

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

Activation des neutrophiles humains par le Toxaphène et le chlordane,
deux polluants organiques persistants

Par
Marc Gauthier

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

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

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

Examineur externe

Philippe A. Tessier
Centre hospitalier de l'Université Laval
Centre de recherche en infectiologie

Directeur de recherche

Denis Girard
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en santé humaine

Co-directeur de recherche

Charles Roberge
Centre de recherche de
l'Hôpital St-Sacrement

Résumé

Le présent travail illustre une étude immunotoxicologique sur le toxaphène et le chlordane. Nous nous sommes plus précisément concentrés sur les effets de ces deux composés en relation avec les phénomènes inflammatoires en utilisant les neutrophiles humains comme modèle *in vitro*. Malgré que les deux composés soient connus pour avoir des effets toxiques, incluant quelques effets pro-inflammatoires potentiels, peu de données sont encore disponibles concernant leur action sur des cellules du système immunitaires et tout spécialement sur les neutrophiles.

Le toxaphène et le chlordane sont des polluants organiques persistants (POPs) composés de plusieurs congénères différents. La formulation technique de toxaphène appliqué comme pesticide consiste en plus de 800 congénères. Parmi ceux-ci, le T2 et T12 sont les deux formes prévalentes détectables chez l'humain. Nous avons donc utilisé les formulations techniques de toxaphène et de chlordane *in vitro*, ainsi que les congénères T2 et T12 pour étudier les réponses des neutrophiles isolés à partir de sang de volontaires sains.

Nous avons examiné plusieurs fonctions particulières des neutrophiles, et avons démontré que le toxaphène et le chlordane sont tous deux capables d'induire une production de superoxyde et d'augmenter le phagocytose de manière concentration-dépendante chez les neutrophiles humains. Ces effets ont été notés après des temps d'incubation courts (<1 heure). Le toxaphène a été le seul des deux produits capable d'augmenter l'apoptose chez les neutrophiles incubés pendant 24 heures.

Le potentiel et la cinétique d'induction du superoxyde chez les neutrophiles par le toxaphène et le chlordane ont été similaire à ceux du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), un agoniste classique des neutrophiles. De plus, l'usage de divers inhibiteurs de voies de signalisation cellulaires (génistéine, pertussis toxin, staurosporine, H-7 et HA-

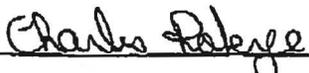
1077) ont suggéré que, comme pour le PMA, la signalisation engendrée par le toxaphène utilise principalement les PKCs et, à moins forte raison, les tyrosines kinases.

Les congénères de toxaphène T2 et T12 ont été testés pour leur potentiel à induire une production de superoxyde chez les neutrophiles humains. Les résultats indiquent que leur potentiel d'induction est faible comparativement à la formulation technique, mais tout de même significatif.

Dans son ensemble, la présente étude apporte de nombreuses et importantes conclusions sur les effets toxiques potentiels du toxaphène et du chlordane sur la santé humaine et celle des écosystèmes. De plus amples informations seraient nécessaires afin de mieux mesurer l'impact réel de ces produits tels qu'ils sont présents dans l'environnement et chez les populations humaines actuellement exposées.


Étudiant


Directeur de recherche


Co-directeur de recherche

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, le docteur Denis Girard, pour son enthousiasme, sa confiance, sa disponibilité et sa bonne humeur. Son support constant m'a permis de compléter mon projet de recherche avec succès et le respect que j'éprouve pour son dévouement au travail comme directeur n'a d'égal que l'amitié qui est née de cette relation.

Je tiens également à remercier mes collègues de laboratoire pour leur aide et pour l'ambiance de travail dynamique et chaleureuse qui régnait au laboratoire. Merci donc à Martin Pelletier, Valérie Lavastre, Annie Couture et Anik Savoie.

Merci à ma famille, mes parents Francine et Réjean et mon frère et ma sœur Philippe et Rosemarie qui m'ont toujours appuyé et encouragé.

Finalement, merci à ma conjointe Nathalie et à ma fille Émilie pour leur amour, leur support et leur compréhension pour toutes ces heures passées au laboratoire.

Table des matières

Résumé	v
Remerciements	vii
Liste des abréviations	xi
Liste des figures et tableaux	xii
Introduction	xiii
 Première partie	
1. L'inflammation	1
1.1 Définition et généralités.....	1
1.2 Le processus inflammatoire.....	2
2. Le neutrophile	4
2.1 Généralités	4
2.2 Les fonctions cellulaires du neutrophile	5
2.2.1 Adhésion.....	5
2.2.2 Diapédèse	7
2.2.3 Chimiotactisme.....	7
2.2.4 Flambée oxydative	9
2.2.5 Production de cytokines	10
2.2.6 Phagocytose.....	10
2.2.7 Apoptose.....	11
3.3 La signalisation cellulaire chez le neutrophile.....	12
3.3.1 Protéines G	12
3.3.2 Protéines kinases	13
3.3.3 Phospholipases	15
 Seconde partie	
4. Les POPs	18
4.1 Définition et généralités.....	18
4.2 Aspects structuraux.....	21
4.3 Le chlordane et le toxaphène	21
5. Le toxaphène	23
5.1 Aspects généraux	23
5.2 Toxicologie du toxaphène.....	24
5.2.1 Exposition aiguë :	24
5.2.2 Exposition chronique :	25
5.3 Immunotoxicologie.....	27

6. Le chlordane	30
6.1 Aspects généraux	30
6.2 Toxicologie du chlordane	31
6.2.1 Exposition Aiguë :	31
6.2.2 Exposition chronique :	31
6.3 Immunotoxicologie	33
Troisième partie	
7. Article # 1 : Activation of human neutrophils with technical toxaphene.....	37
7.1 Résumé français de l'article #1	37
7.2 Article #1	38
8. Article #2 :	47
8.1 Résumé français de l'article #2.....	47
8.2 Article #2	48
Quatrième partie	
9. Discussion.....	59
10. Perspectives.....	64
Références	67
Annexe.....	73

Liste des abréviations

ATP	Adénosine triphosphate	LTB ₄	Leukotriene B ₄
BPC	Biphényl polychlorés	MAPK	Kinase activée par un mitogène
BPI	Protéine inductrice de perméabilité bactérienne	O	Oxygène singulet
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique	O ₂ ⁻	Anion superoxide
DAG	Diacylglycérol	OH	Radical hydroxyle
DDT	Dichlorodiphényl- trichloroéthane	PAF	Facteur d'activation des plaquettes
DL ₅₀	Dose létale 50%	PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
DR	Récepteur de mort	PK	Protéine kinase
ERR	Récepteur relié aux oestrogènes	PL	Phospholipase
fMLP	N-formyl-méthionine-leucine-phénylalanine	PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
GDP	Guanosine diphosphate	PNUE	Programme des Nations Unies pour l'environnement
GTP	Guanosine triphosphate	POP	Polluant organique persistant
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène	RANTES	Regulated upon activation, normal T expressed and presumably secreted
HOCl	Acide hypochloreux	SAPK	Kinase activée par le stress
ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire	SI	Système immunitaire
IL	Interleukine	TNF	Facteur nécrosant les tumeurs
INF	Interféron	TOX	Toxaphène
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate	TRAIL	Ligand inducteur d'apoptose apparenté au TNF

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Implication des neutrophiles dans la réponse inflammatoire.....	3
Figure 2 : Structure chimique des douze POPs (PNUE, 2001).....	20
Figure 3 : Structures du Camphène et du 4,7-méthanoindène.....	22
Figure 4 : Résumé schématique de l'action du toxaphène sur les neutrophiles.....	61
Figure 5 : Résumé schématique de l'action du chlordane sur les neutrophiles.....	61

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des différents POPs et leur usage.....	19
Tableau 2 : DL ₅₀ pour le toxaphène technique selon l'espèce et la voie d'administration.....	25

Introduction

Le système immunitaire (SI), qui nous protège contre les infections de toutes sortes, est constamment mis à l'épreuve dans notre vie de tous les jours. En plus de toutes les bactéries, virus, champignons et autres pathogènes potentiels pouvant attaquer le SI, ce dernier est sujet à de multiples stimuli, comme les hormones, les variations de température ou d'humidité, etc. qui l'empêcheront trop souvent de faire son travail convenablement. De nos jours, un nouvel obstacle se dresse contre le SI : l'exposition aux xénobiotiques de toutes sortes, issus du développement industriel. Ces expositions menacent, par leurs effets toxicologiques, l'immunité de même que les autres fonctions physiologiques normales qui assurent l'homéostasie des organismes vivants.

Le présent travail portera donc sur les effets toxiques potentiels de deux composés chimiques, le toxaphène et le chlordane, sur un aspect précis du SI, soit l'inflammation. Le toxaphène et le chlordane sont deux pesticides de la classe des organochlorés qui présentent des dangers pour l'environnement à cause de leur grande persistance. En effet, les deux composés sont classés parmi les douze polluants organiques persistants (POPs) et considérés comme prioritaires par Santé-Canada.

Si beaucoup de données ont été accumulées jusqu'à ce jour sur les effets toxiques de ces deux composés, peu de choses restent encore dites à propos de leurs effets sur le système immunitaire. Les neutrophiles serviront ici de modèle afin de déterminer et quantifier les effets immunotoxicologiques potentiels des deux produits. Ce sont des cellules du SI qui sont particulièrement impliquées dans les processus inflammatoires, et qu'il est possible d'isoler à partir de sang frais. En utilisant ici du sang humain obtenu de donateurs volontaires, nous pouvons fournir ici une étude pertinente et révélatrice.

La revue de la littérature est divisée en deux parties bien distinctes, soit une première traitant de l'inflammation et de la physiologie des neutrophiles, qui sont les globules blancs les plus impliqués dans les premiers stades de l'inflammation. La

deuxième partie est une revue de la toxicologie des deux composés chimiques en question.

Première partie

Revue de la littérature sur l'inflammation et les neutrophiles

1. L'inflammation

1.1 Définition et généralités

L'inflammation est un processus de défense propre aux organismes supérieurs en réponse à différents stimuli. Ceux-ci peuvent être de trois types, soit bactérien, physique ou chimique. Si les deux premiers sont connus de longue date, la littérature scientifique récente présente de nouvelles données concernant les agents chimiques à propriétés pro-inflammatoires. Ces données confirment l'importance de la compréhension de la réaction inflammatoire dans le domaine de l'immunotoxicologie.

Les chercheurs œuvrant dans le domaine de l'inflammation reconnaissent actuellement l'importance de l'acquisition de nouvelles données concernant les effets des xénobiotiques sur la réponse inflammatoire (Tryphonas, 1998). À ce chapitre, les neutrophiles sont certainement les cellules les plus fréquemment étudiées. Elles le sont pour leur capacité à réagir rapidement à de nombreux stimuli, mais aussi parce qu'elles initient souvent la réponse inflammatoire. Leur capacité à produire des radicaux libres est également une caractéristique importante, pouvant interagir avec le xénobiotique lui-même en le dégradant ou encore en l'activant (Eastmond et Smith, 1990). Les particularités des neutrophiles suscitent d'ailleurs le développement de nouvelles approches expérimentales afin d'en permettre l'étude avec les xénobiotiques (Parchment, 1998 ; Kochel et Sajewicz, 1997)

La littérature scientifique récente propose ainsi un grand nombre d'études sur les effets de xénobiotiques sur les neutrophiles, utilisant des composés aussi divers que des polluants organiques comme les biphényles polychlorés (Tithof *et al.*, 1997 ; Lee et Park, 1980), des polluants atmosphériques comme les sulfites (Pelletier, Savoie et Girard, 2000 ; Mishra *et al.*, 1995), des métaux lourds comme le cadmium et le nickel (Macia et Hernandez, 1995), des agents de conservation et de formulation pour l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique comme le propylène glycol (Morisaki, 1989 ;

Denning et Webster, 1987). Ainsi, les neutrophiles sont de plus en plus considérés aujourd'hui dans les études immunotoxicologiques.

1.2 Le processus inflammatoire

Le processus inflammatoire est une réaction stéréotypée, au cours de laquelle une série d'événements prend place, favorisant l'élimination de l'agent menaçant. On distingue les processus d'inflammation aiguë, chronique et le processus de résolution de l'inflammation.

L'inflammation chronique se distingue par une prolifération de fibroblastes et de petits vaisseaux sanguins ainsi que par un influx de cellules inflammatoires chroniques (lymphocytes, cellules plasmiques et macrophages). L'inflammation chronique peut ne pas être précédée d'un stade d'inflammation aiguë et elle est en fait une condition primaire rencontrée lors de certaines conditions immunologiques précises. Elle diffère aussi de l'inflammation aiguë en ce qu'elle est presque entièrement dirigée par les cellules du système immunitaire.

Les premières phases de l'inflammation sont caractérisées par des événements vasculaires (vasodilatation et augmentation de la perméabilité vasculaire) régis par des médiateurs chimiques comme l'histamine, la bradykinine et les métabolites de l'acide arachidonique (prostaglandines et leucotriènes). La production de ces médiateurs implique parfois une boucle d'amplification et plusieurs d'entre eux partagent des modes d'activation ainsi que des modes d'action semblables. En plus de moduler les fonctions vasculaires, la présence de ces médiateurs chimiques attirera au site inflammatoire les cellules du SI et causera également une sensation de douleur associée à la réponse inflammatoire.

Les mastocytes et les neutrophiles sont parmi les premières cellules à favoriser la production de ces médiateurs chimiques, grâce à leur capacité de dégranuler en réponse à

divers stimuli. Situées près des vaisseaux sanguins et des surfaces cutanées, ces cellules vont ainsi activer les parois des vaisseaux sanguins et les cellules des tissus environnants. Les médiateurs chimiques produits au site inflammatoire en conjonction avec l'augmentation de l'influx et de la perméabilité sanguine vont par la suite favoriser un influx de cellules du SI vers le site inflammatoire.

Les phagocytes, c'est-à-dire principalement les granulocytes et les macrophages seront les premières cellules à arriver à un site inflammatoire (Figure 1). Parmi celles-ci, les neutrophiles seront les toutes premières à y arriver grâce à leur capacité accrue de migration. Cette migration s'effectue en quatre étapes : premièrement l'adhésion et roulement des cellules contre la paroi de l'endothélium (1), l'adhésion ferme par le biais des intégrines (2), l'émigration vers le tissu ou diapédèse (3), puis leur mouvement à l'intérieur du tissu vers le site inflammatoire, que l'on nomme chimiotactisme (4).

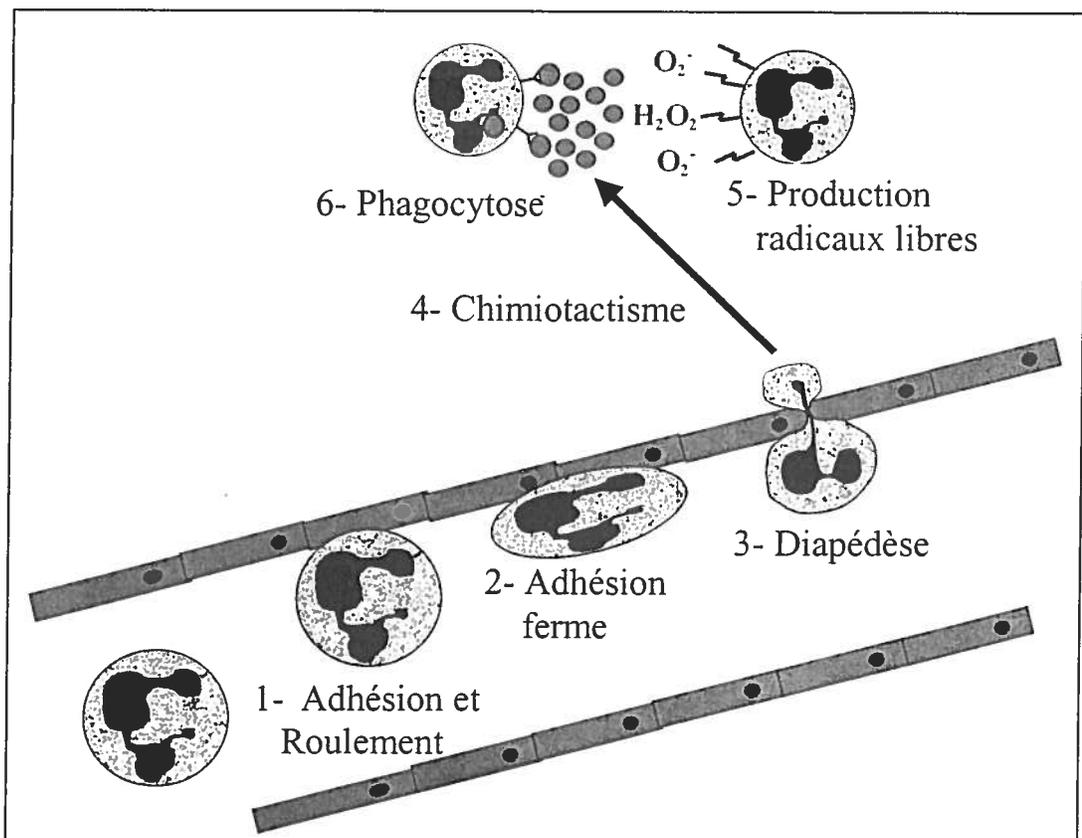


Figure 1 : Implication des neutrophiles dans la réponse inflammatoire.

Une fois arrivés sur les lieux, les neutrophiles pourront reconnaître la présence de l'agent infectieux ou menaçant et le combattre par différents moyens. Cette reconnaissance peut être ou non améliorée par la présence d'opsonines, de molécules comme des anticorps ou comme la partie C3b du complément qui vont se fixer à la surface de la particule à ingérer ou à détruire, facilitant ainsi leur ingestion par phagocytose.

Au site inflammatoire, le neutrophile pourra à son tour produire des facteurs de chimioattraction et de modulation de la réponse immunitaire (cytokines, prostaglandines et leukotriènes). Il pourra également produire et/ou relâcher dans le milieu environnant des agents chimiques dirigés contre les microorganismes présents (5). Parmi ceux-ci, notons la présence de radicaux libres, (substances oxydantes très puissantes) et d'enzymes digestives comme des protéases diverses qui vont contribuer à dégrader les composantes cellulaires des microorganismes. Ensuite, tel que mentionné, les granulocytes et macrophages peuvent également phagocyter (6), c'est-à-dire avaler littéralement les particules ou microorganismes.

Par suite de ces événements, il est important que le processus inflammatoire se termine, et ceci débute par l'apoptose, ou mort programmée, des cellules du SI. Les débris cellulaires sont phagocytés par les macrophages, et le fluide (œdème) absorbé par les cellules environnantes et redirigé vers la circulation.

2. Le neutrophile

2.1 Généralités

Les neutrophiles, comme les éosinophiles et basophiles, sont des granulocytes. Également nommés leucocytes polymorphonucléaires, les granulocytes sont des phagocytes, tout comme les monocytes/macrophages. Après les globules rouges et les plaquettes, les neutrophiles sont les cellules les plus abondantes du SI, constituant de 50 à

70% des leucocytes totaux. Ces cellules sont d'autant plus importantes qu'elles constituent la première ligne de défense contre les microorganismes (bactéries, virus, parasites et autres) qui tentent d'envahir notre corps.

La genèse des neutrophiles s'effectue à partir de la moelle osseuse et passe par plusieurs étapes de maturation. Les précurseurs, les myéloblastes, se divisent et mûrissent graduellement du stade promyélocyte à myélocyte, métamyélocyte, neutrophile immature puis finalement au stade de neutrophile mature. Cette maturation s'accompagne de l'acquisition progressive de récepteurs extracellulaires, ainsi que des différents types de granules. Les granules primaires, par exemple, apparaissent à partir de l'état de promyélocyte tandis que les granules secondaires se forment à l'état de myélocyte seulement. Le neutrophile immature, appelé aussi « band neutrophil », ne possède déjà plus la capacité de se diviser et le neutrophile mature, s'il n'est pas activé, possède une demi-vie de six à neuf heures dans la circulation. Cette demi-vie très courte et le nombre impressionnant de neutrophiles en circulation impliquent donc que le taux de production de ce type cellulaire par la moelle osseuse est très élevé. La production quotidienne a été estimée à $0,9 \times 10^9$ neutrophiles par kilo de poids corporel chez une personne moyenne (Edwards, 1994).

2.2 Les fonctions cellulaires du neutrophile

Comme mentionné auparavant, le rôle des neutrophiles au cours du processus inflammatoire passe par plusieurs étapes conduisant à l'arrivée des neutrophiles au site inflammatoire, leur combat contre l'agent infectieux puis leur retrait et élimination. Chacune de ces étapes implique certaines fonctions cellulaires qui sont détaillées ici selon un ordre chronologique.

2.2.1 Adhésion

La première étape menant à l'arrivée des leucocytes au site inflammatoire implique que ceux-ci doivent adhérer aux parois des vaisseaux sanguins afin de quitter la circulation sanguine. Cette adhésion se subdivise elle-même en deux étapes distinctes et successives, soit l'adhésion via les sélectines et ensuite via les intégrines.

Les sélectines représentent donc le premier groupe de molécules d'adhésion qui permettront aux neutrophiles de ralentir leur course d'abord, puis de rouler ensuite vers l'endroit où ils choisiront de traverser l'endothélium. Ce mouvement se fait par l'attachement et le détachement successif des sélectines sur leur récepteurs situés à la surface des neutrophiles et des cellules de l'endothélium. La sélectine majeure exprimée à la surface des neutrophiles est la *L-sélectine*, tandis que l'endothélium exprime la *P-sélectine* et la *E-sélectine* (Edwards, 1994).

Après l'attachement des neutrophiles aux cellules endothéliales par les sélectines, vient l'attachement par les intégrines. Ces molécules d'adhésion fournissent une adhérence beaucoup plus ferme que les sélectines et peuvent conduire vers le stade ultérieur de la diapédèse. Sous l'activation des intégrines, un clivage protéolytique des sélectines de la surface des neutrophiles s'effectuera. Les intégrines sont cependant peu actives à la surface des neutrophiles au repos, et la présence de facteurs d'activation comme le PAF (platelets activating factor) est ainsi nécessaire pour permettre aux intégrines de jouer leur rôle. Les principales intégrines exprimées par les neutrophiles sont la CR3 (CD11b/CD18) et la LFA-1 (CD11a/CD18). Le bon fonctionnement des intégrines semble être dépendant de certains cations : le Ca^{2+} est lié aux intégrines inactives et doit être remplacé par le Mg^{2+} pour que la liaison se produise (Edwards, 1994).

Mentionnons également la présence de certaines molécules de la superfamille des immunoglobulines comme les « intercellular adhesion molecule » (ICAM-1, ICAM-2 et ICAM-3 ainsi que VCAM-1 ou vascular cells adhesion molecule). Ces molécules contribuent aussi à l'adhésion cellulaire ferme en interagissant avec les intégrines. ICAM-1 est présente à la surface de tous les endothéliums et son interaction avec les

intégrines des neutrophiles est le mécanisme principal menant à la migration transendothéliale.

2.2.2 Diapédèse

Afin de traverser le tissu, les neutrophiles doivent passer dans un espace restreint entre les cellules de l'endothélium activé. Cette migration implique une déformation de la cellule et des mouvements cellulaires suite à l'action des protéines du cytosquelette. Le mouvement s'initie par la formation d'un pseudopode qui traverse le tapis cellulaire. Il n'existe pas encore de modèle définitif quant aux mécanismes impliqués, mais on sait que les filaments d'actine, composante majeure des microfilaments, et les microtubules en sont responsables, en conjonction avec d'autres protéines. Une fois arrivée de l'autre côté, la cellule devra se réorganiser afin de poursuivre sa migration, cette fois à travers le tissu lui-même (chimiotactisme).

2.2.3 Chimiotactisme

Tout comme la diapédèse, le chimiotactisme est un mouvement cellulaire engendré par l'action des protéines du cytosquelette. Cette fonction s'opère cependant obligatoirement vers un gradient de concentration d'un agent chimiotactique. Parmi ceux-ci, notons certaines cytokines comme l'interleukine-8 (IL-8), des médiateurs lipidiques comme le leucotriène B₄ (LTB₄), le fragment C5a du complément et des peptides d'origine bactériens comme le N-formyl-méthionine-leucine-phénylalanine (fMLP) (Trowbridge et Emling, 1997). D'autres agents comme l'histamine peuvent augmenter le chimiotactisme en réponse à d'autres agonistes sans avoir d'effets directs sur cette fonction (Edwards, 1994).

Suite à une stimulation appropriée, les neutrophiles peuvent ainsi migrer à une vitesse allant jusqu'à 20 $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ (Edwards, 1997). Des récepteurs variés permettent de répondre à différents stimuli et ainsi, le neutrophile peut effectuer un trajet en plusieurs

étapes, répondant à des gradients successifs de différents agonistes (Foxman, Campbell et Butcher, 1997)

2.2.4 Dégranulation

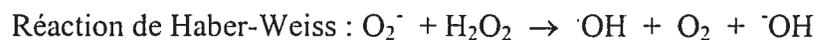
Les organelles les plus abondantes chez le neutrophile sont de loin les granules. Ces petites inclusions entourées d'une membrane contiennent de nombreuses substances dont le but est de dégrader les constituants cellulaires des agents infectieux. Parmi ces substances, notons la présence d'enzymes de dégradation comme des protéases diverses (cathepsine G, azurocidine et élastase), des enzymes participant à la flambée oxydative (myéloperoxydase et des composantes de la NADPH oxydase), des hydrolases et des enzymes s'attaquant plus spécifiquement aux bactéries : les défensines et la BPI (bactericidal permeability-inducing protein). On y trouve également d'autres enzymes de toutes sortes comme l'ATPase, la collagénase, la gélatinase, etc. (Edwards, 1994).

On distingue les granules azurophiles primaires (lysosomes), qui sont peroxydase-positives et contiennent toute la panoplie des enzymes antimicrobiennes et des hydrolases. Viennent ensuite les granules secondaires (spécifiques), tertiaires et les vésicules sécrétrices, peroxydase-négatives.

Suite à une activation, le contenu des granules des neutrophiles peut être relâché directement vers le milieu extracellulaire pour combattre les bactéries et infections diverses. Celles-ci peuvent également se fusionner avec les phagosomes nouvellement formés afin de dégrader les microorganismes ingérés, formant ainsi les phagolysosomes lors de la phagocytose. Les granules secondaires, tertiaires et les vésicules sécrétrices, qui contiennent beaucoup moins d'enzymes anti-microbiennes, ont cependant la caractéristique intéressante de posséder de nombreux récepteurs de surface variés inclus dans leur membrane. En se fusionnant avec la membrane cytoplasmique, ces granules participent donc à l'activation des neutrophiles en enrichissant leur surface en récepteurs divers. Parmi ceux-ci, les récepteurs au fMLP, CR1, CR3, gp150 et gp95, CD45 et les récepteurs à laminine (Edwards, 1994).

2.2.4 Flambée oxydative

Un moyen de défense très puissant que possède le neutrophile dans sa lutte contre les microorganismes envahisseurs est la flambée oxydative. Activée en réponse à une présence bactérienne ou autre agression, cette attaque consiste en la production de radicaux libres et autres substances oxydantes par un complexe enzymatique nommé la NADPH oxydase. On compte parmi les substances produites l'anion superoxide (O_2^-), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (O). Il est aujourd'hui connu que le radical hydroxyle est celui ayant la plus grande toxicité, mais tous ces dérivés sont liés entre eux par de multiples réactions biochimiques qui les rendent tous susceptibles de générer une toxicité au bout du compte. Par exemple, dans la réaction de Haber-Weiss catalisée par le présence d'ions métalliques, le O_2^- et le H_2O_2 peuvent se combiner pour donner, entre autres, un radical hydroxyle $\cdot OH$.



En plus de la NADPH oxydase, une autre enzyme vient aussi jouer un rôle important dans la flambée oxydative. La myéloperoxydase est une enzyme qui utilise comme substrat le peroxyde d'hydrogène, produit lors de la flambée oxydative et le transforme en hypochlorite d'hydrogène ($HOCl$). Cette substance très réactive ira par la suite réagir avec les groupements aminés pour les transformer en chloramines, avec les thioethers pour les transformer en sulfoxydes, et générer plusieurs autres réactions toxiques (Edwards, 1994).

Il est à noter que, si les substances oxydantes sont très toxiques pour les bactéries présentes, il en va de même pour les cellules et tissus environnants, ainsi que pour les leucocytes eux-mêmes. La flambée oxydative est donc une stratégie assez radicale de tenter de régler une infection, un moyen qui entraîne la destruction d'un bon nombre de

cellules en périphérie de la zone concernée. Un bon mécanisme de régulation est donc évidemment nécessaire afin de limiter l'action de cette fonction.

2.2.5 Production de cytokines

En plus de réagir à plusieurs cytokines, les neutrophiles sont également capables d'en synthétiser un bon nombre. Notons parmi celles-ci l'IL-1 α , IL-1 β , IL-8, TNF- α (tumor necrosis factor α) et INF- γ (interféron γ) (Edwards, 1994). Beaucoup de ces cytokines ont des propriétés autocrines, ce qui veut dire qu'elles auront des effets sur les neutrophiles eux-même. Par exemple, l'IL-8, qui est une chimiokine (stimule le chimiotactisme), peut être synthétisée par les neutrophiles qui arrivent à un site inflammatoire dans le but d'attirer d'autres neutrophiles. Le réseau des cytokines et leurs modes d'action est très complexe, certaines cytokines étant produites en réponse à d'autres, et les effets variant selon le type cellulaire et le niveau d'activation.

2.2.6 Phagocytose

La phagocytose est une fonction importante chez le neutrophile. Elle lui permet d'englober la particule à ingérer, qu'elle soit bactérienne ou autre, et de la capter dans une inclusion cytoplasmique entourée d'une membrane.

La phagocytose est donc une autre fonction qui requiert des mouvements cellulaires dépendants du cytosquelette et actionné par les protéines qui y sont reliées. Ces mouvements débutent par la formation d'une invagination de la membrane cytoplasmique afin d'englober la particule à ingérer. La particule ainsi englobée constituera le phagosome et comme mentionné plus haut, des granules intracytoplasmiques contenant des enzymes de digestion viendront s'y fusionner afin de dégrader les particules s'y trouvant, formant le phagolysosome.

Ainsi confiné, le microorganisme peut être détruit de manière beaucoup plus efficace, puisque les substances qui l'attaquent se trouvent plus concentrées que si elles étaient dans le milieu extracellulaire.

Comme mentionné auparavant, la reconnaissance des microorganismes et autres particules à ingérer peut être ou non facilitée par l'action d'opsonines, des molécules qui vont se lier à la particule en question. Les phagocytes (neutrophiles et macrophages) possèdent des récepteurs pouvant reconnaître les deux principaux types d'opsonines présentes à la surface des microorganismes, soit le fragment C3b du complément (C3bR) et les immunoglobulines (FcγR). Sans la présence de ces opsonines, le processus de phagocytose serait très difficile, puisque certaines bactéries ont développé des mécanismes qui leur permettent d'échapper aux phagocytes.

2.2.7 Apoptose

Les neutrophiles meurent assez rapidement, et cette mort volontaire ou programmée est nommée apoptose, par opposition au processus de nécrose. Contrairement à ce dernier, l'apoptose est un processus cellulaire bien établi, qui possède ses enzymes effectrices, ses récepteurs et ses voies de signalisation. Parmi les récepteurs pouvant enclencher l'apoptose, on compte le récepteur Fas (CD95), le death receptor 1 (DR1), DR2, DR3 et le récepteur pour la cytokine TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Le récepteur du TNF- α peut également stimuler l'apoptose dans certaines conditions. Les facteurs qui vont le plus communément engendrer l'apoptose chez le neutrophile sont certaines cytokines comme le TNF- α ainsi que le ligand de Fas (FasL) mais aussi certains radicaux libres, qui peuvent être produits par les neutrophiles eux-mêmes. La suite du signal apoptotique, qu'il soit induit via un récepteur ou de façon intracellulaire, est assurée par une famille d'enzymes protéolytiques nommées les caspases.

Lors de l'apoptose, plusieurs enzymes de dégradation sont activées et iront attaquer les constituants cellulaires des neutrophiles. Plusieurs protéines du cytosquelette et divers organelles seront ainsi dégradées, des récepteurs seront clivés et se détacheront de la surface, et même l'ADN sera dégradé par l'action de certaines endonucléases. La cellule ainsi transformée deviendra graduellement incapable de remplir ses fonctions (Whyte *et al.*, 1993) et verra son noyau rapetisser et même la taille de la cellule va diminuer légèrement. Cet état de choses va entraîner sa reconnaissance par les macrophages, qui viendront phagocyter les neutrophiles apoptotiques, menant ainsi à la résolution de l'inflammation.

3.3 La signalisation cellulaire chez le neutrophile

Les voies de signalisation menant à la régulation et au bon fonctionnement des différentes fonctions des neutrophiles sont multiples, complexes et encore mal connues. De plus, certaines fonctions partagent des voies communes de signalisation, et l'activation d'un même signal peut se faire par plusieurs récepteurs ou agonistes différents. Malgré toute cette complexité, plusieurs acteurs importants ont été bien caractérisés jusqu'à ce jour, et leur importance physiologique chez le neutrophile a été démontrée. Nous passerons ici en revue quelques-unes de ces protéines de signalisation intracellulaire, leur action biochimique et leurs conséquences physiologiques connues.

3.3.1 Protéines G

De nombreuses fonctions pouvant être régulées par un récepteur extracellulaire chez le neutrophile utilisent les protéines G comme instigateur du signal intracellulaire. Les protéines G tiennent leur nom du fait qu'elles se lient au GTP (Guanosine triphosphate) et sont divisées en deux groupes : les protéines G hétérotrimériques et les protéines G de faible poids moléculaire.

Les protéines G hétérotrimériques, comme leur nom l'indique, sont composées de trois sous-unités distinctes, soit deux grandes sous-unités α (39-52 kDa) et β (35-36 kDa) et une plus petite sous-unité γ (<10 kDa) (Edwards, 1994). Le dimère $\beta\gamma$ est très stable et hydrophobe, ce qui le confine à demeurer au niveau de la membrane cytoplasmique. La sous-unité α est plus facilement dissociable du trimère, et c'est d'ailleurs son détachement qui fera suite à l'activation de récepteur. Une fois dissociée, cette sous-unité ira alors activer ou inhiber la ou les voies de signalisation qu'elle peut influencer. Les deux sous-unités β et γ sont conséquemment beaucoup plus homologues entre les différentes protéines G hétérotrimériques, alors que la sous-unité α est très variable entre les différentes protéines G hétérotrimériques, mais contenant toujours un site de liaison pour le GTP.

Les protéines G de faible poids moléculaire sont une superfamille de protéines structurellement reliées à la protéine ras. Plus de trente membres de cette famille ont été identifiés jusqu'à maintenant, jouant presque toujours un rôle dans la signalisation cellulaire. Tout comme les protéines G de haut poids moléculaire, elles possèdent toutes un site de liaison au GTP et une activité hydrolytique transformant le GTP en GDP.

3.3.2 Protéines kinases

Les protéines kinases sont des enzymes possédant un ou plusieurs sites de phosphorylation. Elles transmettent habituellement le signal de phosphorylation vers d'autres facteurs en les phosphorylant à leur tour. Ce type de signal est très courant et plusieurs familles de kinases existent ainsi, regroupées selon leur mode d'activation et le type de phosphorylation qu'elles subissent.

Protéines kinases de type A (PKA) : Cette famille de kinases est activée par la présence de cAMP (adénosine monophosphate cyclique). La production de cAMP est contrôlée par l'adényl cyclase, une enzyme activée en réponse à l'engagement d'un récepteur couplé aux protéines G. Ce type de kinase a pour effet d'inhiber, dans certaines

conditions, la dégranulation, le chimiotactisme et la production de radicaux libres, agissant ainsi comme régulateur négatif de ces fonctions (Edwards, 1994).

Protéines kinases de type C (PKC) : Cette famille de kinases est activée par l'élévation de calcium ionique (Ca^{2+}) dans le cytosol. La famille des PKCs est subdivisée en sous-groupes, selon que l'enzyme soit ou non activable par le diacylglycérol (DAG). L'action des PKC est bien connue pour stimuler la phagocytose, la production de radicaux libres et le chimiotactisme (Edwards, 1994). Plusieurs isoformes de PKC sont connues à ce jour, et le neutrophile en exprime cinq : α , βI , βII , δ et ζ (Sergeant et McPhail, 1997).

Protéines tyrosine kinases : Il a été démontré que la stimulation des neutrophiles entraîne la phosphorylation d'un certain nombre de protéines au niveau d'un résidu tyrosine. Les protéines tyrosines kinases, qui sont responsables de cette activité, sont connues pour jouer un rôle important dans la régulation de certaines fonctions d'un grand nombre de cellules. Les protéines tyrosine kinase se divisent en deux groupes : celles qui sont liées à des récepteurs et celles qui ne le sont pas (Edwards, 1994). En effet, plusieurs récepteurs membranaires possèdent des motifs de liaison tyrosine kinase qui sont partiellement responsables de la transmission de leur signal d'activation. Par exemple, l'oligomérisation du récepteur Fc γ RIIIa (CD32) va entraîner la phosphorylation de la protéine Syk, qui est une tyrosine kinase impliquée entre autres dans la phagocytose (Raeder *et al.*, 1999). Parmi les autres tyrosine kinases d'importance pour le neutrophile, notons aussi toute la famille des JAKs dont il existe plusieurs isoformes, qui participent à la voie de signalisation JAK-STAT (Edwards, 1994).

Protéines sérine-thréonine kinases : Les « mitogen-activated protein kinases » (MAP kinases) sont parmi les plus importantes sérine/thréonine kinases chez le neutrophile. Trois types de MAP kinases ont été découverts jusqu'à maintenant, soit erk1&2, p38 et JNK/SAPK (stress activated protein kinase). Les MAP kinases ont la propriété de se transloquer au noyau de la cellule pour y transmettre leur signal. Elles ont

un rôle à jouer dans la régulation de la phagocytose, de la flambée oxydative et possiblement dans l'apoptose (Edwards, 1994).

3.3.3 Phospholipases

Les phospholipases regroupent une famille d'enzymes qui ont la capacité de scinder certains phospholipides membranaires. Elles exercent un rôle important dans la signalisation, puisque cette scission va entraîner la formation de produits qui joueront le rôle de seconds messagers.

Phospholipases de type C (PLC) : Très diversifiée, cette famille de phospholipases attaquent spécifiquement les phosphatidylinositols membranaires. Le clivage d'un de ces lipides, le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂), relâche dans le cytosol de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et du diacylglycérol (DAG). L'IP₃ est un activateur de protéines de transport de calcium, qui augmente l'influx calcique intracytosolique. L'activité PLC entraîne donc la potentialisation des PKCs chez plusieurs types cellulaires, puisqu'elle augmente le DAG et le Ca²⁺. Chez le neutrophile, cette activation mène presque toujours à la flambée oxydative, puisque les PKCs concernées phosphorylent par la suite des composantes de la NADPH oxydase et l'active (Edwards, 1994).

Phospholipases de type A₂ (PLA₂) : L'action enzymatique de cette famille de phospholipases mène à une production d'acide arachidonique, un autre second messager important. L'acide arachidonique est un substrat pour la cyclooxygénase et pour la lipoxygénase, menant ainsi à la formation d'éicosanoïdes (prostaglandines et leucotriènes). Le fMLP, le fragment C5a du complément et le LTB₄ sont tous des agonistes qui activent les phospholipases de type A₂ (Edwards, 1994).

Phospholipases de type D (PLD) : Les PLDs constituent une autre famille de phospholipases qui peuvent générer une production de DAG, cette fois-ci par la scission des phosphatidylcholines, le phospholipide le plus commun de la membrane des neutrophiles (Edwards, 1994). Le clivage des phosphatidylcholines produit de l'acide

phosphatidique, qui peut par la suite être transformé par la phosphatidate phosphohydrolase en DAG. De plus, la DAG kinase peut par la suite renverser cette réaction et transformer le DAG en acide phosphatidique. L'acide phosphatidique et le DAG ont tous les deux des rôles comme seconds messagers, et l'action de cette série d'enzymes régule ainsi leur niveau dans le cytosol. L'activité PLD peut être inhibée par la présence de cAMP et activée suite à la phosphorylation par certaines PKCs et aurait un rôle à jouer dans la flambée oxydative (Edwards, 1994).

Seconde partie

Revue de la littérature sur le chlordane et le toxaphène

4. Les POPs

4.1 Définition et généralités

Les polluants organiques persistants (POPs) sont des substances chimiques persistantes dans l'environnement qui se bio-accumulent dans la chaîne trophique et présentent un risque pour la santé humaine et une menace pour l'environnement. Suite aux preuves du transport de ces substances sur de longues distances et vers des contrées où elles n'ont jamais été utilisées ou produites et suite aux dangers qu'elles représentent pour l'environnement à l'échelle mondiale, la communauté internationale a souligné à de multiples occasions l'urgence d'actions globales pour réduire et éliminer les rejets de ces produits chimiques.

À sa dix-neuvième session, en février 1997, le Conseil d'administration du programme des nations unies pour l'environnement (PNUE) est arrivé à la conclusion qu'une action internationale, y compris un instrument juridiquement contraignant de portée mondiale, est nécessaire pour réduire les risques que présente pour la santé des personnes et l'environnement la libération des 12 polluants organiques persistants. Le Conseil d'administration a demandé au PNUE de créer et de convoquer au début de 1998 un Comité de négociation intergouvernemental qui serait chargé d'élaborer un instrument international juridiquement contraignant visant à la mise en oeuvre d'une action internationale concernant les 12 polluants organiques persistants (UNEP, 2001).

Le conseil a en outre demandé que soit constitué, sous l'égide du Comité de négociation intergouvernemental, un groupe d'experts appelés à définir des critères scientifiques ainsi qu'une procédure pour déterminer quels autres polluants organiques persistants pourraient faire l'objet d'une action internationale future. Le Conseil d'administration a aussi demandé au PNUE de prendre immédiatement des mesures en vue de mettre au point et de mettre en commun des informations, d'évaluer et de suivre les résultats des stratégies appliquées, de trouver des solutions de remplacement des

pesticides qui sont des polluants organiques persistants, de repérer les biphényles polychlorés et d'en dresser des inventaires, de répertorier les moyens de destruction disponibles, de recenser des sources de dioxines et de furanes et de déterminer les différents aspects de leur gestion.

Les gouvernements du Canada, des États-Unis et d'autres pays impliqués financent actuellement des programmes de recherche visant à fournir plus d'informations sur les POPs et leurs impacts sur la santé humaine et celle des écosystèmes en général.

Douze produits sont actuellement listés par le programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE) comme étant des POPs prioritaires, dont huit pesticides :

Tableau 1 : Liste des différents POPs et leur usage.

POP	Usage
Aldrine	Pesticide
Chlordane	Pesticide
Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT)	Pesticide
Dieldrine	Pesticide
Mirex	Pesticide
Toxaphène	Pesticide
Hexachlorobenzène	Pesticide et produit chimique industriel
Biphényles polychlorés (BPC)	Produit chimique industriel
Dioxines	Produit de dégradation dérivé des POPs
Furanes	Produit de dégradation dérivé des POPs

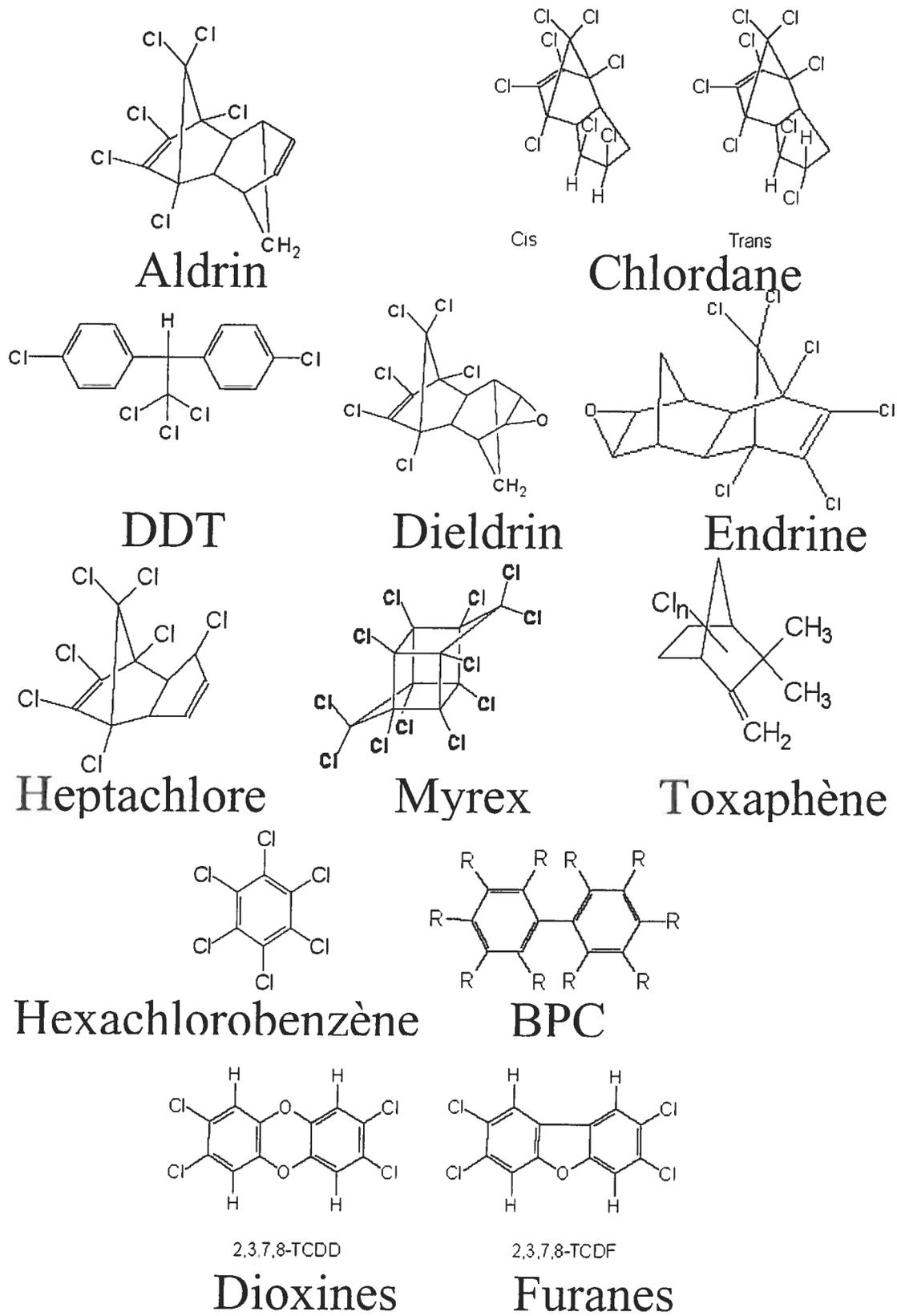


Figure 2 : Structure chimique des douze POPs (PNUE, 2001).

4.2 Aspects structuraux

Les douze POPs ont en commun deux importantes caractéristiques de structure chimique : ce sont tous des organochlorés cycliques (Figures 3). La liaison chlore (C-Cl) étant une liaison covalente très stable, les organochlorés sont en général des composés difficilement biodégradables. Le processus de chlorination remplace donc les liens doubles entre les molécules de carbones (C=C) et les liens hydrogènes (C-H). De plus, comme ce type de liaison est exogène dans les systèmes biologiques, il existe peu d'enzymes capables de dégrader de tels composés. Ceci est particulièrement vrai chez les organismes supérieurs (Boon *et al.*, 1998) comparativement aux bactéries (Furukawa, 2000 ; Wittich, 1998).

En plus de ces deux caractéristiques qui le rendent persistant, un composé doit également être liposoluble et donc bio-accumulable pour être classifié comme un POP. Cette condition se rencontre lorsque les atomes de chlore sont répartis sur la molécule entière de manière à diminuer la polarité de la structure finale. Autrement, le moment dipolaire résultant tend à augmenter l'hydrosolubilité et donc l'excrétion du composé ainsi que sa biodisponibilité. Comme dernier critère, le produit doit être ou avoir été produit et rejeté dans l'environnement en quantité suffisante pour présenter une menace pour la santé humaine et les écosystèmes (UNEP, 2001).

Concernant les pesticides organochlorés cependant, de nouvelles classes de composés ont fait leur apparition depuis les vingt dernières années, dont les organophosphorés et les carbamates qui sont beaucoup plus biodégradables. Ainsi, l'usage des pesticides organochlorés faisant partie des POPs est en train de disparaître peu à peu mondialement.

4.3 Le chlordane et le toxaphène

Le chlordane et le toxaphène sont deux pesticides à large spectre qui partagent plusieurs caractéristiques de distribution et modes de toxicité, puisque ce sont deux composés dont la structure moléculaire est très semblable.

La figure 4 illustre les squelettes carbonés non chlorés de molécules de camphène (un des composés de base du toxaphène ; de Geus *et al.*, 1999) et de 4,7-méthanoindène (composé de base du chlordane ; US DSSH, 1992).

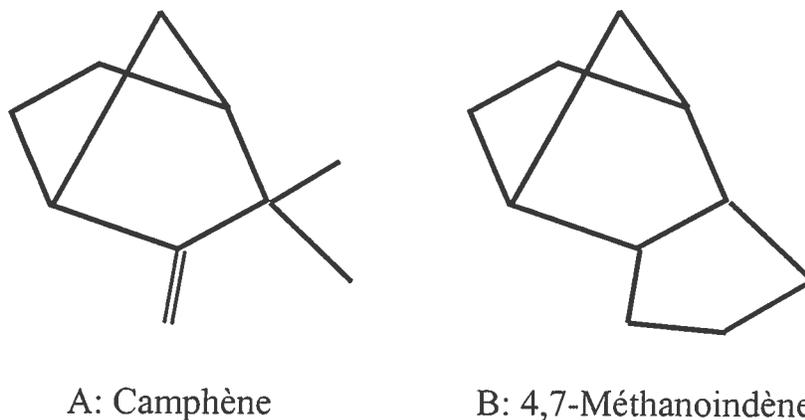


Figure 3 : Structures du camphène et du 4,7-méthanoindène.

Outre cette similarité de structure, le toxaphène et le chlordane sont également les deux composés pour lesquels les niveaux d'ingestion chez les populations nordiques du Canada sont plus élevés que les niveaux jugés acceptables (Kuhnlein *et al.*, 1995 ; Oostdam *et al.*, 1999). Ils sont également tous deux suspectés comme étant cancérigènes (de Geus *et al.*, 1999 ; Goldsmith, 2000).

Pour toutes ces raisons, le toxaphène et le chlordane ont très régulièrement été pris de pair pour de nombreuses études toxicologiques, et bon nombre d'entre elles ont obtenu pour ces deux composés des résultats très semblables (Moser et Smart, 1989 ; Gauthier, Dubeau et Rassart, 1999 ; Vonier *et al.*, 1996 ; Arnold *et al.*, 1997 ; Yang et Chen, 1999).

5. Le toxaphène

5.1 Aspects généraux

Le toxaphène, qui a fait son apparition comme pesticide à large spectre en 1940, est un composé formulé à partir d'extrait de résine de pin qui est par la suite chlorée. Cette chlorination, qui n'est pas portée jusqu'à saturation, résulte en un produit final dont la composition est extrêmement complexe. En fait, un calcul théorique révèle la possibilité de plus de 3000 composés (de Geus *et al.*, 1999), mais ce nombre est en réalité plus restreint. Les différents auteurs ne s'entendent toujours pas sur le nombre exact à considérer, et la co-élution de plusieurs congénères pose encore des problèmes de séparation et de détection. Les auteurs les plus modestes parlent ainsi de 180 composés environ (de Boer et Wester, 1993 ; Shoeib *et al.*, 1999) et les autres mentionnent l'existence de 800 congénères, par exemple (Stelzer et Chan, 1999). Ces composés sont détectables par des techniques analytiques de pointe comme la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse (Stern *et al.*, 1993 ; Gill *et al.*, 1996).

Après que l'utilisation du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) ait été banni au Canada et aux Etats-Unis en 1970, le toxaphène devint rapidement le plus utilisé des pesticides en Amérique du nord et un peu partout à travers le monde jusqu'à son interdiction en 1982. Son utilisation comme insecticide, miticide et même piscicide lui a permis d'être rejeté dans l'environnement en des quantités impressionnantes estimées à 1330×10^6 kg entre 1950 et 1993 (Voldner *et al.*, 1993). Une étude longitudinale réalisée entre 1982 et 1992 indique que les niveaux de toxaphène n'ont diminués que très peu durant cette période (Glassmeyer *et al.*, 1997), témoignant de sa grande résilience et confirmant alors son statut de POP.

La bio-concentration du toxaphène à travers la chaîne alimentaire mène vers des concentrations allant jusqu'à 46 µg/g de tissus adipeux chez le dauphin de Terre-neuve (de Geus *et al.*, 1999), par exemple, et jusqu'à 67,7 ng/g de lipides dans le lait maternel

de populations inuit canadiennes (Newsome et Ryan, 1999), le lait maternel étant le principal moyen d'excrétion du toxaphène.

La bio-accumulation du toxaphène tout au long de la chaîne trophique donne lieu à une sélection des composés de toxaphène qui entraîne la diminution du nombre de congénères prévalents. Ainsi, on ne retrouve qu'une vingtaine des 180 congénères détectables en quantité significative chez les poissons des grands lacs, huit chez les mammifères marins, et seulement deux chez l'humain (Stelzer et Chan, 1999). Ces deux derniers sont les 2-exo,3-endo,5-exo,6-endo,8,8,10,10-octachlorobornane également nommé T2 et le 2-exo,3-endo,5-exo,6-endo,8,8,9,10,10-nonachlorobornane ou T12 (Stern *et al.*, 1992). La bio-disponibilité très faible de ces derniers est principalement responsable de ce phénomène, les autres congénères moins bio-accumulables étant dégradés chez les organismes concernés. (Boon *et al.*, 1998 ; Vetter et Luckas, 2000). Récemment, l'isolation de ces composés individuels a permis de les mettre à la disposition des toxicologues et autres scientifiques, ouvrant ainsi de nouveaux espoirs pour la compréhension de leurs effets potentiels sur la santé humaine et leur mode d'action.

5.2 Toxicologie du toxaphène

L'exposition chronique et aiguë au toxaphène a fait l'objet de nombreuses recherches par le passé, et nous ne présenterons donc ici qu'une revue succincte des principaux effets démontrés lors de tests en laboratoire chez différents mammifères ainsi que les quelques études conduites chez l'homme (de Geus *et al.*, 1999 ; Saleh 1981).

5.2.1 Exposition aiguë :

La plupart des études conduites à ce chapitre ont eu lieu entre 1950 et 1980. Comme le relate Saleh (1981), la DL_{50} (dose létale pouvant affecter 50% des animaux traités) pour les mammifères de laboratoire varie entre 5 et 1075 mg Kg^{-1} , selon la voie

d'administration et l'espèce (Tableau 2). Les principaux symptômes généralement rencontrés lors d'une intoxication au toxaphène sont des convulsions précédées d'une salivation importante, de régurgitation et de spasmes musculaires. Des pathologies comme l'œdème pulmonaire et une dégénération des tissus céphaliques et rachidiens peuvent aussi survenir (Saleh, 1981).

Tableau 2 : DL₅₀ pour le toxaphène technique selon l'espèce et la voie d'administration (Saleh, 1981).

Espèce	Voie d'ingestion	DL50 (mg/Kg)
Rat Mâle	Orale	90
Rat Femelle	Orale	80
Rat Mâle	Dermale	1075
Rat Femelle	Dermale	780
Rat	i.v.	13
Souris	Orale	120
Lapin	Orale	75-100
Lapin	Dermale	<250
Cochon d'Inde	Orale	270
Chat	Orale	25-40
Chien	Orale	49
Chien	i.v.	05-oct
Mouton	Orale	200
Chèvre	Orale	200
Vache	Orale	144
Cerf mulet	Orale	60
Homme	Orale	139-240

5.2.2 Exposition chronique :

Parmi les nombreux effets chroniques d'une exposition au toxaphène, notons :

Neurotoxicité : Des effets sur le comportement et troubles d'apprentissage ont été notés chez le cochon d'Inde (Saleh, 1991). Des changements histologiques cervicaux ont également été observés chez cette espèce, c'est-à-dire une désorganisation et un élargissement des neurones.

Hépatotoxicité : Le foie est le principal organe métabolisant le toxaphène, et une induction de différentes enzymes de biodégradation a été notée à de maintes reprises chez différentes espèces. Parmi celles-là, notons le cytochrome P450, la benzo[*a*]pyrene hydrolase et l'aliesterase (de Geus *et al.*, 1999). D'autres enzymes sont inhibées, comme l'ATPase et l'acétylcholinestérase ainsi que le métabolisme du calcium et du collagène. Des changements morphologiques accompagnent également ces effets à des doses semblables (2 à 5 mg•Kg⁻¹•Jour⁻¹) chez le cochon d'inde, c'est-à-dire une augmentation du poids de l'organe, une congestion veineuse chronique, des infiltrations de cellules mononucléaires et un changement dans les taux de graisse des hépatocytes (Saleh, 1981).

Néphrotoxicité : Même si peu de changements morphologiques ont été observés au niveau des reins des animaux intoxiqués, des changements enzymatiques (réduction de l'activité ATPase et acétylcholinestérase et une augmentation du contenu en cytochrome P450) indiquent que les reins peuvent eux aussi métaboliser le toxaphène un peu comme le foie (de Geus *et al.*, 1999).

Effets endocriniens : Des recherches plus récentes ont démontré qu'un certain nombre de polluants environnementaux peuvent avoir des effets endocriniens. Le toxaphène ne semble avoir que des propriétés oestrogéniques très limitées (0,0001 comparativement à l'estradiol qui est la valeur de référence, soit 1), tel que démontré par le « E-screen test » chez les humains (de Geus *et al.*, 1999). Ce test a pour principe de mesurer la prolifération de cellules humaines sensibles aux oestrogènes, les cellules MCF-7. Mis en présence d'autres polluants oestrogéniques, il peut cependant présenter un effet synergique (de Geus *et al.*, 1999). Des études *in vivo* ont également démontré que le toxaphène ne semble pas interagir avec les récepteurs à œstrogène et progestérone (Vonier *et al.*, 1996 ; Arnold *et al.*, 1997). Une étude *in vitro* a cependant démontré qu'il peut être un antagoniste pour un autre récepteur de la même famille, le ERR- α -1 (Estrogen-related receptor) (Yang *et al.*, 1999).

L'effet des congénères du toxaphène T2 et T12 a lui aussi été testé (Stelzer et Chan, 1999), mais ceux-ci se sont avérés encore moins efficaces que la formulation initiale *in vitro* et n'ont pas démontré d'effet synergique.

Carcinogénicité : Beaucoup d'efforts ont été déployés jusqu'à présent dans le but de prouver la cancérogénicité du toxaphène. Malgré que la génotoxicité et la mutagénicité du toxaphène aient été démontrées *in vitro*, (Saleh, 1981 ; Gauthier, Dubeau et Rassart, 1999) seule une étude épidémiologique tend à démontrer la cancérogénicité du toxaphène chez des travailleurs exposés (Goldsmith, 2000). Des travaux supplémentaires seraient nécessaires afin d'en faire la preuve *in vitro*, et des expériences faites avec les congénères T2 et T12 ont démontrés qu'ils étaient moins mutagéniques que la formulation initiale de toxaphène (Steinberg *et al.*, 1998) et également moins génotoxiques (Boon *et al.*, 1998).

En ce qui concerne le mode d'action possible du toxaphène sur la cancérogenèse, Moser et Smart (1989) ont démontré que ce POP pouvait stimuler une augmentation de l'activité des protéines kinases de type C (PKC) *in vitro* tout comme le font les esters de phorbol qui sont des agents promoteurs de cancers, sans que le lien causal direct n'en soit encore établi.

5.3 Immunotoxicologie

Beaucoup de travaux *in vitro* et *in vivo* ont été menés jusqu'à ce jour, mais encore beaucoup reste à faire à ce chapitre, principalement dans le but d'en saisir les effets sur la santé humaine. Si les effets aigus et chroniques d'une intoxication au toxaphène ont été relativement bien documentés chez les animaux et même chez les humains, les conséquences d'une exposition chronique par suite d'ingestion de denrées contaminées au toxaphène après biotransformation (effet de certains congénères seulement) sont encore largement inconnues. Les populations inuit du Canada et les populations nordiques d'autres pays subissent actuellement ce type d'exposition, ce qui porte le gouvernement

du Canada à déconseiller aux femmes inuit un allaitement trop prolongé de leurs enfants (Pohl et Tylanda, 2000).

Ce type d'exposition récurrente à faible dose entraîne donc une bio-accumulation des deux congénères T2 et T12 dont nous avons discuté plus haut. Ce phénomène est courant pour les organochlorés, résultant généralement en des effets toxiques différents de la formulation initiale. Les deux congénères T2 et T12, par exemple, sont beaucoup moins oestrogéniques que le toxaphène technique (Stelzer et Chan, 1999)

Tryphonas (1998) mentionne que des impacts de l'exposition aux organochlorés sur le SI sont envisageables, malgré que ce mode de toxicité ait été peu étudié jusqu'à maintenant. Un mauvais fonctionnement du SI entraînerait ainsi une augmentation de la susceptibilité aux infections, un effet plutôt difficile à mesurer par des études épidémiologiques. Dans le cas de l'exposition aux BPC par exemple, une diminution de la production d'anticorps a été démontrée chez le singe au niveau du développement de la réponse immunitaire normale du rejeton exposé *in utero*. Le jeune singe ainsi exposé était par la suite moins capable de répondre à une stimulation antigénique pour laquelle une production d'anticorps plus forte aurait du être observée (Tryphonas, 1998).

Dans le cas du toxaphène, des soupçons existaient déjà sur sa capacité à perturber le SI de l'homme depuis qu'une tentative de suicide par l'ingestion de toxaphène a eu lieu en 1983 (Milhorn et Wells, 1983). Après avoir démontré un compte de globules blancs totaux anormalement élevé, l'homme a étrangement souffert de la goutte (une maladie semblable à l'arthrite) au niveau de l'épaule. Des études ont par la suite été menées au niveau cellulaire, étudiant la mortalité induite par différentes concentrations de pesticides sur des lignées lymphocytaires humaines (Sobti *et al.*, 1983). Cette première série de résultats présente le toxaphène comme le plus toxique des huit organochlorés lorsque testés à faible concentration (10^{-6} M). Des résultats ont également mis en évidence des anomalies dans le processus de division cellulaire chez les lignées lymphocytaires étudiées (Sobti *et al.*, 1983 ; Steinel *et al.*, 1990), suggérant un effet génotoxique du toxaphène.

Une première étude immunotoxicologique *in vivo* a été menée en 1983 (Allen *et al.*, 1983) sur des rats nourris avec de la nourriture contaminée au toxaphène de façon contrôlée. Les traitements au toxaphène ont diminué la capacité phagocytaire des macrophages dans tout les cas, et les rejets issus de femelles traitées ont démontré une production d'anticorps plus réduite que les individus contrôles.

Plusieurs années plus tard, une autre étude immunotoxicologique *in vivo* a été menée chez le singe (Tryphonas *et al.*, 2000). Celle-ci suggère que l'exposition chronique au toxaphène (mélange initial) perturbe la production d'anticorps (à la hausse ou à la baisse selon le type d'antigène), diminue le titre de lymphocytes T accessoires et diminue la flambée oxydative chez les monocytes et granulocytes en réponse à divers stimuli (PMA et fMLP conjointement). Ces effets n'étaient cependant pas significatifs et le nombre de sujets de chaque groupe était très restreint (n=4).

Une autre étude récente a démontré que le toxaphène, le chlordane et d'autres organochlorés semblent pouvoir diminuer la réponse chimiotactique des neutrophiles et monocytes *in vitro* envers l'IL-8 pour les neutrophiles et le RANTES (Regulated upon activation, normal T expressed and presumably secreted) pour les monocytes (Miyagi *et al.*, 1998). Ces effets ont curieusement été mesurables jusqu'à de très faibles concentrations (10^{-14} M). Aucune étude immunotoxicologique n'a cependant été conduite avec les congénères de toxaphène séparés jusqu'à ce jour.

6. Le chlordane

6.1 Aspects généraux

Le chlordane est un autre pesticide organochloré qui a fait son apparition au Canada et aux États-Unis en 1948. Il est aussi connu sous le nom d'Octachlor ou de Velsicol 1068 (US DSSH, 1992). L'utilisation du chlordane a été bannie au Canada et aux États-Unis en 1988 suite aux inquiétudes environnementales que le produit suscitait. Déjà, en 1983, son utilisation était restreinte au contrôle des termites près des maisons. Une étude épidémiologique a d'ailleurs suggéré par la suite que ce type d'utilisation pouvait être néfaste pour les habitants des demeures traitées, qui pouvaient souffrir de symptômes d'intoxication plusieurs années plus tard (Kilburn et Thornton, 1995).

Le chlordane est très persistant, et peut subsister dans certains sols pour plus de 20 ans. Depuis 1946, 70 000 tonnes de chlordane ont été produites et, selon le département de santé humaine des États-Unis (1992), de 25 à 50% de cette production existe toujours dans l'environnement sous sa forme initiale. Le composé se laisse transporter sur de longues distances dans l'atmosphère, jusqu'à des endroits où il risque de persister encore plus longtemps comme dans les régions arctiques. Des estimations laissent croire que près de 3 300 Kg de chlordane se déposent chaque année dans les régions arctiques (US DHHS, 1992).

Le chlordane technique est un mélange de plus de 140 composés chimiques issus du processus de synthèse (chlorination). De ces composés, le *cis*-chlordane et le *trans*-chlordane sont les deux plus importants et composent à eux seuls 65 à 80% du chlordane technique (Buckert *et al.*, 1989 in US DSSH 1992). Parmi les autres produits notons la présence de l'Heptachlore, du Nonachlore et du Chlordène. Ces derniers peuvent également découler de la dégradation du chlordane après sa distribution dans l'environnement.

6.2 Toxicologie du chlordane

6.2.1 Exposition aiguë :

Le chlordane, selon des critères toxicologiques largement acceptés, est un agent chimique de toxicité modérée (Grutsh et Khasawinah, 1991). Sa DL_{50} chez les souris est de 300mg/Kg, et une telle dose produit des effets physiologiques modérés (US DHHS, 1992). Parmi les pathologies typiques découlant d'une telle intoxication, on note des lésions hépatiques et de l'œdème, principalement pulmonaire et cervicale. Chez les humains, la DL_{50} a été estimée à environ 25 à 50 mg/Kg (US DSSH, 1992).

6.2.2 Exposition chronique :

Parmi les effets d'une intoxication chronique au chlordane, notons :

Neurotoxicité : Les symptômes neurologiques de maux de tête, étourdissements, confusion, spasmes musculaires, irritabilité, excitabilité, convulsions et coma sont les plus souvent associés aux intoxications humaines accidentelles au chlordane (Kilburn, 1997). Une étude épidémiologique menée auprès de 216 personnes exposées suite au traitement de leur maison au chlordane a dénoté une plus haute fréquence de symptômes neurologiques divers, respiratoires, neuro-comportementaux et rhumatoïdes (Kilburn et Thornton, 1995). Les expériences menées chez les souris nous indiquent que des doses chroniques sous-létales de 5mg/Kg/jour peuvent induire des convulsions et que des doses de 1,25mg/Kg/jour sont suffisantes pour entraîner une diminution de l'activité ATPase du cerveau, qui pourrait être un facteur important de cette neurotoxicité (Drummond *et al.*, 1983 in US DHHS, 1992).

Hépatotoxicité : Une induction de plusieurs enzymes microsomaux et l'inhibition de certaines enzymes mitochondriales ont été notées, de même que des lésions morphologiques et une augmentation du poids du foie. Si l'induction d'enzymes de dégradation est normalement perçue comme un mécanisme de détoxification, il a été

démontré dans le cas du chlordane que ce type de réaction entraîne la formation de produits de dégradation plus toxiques que le composé initial, tel que le Chlordène et le Chlorohydrine (US DSSH, 1992).

Le chlordane s'avère être un composé assez bio-disponible et bio-transformable chez les animaux, de telle sorte que Poonawalla et Korte (1964 in US DHHS, 1992) ont démontré que, selon la dose, de 10 à 80% de la radioactivité présente dans les excréments et les tissus de rats ayant reçu une dose intraveineuse de chlordane radioactif s'y trouvait sous forme de métabolites hydrosolubles. Malgré ceci, il n'en reste pas moins que le chlordane est très bio-accumulable dans l'environnement à travers la chaîne trophique.

Néphrotoxicité : Malgré que les reins ne soient pas un organe cible typique d'une intoxication au chlordane, il a été démontré (Truhaut *et al.* 1974, in US DHHS, 1992) que des doses sous-létales pouvaient entraîner une congestion des reins, sans faire augmenter le poids de l'organe ni causer de lésions apparentes.

Effets endocriniens : Le chlordane est connu pour causer un déséquilibre hormonal à des concentrations généralement moins fortes que les concentrations génotoxiques (US DHHS, 1992). Parmi les principaux effets, un retard de croissance (Talamantes et Jang, 1977), une augmentation des hormones corticostéroïdiennes (Cranmer *et al.*, 1978 ; Cranmer *et al.*, 1984) et une diminution des niveaux de testostérone et de progestérone (Willingham *et al.*, 2000) ont été notés. Tout comme le toxaphène, le chlordane ne semble pas interagir avec les récepteurs des œstrogènes et progestérones selon des études *in vivo* (Vonier *et al.*, 1996 ; Arnold *et al.*, 1997).

Cancérogénicité : Une étude épidémiologique (Menconi *et al.*, 1988 in US DHHS, 1992) a démontré que les populations humaines habitant des maisons dont le sol avoisinant a été traité au chlordane présentent un plus haut taux de cancer de la peau que les populations de référence. D'autres études épidémiologiques menées chez des fermiers exposés et chez des épandeurs professionnels de pesticides tendent également à démontrer la cancérogénicité du chlordane. Toutefois, le chlordane n'étant pas le seul

pesticide présent dans l'environnement des populations ciblées, ces analyses n'ont pu être concluantes (US DHHS, 1992).

Les essais faits sur les animaux de laboratoire indiquent sans équivoque que les expositions chroniques au chlordane provoquent la formation de cancers hépatiques (US DHHS, 1992). Une étude faite avec des neurones de rat par Moser et Smart (1989) démontre que le chlordane peut également (tout comme le toxaphène, voir section 5.2.2) causer une augmentation de l'activité des PKC *in vitro*.

Au niveau cellulaire, la majorité des essais de génotoxicité effectués sur le chlordane technique se sont avérés négatifs, (US DHHS, 1992) sauf pour ceux menés plus récemment par Gauthier, Dubeau et Rassart (1999).

6.3 Immunotoxicologie

Les études menées sur les effets toxiques du chlordane *in vivo* n'ont pas détecté d'effet sur le SI, sauf une atrophie thymique chez le rat (Khasawinah *et al.*, 1989 in US DHHS) et une augmentation du nombre de lymphocytes périphériques (Johnson *et al.*, 1986 in US DHHS, 1992). Une étude plus récente suggère cependant que le chlordane pourrait inhiber le chimiotactisme des monocytes et des granulocytes de singe *in vitro* (Miyagi *et al.*, 1998). Une autre étude fait également état de l'effet stimulateur du chlordane sur les leukocytes polymorphonucléaires de cochons d'Inde isolés *in vitro*, démontrant une augmentation de calcium (Ca^{2+}) cytosolique, une production de superoxide (O_2^-) et une altération du potentiel membranaire cytosolique (Suzaki *et al.*, 1988).

Troisième partie
Les articles scientifiques

7. Article # 1 : Activation of human neutrophils by technical toxaphene.

7.1 Résumé français de l'article #1

Activation des neutrophiles humains par le toxaphène technique.

Marc Gauthier, Charles J. Roberge, Martin Pelletier, Philippe A. Tessier et Denis Girard.

Le toxaphène est un polluant organique persistant (POP) composé de plusieurs congénères. La formulation technique de toxaphène appliquée comme pesticide consiste en plus de 800 congénères. Parmi celles-ci, le T(2) et le T(12) sont les deux formes prévalentes détectables chez l'humain. Malgré que le toxaphène soit connu pour avoir des effets toxiques, incluant quelques effets pro-inflammatoires potentiels, peu de données existes concernant son action sur les cellules du système immunitaire et tout spécialement sur les neutrophiles. Au cours de la présente étude, nous avons démontré que le toxaphène n'est pas nécrotique pour les neutrophiles incubés jusqu'à 24 heures en présence de concentrations variant de 0,1 à 50 µg/mL. Le toxaphène a été capable d'induire une production de superoxyde de manière concentration-dépendante. Le potentiel et la cinétique d'induction du superoxyde chez les neutrophiles par le toxaphène ont été similaires à ceux obtenus avec le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), un agoniste classique des neutrophiles. De plus, l'usage de divers inhibiteurs de voies de signalisation cellulaires (génistéine, pertussis toxin, staurosporine, H-7 et HA-1077) ont suggéré que, comme pour le PMA, la signalisation engendrée par le toxaphène utilise principalement les PKCs et, à un degré moindre, les tyrosines kinases. Ainsi, la staurosporine, le H-7 et la génistéine ont été capable d'inhiber la réponse au toxaphène de 52, 72 et 31% et pour le PMA de 63, 62 et 23%, respectivement. Le toxaphène a aussi été capable d'augmenter significativement la phagocytose de globules rouges de mouton par les neutrophiles et d'induire leur apoptose. L'induction d'apoptose était accompagnée d'une diminution de l'expression du récepteur de surface CD16. Le T(2) et le T(12), les deux congénères trouvés chez l'humain, ont également induit une production de superoxyde significative à

5 µg/mL. En conclusion, nous avançons que les neutrophiles sont d'importantes cibles pour le toxaphène, et que ce POP peut ainsi activer la production de superoxyde par une voie PKC- et tyrosine kinase-dépendante, augmenter la phagocytose et accélérer l'apoptose. Cette étude est la première à s'intéresser spécifiquement aux interactions toxaphène/neutrophiles.

7.2 Article #1

Activation of Human Neutrophils by Technical Toxaphene

Marc Gauthier,* Charles J. Roberge,† Martin Pelletier,* Philippe A. Tessier,‡ and Denis Girard*¹

*INRS-Institut Armand-Frappier/Santé Humaine, Université du Québec; †Association du Cancer de l'Est du Québec (ACEQ); and

‡Centre de Recherche en Infectiologie, CHUQ, Pavillon CHUL, Université Laval, Pointe-Claire, Québec H9R 1G6, Canada

Toxaphene is a persistent organic pollutant (POP) known to be composed of numerous congeners. Toxaphene technical mixture applied as a pesticide consists of over 800 congeners. Among these, T₂ and T₁₂ are the two environmentally prevalent forms found in humans. Although toxaphene is known to exert some toxic effects, including potential proinflammatory properties, little is known concerning its action on cells of the human immune system, especially neutrophils. In the present study, we found that toxaphene was not necrotic for human neutrophils incubated for up to 24 h with concentrations ranging from 0.1 to 50 µg/ml. Toxaphene was found to induce neutrophil superoxide production (O₂⁻) in a concentration-dependent manner. The potency and the kinetics of toxaphene-induced O₂⁻ by neutrophils were found to be similar to that of the classical neutrophil agonists phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Furthermore, the use of various transduction signal inhibitors (genistein, pertussis toxin, staurosporine, H-7, and HA-1077), suggests that, as for PMA, toxaphene mediates its effect primarily via PKCs and, to a lesser extent, via tyrosine kinases. In this respect, staurosporine, H-7, and genistein were found to inhibit toxaphene- and PMA-induced O₂⁻ production by 52, 72, and 31% and by 63, 62, and 23%, respectively. Toxaphene was also found to significantly enhance neutrophil phagocytosis of opsonized sheep red blood cells and to induce neutrophil apoptosis. The induction of neutrophil apoptosis was paralleled with a decrease in CD16 expression. T₂ and T₁₂, the two prevalent congeners found in humans, were also found to significantly increase the O₂⁻ production in neutrophils at a concentration of 5 µg/ml. We conclude that neutrophils are important targets for toxaphene, as this POP can activate O₂⁻ production by a PKC- and tyrosine kinase-dependent mechanism, induce phagocytosis, and accelerate the apoptotic rate. This is the first study that focuses on toxaphene/human neutrophil interactions.

© 2000 Academic Press

¹ To whom correspondence and reprint requests should be addressed at the INRS-Institut Armand-Frappier/Santé Humaine, 245 boul Hymus, Pointe-Claire (PQ), Canada, H9R 1G6. Fax: (514) 630-8847/8850. E-mail: Denis.Girard@INRS-Sante.Uquebec.ca.

Key Words: inflammation; neutrophils; organochlorine; phagocytosis; apoptosis; PKCs.

INTRODUCTION

Toxaphene is a chlorinated hydrocarbon insecticide that belongs to a group of chemicals of environmental concern designated persistent organic pollutants (POPs).² Toxaphene technical mixture applied as a pesticide consists of over 800 congeners (1, 2). It was used primarily on cotton, fruits and vegetables, cereal grains, and nuts, as well as to control ticks and mites in livestock (1, 2). It was estimated that 1330 × 10⁶ kg of toxaphene were used throughout the world between 1950 and 1993 (2). Because of its high vapor pressure and spread in the environment, this POP can be transported through the atmosphere far from its site of application. Toxaphene is ubiquitous in the environment and persists in soils and lake sediments. Due to its lipophilic properties, this contaminant can bioaccumulate in living organisms. In this respect, toxaphene has been found in fish, marine and terrestrial mammals, and even in human breast milk (3, 4). Differences in the biological half-life of the congeners can explain the general reduction of the number of congeners along the food chain. Among these congeners, about 20 are found in fish and 8 in marine mammals (2). The 2 environmentally prevalent congeners found in humans are T₂ (2-exo,3-endo,5-exo,6-endo,8,8,10,10-octachlorobornane) and T₁₂ (2-exo,3-endo,5-exo,6-endo,8,8,9,10,10-nonachlorobornane) (5–7).

Cumulative data indicate that toxaphene is of intermediate acute toxicity to most mammals when compared to other organochlorine insecticides (1). In a study conducted with human volunteers exposed to toxaphene (both dermally and by inhalation) for several days, no apparent adverse effects based on physical examinations and blood and urine analysis were noted. This unpublished study was conducted by Hercules Inc., one of the four major producers of toxaphene

² Abbreviations used: T₂, 2-exo,3-endo,5-exo,6-endo,8,8,10,10-octachloro-bornane; T₁₂, 2-exo,3-endo,5-exo,6-endo,8,8,9,10,10-nonachlorobornane; O₂⁻, superoxide; POPs, persistent organic pollutants; SRBCs, sheep red blood cells.

in the United States (1). In contrast, results from another study evaluating the chronic toxicity of various organochlorine pesticides to human beings indicated that toxaphene may be one of the most toxic chemicals among these contaminant compounds (8). Despite the conclusion from this study conducted more than 25 years ago, very few data concerning its toxicity to humans are available. At the cellular level, it was reported that toxaphene, as chlordane, difocol, and endosulfan, can increase the frequency of sister exchange chromatides in the human lymphoid B cell line LAZ-007, testifying that these compounds can alter DNA replication (9).

Although immunotoxicological studies have paid attention to various chemicals of environmental concern in the past 2 decades, very few have focused on toxaphene. One study conducted in mice fed for 8 weeks with 100 or 200 ppm of toxaphene revealed a depressed IgG antibody formation in those animals when compared to controls, while cell-mediated immune responses were not affected (10). Another study reported elevated murine neutrophil counts in toxaphene-treated animals (11). More recently, results from an immunotoxicological pilot study on the effects of chronic exposure to low levels of toxaphene on cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) treated with toxaphene for 52 weeks suggest that toxaphene may be immunosuppressive for monkeys and may pose a hazard to human health (12). In this latter study, the respiratory activity of blood monocytes and granulocytes was slightly reduced in toxaphene-treated animals, whereas no change in the phagocytic activity was noted. In another study, the chemokine-induced chemotaxis of toxaphene-treated neutrophils and monocytes isolated from rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) was found to be suppressed (13). Finally, inflammatory signs, such as an increase in the leukocyte count, were observed in the blood of an individual who attempted a suicide by toxaphene ingestion (14).

Cumulative recent reports and data have indicated that inflammation is a common manifestation of xenobiotic toxicity. Although different immunotoxicological studies have focused on the role of various environmental contaminants on murine lymphocytes and cells of the monocyte/macrophage lineage, curiously, less attention has been paid to the potential effects of these chemicals on neutrophil cell physiology, the first cell type to arrive at inflammatory sites. Furthermore, the use of neutrophils of human origin as targets of pollutants is not well documented despite the fact that some of their functions were found to be altered when isolated from accidentally exposed workers (15, 16). We have recently initiated studies in order to better understand xenobiotic/neutrophil interactions. We have documented that sodium sulfite (Na_2SO_3) can activate human neutrophils but is toxic for the promyelocytic

HL-60 cell line (17, 18). We have also found that diel-drin, but not lindane, can activate various neutrophil responses (19). In this study, we demonstrate for the first time that toxaphene is a potent human neutrophil activator. We also show that toxaphene induces O_2^- production via protein kinases C and, to a lesser extent, via tyrosine kinases. In addition, T_2 and T_{12} congeners were found to induce neutrophil O_2^- production.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and agonists. Technical toxaphene (Lot 22914B), freshly prepared from a stock solution in low endotoxin level DMSO (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ont.), was purchased from Ultra Scientific (North Kingstown, RI). Final concentrations of toxaphene used in our experiments were based on previously reported concentrations studied during *in vitro* experiments (7). T_2 (BgVV component 1, Parlar 26) and T_{12} (BgVV component 2, Parlar 50) congeners were purchased from ChemService Inc. (West Chester, PA) and were also dissolved in low endotoxin DMSO. Phorbol 12-myristate 13-acetate, LPS, genistein (tyrosine kinases inhibitor), pertussis toxin (G protein inhibitor), staurosporine (PKC inhibitor), and H-7 (PKC inhibitor) were purchased from Sigma. HA-1077 (PKA inhibitor) was purchased from Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, CA) and recombinant human GM-CSF (specific activity 9×10^6 U/mg) was a gift from the Genetics Institute (Boston, MA). IL-4 was purchased from R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN). The final concentration of DMSO in each treatment never exceeded 0.1%. The neutrophil responses studied were similar whether toxaphene was diluted in DMSO or anhydrous ethyl alcohol (data not shown).

Neutrophil isolation. Neutrophils were isolated from the venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech Inc., Que.), as previously described (17–21). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to institutionally approved procedures. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion and the purity (>98%) was verified by cytology from cytocentrifuged preparations colored by Diff-Quick staining. Toxaphene was not toxic for neutrophils following treatments of 1–60 min or after 4, 12, and 24 h when used at 0.1, 1, 5, 25, or 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (data not shown). A concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of toxaphene is approximately 1.3×10^{-4} M.

Superoxide production. Superoxide production was monitored by the reduction of cytochrome c, as previously reported (17–21). Briefly, neutrophil suspensions (1×10^6 cell/ml in HBSS–1.6 mM CaCl_2) were incubated in the presence or the absence of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ superoxide dismutase (Sigma) with 130 μM cytochrome c

(Sigma) for 5 to 120 min at 37°C in the presence of buffer, diluent, PMA (10^{-7} M), or an increasing concentration of toxaphene. The absorption of cytochrome c was monitored at 550 nm and the number of superoxide anions produced was calculated from the difference between corresponding wells either with or without superoxide dismutase using a molar coefficient extinction of 21.1.

Phagocytosis of sheep erythrocytes. Sheep red blood cells (SRBCs) (Quelab, Montreal, Quebec) were opsonized with a 1/200 dilution of a rabbit IgG anti-SRBC antibody (Sigma) for 45 min at 37°C, as previously described (19, 20). Neutrophils (2.5×10^6 cells in RPMI 1640 alone) pretreated 30 min with buffer, diluent (<1% DMSO), IL-4 (10 ng/ml), or increasing concentrations of toxaphene were incubated with 50×10^6 opsonized SRBCs for 45 min as described above. The samples were centrifuged at 200g for 10 min at 4°C. Supernatants were discarded and an osmotic shock was performed on the pellets by treating them with 500 μ l H₂O for 15 s, followed immediately by the addition of 10 ml HBSS. The samples were washed and the final pellets were suspended in 1 ml HBSS. Duplicate cyto-centrifuged preparations were prepared in aliquots of ~200 μ l and processed as for apoptosis (described later). Phagocytosis was measured and expressed as

the percentage of neutrophils ingesting at least one opsonized SRBC. IL-4 was used herein as a positive control since it has been previously reported that IL-4 increased neutrophil phagocytosis (19, 20).

Assessment of neutrophil apoptosis by cytology and by CD16 expression. Freshly isolated human neutrophils (100 μ l of a 10×10^6 cells/ml suspension in RPMI 1640 supplemented with 10% autologous serum) were incubated for the indicated times in the presence or the absence of toxaphene or a control as illustrated in the appropriate figure legend and apoptosis was evaluated by cytology. Cyto-centrifuged preparations of neutrophils were performed with a Cyto-tek centrifuge (Miles Scientific, Elkhart, IN) essentially as previously described (17-21) and were stained with a Diff-Quick staining kit (Baxter, FL) according to the manufacturer's instructions. Cells were examined by light microscopy at $\times 400$ final magnification and apoptotic neutrophils were defined as cells containing one or more characteristic darkly stained pyknotic nuclei. An ocular containing a 10×10 squares grill was used in order to count at least five different fields (>100 cells) for assessment of apoptotic cells. Results were expressed as percentages of neutrophils in apoptosis.

CD16 expression is known to be down-regulated in apoptotic neutrophils and the level of CD16 expression

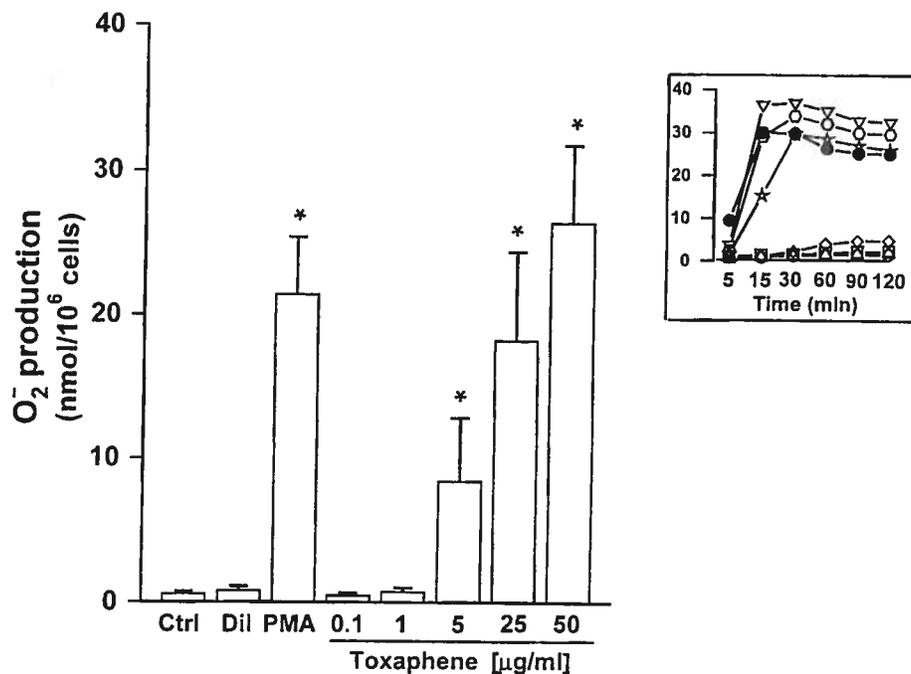


FIG. 1. Toxaphene induces O₂⁻ production in a concentration-dependent manner. Freshly isolated human neutrophils were treated with buffer (Ctrl), the diluent (Dil), or increasing concentrations of 0.1, 1, 5, 25, or 50 μ g/ml toxaphene for 15 min and the O₂⁻ production was measured as described under Materials and Methods. Results are means \pm SEM ($n = 4$ different blood donors). * $P < 0.05$ by Student's t test (vs corresponding diluent). (Inset) A kinetic and concentration-dependent experiment representative of four. (Δ , \square , \bullet , \star , \circ , ∇) diluent, PMA (10^{-7} M), and 0.1, 1, 5, 25, and 50 μ g/ml toxaphene, respectively).

was measured in order to confirm the toxaphene-induced apoptosis according to previous procedures (22, 23). To do so, after 24 h of incubation in the presence or the absence of toxaphene, cells were suspended at a concentration of 1.5×10^6 cells/ml, washed, and preincubated for 30 min (4°C, light protected) with 20% autologous serum to prevent nonspecific binding via Fc receptors. Cells were then washed and incubated with 2 μ l of FITC-mouse anti-human CD16 mAb (PharMingen Canada) for 30 min at 4°C, light protected, before FACS analysis. Flow cytometric analysis (10,000 events) was performed using a FACScan (Becton-Dickinson).

RESULTS

Toxaphene induces neutrophil superoxide production. In order to study the effect of toxaphene on neutrophil responses, we first investigated the O_2^- production. As illustrated in Fig. 1, toxaphene induced O_2^- production in a concentration-dependent manner. The O_2^- production was monitored for up to 120 min and, as illustrated in the inset of Fig. 1, reached a plateau after 30 min and then remained stable. The magnitude as well as the kinetics of O_2^- production induced by toxa-

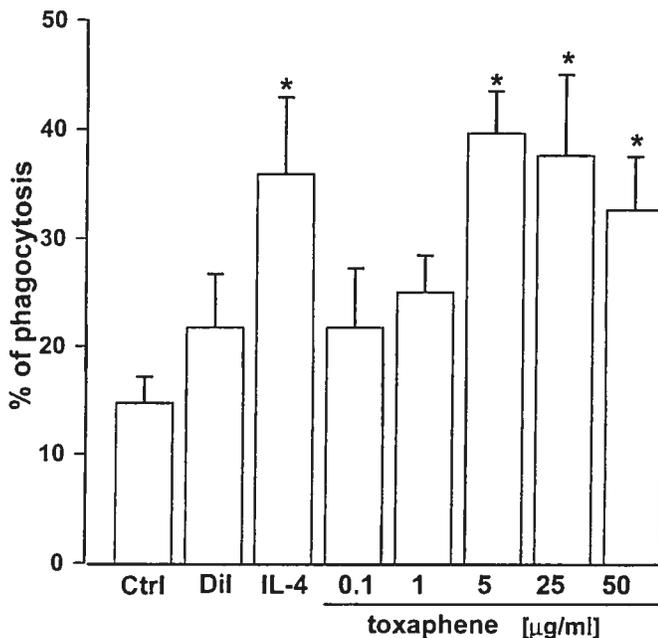


FIG. 2. Toxaphene induces the neutrophil phagocytosis of opsonized sheep red blood cells. Phagocytosis was evaluated by ingestion of opsonized SRBCs by neutrophils pretreated 30 min with buffer (Ctrl); the diluent (Dil); 10 ng/ml interleukin-4 (IL-4); or increasing concentrations of toxaphene as described under Materials and Methods. Results are expressed as the percentage of phagocytosis (cells ingesting at least one opsonized SRBC/number of cells counted \times 100) and are means \pm SEM ($n = 3$ different blood donors). * $P < 0.05$ by Student's t test (vs corresponding diluent).

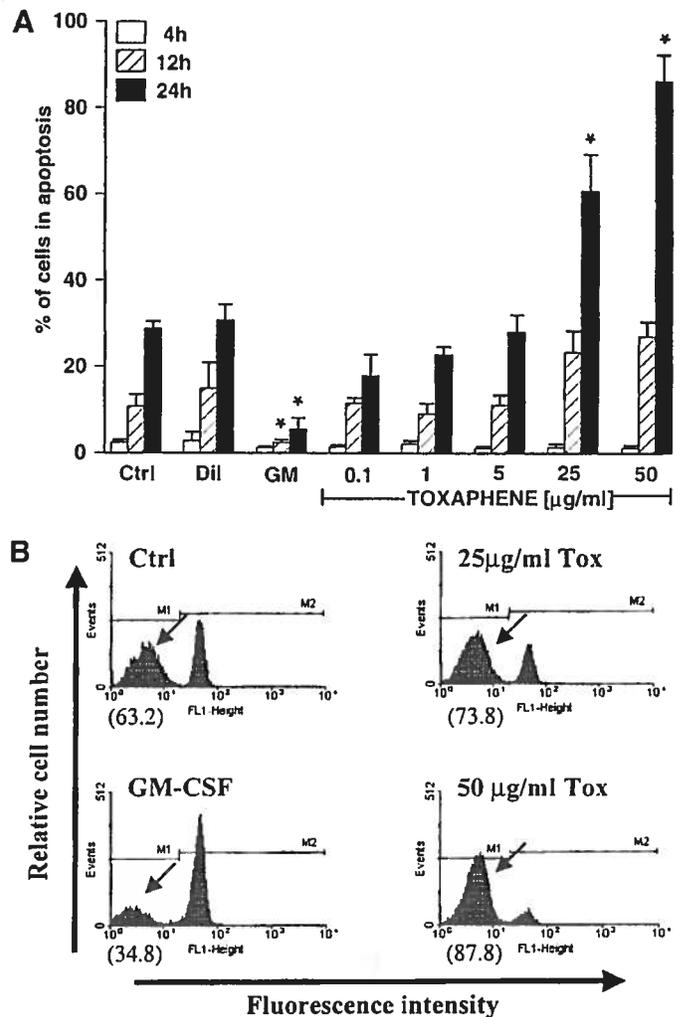


FIG. 3. Toxaphene induces neutrophil apoptosis in a concentration-dependent fashion. Neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 10% autologous serum) were incubated for up to 24 h in the presence of buffer (Ctrl); the diluent DMSO (Dil); 65 ng/ml GM-CSF (a potent inhibitor of neutrophil apoptosis); or an increasing concentration of toxaphene. (A) Apoptosis was then assessed by cytology from Diff-Quick-stained cytocentrifuged preparations as described under Materials and Methods after 4, 12, and 24 h. Results are means \pm SEM ($n = 5$ different blood donors). * $P < 0.05$ by Student's t test (vs corresponding). (B) Apoptosis was confirmed by a downregulation of CD16 expression. Results are one representative experiment of four. Arrow, the apoptotic cell population; Tox, toxaphene. Numbers in parenthesis are the percentages of apoptotic cells. As expected, GM-CSF delays neutrophil apoptosis.

phene was comparable to that observed with PMA. Toxaphene did not interfere in the assay by itself, since addition of this chemical to the blank did not alter the optical density (data not shown). Similar results were obtained with the use of another lot of toxaphene (Lot 2374C).

Toxaphene enhances neutrophil phagocytosis. We next investigated whether the effect of toxaphene on

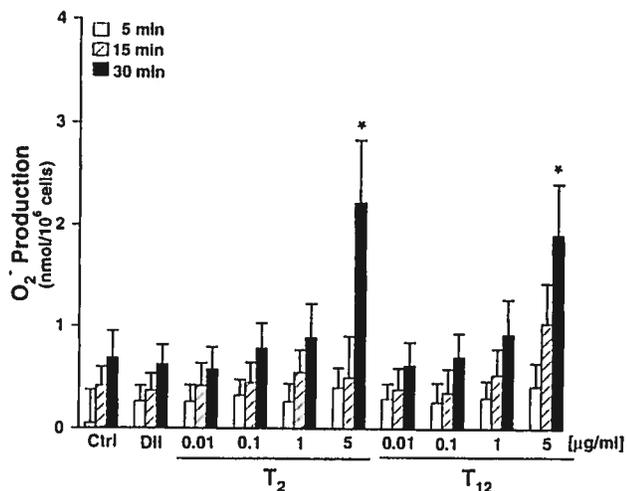


FIG. 4. Effect of T_2 and T_{12} congeners on human neutrophil O_2^- production. Cells were treated with buffer (Ctrl), the diluent (Dil), or increasing concentrations of 0.01, 0.1, 1, or 5 $\mu\text{g/ml}$ T_2 or T_{12} congener for 5, 15, or 30 min and the O_2^- was measured as described under Materials and Methods. Results are means \pm SEM ($n = 3$ different blood donors). * $P < 0.05$ by Student's t test (vs corresponding diluent).

neutrophils was restricted to the generation of O_2^- . Ingestion of opsonized SRBCs was therefore used as a measure of the effect of toxaphene on neutrophil phagocytosis, an important neutrophil function. Results in Fig. 2 illustrate that toxaphene enhances phagocytosis of opsonized SRBCs.

Toxaphene induces neutrophil apoptosis at high concentrations. As shown in Fig. 3A, toxaphene did not significantly alter the normal apoptotic rate of neutrophils after 4 or 12 h of treatment. However, concentrations of 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$ of toxaphene were found to significantly increase the number of apoptotic neutrophils after 24 h of treatment without inducing apparent necrosis, as all cells (normal viable and apoptotic cells) excluded trypan blue (data not shown). The percentages of apoptotic human neutrophils were 60.8 ± 8.5 (mean \pm SEM, $n = 5$) and $86.5 \pm 6.2\%$ after a 24-h treatment with 25 or 50 $\mu\text{g/ml}$, respectively, while the percentages were only 28.7 ± 1.7 and $30.5 \pm 3.8\%$ when cells were untreated or incubated with the diluent DMSO for the same time period (Fig. 3A). As expected, GM-CSF was found to delay neutrophil apoptosis (17, 19, 20) and its effect was reversed by toxaphene (data not shown). The toxaphene-induced neutrophil apoptosis was also confirmed by a down-regulation of CD16 expression (Fig. 3B).

Effect of T_2 and/or T_{12} congeners on neutrophil O_2^- production. Since T_2 and T_{12} are the two environmentally prevalent forms of toxaphene congeners found in humans, their effect on neutrophil O_2^- production was

investigated. Figure 4 illustrates that treatment of cells with 5 $\mu\text{g/ml}$ of T_2 or T_{12} for 30 min can significantly increase O_2^- production from 0.6 ± 0.2 (diluent) to 2.2 ± 0.6 (T_2) or 1.9 ± 0.4 (T_{12}) nmol/ 10^6 cells (mean \pm SEM, $n = 3$). In these experiments, an equivalent concentration of toxaphene was found to increase O_2^- production to nearly 30 nmol/ 10^6 cells (data not shown). A mixture of T_2 and T_{12} congeners was also found to slightly induce O_2^- production in a concentration-dependent manner but no additive or synergistic effects were observed (Fig. 5).

Toxaphene induces superoxide production via protein kinases C and tyrosine kinases. Figure 6 illustrates that toxaphene-induced O_2^- production is significantly decreased by preincubation of cells with inhibitors of PKCs (staurosporine and H7) and of tyrosine kinases (genistein). Indeed, an inhibition of 51.5, 71.8, or 30.9% was observed when neutrophils treated with 25 $\mu\text{g/ml}$ toxaphene were preincubated with staurosporine, H-7, or genistein, respectively. Similarly, an inhibition of 62.6, 61, or 22.5%, in the same order, was obtained when the cells were treated with PMA. Also as for PMA, pretreatments of cells with pertussis toxin (G protein inhibitor) or HA-1077 (PKA, PKG) had no effect on the toxaphene-induced O_2^- production (Fig. 6). We have selected the concentration used for each inhibitor according to the literature. Note that we have always tested a 10 times lower and 10 times greater concentration than the one proposed (data not shown). Cytotoxicity was performed in parallel in the presence or the absence of toxaphene.

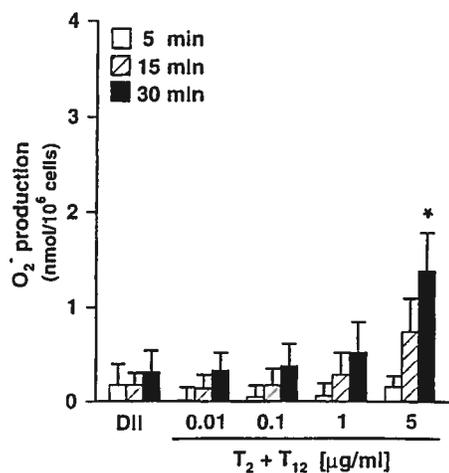


FIG. 5. Effect of a mixture of T_2 and T_{12} congeners on human neutrophil O_2^- production. Cells were treated with buffer (Ctrl), the diluent (Dil), or a 50:50 mixture of T_2 and T_{12} congeners each at 0.01, 0.1, 1, or 5 $\mu\text{g/ml}$ for 5, 15, or 30 min and the O_2^- was measured as described under Materials and Methods. Results are means \pm SEM ($n = 3$ different blood donors). * $P < 0.05$ by Student's t test (vs corresponding diluent).

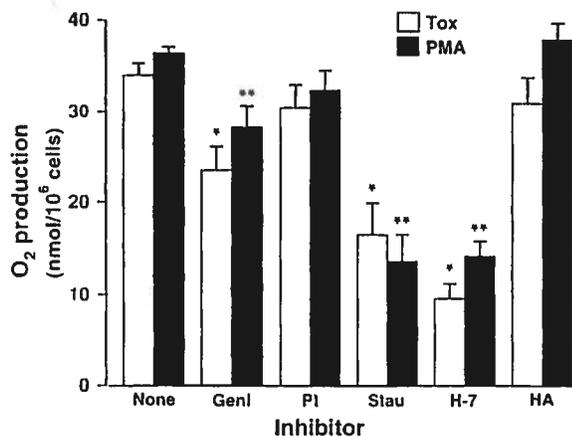


FIG. 6. Toxaphene induces O_2^- production via PKCs and tyrosine kinases. Neutrophils were treated for 30 min with buffer (none); 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ genistein (Geni); 50 ng/ml pertussis toxin (Pt); 100 nM staurosporine (Stau); 0.5 mM H-7; or 40 μM HA-1077 (HA) and then incubated with 10^{-7} M PMA or 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ toxaphene for 30 min. Superoxide production was assessed as described under Materials and Methods. Results are means \pm SEM ($n = 4$ different blood donors). * $P < 0.05$ by Student's t test (vs corresponding diluent).

DISCUSSION

In this study, we investigated for the first time the effect of toxaphene on human neutrophil functions. We found that toxaphene can directly modulate various neutrophil functions at nonnecrotic concentrations (0.1 to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Indeed, we demonstrated that toxaphene activates O_2^- production, enhances phagocytosis, and induces apoptosis.

Toxaphene was found to induce O_2^- production as strongly as the classical neutrophil agonist PMA when used at a concentration ≥ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. However, PMA appears to act slightly more rapidly than toxaphene on the O_2^- production (Fig. 1, inset). In a pilot study, chronic exposure of cynomolgus monkeys (*M. fascicularis*) to low levels of toxaphene for 52 weeks was found to slightly reduce the respiratory burst activity of blood monocytes and neutrophils when monitored after 32 weeks of treatment (12). Whether their observations were due to a decrease in the responsiveness state of the cells is not clear, as no positive controls were included in their experiments (12). Unlike this study, we found that toxaphene is a potent activator of human neutrophil O_2^- production when administered *in vitro* at a single concentration.

The use of a panel of transduction inhibitors in our experiments allowed us to conclude that PKCs and tyrosine kinases, but not G proteins, are involved in O_2^- production. Our results are in agreement with those from a unique study which has reported that various chlorinated hydrocarbons, such as chlordane, kepone, heptachlor, 2,2-bis(4-chlorophenyl)-1,1-dichloroeth-

ane, lindane (γ -hexachlorocyclohexane), the polychlorinated biphenyl Aroclor 1254, aldrin, 2,2-bis(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT), and toxaphene, were the most potent stimulators of PKC activity in a mouse brain PKC activity assay (24). Among these, chlordane, another POP, was the most potent. Whether this chemical would act as toxaphene on human neutrophils remains to be determined.

PKCs are a family of serine-threonine protein kinases composed of at least 11 different isoenzymes (25). Human neutrophils are known to express PKC- α , - β_1 , β_{11} , - δ , and - ζ (26), which are involved in several functions. In this sense, different agents known to induce neutrophil O_2^- production, such as Na_2SO_3 , PMA, arachidonic acid derivatives, the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1242, as well as anti-neutrophil cytoplasm autoantibody (ANCA), mediate their response via PKCs (18, 19, 27–30). Also, it was recently documented that caspase-3-mediated activation of PKC- δ was involved in spontaneous neutrophil apoptosis (31). In addition, PKCs were found to be involved in neutrophil phagocytosis, degranulation, and adhesion, as well as to modulate expression of L-selectin by inducing proteolysis (27, 31–33). Tyrosine kinases are also involved in mediating various neutrophil functions, such as phagocytosis, apoptosis, and activation of various genes (35, 36). The precise nature and roles of the PKCs and tyrosine kinases involved in toxaphene-induced neutrophils are not clear and remain to be determined.

It is frequently suggested that xenobiotic-treated animals would be susceptible to infections because of a reduced capacity of their cells to exert phagocytosis. Although this has been particularly observed with phagocytes of the monocyte-macrophage lineage, fewer studies have been conducted with neutrophils. Unexpectedly, we found herein that toxaphene can enhance the ability of human neutrophils to phagocytose opsonized SRBCs *in vitro*. This is unlike other xenobiotics we have tested in our laboratory, namely, dieldrin, lindane, and Na_2SO_3 , where no major changes were observed (17–19). Our results are not in agreement with the pilot study conducted with monkeys (12), as no major change in the phagocytic activity of neutrophils was observed. As for the respiratory burst activity, it is not clear if the responsiveness state of the cells was altered during this study. The mechanism by which toxaphene acts to induce neutrophil phagocytosis remains to be determined. It is tempting to speculate that PKCs and tyrosine kinases could be involved. Experiments are in progress in our laboratory to elucidate the signaling events involved in toxaphene-induced neutrophil phagocytosis. Preliminary results suggest that pertussis toxin, H-7, and HA-1077 cannot reverse or attenuate this response (data not shown). Since genistein by itself was found to enhance phago-

cytosis, this inhibitor cannot be used for inhibitory experiments. One interesting potential route to investigate in future is the activation of the syk protein, which is known to be involved in neutrophil phagocytosis (37).

Toxaphene was found to be a potent activator of neutrophil apoptosis as virtually all cells were apoptotic after 24 h without apparent cell necrosis. However, this was observed at high concentrations of toxaphene. We have recently observed similar results with the plant lectin VAA-I (38). This contrasts with high concentrations of methyl mercury that were found to be necrotic as the cells were clearly necrotic (38, and data not shown). Herein, we confirm the apoptotic state of the cells by a decrease in CD16 expression. This procedure has been used by others to demonstrate an alteration of the cytoskeleton functions (22, 23). Collectively, these data demonstrate that human neutrophils preferentially undergo apoptosis *in vitro* instead of cell necrosis when incubated with high concentrations of chemicals. The mechanism by which toxaphene can drive neutrophils into apoptosis is presently unknown.

Toxaphene was previously detected at 0.1 mg/kg on a milk fat basis by negative ion GC/MS in one study (39). Others have found that the toxaphene concentration found in 16 human milk samples from Nicaragua ranged from 0.3 to 7.6 mg/kg lipid weight using GC/NCI-MS (40). These data indicate that this chemical can be found at relatively high concentrations in the human body. The roles of both T₂ and T₁₂ congeners were also investigated in the present study as several reports indicate their persistence in the environment and presence in human fat (41), milk, and serum (1–7). Our results also indicate that these congeners can induce O₂⁻ production in human neutrophils when used separately or in combination. This also suggests that these congeners are not necessarily those involved in toxaphene-induced neutrophil O₂⁻ production. If so, one has to admit that other congeners contained in the toxaphene preparation are simultaneously involved since we only observed a slight response of about 3 nmol O₂⁻/10⁶ cells at a concentration of 5 µg/ml of T₂ and T₁₂ after a treatment of 30 min. Under the same conditions, toxaphene was found to induce ~30 nmol O₂⁻/10⁶ cells which is almost equivalent to the maximal level that could be obtained with PMA in this system. In our hands, neutrophil O₂⁻ production cannot exceed 40 nmol O₂⁻/10⁶ cells. Our observations are in agreement with a general interest in studying the "technical" toxaphene formulation in different systems. Since this POP retains an increasing interest in several studies, we propose to study in parallel both "technical" toxaphene and particular congeners in future experiments, when possible. This will certainly be helpful for

a better understanding of how this chemical can act in different systems.

In conclusion, since free radicals are known to participate in the inflammatory process, as they are highly toxic to surrounding cells and tissues, and knowing that toxaphene was previously found to increase neutrophil counts in treated animals (11) as well as in a suicide attempt (14), we propose to classify this POP as a potential proinflammatory candidate.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Annie Couture for her technical help. This study was partly supported by Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), FRSQ-Réseau de Recherche en Santé Environnementale, Toxic Research Initiative Substance/Health Canada, and Fonds de Recherche de l'ACEQ. M.P. holds a M.Sc. FCAR-FRSQ Santé award, and D.G. and P.A.T. are Scholars from FRSQ and The Arthritis Society, respectively.

REFERENCES

1. Saleh, M. A., Toxaphene: Chemistry, biochemistry, toxicity and environmental fate. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **118**, 1–85, 1991.
2. de Geus, H. J., *et al.* Environmental occurrence, analysis, and toxicology of toxaphene compounds. *Environ. Health Perspect.* **107**(Suppl. 1), 115–144, 1999.
3. Newsome, W. H., and Ryan, J. J., Toxaphene and other chlorinated compounds in human milk from northern and southern Canada: A comparison. *Chemosphere* **39**, 519–526, 1999.
4. Bidleman, T. F., Walla, M. D., Muir, D. C. G., and Stern, G. A., Selective accumulation of polychlorocamphenes in aquatic biota from the Canadian arctic. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 701–709, 1993.
5. Stern, G. A., Muir, D. C. G., Ford, C. A., Grift, N. P., Dewally, E., Bidleman, T. F., and Walla, M. D., Isolation and identification of two major recalcitrant toxaphene congeners in aquatic biota. *Environ. Sci. Technol.* **26**, 1838–1840, 1992.
6. Stelzer, A., and Chan, H. M., The relative estrogenic activity of technical toxaphene mixture and two individual congeners. *Toxicology* **138**, 69–80, 1999.
7. Calciu, C., Chan, H. M., and Kubow, S., Toxaphene congeners differ from toxaphene mixtures in their dysmorphogenic effects on cultured rat embryos. *Toxicology* **124**, 153–162, 1997.
8. Deichmann, W. B., "The Chronic Toxicity of Organochlorine Pesticides in Man," p. 347. Proc. 8th Pestic. Symp. Collect. Pap. Inter-Am. Conf. Toxicol. Occup. Med., 1973.
9. Sobti, R. C., Krlshan, A., and Davies, J., Cytokinetic and cytogenetic effect of agricultural chemicals on human lymphoid cells in vitro. II. Organochlorine pesticides. *Arch. Toxicol.* **52**, 221–231, 1983.
10. Allen, A. L., Koller, L. D., and Pollock, G. A., Effect of toxaphene exposure on immune responses in mice. *Toxicol. Environ. Health* **11**, 61–69, 1983.
11. Bacumler, W., Side effects of toxaphene on mice. *Anz. Schaefflingskd. Pflanz. Umweltschutz* **48**, 65–71, 1975.
12. Tryphonas, H., Bryce, F., Huang, J., Lacroix, F., Hodgen, M., Ladouceur, D. T., and Hayward, S., Effects of toxaphene on the immune system of cynomolgus (*Macaca fascicularis*) monkeys. A pilot study. *Food Chem. Toxicol.* **38**, 25–33, 2000.
13. Miyagi, T., Lam, K. M., Chuang, L. F., and Chuang, R. Y., Suppression of chemokine-induced chemotaxis of monkey neu-

- trophils and monocytes by chlorinated hydrocarbon insecticides. *In Vivo* **12**, 441–446, 1998.
14. Wells, W. L., and Millhorn, H. T., Sulcidal attempt by toxaphene: A case report. *J. Miss. State Assoc.* **12**, 329–330, 1983.
 15. Queiroz, M. L., Bincoletto, C., Perlingeiro, R. C., Souza, C. A., and Toledo, H., Defective neutrophil function in workers occupationally exposed to hexachlorobenzene. *Hum. Exp. Toxicol.* **16**, 322–326, 1997.
 16. Queiroz, M. L., Quadros, M. R., Valadares, M. C., and Silveira, J. P., Polymorphonuclear phagocytosis and killing in workers occupationally exposed to hexachlorobenzene. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **20**, 447–454, 1994.
 17. Labbé, P., Pelletier, M., Omara, F. O., and Girard, D., Functional responses of human neutrophils to sodium sulfite (Na_2SO_3) in vitro. *Hum. Exp. Toxicol.* **17**, 600–605, 1998.
 18. Pelletier, M., Savoie, A., and Girard, D., Activation of human neutrophils by the air pollutant sodium sulfite (Na_2SO_3): Comparison with immature promyelocytic HL-60 and DMSO-differentiated HL-60 cells reveals that Na_2SO_3 is a neutrophil but not HL-60 cell agonist. *Clin. Immunol.* **96**, 131–139, 2000.
 19. Pelletier, M., Gauthier, M., and Girard, D., "Human Neutrophils Respond Differently to Dieldrin and Lindane, Two Chemicals of Environmental Concern That Share a Similar Structure." Canadian Society of immunology, Château Bromont (Qc), March 17–20, 2000.
 20. Girard, D., Paquet, M. E., Paquin, R., and Beaulieu, A. D., Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: Modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood* **88**, 3176–3184, 1996.
 21. Girard, D., Boiani, N., and Beaulieu, A. D., Human neutrophils express the interleukin-15 receptor alpha (IL-15R α) but not IL-9R α . *Clin. Immunol. Immunopathol.* **88**, 232–240, 1998.
 22. Dransfield, I., Buckle, A. M., Savill, J. S., McDowall, A., Haslett, C., and Hogg, N., Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *J. Immunol.* **153**, 1254–1263, 1994.
 23. Moulding, D. A., Hart, C. A., and Edwards, S. W., Regulation of neutrophil Fc gamma RIIIb (CD16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 875–882, 1999.
 24. Moser, G. J., and Smart, R. C., Hepatic tumor-promoting chlorinated hydrocarbons stimulate protein kinase C activity. *Carcinogenesis* **10**, 851–856, 1989.
 25. Nishizuka, Y., Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**, 607–614, 1992.
 26. Sergeant, S., and McPhail, L. C., Opsonized zymosan stimulates the redistribution of protein kinase C isoforms in human neutrophils. *J. Immunol.* **159**, 2877–2885, 1997.
 27. Olivero, J., and Ganey, P. E., Role of protein phosphorylation in activation of phospholipase A2 by the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1242. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **163**, 9–16, 2000.
 28. Yamamori, T., Inanami, O., Nagahata, H., Cui, Y., and Kuwabara, M., Roles of p38 MAPK, PKC and PI3-K in the signaling pathways of NADPH oxidase activation and phagocytosis in bovine polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett.* **467**, 253–258, 2000.
 29. Hii, C. S., Huang, Z. H., Bilney, A., Stacey, K., Murray, A. W., Rathjen, D. A., and Ferrante, A., Involvement of protein kinase C, p38 MAP kinase and ERK in arachidonic acid-stimulated superoxide production in human neutrophils. *Adv. Exp. Med. Biol.* **469**, 365–370, 1999.
 30. Radford, D. J., Lord, J. M., and Savage, C. O., The activation of the neutrophil respiratory burst by anti-neutrophil cytoplasm autoantibody (ANCA) from patients with systemic vasculitis requires tyrosine kinases and protein kinase C activation. *Clin. Exp. Immunol.* **118**, 171–179, 1999.
 31. Pongracz, J., Webb, P., Wang, K., Deacon, E., Lunn, O. J., and Lord, J. M., Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3-mediated activation of protein kinase C-delta. *J. Biol. Chem.* **274**, 37329–37334, 1999.
 32. Alexander, S. R., Kishimoto, T. K., and Walcheck, B., Effects of selective protein kinase C inhibitors on the proteolytic down-regulation of L-selectin from chemoattractant-activated neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 415–422, 2000.
 33. Tominaga, K., Honda, K., Akahoshi, A., Makino, Y., Kawarabayashi, T., Takano, Y., and Kamiya, H., Substance P causes adhesion of neutrophils to endothelial cells via protein kinase C. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 1242–1245, 1999.
 34. Nagaji, J., The role of protein kinase C and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in superoxide anion synthesis and myeloperoxidase degranulation of human neutrophils. *Kurume Med. J.* **46**, 157–162, 1999.
 35. Fuortes, M., Melchior, M., Han, H., Lyon, G. J., and Nathan, C., Role of the tyrosine kinase pyk2 in the integrin-dependent activation of human neutrophils by TNF. *J. Clin. Invest.* **104**, 327–335, 1999.
 36. Simon, H. U., Yousefi, S., and Blaser, K., Tyrosine phosphorylation regulates activation and inhibition of apoptosis in human eosinophils and neutrophils. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **107**, 338–339, 1995.
 37. Raeder, E. M., Mansfield, P. J., Hinkovska-Galcheva, V., Shayman, J. A., and Boxer, L. A., Syk activation initiates downstream signaling events during human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis. *J. Immunol.* **163**, 6785–6793, 1999.
 38. Savoie, A., Pelletier, M., Hostanska, K., Hatjo, T., and Girard, D., Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I): Modulation of de novo protein synthesis and evidence that caspases are involved for induction of apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 2000 (in press).
 39. Vaz, R., and Blomkvist, G., Traces of toxaphene components in Swedish breast milk analysed by capillary GC using ECD, electron impact and negative ion chemical ionization MS. *Chemosphere* **14**, 223–231, 1985.
 40. De Boer, J., and Wester, P. G., Determination of toxaphene in human milk from Nicaragua and in fish and marine mammals from the northeastern Atlantic and the North Sea. *Chemosphere* **27**, 1879–1890, 1993.
 41. Witt, K., and Niessen, K. H., Toxaphenes and chlorinated naphthalenes in adipose tissue of children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **30**, 164–169, 2000.

8. Article #2 :

8.1 Résumé français de l'article #2

Nous avons récemment rapporté que les neutrophiles humains sont d'importantes cibles pour différents xénobiotiques, incluant des composés chimiques environnementaux. Dans la présente étude, nous avons démontré que le chlordane n'était pas toxique pour les neutrophiles incubés jusqu'à 24 heures en présence de concentrations variant de 0,1 à 50 µg/mL. Le chlordane a cependant été capable d'induire une production de superoxyde (O_2^-) de manière concentration-dépendante et son potentiel d'induction s'est révélé similaire à celui du phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), un agoniste classique des neutrophiles. L'utilisation de différents inhibiteurs de signalisation cellulaire (génistéine, pertussis toxin, staurosporine et calphostin C) nous a indiqué que, comme pour le PMA, le chlordane induit la production de superoxyde via les protéines kinases de type C (PKCs). En effet, la staurosporine et le calphostin C ont inhibé la production de superoxyde induite par le chlordane et le PMA à 65% et 72% et à 83% et 85%, respectivement.

Le chlordane a également augmenté de manière significative la phagocytose de globules rouges de mouton opsonisés. Malgré cela, le chlordane n'a pas affecté l'apoptose chez les neutrophiles tel que mesuré par cytométrie en flux (expression du CD16) et par cytologie (coloration Diff-Quick). Le chlordane n'a pas non plus influencé le chimiotactisme des neutrophiles, mesuré dans une chambre de Boyden. Cependant, les neutrophiles étaient toujours en état de répondre puisqu'ils ont migré efficacement vers l'interleukine-8, bien connue pour ses propriétés chimiotactiques.

Nous concluons donc ici que le chlordane peut activer la production de superoxyde par un mécanisme PKC-dépendant et induire la phagocytose sans altérer l'apoptose ni le chimiotactisme. Le chlordane peut ainsi donc être ajouté à la liste

grandissante des contaminants environnementaux qui possèdent des propriétés pro-inflammatoires.

8.2 Article #2

Pour des raisons de droits d'auteur, les pages de l'article ont été retirées de ce document.
L'article se trouve à l'adresse URL suivante : <http://het.sagepub.com/content/20/5/229.abstract>

Quatrième partie
Discussion et perspectives

9. Discussion

Les expériences qui ont été détaillées dans le présent mémoire nous permettent ici de tirer d'importantes conclusions concernant les effets des deux polluants organiques persistants que sont le chlordane et le toxaphène. La présente discussion portera non seulement sur les résultats présentés dans les deux articles de référence, mais également sur d'autres données qui feront partie d'autres articles scientifiques actuellement en préparation.

Mentionnons tout d'abord que les concentrations utilisées (de 0.1 à 50 $\mu\text{g/mL}$), qui sont les mêmes pour les deux produits, ont été choisies comme représentant une dose-réponse sous-létale. En effet, des tests de viabilité nous ont révélé qu'après 24 heures d'exposition (en présence de 10% de sérum autologue), les cellules exposées à des concentrations inférieures à 50 $\mu\text{g/mL}$ ne démontraient aucun signe de nécrose. Les concentrations utilisées sont d'ailleurs consistantes avec celles que l'on trouve dans la littérature scientifique pour des expositions *in vitro* (Steinel et al., 1990 ; Moser et Smart, 1989 ; Stelzer et Chan, 1999).

Examinons, dans un premier temps, les différentes réponses fonctionnelles obtenues. Le toxaphène et le chlordane stimulent la production de superoxyde, de manière concentration-dépendante. Toutefois dans le cas du chlordane, la réponse plafonne à une concentration de 5 $\mu\text{g/mL}$.

Le taux d'apoptose, pour sa part, ne semble pas être influencé par le chlordane, alors que le toxaphène induit significativement cette réponse après 24 heures en présence de 10% de sérum autologue dans le milieu.

Les résultats issus de récentes expériences sur le point d'être soumis pour publication, nous ont révélé que la catalase (2000 U/mL), une enzyme qui dégrade le peroxyde d'hydrogène, peut protéger encore plus efficacement les neutrophiles de

l'apoptose induite par le toxaphène. Ceci suggère que l'action des radicaux libres est déterminante pour les effets pro-apoptotiques du toxaphène. Les effets pro-apoptotiques du peroxyde d'hydrogène étaient déjà connus dans la littérature (Rollet-Labelle et *al.*, 1998 ; Hiraoka et *al.*, 1998).

La fonction de phagocytose est augmentée aussi bien par le toxaphène que par le chlordane, mais la réponse est en forme de cloche, diminuant à 25 et 50 µg/mL. Certains tests d'apoptose sans sérum nous permettent de croire que l'apoptose est probablement ce qui fait diminuer la réponse de phagocytose à hautes concentrations. En effet, le protocole de phagocytose que nous avons utilisé se fait dans un milieu sans sérum, et l'observation microscopique des lames de cytologie nous confirme l'apoptose chez les cellules concernées. Il est bien connu dans la littérature que l'état apoptotique diminue drastiquement la capacité des neutrophiles à effectuer leurs fonctions cellulaires (Whyte et *al.*, 1993).

Afin d'éclaircir d'avantage le mode d'action des deux produits sur la physiologie des neutrophiles, nous avons par la suite employé une série d'inhibiteurs de voies de signalisation classiques. En utilisant la production de superoxyde comme réponse indiquant l'activation des neutrophiles par les deux produits, nous avons constaté que les PKCs sont grandement impliquées. En effet, les inhibiteurs staurosporine (PKC, PKA et PKG) et H-7 (PKC, PKA et PKG) ont démontré un grand pouvoir d'inhibition, alors que le HA-1077 (PKA et PKG), la *Pertussis toxin* (protéines G) et la génistéine (tyrosine kinases) n'ont démontré que des pouvoirs d'inhibition très faibles ou nuls. Pour le chlordane, le Calphostin C a remplacé le HA-1077 et le H-7, qui n'ont pas pu être utilisés comme inhibiteurs de PKCs.

Les figures 1 et 2 résument l'action du toxaphène et du chlordane sur les neutrophiles humains *in vitro*. Les deux produits stimulent l'activité des PKCs, qui entraîneront une cascade de phosphorylation menant à la production de superoxyde. Les radicaux libres produits, en particulier le peroxyde d'hydrogène, entraînent par la suite des effets pro-apoptotiques *in vitro*. Ce n'est cependant pas le cas pour le chlordane, et

les résultats présentés ici ne permettent pas de déterminer si la production de radicaux libres plus réduite associée au chlordane en est la cause.

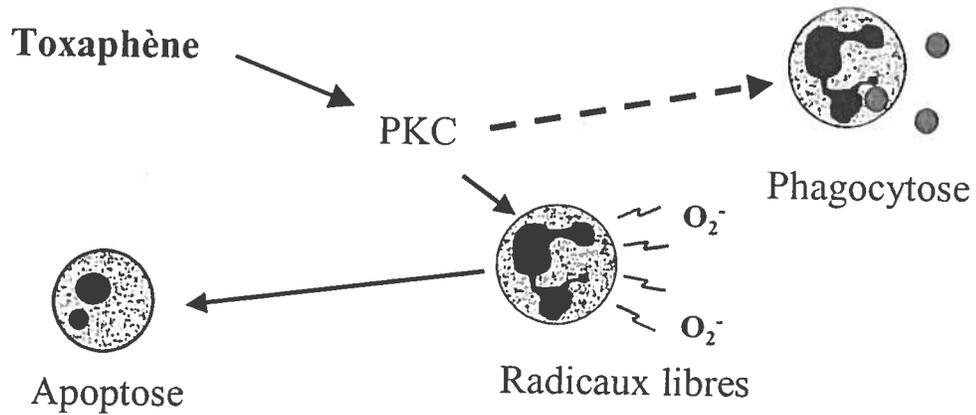


Figure 4 : Résumé schématique de l'action du toxaphène sur les neutrophiles.

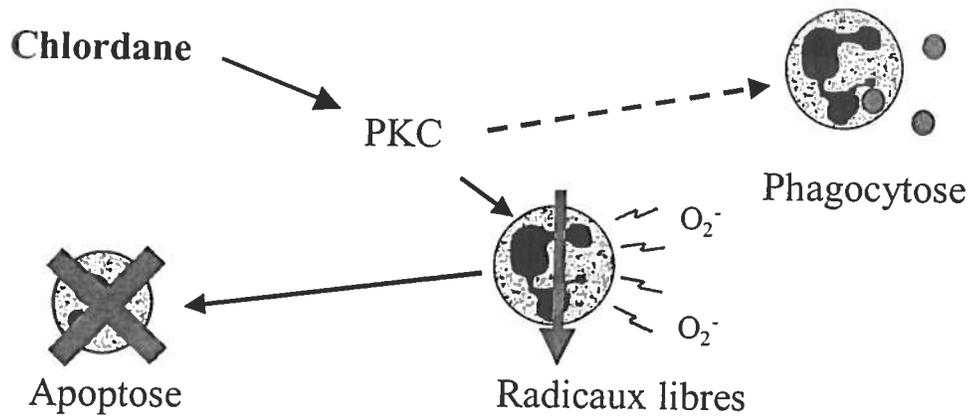


Figure 5 : Résumé schématique de l'action du chlordane sur les neutrophiles.

La ligne pointillée (figure 1 et 2) qui mène des PKCs à l'activation de la phagocytose fait référence à la voie de signalisation bien connue qui origine des PKCs et mène à l'activation de certaines MAP kinases et PI-3 kinases en passant par la petite protéine G ras (Raeder et al., 1999) Cette voie de signalisation est bien connue pour jouer un rôle non seulement dans la production de superoxyde mais également sur la phagocytose et sur le chimiotactisme (Scott-Zaki et al., 2000).

En effet, l'oligomérisation du récepteur à phagocytose FcγRIIIa, couplé à la protéine tyrosine kinase Syk, mène à l'activation de cette voie de signalisation classique chez le neutrophile (Raeder et al., 1999). Comme les résultats présentés ici ne peuvent démontrer clairement cette relation, de plus amples expérimentations seraient donc ici nécessaires afin de démontrer clairement quelle est la voie de signalisation impliquée.

Selon nos résultats *in vitro*, nous pouvons actuellement conclure que le toxaphène est un agent pro-inflammatoire. Cette constatation nous éclaire d'ailleurs sur les symptômes inflammatoires étonnants qu'un patient suicidaire avait ressenti après avoir ingéré oralement une forte dose de toxaphène technique (Wells et Milhorn, 1983). Les effets stimulants du toxaphène envers les neutrophiles pourraient également expliquer la diminution de la production de superoxyde chez les neutrophiles de singes exposés *in vivo* par voie orale (Tryphonas et al., 2000). En effet, la présence constante de toxaphène dans l'organisme de ces animaux pourrait altérer le seuil de réponse de leurs neutrophiles pour un agoniste agissant sur les PKCs. Les résultats obtenus par cette équipe ne permettent cependant pas de dire si la diminution de la production de superoxyde observée est effectivement due à une augmentation du seuil de réponse des neutrophiles ainsi exposés. L'utilisation d'une série croissante de concentrations de l'agent stimulant (PMA) aurait été nécessaire afin de déterminer précisément ce seuil de réponse.

Dans le but de mieux cerner les conséquences de nos recherches sur la santé humaine, nous avons par la suite étudié les deux congénères de toxaphène prévalant chez l'humain, soit le T2 et le T12. Ces deux molécules, que nous avons dû utiliser en doses plus faibles (5 µg/mL maximum), n'ont présenté qu'une activité très réduite, mais tout de

même significative, sur la production de radicaux libres. Les dosages de superoxyde obtenus sont environ huit à dix fois inférieures à ceux causés par la formulation technique de toxaphène à pareilles concentrations

Tous ces résultats semblent donc indiquer que le toxaphène, tel que bio-accumulé chez l'humain, ne présente qu'une activité réduite sur les neutrophiles comparativement à la formulation initiale. Cette observation permet ici de mieux saisir pourquoi les humains qui accumulent des concentrations élevées de toxaphène (de l'ordre du $\mu\text{g/g}$ de tissus adipeux) présentent une condition immunologique généralement normale (Tryphonas, 1998). À l'inverse, les animaux qui bio-accumulent en laboratoire le toxaphène à partir de sa forme initiale (toxaphène technique) présentent des dysfonctions du système immunitaire (Tryphonas et al., 2000).

10. Perspectives

Plusieurs points importants restent encore à clarifier ici concernant l'action des deux organochlorés sur les neutrophiles humains. Leur influence sur d'autres fonctions des neutrophiles pourrait être un des aspects à explorer. Ainsi la production de cytokines et d'autres molécules comme la lactoferrine et la myéloperoxydase par exemple, issus de la dégranulation, pourraient faire l'objet de recherches futures dans notre laboratoire. L'utilisation de techniques de dosages par ELISA pour ce genre de mesures est une méthode rapide, simple et très précise.

La signalisation cellulaire suivant les traitements au toxaphène et au chlordane comprend également plusieurs points qui restent encore à explorer. L'implication possible de phospholipases mériterait d'être considérée, puisque ces enzymes peuvent engendrer la production de seconds messagers qui peuvent à leur tour activer des voies de signalisation comme celle des PKCs.

De la même façon, les différents isoformes de PKCs qui peuvent ou non être activées par le toxaphène sont encore inconnues. Il est actuellement connu que les neutrophiles expriment au moins cinq de ces isoformes (alpha, betaI, betaII, delta, et zeta, selon Sergeant et McPhail, 1997) et leur stimulation différentielle pourrait expliquer, par exemple, l'activation de multiples fonctions cellulaires par le même produit. Les isoformes de PKCs sont connues pour avoir des effets divergents sur les fonctions cellulaires (Hata et al., 1993)

Le chlordane, qui a été étudié moins en profondeur ici, est aussi une source pour de multiples avenues de recherche. Des études *in vivo*, comme celle qui ont été récemment effectuées dans notre laboratoire avec le dieldrin (Pelletier et al., 2001) à l'aide d'un modèle murin inflammatoire, pourraient également nous renseigner sur les propriétés pro-inflammatoires du chlordane.

La stimulation de la fonction de phagocytose demeure encore un mystère au niveau de la signalisation. Nous savons que les voies de signalisation de la phagocytose partagent certains aspects avec celles de la production de superoxyde comme l'activation des MAP kinases et des PKCs. Par contre, nous ignorons toujours quelles sont les voies empruntées par les deux organochlorés étudiés. Il s'agirait donc maintenant de vérifier par immunoprécipitation s'il est possible que la phosphorylation de la protéine Syk puisse survenir suite aux traitements avec le toxaphène et le chlordane. Si tel est le cas, cette phosphorylation expliquerait très bien comment les produits imitent l'activation des récepteurs à phagocytose en phosphorylant la protéine qui a pour but de transmettre un signal d'activation.

Également, la production de seconds messagers par les phospholipases de toutes sortes peut avoir un rôle important à jouer dans la phagocytose (Lennartz, 1999). Les phospholipases de type C, les phospholipases de type A₂ (PLA₂) et les phospholipases de type D (PLD) sont toutes trois importantes dans la physiologie des neutrophiles, comme décrit plus haut. La production de seconds messagers comme le DAG pouvant entraîner l'activation des PKCs, il est possible que certaines phospholipases aient un rôle à jouer en amont dans la signalisation cellulaire induite par le toxaphène et le chlordane.

Enfin les congénères T2 et T12 méritent aussi très certainement encore d'être étudiés sous d'autres aspects. Leur potentiel immunomodulateur a été mesuré seulement sur deux fonctions cellulaires des neutrophiles, ce qui représente encore bien peu comparativement à tout ce qui a été fait et reste à faire avec le toxaphène technique. Des mesures d'apoptose, de phagocytose et des expériences *in vivo* seraient aussi nécessaires. Ces mesures sont évidemment tout aussi importantes, sinon plus, afin de mieux comprendre les effets et, ultimement, réglementer les expositions au produit toxique dans l'environnement.

Références

- ALLEN, A. L., L. D. Koller, and G. A. Pollock. 1983. «Effect of Toxaphene Exposure on Immune Responses in Mice». J Toxicol Environ Health, vol. 11, no. 1, p. 61-69.
- ARNOLD, S. F., P. M. Vonier, B. M. Collins, D. M. Klotz, L. J. Guillette Jr, and J. A. McLachlan. 1997. «In Vitro Synergistic Interaction of Alligator and Human Estrogen Receptors With Combinations of Environmental Chemicals». Environ Health Perspect, vol. 105 Suppl , p. 615-618.
- BAGCHI, D., M. Bagchi, E. A. Hassoun, and S. J. Stohs. 1995. «In Vitro and in Vivo Generation of Reactive Oxygen Species, DNA Damage and Lactate Dehydrogenase Leakage by Selected Pesticides». Toxicology, vol. 104, no. 1-3, p. 129-140.
- BOON, J. P., H. M. Sleiderink, M. S. Helle, M. Dekker, A. van Schanke, E. Roex, M. T. Hillebrand, H. J. Klamer, B. Govers, D. Pastor, D. Morse, P. G. Wester, and J. de Boer. 1998. «The Use of Microsomal in Vitro Assay to Study Phase I Biotransformation of Chlorobornanes (Toxaphene) in Marine Mammals and Birds». Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol, vol. 121, no. 1-3, p. 385-403.
- CRANMER, J. M., M. F. Cranmer, and P. T. Goad. 1984. «Prenatal Chlordane Exposure: Effects on Plasma Corticosterone Concentrations Over the Lifespan of Mice». Environ Res, vol. 35, no. 1, p. 204-210.
- CRANMER, J. S., D. L. Avery, R. R. Grady, and J. I. Kitay. 1978. «Postnatal Endocrine Dysfunction Resulting From Prenatal Exposure to Carbofuran, Diazinon or Chlordane». J Environ Pathol Toxicol, vol. 2, no. 2, p. 357-369.
- DALHOFF, A., G. Frank, and G. Luckhaus. 1982. «The Granuloma Pouch: an in Vivo Model for Pharmacokinetic and Chemotherapeutic Investigations. I. Biochemical and Histological Characterization». Infection, vol. 10, no. 6, p. 354-360.
- DE GEUS, H. J., H. Besselink, A. Brouwer, J. Klungsoyr, B. McHugh, E. Nixon, G. G. Rimkus, P. G. Wester, and J. de Boer. 1999. «Environmental Occurrence, Analysis, and Toxicology of Toxaphene Compounds». Environ Health Perspect, vol. 107 Suppl 1, p. 115-44.
- DENNING, D. W. and A. D. Webster. 1987. «Detrimental Effect of Propylene Glycol on Natural Killer Cell and Neutrophil Function». J Pharm Pharmacol, vol. 39, no. 3, p. 236-38.
- DRUMMOND, L., K. N. Chetty, and D. Desai. 1983. «Changes in Brain ATPases in Rats Fed on Chlordane Mixed With Iron-Deficient and Sufficient Diet». Drug Chem Toxicol, vol. 6, p. 259-266.
- EASTMOND, D. A. and M. T. Smith. 1990. «Xenobiotic Activation by Stimulated

Human Polymorphonuclear Leukocytes and Myeloperoxidase». Methods Enzymol, vol. 186, p. 579-85.

EDWARDS, S. W. 1994. Biochemistry and Physiology of the Neutrophil. New York : Cambridge University Press, 299p.

FOXMAN, E. F., J. J. Campbell, and E. C. Butcher. 1997. «Multistep Navigation and the Combinatorial Control of Leukocyte Chemotaxis». J Cell Biol, vol. 139, no. 5, p. 1349-1360.

FURUKAWA, K. 2000. «Engineering Dioxygenases for Efficient Degradation of Environmental Pollutants». Curr Opin Biotechnol, vol. 11, no. 3, p. 244-9.

GAUTHIER, J. M., H. Dubeau, and E. Rassart. 1999. «Induction of Micronuclei in Vitro by Organochlorine Compounds in Beluga Whale Skin Fibroblasts». Mutat Res, vol. 439, no. 1, p. 87-95.

GILL, U. S., H. M. Schwartz, B. Wheatley, and H. Parlar. 1996. «Congener Specific Analysis of Toxaphene in Serum Using ECNI-MS». Chemosphere, vol. 33, no. 6, p. 1021-1025.

GLASSMEYER, S. T., D. S. De Vault, T. R. Myers, and R. A. Hites. 1997. «Toxaphene in Great Lakes Fish: a Temporal, Spatial and Trophic Study». Environmental Science and Technologies , vol. 31, p. 84-88.

GOLDSMITH, D. F. 2000. «Linking Environmental Cancer With Occupational Epidemiology Research: the Role of the International Agency for Research on Cancer (IARC)». J Environ Pathol Toxicol Oncol, vol. 19, no. 1-2, p. 171-175.

GRUTSCH, J. F. and A. Khasawinah. 1991. «Signs and Mechanisms of Chlordane Intoxication». Biomed Environ Sci, vol. 4, no. 3, p. 317-326.

HATA, A., Y. Akita, K. Suzuki, and S. Ohno. 1993. «Functional Divergence of Protein Kinase C (PKC) Family Members. PKC Gamma Differs From PKC Alpha and -Beta II and NPKC Epsilon in Its Competence to Mediate-12-O-Tetradecanoyl Phorbol 13-Acetate (TPA)-Responsive Transcriptional Activation Through a TPA-Response Element». J Biol Chem, vol. 268, no. 12, p. 9122-9129.

HIRAOKA, W., N. Vazquez, W. Nieves-Neira, S. J. Chanock, and Y. Pommier. 1998. «Role of Oxygen Radicals Generated by NADPH Oxidase in Apoptosis Induced in Human Leukemia Cells». J Clin Invest, vol. 102, no. 11, p. 1961-1968.

JOHNSON, K. W., M. P. Holsapple, and A. E. Munson. 1986. «An Immunotoxicological Evaluation of Gamma-Chlordane». Fundam Appl Toxicol, vol. 6, p. 317-326.

KHASAWINAH, A. M. and J. F. Grutsch. 1989. «Chlordane Thirty-Month Tumorigenicity and Chronic Toxicity in Rats». Reg Toxicol Pharmacol, vol. 10, p. 244-254.

- KILBURN, K. H. 1997. «Chlordane As a Neurotoxin in Humans». South Med J, vol. 90, no. 3, p. 299-304.
- KILBURN, K. H. and J. C. Thornton. 1995. «Protracted Neurotoxicity From Chlordane Sprayed to Kill Termites». Environ Health Perspect, vol. 103, no. 7-8, p. 690-694.
- KOCHEL, B. and W. Sajewicz. 1997. «A New Measure of Xenobiotic Toxicity to the First-Line Human Defence System From the Time-Resolved Phagocyte Luminescence». Bull Math Biol, vol. 59, no. 5, p. 897-910.
- KUHNLEIN, H. V., O. Receveur, D. C. Muir, H. M. Chan, and R. Soueida. 1995. «Arctic Indigenous Women Consume Greater Than Acceptable Levels of Organochlorines». J Nutr, vol. 125, no. 10, p. 2501-2510.
- LEE, T. P. and B. H. Park. 1980. «Effect of Aroclor 1254 on Leukocyte Glucose Uptake». J Toxicol Environ Health, vol. 6, no. 3, p. 607-11.
- LENNARTZ, M. R. 1999. «Phospholipases and Phagocytosis: the Role of Phospholipid-Derived Second Messengers in Phagocytosis». Int J Biochem Cell Biol, vol. 31, no. 3-4, p. 415-430.
- MACIA, M. and M. Hernandez. 1995. «Modulation of the Adherence of Human Polymorphonuclear Leukocytes by Cadmium and Nickel: Sexual Differences». Arch Environ Contam Toxicol, vol. 29, no. 1, p. 15-19.
- MENCONI, S., J. M. Clark, and P. Langenberg. 1988. «A Preliminary Study of Potential Human Health Effects in Private Residences Following Chlordane Application for Termites Control». Arch Environ Health, vol. 43, p. 349-352.
- MISHRA, A., N. Dayal, and I. Beck-Speier. 1995. «Effect of Sulphite on the Oxidative Metabolism of Human Neutrophils: Studies With Lucigenin- and Luminol-Dependent Chemiluminescence». J Biolumin Chemilumin, vol. 10, no. 1, p. 9-19.
- MIYAGI, T., K. M. Lam, L. F. Chuang, and R. Y. Chuang. 1998. «Suppression of Chemokine-Induced Chemotaxis of Monkey Neutrophils and Monocytes by Chlorinated Hydrocarbon Insecticides». In Vivo, vol. 12, no. 5, p. 441-446.
- MORISAKI, H. 1989. «[Inhibition of Neutrophil Function by Solvent of Injectable Sedatives-- Effects of Propylene Glycol, Ethanol and Benzyl Alcohol]». Masui, vol. 38, no. 12, p. 1588-96.
- MOSER, G. J. and R. C. Smart. 1989. «Hepatic Tumor-Promoting Chlorinated Hydrocarbons Stimulate Protein Kinase C Activity». Carcinogenesis, vol. 10, no. 5, p. 851-856.
- NEWSOME, W. H. and J. J. Ryan. 1999. «Toxaphene and Other Chlorinated Compounds in Human Milk From Northern and Southern Canada: a Comparison». Chemosphere, vol. 39, no. 3, p. 519-526.

- PARCHMENT, R. E. 1998. «Alternative Testing Systems for Evaluating Noncarcinogenic, Hematologic Toxicity». Environ Health Perspect, vol. 106 Suppl 2, p. 541-57.
- PELLETIER, M., A. Savoie, and D. Girard. 2000. «Activation of Human Neutrophils by the Air Pollutant Sodium Sulphite (Na₂SO₃): Comparison With Immature Promyelocytic HL-60 and DMSO-Differentiated HL-60 Cells Reveals That Na₂SO₃ Is a Neutrophil but Not a HL-60 Cell Agonist». Clin Immunol, vol. 96, no. 2, p. 131-39.
- PELLETIER, M., Roberge CJ, Gauthier M, Vandal K, Tessier PA, 2001. Girard D. «Activation of human neutrophils in vitro and dieldrin-induced neutrophilic inflammation in vivo. » *J. Leukoc. Biol.* Vol 70, p. 367-373.
- POHL, H. R. and C. A. Tylenda. 2000. «Breast-Feeding Exposure of Infants to Selected Pesticides: a Public Health Viewpoint». Toxicol Ind Health; VOL, vol. 16, no. 2, p. 65-77.
- POONAWALA, N. H. and F. Korte. 1971. «Metabolism of Trans-Chlordane-14C and Identification of Its Metabolites From the Urine of Rabbits». J Agr Food Chem, vol. 19, p. 467-470.
- RAEDER, E. M., P. J. Mansfield, V. Hinkovska-Galcheva, J. A. Shayman, and L. A. Boxer. 1999. «Syk Activation Initiates Downstream Signaling Events During Human Polymorphonuclear Leukocyte Phagocytosis». J Immunol, vol. 163, no. 12, p. 6785-6793.
- SALEH, M. A. 1991. «Toxaphene: Chemistry, Biochemistry, Toxicity and Environmental Fate». Rev Environ Contam Toxicol, vol. 118, p. 1-85.
- SCOTT-ZAKI, P., D. Purkall, and S. Ruddy. 2000. «Neutrophil Chemotaxis and Superoxide Production Are Induced by Cross-Linking FcγRII Receptors». Cell Immunol, vol. 201, no. 2, p. 89-93.
- SERGEANT, S. and L. C. McPhail. 1997. «Opsonized Zymosan Stimulates the Redistribution of Protein Kinase C Isoforms in Human Neutrophils». J Immunol, vol. 159, no. 6, p. 2877-2885.
- SOBTI, R. C., A. Krishan, and J. Davies. 1983. «Cytokinetic and Cytogenetic Effect of Agricultural Chemicals on Human Lymphoid Cells in Vitro. II. Organochlorine Pesticides». Arch Toxicol, vol. 52, no. 3, p. 221-231.
- STEINEL, H. H., A. Arlauskas, and R. S. Baker. 1990. «SCE Induction and Cell-Cycle Delay by Toxaphene». Mutat Res, vol. 230, no. 1, p. 29-33.
- STELZER, A. and H. M. Chan. 1999. «The Relative Estrogenic Activity of Technical Toxaphene Mixture and Two Individual Congeners». Toxicology, vol. 138, no. 2, p. 69-80.

- STERN, G. A., D. C. Muir, J. B. Westmore, and W. D. Buchannon. 1993. «Mass Spectrometric Studies of the Toxaphene Components 2-Exo,3-Endo,5-Exo,6-Endo,8,8,10,10-Octachlorobornane (T2) and 2-Exo,3-Endo,5-Exo,6-Endo,8,8,9,10,10-Nonachlorobornane (T12)». Biol Mass Spectrom; VOL, vol. 22, no. 1, p. 19-30.
- STERN, G. A., D. C. G. Muir, C. A. Ford, N. P. Grift, E. B. T. F. Dewailly, and M. D. Wala. 1992. «Isolation and Identification of Two Major Recalcitrant Toxaphene Congeners in Aquatic Biota». Environmental Science and Technologies, vol. 26, p. 1838-1840.
- SUZAKI, E., B. Inoue, E. Okimasu, M. Ogata, and K. Utsumi. 1988. «Stimulative Effect of Chlordane on the Various Functions of the Guinea Pig Leukocytes». Toxicol Appl Pharmacol, vol. 93, no. 1, p. 137-145.
- TALAMANTES, F. and H. Jang. 1977. «Effects of Chlordane Isomers Administered to Female Mice During the Neonatal Period». J Toxicol Environ Health, vol. 3, no. 4, p. 713-720.
- TITHOF, P. K., S. Watts, and P. E. Ganey. 1997. «Protein Tyrosine Kinase Involvement in the Production of Superoxide Anion by Neutrophils Exposed to Aroclor 1242, a Mixture of Polychlorinated Biphenyls». Biochem Pharmacol, vol. 53, no. 12, p. 1833-42.
- TROWBRIDGE, H. M. et R. C. Emling. 1997. Inflammation. A Review of the Process. 5^e édition. Chicago : Quintessence Publishing Co, Inc., 236p.
- TRUHAUT, R., J. C. Gak, and Graillet C. 1974. «Organochlorine Insecticides; Research Work on Their Toxic Action (Its Modalities and Mechanism)». J Eur De Toxicol, vol. 7, p. 159-166.
- TRYPHONAS, H. 1998. «The Impact of PCBs and Dioxins on Children's Health: Immunological Considerations». Can J Public Health, vol. 89 Suppl 1, p. 49-57.
- TRYPHONAS, H., F. Bryce, J. Huang, F. Lacroix, M. Hodgen, D. T. Ladouceur, and S. Hayward. 2000. «Effects of Toxaphene on the Immune System of Cynomolgus (Macaca Fascicularis) Monkeys. A Pilot Study». Food Chem Toxicol, vol. 38, no. 1, p. 25-33.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES Toxicological Profile for Chlordane. Agency for toxic substances and disease registry, 159p.
- VAN OOSTDAM, J., A. Gilman, E. Dewailly, P. Usher, B. Wheatley, H. Kuhnlein, S. Neve, J. Walker, B. Tracy, M. Feeley, V. Jerome, and B. Kwavnick. 1999. «Human Health Implications of Environmental Contaminants in Arctic Canada: a Review». Sci Total Environ, vol. 230, no. 1-3, p. 1-82.
- VOLDNER, E. C. and Li Y. F. 1993. «Global Usage of Toxaphene». Chemosphere, vol. 27, p. 2073-2078.
- VONIER, P. M., D. A. Crain, J. A. McLachlan, L. J. Guillette Jr, and S. F. Arnold. 1996.

«Interaction of Environmental Chemicals With the Estrogen and Progesterone Receptors From the Oviduct of the American Alligator». Environ Health Perspect, vol. 104, no. 12, p. 1318-1322.

WELLS, W. L. and H. T. Milhorn Jr. 1983. «Suicide Attempt by Toxaphene Ingestion: a Case Report». J Miss State Med Assoc, vol. 24, no. 12, p. 329-330.

WHYTE, M. K., L. C. Meagher, J. MacDermot, and C. Haslett. 1993. «Impairment of Function in Aging Neutrophils Is Associated With Apoptosis». J Immunol, vol. 150, no. 11, p. 5124-34.

WILLINGHAM, E., T. Rhen, J. T. Sakata, and D. Crews. 2000. «Embryonic Treatment With Xenobiotics Disrupts Steroid Hormone Profiles in Hatchling Red-Eared Slider Turtles (*Trachemys Scripta Elegans*)». Environ Health Perspect, vol. 108, no. 4, p. 329-332.

WITTICH, R. M. 1998. «Degradation of Dioxin-Like Compounds by Microorganisms». Appl Microbiol Biotechnol, vol. 49, no. 5, p. 489-99.

YANG, C. and S. Chen. 1999. «Two Organochlorine Pesticides, Toxaphene and Chlordane, Are Antagonists for Estrogen-Related Receptor Alpha-1 Orphan Receptor». Cancer Res, vol. 59, no. 18, p. 4519-24.

Annexe

Cette section présente le résumé en anglais d'un article auquel j'ai participé pour la réalisation de certaines expériences. C'est un article intitulé « Activation of human neutrophils *in vitro* and induction of neutrophilic inflammation *in vivo* by dieldrin. » qui a été publié dans la revue *Journal of Leukocyte Biology*.

Martin Pelletier, Charles J. Roberge, **Marc Gauthier**, Karen Vandal, Philippe A. Tessier and Denis Girard. Activation of human neutrophils *in vitro* and dieldrin-induced neutrophilic inflammation *in vivo*. *J Leukoc Biol.* 2001 Sep; 70(3):367-73.

Many chemicals of environmental concern are known to alter the immune system and are considered toxic molecules because they affect immune cell functions. Inflammation related to environmental chemical exposure, however, is poorly documented, except that from air pollutants. In this study, we found that the organochlorine insecticide dieldrin could not alter the ability of human neutrophils to phagocytose opsonized sheep red blood cells at nonnecrotic concentrations (0.1, 1, 10, and 50 $\mu\text{g}/\text{M}$). However, dieldrin was found to increase human neutrophil superoxide production, RNA synthesis, and proinflammatory cytokine interleukin-8 production. The normal apoptotic rate of neutrophils evaluated by both cytology and flow cytometry (CD-16 staining) was not altered by dieldrin treatments, and this was correlated with its inability to inhibit spreading of neutrophils onto glass. Using the murine air pouch model, we found that dieldrin induces a neutrophilic inflammation. Taken together, these results demonstrated that dieldrin is a proinflammatory contaminant. To our knowledge, this is the first report establishing that dieldrin is a contaminant exhibiting proinflammatory properties. In addition, it is the first time that the murine air pouch model has been successfully used to confirm that a chemical of environmental concern can induce an inflammatory response *in vivo*.

