population d'érythrocytes. Dans ce cas, nous pourrions être en présence d'une anémie de type régénérative causée par l'hyperhémolyse des érythrocytes entraînant une stimulation érythropoïétique. En effet, lorsqu'il y a destruction accélérée des hématies (hyperhémolyse), une hormone, l'érythropoïétine, est sécrétée et stimule les organes érythropoïétiques. On observe alors une augmentation du taux de réticulocytes dans le sang ou hyperréticulocytose (Zittoun et al., 1982), les réticulocytes étant les équivalents des érythroblastes chez les têtards.

Cette hypothèse est supportée par des observations qualitatives que le sang des têtards exposés au cadmium contient plus de cellules en mitose, d'érythroblastes et d'érythrocytes avec un cytoplasme pâle (suggérant que la concentration en hémoglobine

est plus faible, caractéristique inhérente aux érythrocytes en voie de maturation) que dans les témoins. De plus, l'anémie de type hémolytique est supportée par l'augmentation observée des érythrocytes en voie de dégénérescence. Elle expliquerait, par surcroît, l'hyperthrombocytose et l'hyperleucocytose notées chez les têtards puisque de tels effets ont été signalés chez les rats en réponse à l'injection de plasma provenant d'animaux anémiques (Linman, 1962). Bien que toutes ces modifications morphologiques et de proportions cellulaires se manifestent autant à 1 ppm qu'à 5 ppm de cadmium, la valeur d'hématocrite était significativement plus faible seulement à la plus forte concentration. Ce phénomène peut s'expliquer, à 1 ppm, par une production d'érythrocytes suffisante pour remplacer les cellules lysées alors qu'à 5 ppm, l'hémolyse dépasserait les capacités de restauration de l'érythropoïèse.

Une anémie de type hémolytique fut également diagnostiquée chez des poissons exposés au cuivre (El-Domiaty, 1987). Dans cet article, les hypothèses d'une action du cuivre sur l'ATPase membranaire (causant une déficience des pompes à sodium), sur les enzymes glycolytiques dans les érythrocytes et sur le glutathion furent proposées. Selon Berlin et Friberg (1960), l'anémie observée chez des lapins auxquels on avait injecté du cadmium était causée par une destruction accélérée des érythrocytes et une carence en fer dans la moelle. Les auteurs ont avancé l'hypothèse que ces actions pouvaient résulter d'une

réduction de la résistance des érythrocytes suite à leur contact avec le cadmium. Le temps d'apparition des érythrocytes, marqués à l'aide d'un isotope radioactif, était plus court chez les individus exposés, infirmant l'hypothèse de l'activité érythropoïétique inhibée. Au contraire, les résultats étaient consistants avec une augmentation de l'érythropoïèse. Corroborant les résultats de Berlin et Friberg (1960), Hogan et Razniak (1992) ont démontré que l'exposition de souris au cadmium provoquait une stimulation érythropoïétique.

Les résultats obtenus montrent que l'exposition des têtards à 1 ppm de cadmium provoque, en plus de l'arrondissement des érythrocytes, une augmentation de leur surface. Deux hypothèses sont formulées afin d'expliquer cette modification morphologique.

Premièrement, l'augmentation de la surface érythrocytaire pourrait être liée à la présence d'un plus grand nombre d'érythroblastes qui sont des cellules plus grandes que les hématies. Cette explication renforce l'hypothèse d'une anémie hémolytique régénérative. Dans ce cas, la macrocytose est d'autant plus importante que la production est accélérée puisque les étapes de maturation sont alors raccourcies et conduisent à la mise en circulation de cellules plus grandes (Zittoun et al., 1982).

Deuxièmement, l'augmentation de la surface des hématies pourrait être un symptôme de l'anémie arégénérative macrocytaire. Ce type d'anémie traduit l'insuffisance de synthèse d'ADN induite par une carence en vitamines B<sub>12</sub> ou en folates. Ce problème survenant lors des divisions cellulaires court-circuite les mitoses pendant l'érythropoïèse pour donner des érythrocytes plus volumineux (Zittoun et al., 1982). Cependant, de telles carences suite à l'exposition au cadmium n'ont pas été notées dans la littérature. De plus, cette hypothèse ne concorde pas avec les signes de régénération observés (augmentation des proportions de cellules en mitose et d'érythroblastes).

En considérant l'ensemble des effets observés, l'hypothèse la plus plausible serait donc que l'exposition au cadmium a provoqué une anémie hémolytique régénérative chez les têtards. Cependant, pour être catégorique, le diagnostic devrait être confirmé par la mise en évidence de signes d'hyperdestruction érythrocytaire tels l'hyperbilirubinémie et la baisse de l'haptoglobine (Zittoun et al., 1982) ou leur équivalent chez les têtards. L'anémie hémolytique régénérative pourrait également être démontrée par la réalisation d'une étude semblable à celle produite par Berlin et Friberg (1960). Le devis méthodologique d'une telle étude comporterait l'injection d'un isotope du fer (Fe<sup>59</sup>) suivie, quelques jours plus tard, d'une injection de fer non isotopique (Fe). Ce traitement

serait administré, d'une part, à des têtards exposés au cadmium et, d'autre part, à des témoins. Le principe sous-tendant cette expérimentation est que l'injection de fortes doses de fer contrecarre la réabsorption du fer provenant des érythrocytes détruits dans la circulation sanguine. Ainsi, tous les nouveaux érythrocytes formés après l'injection de  $Fe^{59}$  auraient incorporé cet isotope. Une apparition lente de l'isotope dans les érythrocytes chez les individus exposés au cadmium comparativement aux témoins révélerait que le cadmium inhibe l'érythropoïèse alors qu'une apparition plus rapide démontrerait que la production d'érythrocytes est stimulée. Afin d'attribuer cette stimulation à l'hyperhémolyse, la seconde injection de fer non isotopique, au moment où tous les globules rouges dans la circulation sanguine sont constitués de  $Fe^{59}$ , permettrait de mesurer leur durée de vie. Une durée de vie érythrocytaire plus courte chez les individus exposés au cadmium serait prouvée par la démonstration d'une disparition plus rapide de l'isotope dans le sang de ces individus comparativement aux témoins.

#### 5.3.1.3 Formule leucocytaire

Les têtards exposés au cadmium ont montré une augmentation significative de la proportion de thrombocytes et une augmentation, bien que non significative, de la proportion

de leucocytes accompagnée d'un déséquilibre lymphocytes/granulocytes en faveur de ces derniers. Plusieurs auteurs ont démontré des effets équivalents suite à une exposition au cadmium (Garofano et Hirshfield, 1982; Sjöbeck et al., 1984) ou à d'autres types de xénobiotiques (Casillas et Smith, 1977; Wedemeyer et McLeay, 1981 in Sjöbeck et al., 1984). Garofano et Hirshfield (1982) suggéraient que les résultats enregistrés (augmentation de la proportion de thrombocytes et de neutrophiles, diminution des lymphocytes) peuvent être dus aux effets directs du cadmium sur les cellules souches hématopoïétiques. En effet, l'examen histologique des organes d'hématopoïèse des barbottes brunes exposées au cadmium révélait, entre autres, une augmentation des proportions d'hémoblastes et de progranulocytes. Sjöbeck et al. (1984) ont investigué les effets hématologiques du cadmium chez les perchaudes échantillonnées dans une rivière contaminée. L'effet le plus marquant était une lymphocytose accompagnée d'une anémie légère (diminution de l'hématocrite, du taux d'hémoglobine et du nombre d'érythrocytes) et d'une augmentation des thrombocytes (environ 30%).

Comme il a été suggéré plus haut, une thrombocytose peut être associée à la manifestation des symptômes anémiques: En effet, une relation entre la production d'érythrocytes et de thrombocytes est suggérée par la démonstration de l'activité thrombopoïétique du plasma obtenu d'animaux anémiques (Linman,

1962). D'autre part, il est possible que l'augmentation de la proportion de thrombocytes ne traduise pas une thrombocytose réelle puisqu'une réduction du nombre de globules rouges sans même être accompagnée d'un accroissement du nombre de thrombocytes créerait une augmentation de la proportion de ces derniers. Cette mise en garde s'applique également à l'augmentation de la proportion de leucocytes. Cependant, le débalancement des proportions relatives de granulocytes et de lymphocytes est réel. Bien qu'une granulocytose puisse accompagner une grande variété de désordres, il est intéressant de noter que cet effet est souvent associé aux manifestations d'allergies (Finch, 1972).

### **5.3.2 Histologie**

#### 5.3.2.1 Histologie hépatique

Les principales affections hépatiques, observées chez les têtards et pouvant être attribuées à l'exposition au cadmium, étaient la vacuolisation et la nécrose des hépatocytes ainsi que l'apparition de granulations cytoplasmiques jaunes en fluorescence. La manifestation de ces phénomènes semblait être influencée de façon plus importante par un prolongement de la période d'exposition que par une augmentation de la concentration de cadmium et semblait survenir particulièrement dans la zone centro-lobulaire. L'autre altération observée, un

oedème sinusoidal, n'est pas considérée comme pathologique. Cet état, qui peut résulter simplement d'une congestion sanguine survenue lors de l'hépatectomie, a été diagnostiqué chez trois individus exposés à 5 ppm pendant 30 jours ainsi que chez un témoin.

Les réactions tinctoriales effectuées chez les individus présentant une vacuolisation, positives chez certains individus dans le cas de l'huile rouge et négatives dans le cas de l'APS, nous permettent de croire que la vacuolisation serait due à une accumulation de lipides plutôt qu'à un emmagasinement de glycogène. Des réserves doivent cependant être émises par rapport à ces résultats. Chez des têtards présentant une vacuolisation, un résultat négatif de la coloration à l'huile rouge lors du dépistage des lipides ne signifie pas toujours une absence totale de ces composés. De la même façon, une réaction APS-négative n'implique pas nécessairement une absence de toute forme de glycogène (Canter et Jollès, 1969), puisque seul le lyoglycogène (par opposition au desmoglycogène ou glycogène lié aux protéines) peut être révélé grâce à la méthode à l'acide périodique-Schiff.

La présence de corps jaunes lors de la fluoroscopie était observée principalement dans le foie des individus exposés au cadmium et était généralement corrélée à la présence de vacuoles cytoplasmiques. Plusieurs facteurs tels la

contamination bactérienne et la présence de gouttelettes lipidiques peuvent cependant être responsables de ces corps fluorescents. La première explication est exclue suite aux résultats peu concluants obtenus des colorations Gram effectuées sur les coupes histologiques. L'hypothèse des vacuoles adipeuses est plausible puisque, selon Canter et Jollès (1969), un certain nombre de lipides présentent une couleur jaune en spectrographie de fluorescence. De façon plus précise, la fluorescence jaune caractériserait les dérivés d'oxydation du groupe des chromolipoides (Gabe, 1968).

L'hypothèse de l'accumulation de lipides dans les vacuoles cytoplasmiques est donc étayée par la réaction histochimique à l'huile rouge et par les recherches fluoroscopiques. Elle est supportée également par l'observation d'un phénomène similaire rapporté dans la littérature. En effet, l'observation de ces affections hépatiques corroborent les résultats obtenus par Wani et Latey (1983) et par Usha Rani et Ramamurthi (1989). Wani et Latey (1983) ont observé une vacuolisation, une perturbation de l'architecture normale des travées et une pycnose des noyaux indicatrice d'une nécrose hépatocytaire chez des poissons exposés à 25 ppb de cadmium pendant 30 jours. Usha Rani et Ramamurthi (1989) notaient, chez des poissons soumis à 5 ppm de cadmium pendant différentes périodes allant jusqu'à 30 jours, une dégénérescence vacuolaire et des changements lipidiques dans les hépatocytes, la nécrose des

hépatocytes péri-pancréatiques ainsi qu'une congestion sanguine. Les auteurs attribuaient la production de ces lésions hépatiques à une atteinte cytolytique directe. À l'instar de ce qui est rapporté pour d'autres métaux lourds tels le plomb et le mercure, le cadmium agirait sur les membranes, notamment des mitochondries et du réticulum endoplasmique, en altérant leur perméabilité ainsi que les mécanismes de respiration et de phosphorylation oxydative ou de synthèse des lipoprotéines (Martin et Feldmann, 1983). Ce mécanisme de cytotoxicité conduirait à la stéatose suivie de la nécrose des hépatocytes. Ord et Al-Atia (1979) obtenaient également une accumulation de gouttelettes lipidiques chez des amibes exposées à des concentrations de cadmium sublétales. Ces auteurs mentionnaient que cet état pouvait être la conséquence de l'action du cadmium sur la synthèse ou l'utilisation des lipides ou des dommages sur un organite, comme les mitochondries, dont dépend l'utilisation des lipides.

#### 5.3.2.2 Histologie rénale

Les principales lésions rénales décrites suite à l'exposition des têtards au cadmium sont la dilatation ou stase des tubules, l'oedème glomérulaire et l'augmentation des granulations acidophiles accompagnée d'une vacuolisation dans le cytoplasme des cellules tubulaires. L'incidence de l'augmentation des granules et des vacuoles cytoplasmiques

était élevé principalement chez les têtards exposés à 5 ppm de cadmium. Ces altérations étaient localisées surtout au niveau des tubules proximaux et distaux.

La dilatation tubulaire, observée autant chez les témoins que chez les individus exposés, ainsi que l'oedème glomérulaire ne sont vraisemblablement pas causés par le cadmium. Thiel *et al.* (1980) ont démontré, suite à la provocation d'une ischémie par occlusion de l'artère rénale chez les rats, qu'une dilatation de la lumière des tubules proximaux résultait d'une augmentation de la pression tubulaire causée par la présence de débris cellulaires (probablement des parties apicales des cellules des tubules proximaux) et par la congestion des capillaires sanguins jouxtant les tubules. La stase tubulaire mais aussi l'intumescence glomérulaire peuvent donc être la conséquence du pincement de l'artère rénale précédant la néphrectomie lors du sacrifice du têtard.

Par ailleurs, la vacuolisation et l'augmentation des granules dans les cellules tubulaires corroborent les résultats obtenus par Oronsaye (1989) chez des poissons exposés à 6 ppm de cadmium pendant 18 jours. Cet auteur suggère que ces masses granulaires seraient constituées de complexes contenant du cadmium et que la présence de ces granules dans les lumina des tubules et des tubes collecteurs serait une indication qu'ils sont en voie d'excrétion.

L'incidence et l'importance des lésions néphrétiques identifiées chez les têtards comparativement aux affections hépatiques observées suggèrent que le cadmium est plus hépatotoxique que néphrotoxique.

#### 5.3.2.3 Histologie branchiale

Les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure à un épaississement de l'épithélium des filaments branchiaux suite à l'exposition au cadmium. Ce phénomène est pourtant une réponse commune à l'exposition au cadmium chez les poissons. Oronsaye (1989) a noté, chez des épinoches (*Gasterosteus aculeatus* L.) exposés à des concentrations de cadmium variant entre 2 et 6 ppm pendant une période s'échelonnant sur 30 jours, un soulèvement de l'épithélium et la colonisation par des cellules acidophiles de l'espace créé par ce soulèvement épithélial. Il mentionne que cette hypertrophie épithéliale augmente la difficulté du passage de l'oxygène du milieu aqueux jusqu'au sang. D'autre part, une hypertrophie et une hyperplasie des cellules épithéliales et des cellules acidophiles, spécialement à la base des lamelles, un soulèvement de l'épithélium lamellaire, une nécrose, l'accumulation de débris cellulaires et la congestion des capillaires étaient les principales altérations observées dans les branchies des poissons (*Puntius conchonius* Ham.) exposés à 0,6 ppm de cadmium pendant 12 semaines (Gill et al., 1988).

Versteeg et Giesy (1986) ont également noté une hyperplasie et une hypertrophie des cellules épithéliales des lamelles chez les crapets (*Lepomis macrochirus*) suite à une exposition de 163 jours à 3,9 et 12,7 ppm de cadmium. Aucune référence bibliographique, cependant, ne rapportait les effets du cadmium sur les branchies des têtards.

La mesure de l'épaisseur de l'épithélium filamenteux effectuée dans le cadre de notre étude pouvait rendre compte de modifications histologiques telles un soulèvement de l'épithélium ainsi qu'une hypertrophie ou une hyperplasie des cellules épithéliales sur les filaments. Cependant, les résultats obtenus ne permettent pas de dire qu'il y a eu épaissement de l'épithélium filamenteux des branchies. L'hyperplasie des cellules à chlorure, jouant pourtant un rôle protecteur en excréant le cadmium, n'a pas été observée. De plus, aucune autre pathologie comme celles décrites par Gill *et al.* (1988) n'a été observée.

#### **5.4 Indices somatiques**

Une réduction non significative de la masse hépatique et rénale a été notée chez les têtards exposés au cadmium. Cette diminution était plus prononcée pour le foie que pour les reins.

La tendance observée quant à la diminution de l'indice hépatosomatique peut s'expliquer par une diminution de la concentration de glycogène dans le foie. Wani et Latey (1983), suite à l'observation d'une diminution de l'indice hépatosomatique chez des poissons exposés pendant 30 jours à 25 ppb de cadmium, avançaient également cette hypothèse. Les résultats de Sjöbeck *et al.* (1984) montrent, malgré un indice somatique stable, une baisse de la concentration en glycogène dans les muscles et le foie des poissons exposés au cadmium *in situ* par rapport aux individus de référence. Ces auteurs suggéraient que la diminution de glycogène était probablement provoquée par un déséquilibre du contrôle endocrinien du métabolisme des carbohydrates. Cependant, les résultats de Mudgal et Patil (1986) étaient contradictoires: l'exposition des grenouilles adultes (*R. cyanophlyctis*) au cadmium causait une diminution de la quantité de glycogène dans le foie et les reins des femelles alors qu'une glycogénose était enregistrée dans le foie et les reins des mâles.

### 5.5 Bioconcentration

Nonobstant les intestins, l'accumulation importante du cadmium dans le foie et les reins par rapport aux concentrations retrouvées dans les autres parties corporelles analysées (muscle et résidus), reflète la capacité ou fonction

de détoxification inhérente à ces organes. La forte accumulation de cadmium dans le foie et les reins de la grenouille verte suggère également que le mécanisme de détoxification implique le confinement temporaire du cadmium à l'aide d'une protéine ressemblant à la métallothionéine des mammifères. Des études ont en effet démontré l'existence de cette macromolécule chez plusieurs espèces de différents groupes taxonomiques tels les cyanophycées, le zooplancton, les mollusques, les crustacés et les poissons (Coombs, 1979).

La métallothionéine, protéine de faible poids moléculaire, est synthétisée en réponse à la présence de métaux comme le cadmium dans l'organisme de nombreuses espèces animales. Dans la cellule, le cadmium est presque entièrement lié à cette protéine et ce phénomène protège les organelles cellulaires des effets toxiques du cadmium.

Chez les mammifères, le cadmium s'accumule préférentiellement dans les reins (Samarawickrama, 1979; André *et al.*, 1990) bien que certaines études (Cahill *et al.*, 1983) montrent un patron d'accumulation différent avec le foie comme organe principal, suivi des reins.

Selon Hilmy *et al.* (1986), le cadmium, chez *B. regularis*, s'accumule préférentiellement dans le foie suivi des reins et des muscles alors que les résultats de Canton et Slooff (1982)

montrent que le cadmium s'accumule davantage dans les reins que dans le foie chez *Xenopus laevis*.

Le facteur de bioconcentration des têtards de grenouille verte exposés à 1 ppm pendant 25 jours s'élève à 3,41 avec une valeur maximale de 3,85 atteinte au 20e jour. Bien que la courbe fléchisse entre le 20e et le 25e jour, il est possible que le plateau n'ait pas été atteint. Cette valeur n'est pas particulièrement élevée comparativement aux facteurs de bioconcentration (FBC) calculés pour les algues mais sont du même ordre de grandeur que les FBCs d'autres espèces de vertébrés. En effet, bien que des FBCs atteignent 10 000 chez les algues, la grande majorité des FBCs sont inférieurs à 1000 avec une valeur médiane de 90 (Taylor, 1983). De plus, considérant seulement les espèces de vertébrés (particulièrement les poissons), 60% des valeurs attribuées aux FBCs sont inférieures à 20 (Taylor, 1983; Woodworth et Pascoe, 1983). Une étude réalisée par Canton et Sloof (1982), chez des grenouilles adultes (*X. laevis*) exposées à 29 ug/L, démontrait un facteur de bioconcentration s'élevant à 79 pour 50 jours d'exposition et à 130 pour 100 jours d'exposition.

## CONCLUSION

Les têtards de grenouille verte (*Rana clamitans*) présentent des caractéristiques intéressantes de bioindicateur. En effet, ils semblent être, d'une part, assez tolérants aux perturbations engendrées par l'exposition au cadmium comparativement à d'autres espèces d'amphibiens sous forme larvaire et, d'autre part, présentent des paramètres sensibles aux modifications des conditions du milieu.

Les paramètres montrant un changement significatif suite à l'exposition au cadmium sont la valeur d'hématocrite, les proportions de thrombocytes et d'érythrocytes en dégénérescence dans la circulation sanguine, la morphométrie érythrocytaire (longueur, excentricité, surface) et la concentration de cadmium dans les différentes parties corporelles. Parmi ces paramètres, les plus sensibles, c'est-à-dire ceux qui présentent un plus grand effet proportionnel à la concentration, semblent être l'excentricité érythrocytaire, les proportions de thrombocytes et d'érythrocytes en dégénérescence ainsi que les concentrations de cadmium dans le foie et les reins. De plus, les analyses de variation temporelle montrent que la différence entre les individus exposés et les témoins pour les trois paramètres hématologiques énumérés précédemment semble soit augmenter avec le temps soit tendre à demeurer stable. L'hypothèse la plus plausible pouvant expliquer

l'apparition des effets hématologiques est que le cadmium provoque une anémie régénérative par hémolyse.

Le potentiel de bioconcentration des têtards de grenouille verte n'affiche pas une valeur exceptionnelle comparativement à d'autres espèces aquatiques mais il demeure comparable aux potentiels des autres vertébrés. Par ailleurs, les indices somatiques se sont révélés peu sensibles au stress engendré par le cadmium. Les effets hépatiques observés suite à l'exposition au cadmium sont la nécrose des hépatocytes et la vacuolisation cytoplasmique causée possiblement par une accumulation de lipides. Les effets néphrotiques consistaient en une vacuolisation accompagnée d'une augmentation des granules acidophiles dans le cytoplasme des cellules tubulaires. Comme la stéatose hépatique (accumulation de lipides) de même que les affections rénales observées sont des lésions fréquentes et non spécifiques, nous pouvons conclure que la néphrologie et l'hépatologie sont de bons compléments diagnostics mais ne peuvent servir d'indicateurs isolément. D'autre part, les résultats concernant l'histologie branchiale ne sont pas concluants et ne concordent donc pas avec ce qui a déjà été observé chez les poissons.

La combinaison de paramètres constituée de l'excentricité érythrocytaire et de la concentration de cadmium dans les reins permettait de discriminer le plus efficacement les groupes de

têtards exposés au cadmium. Afin de confirmer ces qualités de sensibilité de paramètres chez les têtards de grenouille verte et leur applicabilité sur le terrain, des études en laboratoire basées sur un plus grand nombre d'individus ainsi que des études vérifiant la convenance de l'utilisation de ces bioindicateurs sur le terrain sont recommandées. Notons que l'utilisation de paramètres sensibles tels la morphologie érythrocytaire chez une espèce constitue un bon compromis entre le réalisme toxicologique (tests sur bactéries, paramètres physiologiques et moléculaires) et le réalisme écologique (indices de diversité, etc.).

## BIBLIOGRAPHIE

André, J.M., J.C. Amiard, C. Amiard-Triquet, A. Boudou, et F. Ribeyre. 1990. Cadmium contamination of tissues and organs of delphinids species (*Stenella attenuata*) - Influence of biological and ecological factors. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 20(3): 290-306.

Anonyme. Culture of amphibian larvae. Carolina Biological Supply Company, Burlington, North Carolina. 3 p.

Anonyme. 1989. Standard guide for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. Rapport no. E 729-88. American Society for Testing and Materials, Philadelphie. p. 360-379.

Axelsson, B., et M. Piscator. 1966. Renal damage after prolonged exposure to cadmium. *Arch. Environ. Health*, 12: 360-373.

Aylett, B.J. 1979. The chemistry and bioinorganic chemistry of cadmium. In The chemistry, biochemistry and biology of cadmium (M. Webb, éd.), Topics in environmental health, Vol. 2, p. 1-43. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. 465 p.

- Berlin, M., et L. Friberg. 1960. Bone-marrow activity and erythrocyte destruction in chronic cadmium poisoning. *Arch. Environ. Health*, 1: 23-30.
- Bertin, L. 1958. Organes de la respiration aquatique. In *Traité de zoologie: anatomie, systématique, biologie*. Tome XIII, Fascicule II. Agnathes et poissons: anatomie, éthologie, systématique. p. 1303-1341. Masson et Cie, éd., Paris. 1812 p.
- Borg, H., A. Edin, K. Holm, et E. Sköld. 1981. Determination of metals in fish livers by flameless atomic absorption spectroscopy. *Water Res.*, 15: 1291-1295.
- Boyle, R.W., et I.R. Jonasson. 1979. Géochimie du cadmium. In *Les effets du cadmium dans l'environnement canadien*. Rapport No. 16744, p. 15-32. Conseil national de recherches du Canada, Ottawa. 150 p.
- Broyles, R.H., G.M. Johnson, P.B. Maples, et G.R. Kindell. 1981. Two erythropoietic microenvironments and two larval red cell lines in bullfrog tadpoles. *Dev. Biol.*, 81: 299-314.

- Cahill, A.L., D. Nyberg, et C.F. Ehret. 1983. Tissue distribution of cadmium and metallothionein as a function of time of day and dosage. *Environ. Res.*, 31: 54-65.
- Canter, P., et G. Jollès. 1969. *Histochimie normale et pathologique*. Gauthier-Villars, Paris. 923 p.
- Canton, J.H., et W. Slooff. 1982. Toxicity and accumulation studies of cadmium (Cd 2+) with freshwater organisms of different trophic levels. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 6: 113-128.
- Case, C.L., et T.R. Johnson. 1984. *Laboratory experiments in microbiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, California. 414 p.
- Casillas, E., et L.S. Smith. 1977. Effect of stress on blood coagulation and hematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Biol.* 10, 481-491.
- Conseil National de la Recherche du Canada (CNRC). 1979. *Les effets du cadmium dans l'environnement canadien*. Service des publications, CNRC/NRCC, Ottawa, Canada. 118 p.
- Cook, F.R. 1984. *Introduction aux amphibiens et reptiles du Canada*. Musées nationaux du Canada, Ottawa. 211 p.

- Cooke, A.S. 1981. Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field. *Environ. Pollut.*, 25: 123-133.
- Coombs, T.L. 1979. Cadmium in aquatic organisms. In The chemistry, biochemistry and biology of cadmium (M. Webb, éd.), Topics in environmental health, Vol. 2, p. 93-139. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. 465 p.
- Cossa, D. 1989. A review of the use of *Mytilus* spp. as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters. *Oceanol. Acta*, 12(4): 417-432.
- Désilets, L., et C. Langlois. 1989. Variabilité spatiale et saisonnière de la qualité de l'eau du fleuve Saint-Laurent. Environnement Canada, Montréal. 112 p.
- Duellman, W.E., et L. Trueb. 1986. Biology of amphibians. McGraw-Hill Book Company, New York. 670 p.
- El-Domiaty, N.A. 1987. Stress response of juvenile *Clarias lazera* elicited by copper. *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol.*, 88(2): 259-262.

- Finch, S.C. 1972. Granulocytosis. In Hematology, (W.J. Williams, W. Beutler, A.J. Erslev, et R.W. Rundles, éds), p. 654-663. McGraw-Hill Book Company, New York. 1480 p.
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. University Press, Cambridge, Eng. 333 p.
- Foxon, G.E.H. 1964. Blood and respiration. In Physiology of the amphibia, p.151-209. Academic Press, New York.
- François-Krassowska, A., et B. Wilczynska. 1987. Morphological blood indexes in ontogeny of *Pelobates fuscus* (Laur.). Acta Biol. Cracov. Ser. Zool., 29: 85-92.
- Freda, J., et D.G. McDonald. 1990. The effects of aluminum on the leopard frog, *Rana pipiens*: life stage comparisons and aluminum uptake. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 47: 210-216.
- Freda, J. 1991. The effects of aluminum and other metals on amphibians. Environ. Pollut., 71: 305-328.
- Gabe, M. 1968. Techniques histologiques. Masson, Paris. 1113 p.

- Garofano, J.S., et H.I. Hirshfield. 1982. Peripheral effects of cadmium on the blood and head kidney in the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 28: 552-556.
- Giannetti, M., H. Strick, A. Trux, et W.J. Kloft. 1990. Changes in serum parameters of an amphibian vertebrate bioindicator model for the detection of radiation stress. Naturwissenschaften, 77(4): 179-182.
- Gill, T.S., et J.C. Pant. 1985. Erythrocytic and leucocytic responses to cadmium poisoning in a freshwater fish, *Puntius conchoni*. Environ. Res., 36: 327-337.
- Gill, T.S., et J.C. Pant. 1986. Chromatin condensation in the erythrocytes of fish following exposure to cadmium. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 36: 199-203.
- Gill, T.S., J.C. Pant, et H. Tewari. 1988. Branchial pathogenesis in a freshwater fish, *Puntius conchoni* Ham., chronically exposed to sublethal concentrations of cadmium. Ecotoxicol. Environ. Saf., 15(2): 153-161.
- Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica, 16: 183-190.

Goulet, M., et D. Laliberté. 1982. Métaux: contamination du milieu aquatique au Québec méridional. Service de la qualité des eaux, Ministère de l'environnement, Québec. Envirodoq-nd-83-0017. 105 p.

Greenhouse, G. 1976. The evaluation of toxic effects of chemicals in fresh water by using frog embryos and larvae. Environ. Pollut., 11: 303-315.

Hall, R.J., et B.M. Mulhern. 1984. Are anuran amphibians heavy metal accumulators? In Vertebrate ecology and systematics. A tribute to Henry S. Fitch (R.A. Seigel, L.E. Hunt, J.L. Knight, L. Malaret et N.L. Zuschlag, éd.), p. 123-133. University of Kansas, Lawrence, Kansas.

Hardig, J., T. Andersson, B.-E. Bengtsson, L. Forlin, et A. Larsson. 1988. Long-term effects of bleached kraft mill effluents on red and white blood cell status ion balance and vertebral structure in fish. Ecotoxicol. Environ. Saf., 15(1): 96-106.

Hilmy, A.M., N.A. El-Domiaty, A.Y. Daabees, et E.M.A. Taleb. 1986. The use of chelating agent EDTA in the treatment of acute cadmium toxicity tissue distribution and some blood parameters in the egyptian toad *Bufo regularis*. Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol., 85(1): 67-74.

- Hogan, G.R., et S.L. Razniak. 1992. Split dose studies on the erythropoietic effects of cadmium. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 48: 857-864.
- Hose, J.E., J.N. Cross, S.G. Smith, et D. Diehl. 1987. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Southern California. *Mar. Environ. Res.*, 22: 167-176.
- Hould, R. 1984. *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie*. Décarie Editeur, Montréal. 400 p.
- Hughes, G.M., et J. Nemcsók. 1988. Effects of low pH alone and combined with copper sulphate on blood parameters of rainbow trout. *Environ. Pollut.*, 55: 89-95.
- Hutton, M. 1983. Sources of cadmium in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 7: 9-24.
- Jayaprakash Rao, I., et M.N. Madhyastha. 1987. Toxicities of some heavy metals to the tadpoles of frog, *Microhyla ornata* (Dumeril & Bibron). *Toxicol. Lett.*, 36(2): 205-208.
- Jenssen, T.A. 1967. Food habits of the green frog, *Rana clamitans*, before and during metamorphosis. *Copeia*, 1: 214-218.

- Jordan, H.E. 1965. Comparative hematology. In Handbook of hematology (H. Downey, éd.), Vol. II, p. 699-862. Hafner Publishing Company, New York.
- Khangarot, B.S., et P.K. Ray. 1987. Sensitivity of toad tadpoles, *Bufo melanostictus* (Schneider), to heavy metals. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 38: 523-527.
- Korte, F. 1983. Ecotoxicology of cadmium: general overview. Ecotoxicol. Environ. Saf., 7: 3-8.
- Larsson, A., B.E. Bengtsson, et O. Svanberg. 1976. Some haematological and biochemical effects of cadmium on fish. In Effects of pollutants on aquatic organisms. A.P.M. Lookwood (éd.), p. 35-45. Cambridge University Press, Cambridge.
- Leclair, R. Jr. 1985. Les amphibiens du Québec: biologie des espèces et problématique de conservation des habitats. Service des études écologiques, Ministère du Loisir, de la Chasse et de la Pêche, Québec. 121 p.
- Legendre, L., et P. Legendre. 1984. Ecologie numérique. Tome 2. La structure des données écologiques. Presses de l'Université du Québec et Masson. 2e édition. 335 p.

- Léonard, A. 1990. Les mutagènes de l'environnement et leurs effets biologiques. Masson, Paris. 306 p.
- Linman. J.W. 1962. Factors controlling hemopoiesis: thrombopoietic and leukopoietic effects of "anemic" plasma. J. Lab. Clin. Med., 59(2): 262-274.
- Martin, E., et G. Feldmann. 1983. Histopathologie du foie et des voies biliaires de l'adulte et de l'enfant. Masson, Paris. 357 p.
- Matson, T.O. 1990. Erythrocyte size as a taxonomic character in the identification of Ohio *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. Herpetologica, 46(4): 457-462.
- McDonald, D.G., J. Freda, V. Cavdek, R. Gonzalez, et S. Zia. 1991. Interspecific differences in gill morphology of freshwater fish in relation to tolerance of low-pH environments. Physiol. Zool., 64(1): 124-144.
- McNaught, D.C., et D.C. Drake. 1991. Behavioral biomarkers indicative of stress in daphnia. In 18<sup>e</sup> atelier annuel sur la toxicité aquatique, septembre 1991, Ottawa. Résumé.

Miller, T.G., et W.C. Mackay. 1980. The effects of hardness, alkalinity and pH of test water on the toxicity of copper to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Res.*, 14: 129-133.

Ministère de l'Énergie et des Ressources (MER). 1988. Statistiques sur l'industrie minière. Service de la statistique, MER, Gouvernement du Québec. 39 p.

Morin, B., et G. Walsh. 1991. The utilization of gill and liver histopathology to assess habitat quality in the St. Lawrence river. In 18e atelier annuel sur la toxicité aquatique, septembre 1991, Ottawa. Résumé.

Morrison, C.M. 1988. Atlas d'histologie de la morue franche, *Gadus morhua*. Deuxième partie. Appareil respiratoire et pseudobranchies. Ministère des Pêches et des Océans, Ottawa. 91 p.

Mudgal, C.F., et H.S. Patil. 1985. Sex related toxicity of mercury and cadmium to frog *Rana cyanophlyctis*. *Environ. Ecol.*, 3(3): 332-334.

Mudgal, C.F., et H.S. Patil. 1986. Effects of cadmium and mercury in liver, muscles and kidney of the frog *Rana cyanophlyctis*. *Environ. Ecol.*, 4(2): 255-258.

Nei, N.H., C.H. Hull, J.G. Jenkins, K. Steinbrenner, et D.H. Bent. 1975. Statistical package for the social sciences. McGraw-Hill Inc., New York.

Ord, M.J. et G.R. Al-Atia. 1979. The intracellular effects of cadmium: an experimental study using *Amoeba proteus* as a single cell model. In The chemistry, biochemistry and biology of cadmium (M. Webb, éd.), Topics in environmental health, Vol. 2, p. 141-173. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. 465 p.

Oronsaye, J.A.O. 1989. Histological changes in the kidneys and gills of the stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., exposed to dissolved cadmium in hard water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 17(3): 279-290.

Peterson, P.J., et B.J. Alloway. 1979. Cadmium in soils and vegetation. In The chemistry, biochemistry and biology of cadmium (M. Webb, éd.), Topics in environmental health, Vol. 2, p. 45-92. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. 465 p.

Plum, C.M. 1951. Liver and spleen in haematopoiesis. II. Investigations into the influence of a number of metals on the peripheral blood picture, with special reference to the erythrocyte diameter and the injuries to the liver. Arch. Int. Pharmacodyn., 1: 52-79.

Porter, K.R. 1972. Herpetology. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 524 p.

Ross, M.H., E.J. Reith, et L.J. Romrell. 1989. Histology: a text and atlas. Deuxième édition. Williams & Wilkins, Baltimore. 783 p.

Rouf, M.A. 1969. Hematology of the leopard frog, *Rana pipiens*. Copeia, 4: 682-687.

Samarawickrama, G.P. 1979. Biological effects of cadmium in mammals. In The chemistry, biochemistry and biology of cadmium (M. Webb, éd.), Topics in environmental health, Vol. 2, p. 341-421. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. 465 p.

Sjöbeck, M.L., C. Haux, A. Larsson, et G. Lithner. 1984. Biochemical and hematological studies on perch, *Perca fluviatilis* from the cadmium-contaminated river Eman. Ecotoxicol. Environ. Saf., 8: 303-312.

- Smiley, I.E., et W.V. Kessler. 1979. Analytical methods for cadmium detection. In Cadmium Toxicity (J.H. Mennear, éd.), p. 1-28. Marcel Dekker Inc., New York.
- Steele, C.W., S. Strickler-Shaw, et D.H. Taylor. 1991. Failure of *Bufo americanus* tadpoles to avoid lead-enriched water. J. Herpetol., 25(2): 241-243.
- Strick, V.H., M. Giannetti, K. Pantel, et W.J. Kloft. 1990. Das Blutbild von *Xenopus laevis* als potentieller Indikator für radioaktive Belastung. Z. Angew. Zool., 77(1): 35-42.
- Szarski, H., et G. Czopek. 1966. Erythrocyte diameter in some amphibians and reptiles. Bulletin de l'Académie polonaise des Sciences, 14(6): 433-437.
- Szubartowska, E., K. Gromysz-Kalkowska, et K. Wójcik. 1990. Behavior of the formed blood elements in *Rana esculenta* L. after repeated contacts of the animal with a therapeutic dose of Foschlor. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 45: 796-803.
- Taylor, D. 1983. The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms. Ecotoxicol. Environ. Saf., 7: 33-42.

Thiel, G., D. de Rougemont, J. Torhorst, A. Kaufmann, L. Peters-Haefeli, et F.P. Brunner. 1980. Importance of tubular obstruction and its prevention in ischemic acute renal failure in the rat, p. 223-238. In Renal pathophysiology (A. Leaf et al., éds.), Raven Press, New York. 281 p.

Tyler, M.J. 1991. Declining amphibian populations - a global phenomenon? An Australian perspective. *Alytes*, 9(2): 43-50.

Usha Rani, A., et R. Ramamurthi. 1989. Histopathological alterations in the liver of freshwater teleost *Tilapia mossambica* in response to cadmium toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 17: 221-226.

Versteeg, D.J., et J.P. Giesy. 1986. The histological and biochemical effects of cadmium exposure in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 11: 31-43.

Wake, D.B. et al. 1991. Declining amphibian populations - a global phenomenon? Findings and recommendations. *Alytes*, 9(2): 33-42.

Wani, G.P., et A.N. Latey. 1983. Toxic effects of cadmium on the liver of a freshwater teleost *garra mullya* (Sykes). *Curr. Sci.*, 52(21): 1034-1035.

Wedemeyer, G., et D.J. McLeay. 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In *Stress and Fish* (A.D. Pickering, ed.), pp. 247-275. Academic Press, New York/London.

Wetzel, R.G. 1983. *Limnology*. Saunders College Publishing, Philadelphia. 767 p.

Woodworth, J., et D. Pascoe. 1983. Cadmium uptake and distribution in stricklebacks related to the concentration and method of exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 7: 525-530.

Zar, J.H. 1984. *Biostatistical analysis*. Second edition. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. 718 p.

Zittoun, R., A. Bernadou, et M. Samama. 1982. *Manuel d'hématologie*. Doin Editeurs, Paris. 427 p.

## ANNEXE I

## Méthodes histochimiques employées

## A. Méthode histochimique à l'Hémalun-Phloxine-Safran (HPS)

Les pièces de tissu déshydratées, paraffinées et coupées en section d'environ 5  $\mu\text{m}$  étaient trempées dans les bains successifs suivants:

1. Xylène	3 minutes
2. Xylène	2 minutes
3. Alcool	Rincer
4. Alcool	Rincer
5. Alcool-formol 40% (3:1)	5 minutes
6. Eau courante	10 minutes
7. Hémalun	10 minutes
8. Eau courante	10 minutes
9. Phloxine	3 minutes
10. Eau courante	Rincer
11. Alcool	Rincer
12. Alcool	Rincer
13. Alcool	Rincer
14. Safran	3 minutes
15. Alcool	Rincer
16. Alcool	Rincer
17. Xylène	Rincer
18. Xylène	Rincer

## B. Méthode histochimique à l'Acide Périodique de Schiff (APS)

### Ingrédients:

- Toluène
- Éthanol
- Eau distillée
- Tempon diastase: eau distillée: 1 L  
     Disodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ): 0,28 mg  
     Monosodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ): 1,97 mg  
     Chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ): 8 mg  
     Dissoudre complètement  
     Ajouter quelques grains de thymol  
     Filtrer.
- Malt diastase: Tempon diastase: 100 mL  
     Malt diastase: 0,1 mg
- Acide périodique à 0,5%: 0,5 mg dans 100 mL d'eau distillée
- Réactif de Schiff
- Acide sulfuré: bisulfite de soude à 10%: 6 mL  
     acide chlorhydrique: 5 mL  
     eau distillée: 100 mL
- Hémalum (Harris)
- Safran

### Technique:

1. Préparer deux séries de coupes histologiques par pièce de tissu.
2. Déparaffiner et blanchir les coupes en les faisant tremper successivement dans les bains suivants:
 

2.1 Toluène	5 minutes
2.2 Toluène	5 minutes
2.3 Éthanol	2 minutes
2.4 Éthanol	2 minutes
2.5 Éthanol 95%	2 minutes
2.6 Eau distillée	2 minutes
3. Prendre une série de coupes et les soumettre à la digestion par l'amylase selon la technique suivante:
  - 3.1 Placer les lames dans un bain de Malt diastase (chauffée à 37 °C) pendant 30 minutes à 1 heure;
  - 3.2 Laver à l'eau pendant 5 minutes;
  - 3.3 Rincer à l'eau distillée.

4. Prendre les deux séries de coupes (celles ayant subi la digestion à l'amylase et celles n'y ayant pas été soumises) et les faire réagir avec l'acide périodique de Schiff par trempages successifs dans les bains suivants:

4.1	Acide périodique	15 minutes
4.2	Eau distillée	Rincer
4.3	Réactif de Schiff (filtrer sur lame)	20 minutes
4.4	Acide sulfuré (3 fois)	2 minutes
4.5	Eau courante	10 minutes
4.6	Hématoxyline d'Harris	1 minute
4.7	Eau courante	10 minutes
4.8	Alcool 100%	Rincer
4.9	Alcool 100%	Rincer
4.10	Safran	3 minutes
4.11	Alcool 100%	Rincer
4.12	Alcool 100%	Rincer
4.13	Toluol	Rincer

Note: Le glycogène, la mucine, la réticuline, les dépôts hyalins dans les glomérules, les infiltrations amyloïdes et d'autres éléments peuvent donner une réaction positive de rose à rouge pourpre. L'amylase (diastase Malt) digère seulement le glycogène et laisse intacte les autres éléments susceptibles de capter le colorant. Ainsi, lorsque la réaction à l'APS est positive et que la réaction à l'APS avec digestion est négative, cela identifie spécifiquement la présence de glycogène dans les tissus.

## ANNEXE II

## Abréviations utilisées

## Paramètres hématologiques

AIRE	Aire des érythrocytes
BASOS	Proportion de basophiles
BLASTES	Proportion d'érythroblastes
DÉGÉS	Proportion d'érythrocytes en dégénérescence
ÉOSINOS	Proportion d'éosinophiles
ÉRYTHROS	Proportion d'érythrocytes
EXCEN	Excentricité des érythrocytes
LARG	Largeur des érythrocytes
LEUCOS	Proportion de leucocytes
LONG	Longueur des érythrocytes
LYMPHOS	Proportion de lymphocytes
MONOS	Proportion de monocytes
NEUTROS	Proportion de neutrophiles
PROGRAS	Proportion de progranulocytes
THROMBOS	Proportion de thrombocytes

## Autres paramètres

CCF	Concentration de cadmium dans le foie
CCR	Concentration de cadmium dans les reins
CCT	Concentration de cadmium dans l'organisme entier
FBC	Facteur de bioconcentration
PER	Période d'exposition au cadmium (jours)
STADE	Stade de développement