

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

**Évaluation des effets immunotoxiques chez des souris adultes  
et juvéniles C57Bl/6 exposées dans leur diète à  
du poisson contaminé au chlorure de tributylétain**

Par  
Brigitte Badiwa-Bizowe

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	Denis Girard INRS-Institut Armand-Frappier Centre de recherche en santé humaine
Examineur interne	Charles Ramassamy INRS-Institut Armand-Frappier Centre de recherche en santé humaine
Examineur externe	Phillip Spear Université du Québec à Montréal Département de Sciences biologiques
Directeur de recherche	Michel Fournier INRS-Institut Armand-Frappier Centre de recherche en santé humaine
Codirecteur de recherche	Raymond Vancoillie Université de Sherbrooke Centre universitaire de formation en environnement

## Résumé

Parmi les polluants particulièrement préoccupants d'aujourd'hui comme toxiques pour l'environnement, on trouve les composés organostanniques dont fait partie le tributylétain (TBT) qui a été souvent utilisé comme agent anti-salissure dans les peintures sur les parois des bateaux et divers ouvrages. Une fois libéré dans le milieu aquatique, le TBT peut s'accumuler dans la chaîne alimentaire. Ce composé est reconnu comme perturbateur endocrinien provoquant des mutations sexuelles chez certains mollusques marins et il aurait des effets toxiques sur le développement des systèmes nerveux et immunitaire des mammifères. Le TBT s'avère très toxique (1 à 10 µg/l pour la létalité, < 1 µg/l pour la sublétaleté et 0,5 ng/l pour une perturbation endocrinienne dénommée « imposexe »). Dans ce contexte, l'immunotoxicité du TBT est importante tant pour l'environnement que pour la santé humaine. Nous avons ciblé à ce sujet les effets immunotoxiques possibles de la consommation de poissons contaminés avec du TBT chez des populations qui en sont de grands consommateurs.

À cette fin, nous avons mené une étude dans le but d'évaluer les effets du TBT sur le fonctionnement du système immunitaire des souris C57BL/6 adultes et juvéniles, mâles et femelles. Ces souris ont été nourries avec une diète contenant du poisson contaminé à une concentration de 400 µg CTBT/kg (selon la concentration environnementale de TBT contenue dans du poisson frais) pendant 30 jours et les souris ont été ensuite sacrifiées. Cinq paramètres immunologiques ont alors été examinés : les poids corporels et ceux des organes lymphoïdes (rate et thymus), la transformation lymphoblastique à la concanavoline A (CON A) et au lipopolysaccharide (LPS), la phagocytose, l'activité des cellules tueuses (NK), ainsi que le test de la production d'anticorps (PFC). Les résultats obtenus suite à la suite de ces expériences ont montré une immunomodulation du TBT pour certains des paramètres mesurés: il a eu une diminution des poids des rates et des thymus principalement chez des souris mâles juvéniles. On a observé une augmentation significative de la phagocytose chez les souris exposées comparativement aux témoins pour les deux sexes, autant chez les adultes que chez les juvéniles. L'activité des cellules NK a baissé chez les juvéniles. La lymphoprolifération a montré une faible stimulation des lymphocytes T par la concanavoline A (CON A) chez les juvéniles et les

adultes ; par contre la stimulation des lymphocytes B par la lipopolysaccharide (LPS) a été plus élevée chez les juvéniles que chez les adultes.

Ces résultats suggèrent que l'exposition des souris à une faible dose de CTBT a modulé certains aspects des fonctions immunitaires à médiation cellulaire et humorale ainsi que des mécanismes d'immunosurveillance de l'hôte contre les tumeurs et les infections virales, ceci en fonction du sexe et de l'âge, avec une vulnérabilité plus notable chez les juvéniles.

-----  
Étudiant

-----  
Directeur de recherche

## Remerciements

À mon directeur de recherche, Pr Michel Fournier pour m'avoir admis dans son laboratoire afin de réaliser mon projet de recherche et de m'avoir donné aussi la possibilité de participer à diverses conférences et congrès et surtout pour sa patience face à mes multiples difficultés de famille vécues durant mon cursus.

À mon codirecteur, Pr Raymond Van Coillie et son épouse pour leur soutien incessant pour tous les aspects de ma vie estudiantine à l'INRS.

À Dr Pauline Brousseau pour son assistance scientifique à l'élaboration de mon mémoire

À Madame Marlène Fortier pour son appui technique au sein du laboratoire qui m'a été d'un grand support pour la réalisation de mes expériences.

À monsieur Jay Parkash Arravindakshan , ancien collègue de l'INRS qui m'a beaucoup aidée et soutenue durant tout mon cursus.

À mes collègues Farid Kadi et Noël Raynal qui ont toujours ménagé du temps pour moi quand j'en avais besoin.

A tous les collègues étudiants et d'autres membres des laboratoires de Pointe Claire, particulièrement pour leur participation aux journées rudes des expériences.

À tout le personnel technique et administratif de l'INRS-Institut Armand- Frappier pour leur gentillesse à m'aider toutefois que je leur ai fait appel.

À mes défunts parents qui n'ont pas pu être là pour me soutenir durant ces moments très difficiles que j'ai connus au sein de ma famille durant tout mon cursus. Paix à leurs âmes.

<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	<b>PAGES</b>
Résumé.....	i
Remerciements.....	iii
Table de matières.....	iv
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des histogrammes.....	ix
Liste des acronymes, des symboles et des sigles.....	x
 Introduction	 1
 Chapitre I : revue de littérature.....	 4
1. Système immunitaire.....	5
1.1 Définition.....	5
1.2 Caractéristiques du système immunitaire.....	6
1.3 Réactions immunitaires.....	9
1.3.1 Immunité naturelle et non spécifique.....	10
1.3.1.a Phagocytes.....	10
1.3.1.b Cellules naturelles tueuses.....	11
1.3.2 Immunité acquise.....	12
1.3.2.a Réactions à médiation cellulaires.....	13
1.3.2.b Réactions à médiation humorale.....	16
1.3.3 Interactions cellulaires.....	16
 2. Immunotoxicologie et substances immunotoxiques.....	 19
 3. Problématique.....	 21

3.1 Problématique générale.....	21
3.1.1 Effets liés à la consommation de poissons contaminés.....	23
3.1.2 Effets immunotoxiques chez l'humain.....	23
3.2 Problématique spécifique.....	24
4. Propriétés physico-chimiques du tributylétain (TBT).....	27
5. Sources et concentrations du TBT dans l'environnement.....	29
6. Transports et transformations du TBT dans l'environnement.....	30
7. Cinétique et métabolisme du TBT.....	32
8. Toxicités environnementales du TBT.....	33
8.1 Effets du TBT sur les micro-organismes.....	33
8.2 Effets du TBT sur les organismes aquatiques.....	34
8.3 Biotransformation du TBT.....	36
8.3.1 Études chez l'humain.....	36
8.3.2 Études chez les animaux.....	37
9. Immunotoxicité du TBT.....	38
9.1 Animaux aquatiques.....	39
9.2 Animaux de laboratoire.....	39
9.3 Humains.....	43
10. Hypothèse de recherche.....	44
11. Objectifs.....	44
Chapitre 2 : matériel et méthodes.....	45
2.1 Justification du choix du matériel d'expériences.....	46
2.2 Méthodes.....	47
2.2.1 Animaux.....	47
2.3 Sacrifice des souris et évaluation du système immunitaire.....	51
2.3.1 Suspension cellulaire et comptes cellulaires.....	51
2.3.2 Tests immunologiques.....	52
2.3.2-1 Tests de lymphoprolifération.....	52
2.3.2-2 Tests de phagocytose.....	53
2.3.2-3 Activité des cellules tueuses.....	55
2.3.2-4 Test de production d'anticorps.....	57

2.4. Analyses statistiques.....	58
<b>Chapitre 3 : résultats .....</b>	<b>59</b>
3.1 Tests statistiques.....	60
3.2 Présentation des résultats.....	61
3.3 Souris adultes et juvéniles.....	62
3.3.1 Poids des souris adultes.....	64
3.3.1-A Majorité des tests.....	64
3.3.1-B PFC.....	65
3.3.2 Poids des souris juvéniles .....	64
3.3.2-A Majorité des tests.....	64
3.3.2-B PFC.....	65
3.3.3 Poids des organes.....	66
3.3.3.1 Poids des rates des souris adultes.....	66
3.3.3.2 Poids des thymus des souris adultes.....	67
3.3.3.3 Poids des rate des souris juvéniles.....	68
3.3.3.4 Poids des thymus des souris juvéniles.....	68
3.3.4 Phagocytose.....	69
3.3.4.1 Souris adultes.....	69
3.3.4.2 Souris juvéniles.....	71
3.3.5 Transformation lymphoblastique des splénocytes .....	72
3.3.5.1 Souris adultes.....	72
3.3.5.2 Souris juvéniles.....	74
3.3.6 Test des cellules tueuses naturelles .....	75
3.3.6.1 Souris adultes.....	75
3.3.6.2 Souris juvéniles.....	77
3.3.7 Détermination du nombre de cellules productrices d'anticorps (PFC).....	78
3.3.7.1 Souris adultes.....	78
3.3.7.2 Souris juvéniles.....	79
<b>Chapitre 4 : Discussion et conclusion.....</b>	<b>80</b>
4.1 Discussion.....	81
4.2 Conclusion.....	86

Bibliographie.....	87
--------------------	----

## Annexe

Annexe 1 : Tableau A : synthèse générale des effets immunotoxiques du CTBT

Annexe 2 : Tableau B : synthèse générale des effets immunotoxiques du CTBT  
(seuil de signification statistique)

Annexe 3 : Tableau C : Analyse de la variance des paramètres immunotoxiques  
chez les souris adultes

Annexe 4 : Tableau D : Analyse de la variance des paramètres immunotoxiques  
chez les souris juvéniles

<b>Liste des figures</b>	<b>Pages</b>
Figure 1.1 : le système immunitaire.....	7
Figure 1.2 : hématopoïèse des cellules de l'immunité provenant d'une cellule souche de la moelle osseuse.....	8
Figure 1.3 : développement des lymphocytes T au niveau thymique.....	15
Figure 1.4 : substances toxiques dans la chaîne alimentaire.....	22
Figure 3.3.3.1 : Poids des rates des souris adultes femelles et mâles.....	67
Figure 3.3.3.2 : Poids des thymus des souris adultes femelles et mâles.....	67
Figure 3.3.3.3 : Poids des rates des souris juvéniles femelles et mâles.....	64
Figure 3.3.3.4 : Poids des thymus des souris juvéniles femelles et mâles.....	69
Figure 3.3.4.1-A : % de phagocytose 1 bille et plus (souris adultes).....	70
Figure 3.3.4.1.B : % de phagocytose 3 billes et plus (souris adultes).....	70
Figure 3.3.4.2.A : % de phagocytose 1 bille et plus (souris juvéniles).....	71
Figure 3.3.4.1.B : % de phagocytose 3 billes et plus (souris juvéniles).....	72
Figure 3.3.5.1 .A : Transformation lymphoblastique de splénocytes	

de souris adultes en présence de la CON A.....	73
Figure: 3.3.5.1.B : Transformation lymphoblastique de splénocytes de souris adultes en présence du LPS.....	73
Figure 3.3.5.2.A : Transformation lymphoblastique de splénocyte de souris juvéniles en présence de la CON A.....	74
Figure 3.3.5.2.B : Transformation lymphoblastique de splénocyte de souris juvéniles en présence de la LPS.....	75
Figure 3.3.6.1. A : Pourcentage de lyse par les cellules NK chez les souris adultes (ratio E : C=20 :1).....	76
Figure 3.3.6.1. B : Pourcentage de lyse par les cellules NK chez les souris adultes (ratio E : C=40 :1).....	76
Figure 3.3.6.2. A : Pourcentage de lyse par les cellules NK chez les souris juvéniles (ratio E : C=20 :1).....	77
Figure 3.3.6.2. B : Pourcentage de lyse par les cellules NK chez les souris juvéniles (ratio E : C=40 :1).....	78
Figure 3.3.7.1 Nombre de cellules productrices d'anticorps (PFC) Chez les souris adultes .....	79
Figure 3.3.7.2 Nombre de cellules productrices d'anticorps (PFC) Chez les souris juvéniles .....	79

<b>Liste des tableaux</b>	<b>Pages</b>
Tableau 1.1 : formulation générale du tributylétain.....	27
Tableau 1.2 : paramètres physico-chimiques du tributylétain.....	28
Tableau 1.3 : bioaccumulation du TBT chez plusieurs organismes.....	32
Tableau 1.4 : toxicité du tributylétain pour des organismes marins.....	34
Tableau 1.5 : toxicité du tributylétain pour des organismes d'eau douce.....	35
Tableau A : tableau statistique de la synthèse générale des effets immunotoxiques du CTBT(en annexe)	
Tableau B : synthèse générale des effets immunotoxiques du CTBT (en annexe)	

### Liste des histogrammes

Histogramme 1 : Poids des souris adultes durant l'expérience I..... (majorité des testes)	63
Histogramme 2 : Poids des souris adultes durant l'expérience I (PFC).....	64
Histogramme 3 : Poids des souris juvéniles durant l'expérience II..... (majorité des testes)	65
Histogramme 4 : Poids des souris juv.niles durant l'expérience II (PFC)...	66

## Liste des acronymes, des symboles et sigles

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIN	Diète d'animaux de laboratoire d'American Institute of Nutrition
ANOVA	Analyse de variance
ATP	Adénosine triphosphate
ATSDR	Agency for toxic substances and disease registry
BPC	Biphényles polychlorés
BSA	Bovine serum albumine
C	Cellules cibles
CL <sub>50</sub>	Concentration létale pour 50 % des individus testés
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité de type I ou II
CMI	Concentration minimale inhibitrice
ConA	Concanavaleine A
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
CTBC	Chlorure de tributylétain
CDBT	Chlorure de dibutylétain
DBT	Dibutylétain
DDT	Dichloro-dibenzo-trichloroéthane
DIO	3,3'-dioctadécylloxycarbocyanine perchlorate
DJA	Dose journalière admissible
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
DPM	Désintégration par minute
E	Cellules effectrices
GRM	Globules rouges de mouton
<sup>3</sup> H-Thy	Thymidine tritiée
HBSS	Hank's balanced salt solution
FASC	Fluorescence activated cell sorter
FBC	Facteur de bioaccumulation
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
FL 1	Fluorescence 1 (verte)

FL 3	Fluorescence 3 (rouge)
FSC	Forward scattered cell
Ig	Immunoglobulines
Ig A	Immunoglobulines de classe A
Ig D	Immunoglobulines de classe D
Ig E	Immunoglobulines de classe E
Ig G	Immunoglobulines de classe G
Ig M	Immunologies de classe M
IL 1	Interleukine 1
IL 2	Interleukine 2
IL 10	Interleukine 10
INRS	Institut national de la recherche scientifique
Kg	Kilogramme
l	Litre
LOEC	Lowest observed effect concentration (concentration minimale pour un effet observé)
log K <sub>ow</sub>	Logarithme
LPS	Lipopolysaccharides bactériens
m <sup>3</sup>	Mètre cube
mM	microMole
mn	Minute
ng	Nanogramme
NK	Natural killers (cellules tueuses naturelles)
NKCF	Natural killers cytoxic factors (facteurs cytotoxiques de cellules tueuses naturelles)
NOAEL	No observed adverse effect level (dose sans effet adverse observé)
NOEC	No observed effect concentration (concentration sans effet observable)
NRC	National Research Council
OMS	Organisation mondiale de la santé
OTBT	Oxyde de tributylétain
PBS	Tampon de phosphate salin

p.c	Poids corporel
PFC	Plaque forming cells (cellules formant des plages)
PI	Propidium iodide (Iodure de propidium)
p.s	Poids sec
RfD	Dose de référence
rpm	Rotation par minute
RPMI	Milieu de culture cellulaire de Rosewell Park Memorial Institute
RPMIc	Milieu de culture cellulaire complet
SSC	Side scatter
SVF	Sérum de veau fœtal
TBT	Tributylétain
TCDD	Tétrachlorodibenzodioxine
TCR	T cell receptor
TNF $\alpha$	Toxic natural factors alpha
U	Unité
USEPA	United States Environmental Protection Agency
$\mu$ g	Microgramme
YAC-1	Cellules cancéreuses murines



## Introduction

Le passage à l'ère industrielle est caractérisé par une augmentation de la quantité et de la diversité de produits de synthèse introduits dans l'environnement par les activités humaines. La contamination par des substances synthétiques est planétaire et chaque individu porte maintenant en lui plusieurs sortes de substances chimiques synthétiques.

Ces substances peuvent constituer une sérieuse menace pour la santé humaine et les écosystèmes. L'exposition à certains de ces composés chimiques peut avoir des effets néfastes quantifiables sur les systèmes endocriniens, reproducteur, nerveux et immunitaire tant pour l'humain que pour la faune. Des composés, appelés modulateurs endocriniens, regroupent des substances appartenant à diverses classes chimiques dont des dioxines et furanes chlorés, des biphényles polychlorés (BPC), divers pesticides, des phtalates, des composés phénolés et quelques métaux lourds et composés organométalliques. La majeure partie de ces substances est persistante dans l'environnement (sol, eau, air).

Quelles que soient leurs origines, ces divers contaminants s'acheminent presque toujours vers les lacs et les cours d'eau où ils demeurent associés à des particules fines en suspension et (ou) se déposent au fond de l'eau. Ils passent ensuite dans les organismes aquatiques par la consommation d'eau ou de nourriture contaminée. On retrouve diverses concentrations de ces produits chimiques dans les organismes aquatiques. Dans la chair de poisson, ces concentrations varient selon l'espèce en fonction du régime alimentaire et de la teneur en gras de leurs tissus. En règle générale, les viscères (foie par exemple), les graisses et la peau sont les principaux sites d'accumulation de ces contaminants.

Il est reconnu que la nourriture est la principale source de contamination de l'humain par les pesticides. L'exposition par consommation de poissons est importante (Dougherty *et al*, 2000); par conséquent, elle constitue un risque pour la santé via la bioaccumulation de xénobiotiques dans l'organisme humain placé au sommet de la chaîne trophique des grands lacs, fleuves et rivières. La majorité de ces substances chimiques altèrent les

réponses immunitaires par immunosuppression ou par immunostimulation (Vos et al, 1977).

Certains groupes d'individus peuvent être plus sensibles aux effets de l'exposition aux contaminants, comme les fœtus et les enfants en période de croissance, les personnes âgées ainsi que les personnes qui ont un système immunitaire affaibli. Le système immunitaire, étant à la fois une cible et un médiateur des traumatismes causés par les xénobiotiques à l'organisme, peut présenter une vulnérabilité à certains composés chimiques incluant les pesticides capables d'altérer la structure et la fonction du système, ce qui diminue ainsi les mécanismes de résistance aux maladies.

Parmi les substances perturbatrices du système endocrinien du biote aquatique, on trouve des composés organostanniques utilisés couramment comme biocides (INERIS, 2005). Ces produits chimiques sont exclusivement d'origine synthétique et font partie des substances les plus toxiques pour la faune aquicole ; ils ont été introduits par l'humain dans les écosystèmes aquatiques. Compte tenu de leur toxicité reconnue chez certains organismes aquatiques, plusieurs pays ont restreint l'utilisation des composés organostanniques dans les peintures antissalissures pour les navires (Snoeji *et al*, 1987). Toutefois, on décèle encore des concentrations élevées de ces composés dans des zones portuaires, autant dans l'eau que dans les sédiments et la vie aquatique (Oshima *et al*, 1997 et Harino *et al*, 1998 a,b).

Parmi ces composés organostanniques, le plus toxique s'avère le tributylétain qu'on dénomme TBT (du mot anglais tributyltin). Cette substance chimique toxique est utilisée comme agent anti-salissure dans les peintures pour empêcher les mollusques et les organismes aquatiques de se développer sur les parois des bateaux. Le TBT a été aussi employé comme agent général de conservation car il est un mycobactéricide (produit chimique nocif pour les bactéries et les moisissures). Son extrême toxicité pour certains organismes est devenue évidente au milieu des années 1970. Les effets perturbateurs endocriniens du TBT se sont manifestés avec acuité chez certains mollusques marins par le phénomène d'« imposexe » (Horiguchi, 2006 a,b ; Santos, 2006). Des études menées en laboratoire chez des rongeurs ont aussi mis en évidence l'action immunotoxique du

TBT, laquelle se traduit principalement par une atrophie du thymus (Vos *et al*, 1980), une action d'immunosuppression des lymphocytes T, de l'immunité à médiation cellulaire qui se traduit par une hypersensibilité retardée à la tuberculine et par rejet de greffon (Seinen *et al*, 1979 a,b). L'immunotoxicité du TBT est aussi notable au niveau de la réaction des splénocytes et thymocytes à la stimulation des mitogènes et par une baisse de résistance aux infections bactériennes (Seinen, 1979 b). Par contre, on n'a pas observé une modification néfaste de l'immunité humorale ou de la phagocytose.

Pour l'immunotoxicité du TBT en laboratoire chez des rongeurs (Penninks, 1993), notre étude a utilisé une concentration de ce composé habituellement retrouvée dans la chair de poisson et a expérimenté des souris nourries avec du poisson contaminé au chlorure de tributylétain (CTBT). Deux différents stades de développement (adultes et juvéniles) de souris C57Bl/6 ont été utilisés afin d'évaluer quelques paramètres d'immunotoxicité du TBT. cinq paramètres ont été testés, à savoir le poids corporel et des organes lymphoïdes (rates et thymus), la lymphoprolifération, la phagocytose, l'activité des cellules tueuses NK (Natural Killers) et l'activité des cellules sécrétrices d'anticorps (PFC). Notre intérêt ciblait une immunomodulation à travers les paramètres mesurés. Les résultats peuvent servir à établir des valeurs de référence applicables à l'évaluation des risques pour la santé humaine liée à la consommation de poissons et fruits de mer contaminés au TBT.

## **Chapitre I**

### **Revue de littérature**

## **1. Le système immunitaire**

### **1.1 Définition**

Le terme immunité (du latin immunis, libre de.....) s'adressait initialement à la résistance des individus vis-à-vis des infections microbiennes. Cette définition s'est élargie aujourd'hui à l'ensemble des réactions tendant à éliminer des substances étrangères de l'organisme. Par extension, on désigne aussi, sous ce nom, l'ensemble des facteurs humoraux et cellulaires spécifiques ou non à la substance introduite, qui protègent l'organisme contre les agressions infectieuses et les proliférations malignes (Bach et Chatenoud, 2002).

Les réactions immunitaires n'ont pas toujours un rôle favorable car elles peuvent entraîner des réactions d'hypersensibilité, par exemple, sous forme d'une anaphylaxie ou d'une maladie auto-immune quand un dérèglement de l'organisme l'emmène à réagir contre les propres tissus de l'organisme.

Le dénominateur commun aux principales réactions immunitaires est leur spécificité pour les substances étrangères qui les induisent, lesquelles sont des antigènes.

Ces derniers sont des substances capables de provoquer une réaction immunitaire et ensuite de réagir spécifiquement avec le produit de cette réaction qui peut être un anticorps ou des lymphocytes sensibilisés.

Les anticorps sont des substances dont la production est provoquée par l'administration d'antigènes capables de se lier spécifiquement à eux. Ces anticorps sont des globulines plasmatiques ou immunoglobulines (Ig) dont on connaît cinq classes différentes par leurs structures et leurs fonctions, à savoir les IgG, IgA, IgM, IgE et IgD.

L'anticorps se lie à l'antigène, ce qui forme un complexe immunitaire défini comme un complexe macromoléculaire; son activation a lieu via un complément.

Ce complément est un système enzymatique complexe de protéines plasmatiques susceptibles, une fois activées et fixées sur le complexe antigène-anticorps, d'entraîner à leur tour l'activation de diverses cellules phagocytaires et la libération de molécules douées de nombreuses activités biologiques.

## **1.2 Caractéristiques du système immunitaire**

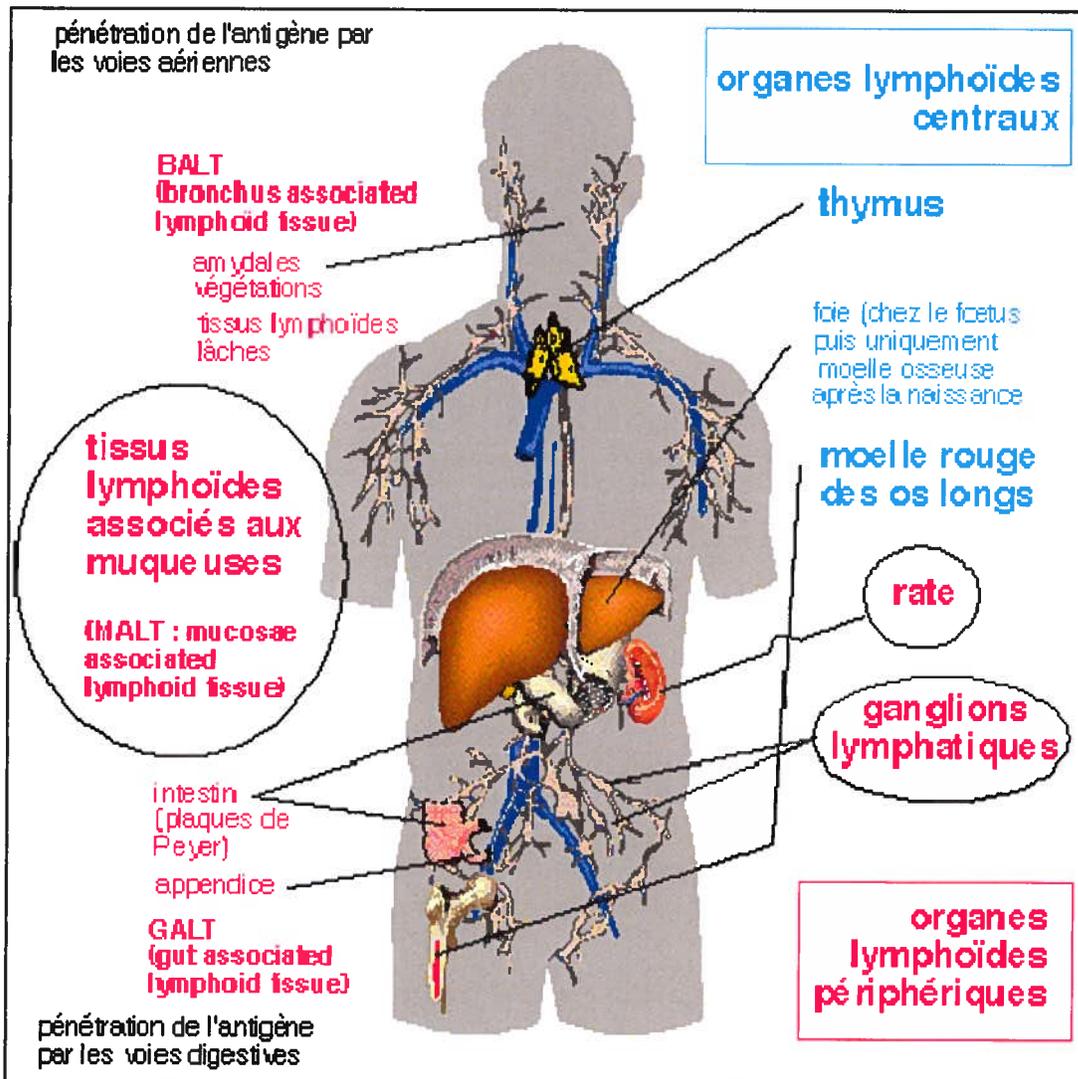
La fonction primordiale du système immunitaire est de maintenir l'intégrité de l'organisme par l'exclusion de constituants étrangers (micro-organismes et greffes) et de reconnaître le soi du non soi. Il permet donc de lutter contre les agents exogènes tout en restant tolérant vis-à-vis des molécules et composantes propres de l'organisme. Cette fonction est assurée aussi bien par des mécanismes cellulaires impliquant des lymphocytes B et T, les cellules phagocytaires et d'autres cellules accessoires, que par des substances de sécrétion telles que les anticorps et les facteurs du complément.

Le système immunitaire est organisé avec un ensemble de tissus et d'organes lymphoïdes primaires et secondaires (figure 1.1). Les organes lymphoïdes primaires dits aussi centraux, tels que la moelle osseuse et le thymus, sont le siège de la production et de la différenciation des cellules immunitaires. Les organes lymphoïdes secondaires ou périphériques sont la rate, les ganglions lymphatiques, les amygdales et les tissus lymphoïdes associés au tube digestif et aux voies respiratoires.

La moelle osseuse est le site où a lieu l'hématopoïèse, phénomène par lequel se fait la ségrégation entre la lignée lymphoïde (lymphocytes B et T) et la lignée myéloïde (granulocytes, monocytes et macrophages). La figure 1.2 résume l'hématopoïèse.

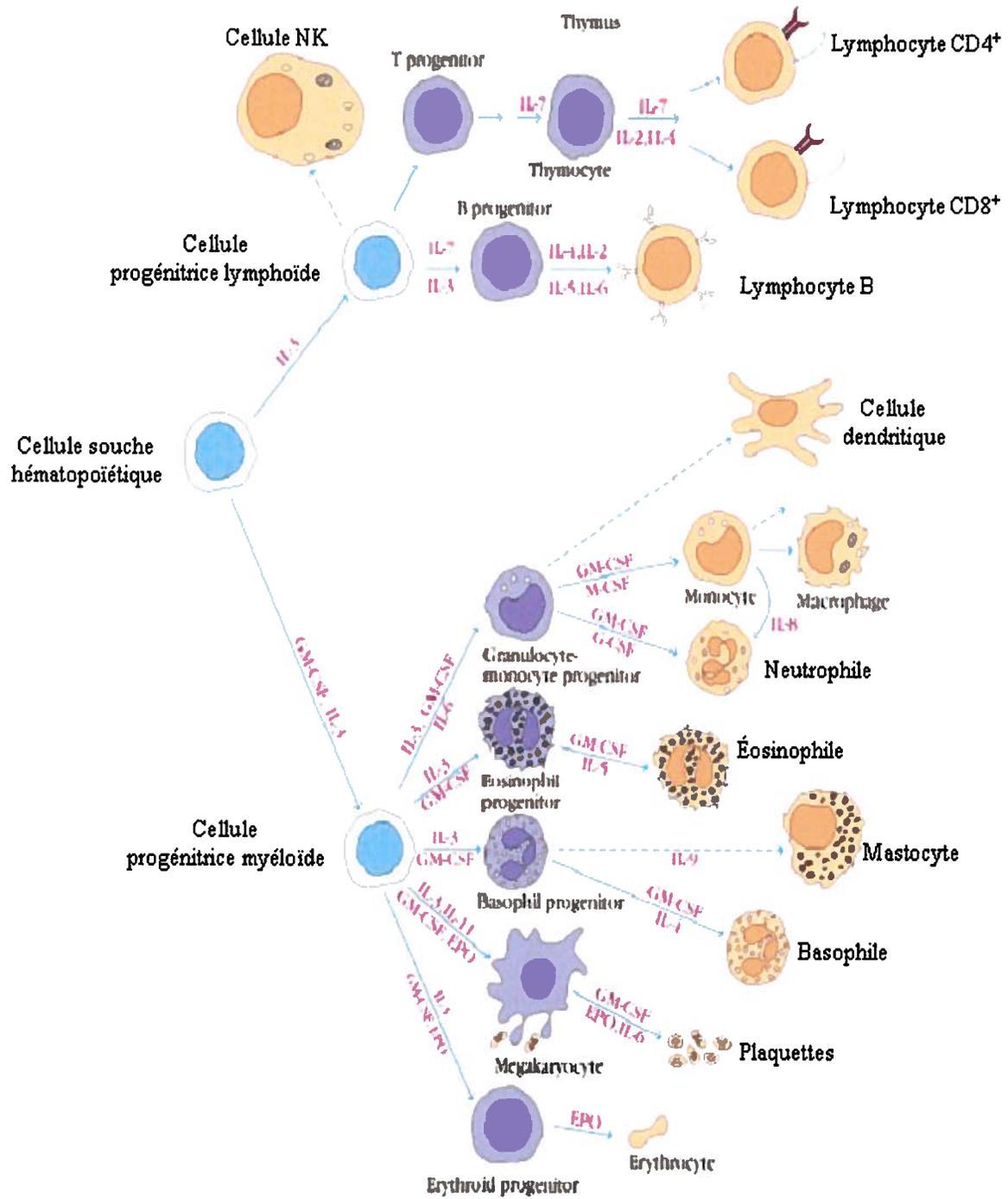
Les réponses immunitaires sont caractérisées par leur spécificité pour les antigènes qui les ont induites. Les lymphocytes qui ont à leur surface des récepteurs pour l'antigène sont garants de cette spécificité.

On distingue deux familles principales de cellules lymphoïdes :



**Figure 1.1 : Le système immunitaire.**

Ce système comprend les organes centraux ou primaires (thymus et moelle osseuse) et les organes périphériques ou secondaires (ganglions lymphatiques, rate et organes lymphoïdes associés aux muqueuses) mais aussi les appareils circulatoires (sanguin et lymphatique).



**Figure 1.2 : hématopoïèse des cellules de l'immunité provenant d'une cellule souche de la moelle osseuse.**

Source : Goldsby *et al*, 1997.

Les lymphocytes issus des cellules souches originaires de la moelle osseuse mais dont la maturation dépend du thymus s'appellent lymphocytes « T » et les lymphocytes qui se différencient en dehors du thymus, dans la bourse de *Fabricsius* chez les oiseaux et dans la moelle osseuse chez les mammifères sont dénommés lymphocytes « B ».

Les lymphocytes T assurent l'immunité à médiation cellulaire et jouent un rôle essentiel dans la régulation des réponses immunitaires tandis que les lymphocytes B sont spécialisés dans la production d'anticorps. Les lymphocytes T vont se différencier en trois sortes : les lymphocytes T auxiliaires, les lymphocytes T cytotoxiques et les lymphocytes T suppresseurs. Les lymphocytes B vont poursuivre leur maturation au niveau de la rate.

Les cellules B et T vont acquérir leur maturation fonctionnelle dans des organes lymphoïdes secondaires qui sont les sièges des réactions immunitaires. L'immunogénèse des cellules immunitaires, soit l'acquisition de leur immunocompétence, s'effectue dans ces organes.

### **1.3 Réactions immunitaires**

La lignée myéloïde, les macrophages et les cellules dendritiques interviennent dans la fonction immunitaire de rejet actif des antigènes étrangers. Ces cellules phagocytaires appelées CPA (cellules présentatrices d'antigènes), ingèrent les antigènes pour les présenter aux lymphocytes dans une disposition adéquate afin de générer une réponse immunitaire. Les macrophages et les cellules dendritiques n'ont pas la capacité de reconnaître spécifiquement des antigènes. D'autres types cellulaires comme les neutrophiles, les mastocytes et les cellules tueuses naturelles (NK) sont impliquées dans certaines fonctions du système immunitaire, notamment l'immunité humorale.

Les réactions immunitaires se répartissent en deux types d'immunité : l'immunité naturelle, dites aussi non spécifique et l'immunité acquise dite spécifique (Brousseau *et al*, 1997).

### **1.3.1 Immunité naturelle et non spécifique**

Cette réponse immunitaire dite innée est automatiquement mise en place au premier contact avec un germe et procure à l'organisme une protection rapide et non spécifique.

Plusieurs barrières naturelles (physiques, mécaniques et chimiques) empêchent, dans la majorité des cas, la pénétration des agents exogènes dans l'organisme.

Pour lutter efficacement contre l'infection, une deuxième ligne de défense s'organise par l'intervention des cellules immunitaires telles que les phagocytes et les cellules tueuses (NK) et une composante sécrétée représentée par les interférons et certaines composantes du complément du complexe antigène-anticorps (Clark, 1981).

#### **1.3.1. a Phagocytes**

Les cellules effectrices du système phagocytaire sont les polymorphonucléaires (neutrophiles et éosinophiles) et les macrophages qui sont les cellules les plus actives de ce système. La phagocytose est une fonction cellulaire essentielle nécessitant un remodelage de la membrane et du cytosquelette (Chimini et Chavrier, 2000). C'est un processus fondamental de l'immunité innée participant à la défense de l'organisme contre les invasions par les micro-organismes et contribuant aux réponses immunitaires et inflammatoires. La phagocytose est initiée par l'interaction d'une particule avec des récepteurs spécifiques situés à la surface de cellules phagocytaires « professionnelles » (macrophages et neutrophiles).

Il y a tout d'abord l'adhésion du germe à la surface du macrophage par l'intermédiaire des protéines ou des polysaccharides de la surface membranaire de ce dernier.

À la suite de cette adhésion, un stimulus cellulaire entraîne la contraction des microtubules du cytosquelette ; ceci provoque l'allongement des pseudopodes qui créent

une poche englobant le corps étranger. Il y a ensuite une « internalisation » qui s'effectue lorsque les deux bouts de la membrane fusionnent ; une vacuole dite « phagosome » se forme alors à l'intérieur de laquelle le germe est isolé du cytoplasme. Le phagosome s'entoure de vacuoles appelées lysosomes qui vont fusionner pour entraîner la libération de leur contenu d'enzymes d'hydrolyse. Le tout forme un phagolysozyme dont le stock enzymatique va détruire le germe phagocyté. Finalement, les anticorps interviennent dans l' « opsonnisation » des antigènes, ce qui favorise ainsi la phagocytose par les macrophages.

### **1.3.1 .b Cellules naturelles tueuses**

Les cellules NK jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée : ces cellules sont dotées d'une haute activité cytotoxique. Elles reconnaissent et tuent des cellules anormales et celles infectées par des virus et des pathogènes intracellulaires. Elles ciblent spécifiquement les cellules déficientes dans la présentation des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH-I) avec antigènes à leur surface. Une fois en contact avec ces cellules cibles, les cellules NK libèrent des substances à activité cytolytique (« Natural killers cytoxic factors ») qui, en se fixant sur les membranes des cellules cibles, créent un déséquilibre de leur osmolarité et entraînent ainsi leur lyse.

Au même moment, des facteurs de sécrétion, soit des interférons, entrent en action pour inhiber la réplication intracellulaire des virus et empêcher ainsi leur dissémination aux cellules adjacentes. Ils entraînent également la stimulation des cellules NK en augmentant leur activité cytotoxique.

Quant au système du complément, son implication dans la réponse immunitaire non spécifique est déclenchée par une voie alterne (Brown *et al*, 1989).

Les mécanismes de défense non spécifiques aboutissent généralement à la destruction des agents infectieux mais ils peuvent être débordés par l'infection qui persiste et se propage.

Une autre ligne de défense rentre aussi en jeu, c'est la réponse immunitaire spécifique dont les particularités sont sa spécificité et sa mémoire : il s'agit de l'immunité acquise.

### **1.3.2 Immunité acquise**

La réponse immunitaire acquise se manifeste quelque temps après la détection d'un corps étranger. En effet, lors d'un contact avec un même antigène, le système immunitaire va le détruire d'une façon beaucoup plus rapide via des cellules mémoires capables de reconnaître cet antigène ultérieurement.

La pénétration dans un organisme d'une substance, molécule ou cellule dénommée «antigène » instaure dans cet organisme une situation nouvelle : l'organisme est immunisé. Cette situation s'établit parce qu'une réaction qu'on appelle «réponse immunitaire» se développe. Elle consiste en une prolifération de lymphocytes sensibilisés à l'antigène : c'est la réponse primaire, au cours de laquelle se multiplient des lymphocytes à vie longue, définis lymphocytes «mémoires».

Lors d'une deuxième pénétration de l'antigène, la réaction immunitaire est plus rapide dans ses effets et plus efficace car elle est accélérée et amplifiée par les lymphocytes « mémoires » (lymphocytes « auxiliaires » ou « helpers ») qui se sont multipliés lors de la réponse primaire. Cette réaction est la réponse secondaire. La réaction immunitaire se déroule en deux étapes : une étape préliminaire et celle de la réaction immunitaire proprement dite.

Durant l'étape préliminaire, l'antigène est pris par des cellules qui le captent, le modifient et le présentent aux lymphocytes ayant des CMH II. Les lymphocytes T, qui possèdent le récepteur TCR pour l'antigène (TCR = T cell receptor) entrent en contact avec ce dernier par l'intermédiaire de ce TCR, sont activés par ce contact et subissent une

transformation lymphoblastique. Les lymphocytes B, quant à eux, peuvent reconnaître l'antigène sous sa forme native.

Lors de la réaction immunitaire proprement dite, la liaison antigène site récepteur provoque des modifications chez le lymphocyte qui acquiert une morphologie de « cellule souche » : c'est la « transformation lymphoblastique ». Elle est suivie d'une multiplication par mitose (ou prolifération clonale) ; les cellules filles (cellules activées) ont les mêmes sites récepteurs que la cellule mère du clone et on distingue parmi elles des « cellules effectrices » et des « cellules mémoire ».

L'immunité acquise se divise en deux grandes composantes. La première composante est une réponse à médiation cellulaire (transférable par les cellules) et met en jeu les lymphocytes T, laquelle réponse est dirigée contre les parasites intracellulaires. La deuxième composante est une réponse à médiation humorale (transférable par le sérum d'individus immunisés) où les lymphocytes B jouent le principal rôle ; cette réponse vise surtout les antigènes circulants. Il faut souligner ici que les acteurs cellulaires de ces deux composantes de l'immunité spécifique interagissent soit de manière directe, soit par l'intermédiaire de substances de sécrétion (Li *et al.*, 2007 ; Evans *et al.*, 2007).

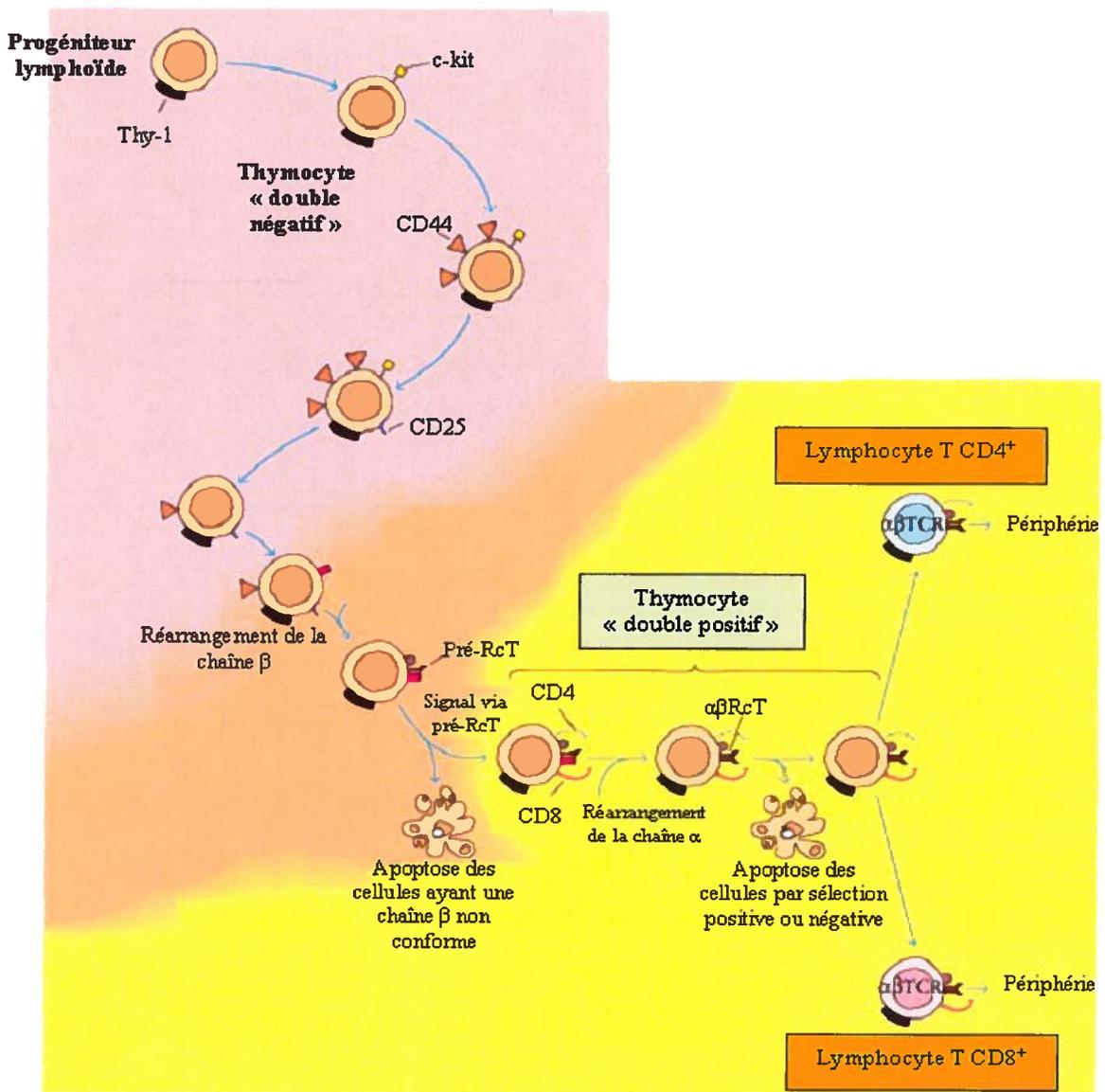
Les interactions cellulaires sont habituellement décrites sous le terme de coopération cellulaire.

### **1.3.2 .a Réaction à médiation cellulaire**

La réaction à médiation cellulaire met en jeu des lymphocytes T (thymodépendants). Les lymphocytes qui acquièrent la spécialisation T dans le thymus (figure 1.3) gagnent, par voie sanguine, les aires thymodépendantes des organes lymphoïdes périphériques ; certains ont une durée de vie courte mais la majorité ont une durée de vie longue et font partie du « pool » des lymphocytes circulants.

La stimulation antigénique provoque la transformation lymphoblastique des lymphocytes porteurs de sites récepteurs et leur multiplication en cellules effectrices ou cellules mémoire.

Les cellules effectrices T apparaissent dans la zone para corticale des ganglions mais aussi parmi les lymphocytes circulants. Elles sont directement actives (lymphocytes T cytotoxiques) ; elles élaborent et sécrètent, quand elles sont stimulées par l'antigène, des substances appelées « lymphokines », responsables de l'expression de la réaction immunitaire à médiation cellulaire.



**Figure 1.3 : développement des lymphocytes T au niveau thymique.**

Source : Goldsby *et al*, 2000.

Les cellules mémoire T sont les lymphocytes T auxiliaires ou « helpers ». Elles sont spécifiques de l'antigène, ont une durée de vie longue et se multiplient lors de chaque stimulation antigénique. Leur nombre croît donc régulièrement, ce qui augmente les chances de rencontre avec l'antigène ; les interleukines qu'elles sécrètent, en particulier l'IL 2 (interleukine 2), permettent d'amplifier la croissance et la différenciation des lymphocytes B. Ceci explique que la réaction dite « secondaire » soit plus rapide et plus efficace que la réaction primaire qui se développe à la suite du premier contact avec l'antigène.

### 1.3.2 .b Réaction à médiation humorale

La réaction à médiation humorale met en jeu des lymphocytes B.

Ces lymphocytes acquièrent la spécialisation B dans la moelle osseuse et vont ensuite peupler les aires burso ou médullo-dépendantes des organes lymphoïdes périphériques : ce sont des lymphocytes à vie courte peu ou pas circulants.

La stimulation antigénique provoque la transformation lymphoblastique de lymphocytes qui possèdent le site récepteur de l'antigène ayant généré la réaction immunitaire (immunoglobuline membranaire de la classe des IgM) et leur multiplication en « cellules effectrices B » avec différenciation en plasmocytes qui sécrètent les anticorps ou immunoglobulines spécifiques de l'antigène (IgM, IgG, IgA, IgE et IgD).

### 1.3.3 Interactions cellulaires

Les rôles assumés par différentes cellules dans la réaction immunitaire sont la phase de préparation par les macrophages, la réponse à médiation cellulaire par les lymphocytes T et la réponse avec sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B. Cette spécialisation n'est pas absolue : il y a des interactions cellulaires dans la réponse immunitaire.

La synthèse d'anticorps contre les antigènes dits « thymo-dépendants » nécessite la coopération de cellules présentatrices d'antigènes (CPA), de lymphocytes T et de lymphocytes B. L'activation des lymphocytes T par les CPA nécessite, dans un premier temps, la captation de l'antigène par un monocyte macrophage et sa présentation en association avec les molécules du CMH II aux lymphocytes T « helpers » spécifiques ; l'épitope est reconnu par l'intermédiaire du récepteur T (TCR = T cell receptor) associé aux molécules CMH II qui sont reconnues par l'intermédiaire du CD4. Ensuite, l'activation du lymphocyte T se fait grâce à des médiateurs solubles. Les macrophages activés synthétisent l'interleukine 1 (IL 1). Ce médiateur induit la synthèse par les

lymphocytes T d'autres médiateurs, en particulier l'interleukine 2 (IL 2), facteur de prolifération des lymphocytes T ainsi que l'expression membranaire de récepteurs pour l'IL 2 par ces mêmes lymphocytes T.

Ces derniers vont activer secondairement d'autres lymphocytes qui, après la prolifération et la différenciation sous l'effet de médiateurs solubles, deviendront des cellules effectrices de l'immunité. Les lymphocytes B donneront des plasmocytes sécréteurs d'anticorps (immunité à médiation humorale) et les lymphocytes T deviendront des lymphocytes T cytotoxiques ou des lymphocytes « HSR », c'est-à-dire sécréteurs de lymphokines responsables d'une hypersensibilité retardée (immunité à médiation cellulaire).

Sous l'action des lymphocytes T « helpers », les lymphocytes B se multiplient, se transforment en cellules productrices d'anticorps immunoglobuline M (IgM) puis commutent en cellules porteuses d'IgG, A ou E membranaires avant de se différencier en plasmocytes sécréteurs de ces mêmes classes d'anticorps. Certains deviennent des lymphocytes B « mémoire » à vie longue. La coopération entre lymphocytes T « helpers » et lymphocytes B fait intervenir des phénomènes spécifiques et non spécifiques de l'antigène.

Une coopération se fait selon le même modèle que celui décrit pour la réponse humorale : le lymphocyte T « helper », après présentation de l'antigène par une CPA, agit sur un autre lymphocyte T et induit sa transformation en lymphocyte T effecteur capable de répondre à une nouvelle introduction de l'antigène. Ce lymphocyte effecteur peut être un lymphocyte cytotoxique ou un lymphocyte T sécréteur de lymphokines.

Les lymphocytes T cytotoxiques se différencient facilement des lymphocytes T « helpers » par leurs marqueurs. Les lymphocytes T « helpers » ont un marqueur membranaire CD4 tandis que les lymphocytes T cytotoxiques ont un marqueur CD8. Le lymphocyte T « helper » activé par l'antigène présenté par la CPA active à son tour, par le biais de médiateurs solubles (IL 2), le lymphocyte T précytotoxique auquel l'antigène

est présenté en association avec les molécules du CMH I (antigène reconnu par le TCR ; le CMH I est reconnu par le CD8). Le lymphocyte T précytotoxique activé se différencie en lymphocyte T cytotoxique capable de tuer toute cellule porteuse de l'antigène (reconnu par le TCR) et de molécules CMH I (reconnues par le CD8). Ces mécanismes sont surtout mis en jeu dans les réponses immunitaires anti-virales et anti-cancéreuses.

Par ailleurs, le développement de la réaction immunitaire s'accompagne de la prolifération de lymphocytes T suppresseurs, possédant un marqueur membranaire CD8. Ces lymphocytes agissent en inhibant l'activation des lymphocytes T « helpers » et des lymphocytes effecteurs. Ils contribuent à la décroissance progressive de la réaction immunitaire.

En conclusion, le système immunitaire fait intervenir, dans ses mécanismes de fonctionnement, un bon nombre de cellules immunocompétentes, capables de reconnaître et de détruire tous les corps étrangers qui pénètrent dans l'organisme en procédant par coopération cellulaire directe ou par l'intermédiaire des facteurs de sécrétion. Entre autres, des systèmes physiologiques et des molécules biologiques interagissent avec les composantes du système immunitaire pour induire la réponse immunitaire la mieux adaptée afin d'éliminer le corps étranger. Un déséquilibre dans le fonctionnement du système immunitaire peut entraîner des dysfonctionnements assez complexes dans l'organisme.

## 2. Immunotoxicologie et substances immunotoxiques

Le système immunitaire est la cible d'une multitude de constituants de l'environnement qui sont des substances étrangères à l'organisme désignées sous le terme générique de xénobiotiques capables d'agir sur les composantes du système immunitaire et d'interférer avec leurs fonctions de protection de l'organisme (Krzystyniak *et al*, 1995).

L'immunotoxicité peut donc être définie comme l'ensemble des effets délétères provoqués par un xénobiotique ou tout autre constituant biologique ou physique de l'environnement sur le système immunitaire à la suite d'une exposition professionnelle, environnementale ou thérapeutique. Il existe divers types d'effets immunotoxiques, à savoir l'immunosuppression pouvant favoriser des infections et des tumeurs, l'immunostimulation, l'auto-immunité et l'hypersensibilité (Descote, 2000). L'immunotoxicologie étudie tous ces effets et les altérations immunologiques survenant chez l'humain et les animaux.

On examine notamment des anomalies au niveau du poids et de l'histologie des organes lymphoïdes ainsi que des changements quantitatifs et qualitatifs au niveau du patrimoine cellulaire du système immunitaire, particulièrement des modifications dans la proportion des différentes sous populations leucocytaires et des dysfonctionnements cellulaires (Dean *et al*, 1994). Ces manifestations toxicologiques surviennent au niveau du système immunitaire à la suite de l'exposition à un ou plusieurs xénobiotiques.

L'immunosuppression ou la chute de la surveillance immunitaire augmente la sensibilité de l'organisme aux agents infectieux et aux tumeurs. Par exemple, l'épidémie due à un virus proche de celui de la maladie de Carré, qui a décimé plus de 2/3 des phoques de la mer du Nord à la fin des années 1980, s'explique probablement par le fort degré de pollution chimique des eaux marines. Il est relativement facile de déceler une immunosuppression aiguë par l'histologie des organes lymphoïdes et des tests « *in vitro* » de fonctionnement des cellules immunocompétentes. Par contre, l'immunosuppression à long terme comme celle induite par certains médicaments immunosuppresseurs

administrés sur de longues périodes de temps (cyclosporine A), pourrait expliquer une incidence augmentée de certains types de cancers (Kouassi *et al*, 2003). Plusieurs produits chimiques de l'environnement tels que des composés organochlorés (BPC, TCDD, dieldrine, mirex) et organostanniques (TBT et ses composés) et certains métaux lourds (mercure, cadmium et plomb) possèdent des propriétés immunosuppressives. Celles-ci entraînent une atrophie du thymus, une inhibition des composantes du système du complément antigène-anticorps, une diminution de la concentration sérique d'IgA et d'IgM ainsi qu'une diminution des lymphocytes T. Dans le cas des métaux lourds, on a souvent observé une induction de l'apoptose ou de nécrose des cellules immunitaires par un mécanisme de cytotoxicité cellulaire (Kouassi *et al*, 2003).

L'immunostimulation augmente la réponse immunitaire qui, en fin de compte, peut s'avérer néfaste à l'organisme car elle peut engendrer une destruction des propres constituants du corps (auto-antigènes) qui ne sont plus reconnus comme des éléments du « soi ».

Des xénobiotiques et des médicaments sont susceptibles d'induire des réactions d'hypersensibilité (allergies) où une substance chimique ou ses produits de biotransformation jouent le rôle d'haptène. Les réactions allergiques résultent d'une seconde exposition au même antigène ou à des expositions ultérieures. On distingue plusieurs types d'hypersensibilité sur la base de leur mécanisme immunologique effecteur dépendant des anticorps ou des cellules T. Les réactions d'hypersensibilité les plus importantes sont les suivantes :

- les réactions d'hypersensibilité immédiate impliquant la production d'anticorps de classe IgE qui se fixent sur les mastocytes et entraînent le re-largage de molécules préformées telles que l'histamine ; cette réaction d'intolérance chimique provoque divers signes cliniques tels que l'asthme, les rhinites et l'anaphylaxie ; quelques métaux (béryllium et nickel), dérivés plastiques et certains antibiotiques et anesthésiques provoquent des réactions d'hypersensibilité immédiate ;

- les réactions d'hypersensibilité retardée, les plus courantes, sont aussi induites par des métaux (béryllium, nickel, chrome, cobalt et mercure) ; elles se manifestent cliniquement par des dermatoses de contact (impliquant essentiellement les cellules T cytotoxiques avec CD8+ spécifiques des peptides hapténisées associées aux molécules du CMH I) et des réactions granulomateuses.

Selon des études d'écotoxicité, la plupart des xénobiotiques présents dans les eaux des Grands Lacs et du fleuve Saint-Laurent se retrouvent dans leurs poissons. Ces xénobiotiques sont notamment des métaux lourds (mercure, cuivre, manganèse, cobalt, cadmium, chrome et certains composés organostanniques), des agents alkylants et des composés organohalogénés (dioxines et furanes, DDT, dieldrine, etc.) (Krzytyniak *et al*, 1995).

Des produits chimiques possèdent des propriétés immunosuppressives (Descote, 2000). Les craintes soulevées par les effets immunotoxiques de ces polluants chimiques ont été accrues par des rapports décrivant des effets immunologiques chez des populations fauniques se nourrissant de poissons contaminés des Grands Lacs et du fleuve Saint-Laurent. Cependant, il y a peu d'études qui traitent de l'aspect immunotoxicologique lié à la consommation de poissons contaminés chez l'humain.

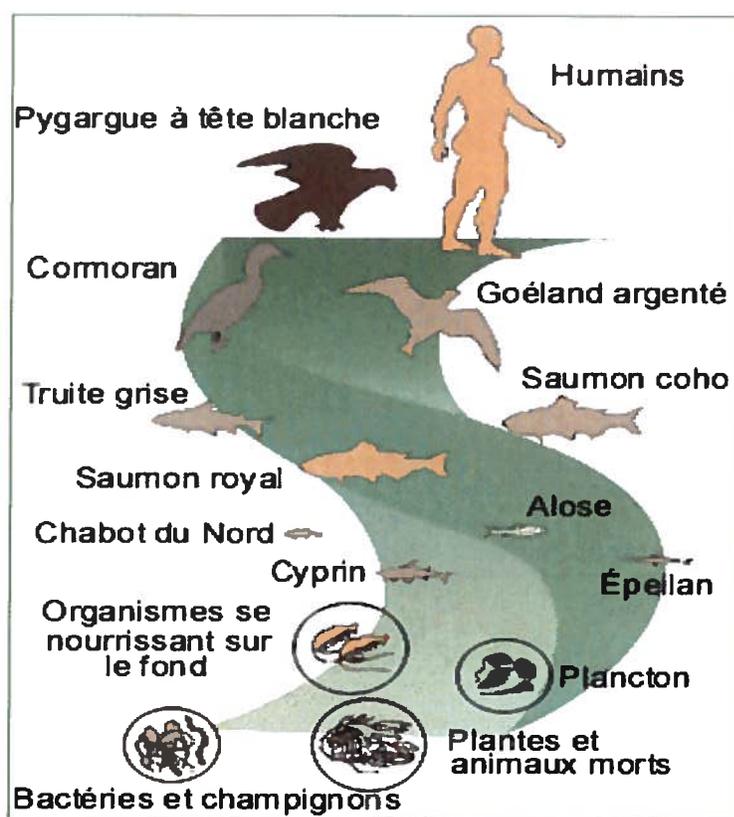
### **3. Problématique**

#### **3.1 Problématique générale**

Diverses constatations scientifiques fondées en grande partie sur des observations d'animaux consommateurs de poissons contaminés vivant dans les régions polluées des bassins des Grands Lacs et du bassin du fleuve Saint-Laurent permettent de considérer que l'exposition à de faibles concentrations de certains contaminants peut avoir des effets subtils sur la reproduction, le développement et d'autres paramètres physiologiques (Environnement Canada, 1996 a et b).

Vu que les êtres humains sont des consommateurs situés au sommet de plusieurs chaînes alimentaires (figure 1.4), des recherches s'avèrent nécessaires afin d'évaluer les effets à long terme d'une exposition à de faibles concentrations de polluants et les incidences chez les grands consommateurs de poissons et de gibiers contaminés.

Les recherches des dernières années ont permis d'identifier des contaminants dans les poissons des lacs et rivières du Québec (Blaney *et al*, 1997). Plusieurs de ces toxiques se sont accumulés dans des poissons pris lors de pêches sportives, lesquelles sont pratiquées par plus de 25 % de la population au Québec. En outre, le poisson est de plus en plus recommandé dans l'alimentation à cause de ses qualités nutritives et des bénéfices de sa consommation pour la santé (Kosatsky *et al*, 1998).



**Figure 1.4 : substances toxiques dans la chaîne alimentaire aquatique**

Source : ([uqar.quebec.ca/jpellerin/semi/.../chaines\\_trophiques\\_sensibles.htm](http://uqar.quebec.ca/jpellerin/semi/.../chaines_trophiques_sensibles.htm))

### 3.1.1 Effets liés à la consommation de poissons contaminés

Plusieurs études ont rapporté des effets néfastes liés à la consommation de poissons contaminés des Grands Lacs et du bassin du fleuve Saint-Laurent. En effet, ces études faites avec des animaux de laboratoire ont permis de vérifier des effets toxiques liés à la consommation du poisson, à savoir des effets sur la reproduction, le développement et le comportement qui ont été démontrés en laboratoire chez des rongeurs nourris sur plusieurs générations avec du poisson contaminé des Grands Lacs (Arnold *et al*, 1998 a,b ; Feeley *et al*, 1998 a, b et Stewart *et al*, 2000 a, b).

### 3.1.2 Effets immunotoxiques chez l'humain

Les résultats d'une étude menée dans des populations lettones ont montré des corrélations significativement positives entre la consommation de poissons contaminés au BPC et la diminution de la proportion des cellules T suppressives (Svensson *et al*, 1994 et Hagmar *et al*, 1995). Une étude suédoise a établi une corrélation significative ( $p = 0,04$ ) entre une diminution des cellules NK et une augmentation des concentrations sanguines de BPC (Svensson *et al*, 1994). On a aussi observé une association entre une exposition prénatale aux BPC et une hausse du nombre de lymphocytes T (Weisglas-Kuperus *et al*, 1995). Un suivi d'enfants âgés de 42 mois a mis en évidence une relation entre une exposition prénatale aux BPC et aux dioxines chlorées et une prévalence d'otites et de varicelles (Weisglas-Kuperus *et al*, 2000). Dewailly *et al* (2000) ont montré qu'une susceptibilité aux otites moyennes est associée à une exposition aux composés organochlorés chez les enfants Inuits du Grand Nord québécois. Une autre étude menée auprès de la même population a permis d'établir des corrélations positives entre les concentrations plasmiqes de BPC et l'inhibition de sécrétion des cytokines inflammatoires IL 10 et TNF $\alpha$  *ex vivo* ; la source de l'exposition chez les mères de ces enfants provient de la bioaccumulation des organochlorés dans la chaîne alimentaire aquatique (Belles Isles, 2002).

Hormis ces études épidémiologiques, il y a peu d'études d'immunotoxicité liées à la consommation de poissons contaminés et menées dans des conditions de laboratoire (Tryphonas *et al.*, 1998 a,b).

Durant ces dernières décennies, le TBT, un composé organostannique qui fait partie des plus polluants de l'écosystème aquatique, a suscité des craintes à cause de son effet perturbateur endocrinien chez certains mollusques vivant dans ce milieu (Horiguchi, 2006 ; Santos *et al.*, 2006) . Il a aussi des effets immunotoxiques chez les rongeurs (Smialowicz *et al.*, 1989 et Tryphonas *et al.*, 2004).

### **3.2 Problématique spécifique**

Le tributylétain (TBT) est un composé toxique qu'on trouvait autrefois dans la plupart des peintures antisalissures (qui servent à prévenir l'incrustation des balanes et d'autres organismes marins sur la coque des navires, les parcs à poissons et d'autres surfaces exposées aux eaux marines). Il a été commercialisé dans les années 1960 pour remplacer les renforçateurs organo mercuriques, arsenicaux et plombiques dans les peintures. Il devint évident, à la fin des années 1970, que non seulement le TBT subissait une lixiviation à partir de surfaces peintes mais qu'il avait des effets néfastes sur des formes de vie marine autres que celles visées (Thompson *et al.*, 1985).

Pendant les années 1980, des concentrations dangereuses de TBT ont été détectées dans de nombreux estuaires et secteurs côtiers dans le monde. Dans certains cas, elles atteignaient des milliers de nanogrammes par litre dans l'eau (Bailey et Davis, 1988 ; Austen *et al.*, 1997 ; Harino *et al.*, 1998 ; Viglino *et al.*, 2006 ). Actuellement, il n'existe pas de lignes directrices canadiennes fixant des limites acceptables aux concentrations des composés organostanniques chez les poissons, les coquillages et les crustacés destinés à la consommation humaine ([www.hc-sc.gc.ca/.../pdf/pubs/contaminants/ps11-lsp1/non\\_pest\\_org\\_comp/organotin-organostanniques\\_f.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/.../pdf/pubs/contaminants/ps11-lsp1/non_pest_org_comp/organotin-organostanniques_f.pdf)).

Les organismes les plus sensibles à la contamination par le TBT sont les gastéropodes (groupe de mollusques comprenant les escargots, les limaces de mer, les pourpres les patelles, les buccins et les conques) qui subissent des transformations morphologiques quand ils sont exposés à des concentrations de TBT de 1-2 ng/l dans l'eau ou quand les concentrations de TBT dans les tissus animaux atteignent 20 µg/kg en poids sec ([www.hc-sc.gc.ca/.../pdf/pubs/contaminants/ps11-lspl/non\\_pest\\_org\\_comp/organotin-organostanniques\\_f.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/.../pdf/pubs/contaminants/ps11-lspl/non_pest_org_comp/organotin-organostanniques_f.pdf)).

L'organisme le plus sensible à cette substance est le pourpre femelle de l'Atlantique *Nucella lapillus*, lequel est un petit escargot marin. Les femelles pourpres de l'Atlantique exposées à des concentrations de TBT aussi faibles de 0,5 ng/l commencent à développer un pénis qui finit par bloquer l'oviducte, ce qui empêche la reproduction de l'espèce et entraîne des baisses de population et leur extinction locale. Ce phénomène s'appelle « imposexe » qui consiste en l'imposition de caractéristiques sexuelles mâles sur les femelles d'une même espèce ; c'est un des exemples les plus spectaculaires de perturbation endocrinienne (Birchenough *et al*, 2002 ; Jorundsdottir *et al*, 2005 ; Santos, 2006).

Le TBT est dangereux du fait de son potentiel de bioaccumulation dans les tissus animaux et de la lenteur de la plupart des organismes pour le métaboliser. On constate ses effets sur des populations de plusieurs organismes à des concentrations aussi faibles que 40 ng par gramme de poids sec d'organisme (Bellas *et al*, 2005, 2006). Les organoétains libérés dans le milieu aquatique sont mesurés dans les fruits de mer et poissons vendus pour la consommation humaine (Lee *et al*, 2005). Il peut également s'accumuler dans les sédiments. Là où il y a contamination par le TBT, celui-ci a généralement une faible concentration dans les échantillons d'eau mais, à cause de la bioaccumulation, les tissus animaux et le benthos des sédiments en renferment beaucoup plus. Le potentiel de bioamplification du TBT est encore mal connu

La molécule de TBT peut non seulement diffuser à la surface de la couche de peinture mais elle peut aussi s'en échapper et se perdre dans la masse d'eau qui entoure la coque

du bateau fraîchement repeint. Elle a alors tendance à s'adsorber à une particule d'argile, un débris ou encore à la surface d'une algue microscopique. Elle entre ainsi dans l'écosystème aquatique et peut exercer ses effets toxiques sur différentes espèces. La molécule de TBT peut aussi perdre l'une de ces chaînes « butyles » pour devenir le dibutylétain (DBT), une substance aussi toxique que le TBT lui-même.

Dès le début des années 1980, ce problème environnemental a été soulevé en France et en Angleterre particulièrement dans les marinas et les zones côtières ayant une forte activité de plaisance. Une réglementation interdisant les peintures au TBT sur les bateaux de moins de 25 mètres a été rapidement mise en place en Europe et ensuite en Amérique du Nord, incluant le Canada en 1989 qui a utilisé à cette fin la Loi sur les produits antiparasitaires. Malheureusement, 10 ans après l'interdiction des peintures au TBT au Canada, on constate que le problème n'a été que partiellement réglé et que la présence subtile du TBT en milieu côtier continue de soulever une inquiétude. De fait, les peintures au TBT ont été interdites sur les petits bateaux seulement mais elles continuent toujours d'être utilisées en toute légalité par 60 % de la flotte commerciale du monde. Subséquemment, les zones côtières ayant un fort trafic maritime et des zones portuaires importantes restent contaminées par le TBT et ses dérivés à des niveaux qui varient considérablement selon l'achalandage, les courants marins et la température de l'eau.

Des travaux de recherche montrent que cette situation perdure dans l'estuaire du Saint-Laurent et le fjord du Saguenay (Saint-Louis *et al*, 1977 ; 1997 et Saint-Jean *et al*, 1999). On retrouve du TBT et du DBT en faible quantité partout le long de la rive sud de l'estuaire ainsi que dans les principaux ports de la côte du Nouveau-Brunswick et de la Nouvelle-Écosse. Le TBT a été également décelé dans le foie de bélugas échoués dans l'estuaire du Saint-Laurent (Saint-Louis *et al*, 1999). Sachant que le TBT et le DBT sont des substances immunotoxiques, c'est-à-dire capables de dérégler le système de défense immunitaire de nombreux organismes (Bouchard *et al*, 1999), il est particulièrement inquiétant de constater leur présence dans les bélugas du Saint-Laurent, une espèce déjà durement atteinte par la présence des BPC et autres substances organochlorées et par des surexploitations passées (sur pêches, tirs de torpilles militaires et chasse).

La toxicité du TBT est reliée à ses caractères physico-chimiques, ses concentrations et sa dégradation en milieu aquatique.

#### 4. Propriétés physico-chimiques du tributylétain

Le TBT fait partie des composés organostanniques qui sont des dérivés organiques de l'étain tétravalent. Ils se caractérisent par la présence de liaisons covalentes entre des atomes de carbone et un atome d'étain. La formulation générale du TBT est la suivante (INERIS, 2005) :



**Tableau 1.1 : formulation générale du TBT**

Substance chimique	N° CAS	N° EINECS	Synonymes	Forme physique*
Oxyde de bis (tributylétain) (C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>3</sub> Sn-O-Sn(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>3</sub>	56-35-9	200-268-0	Oxyde de Tributylétain OTBT	Liquide
Chlorure de tributylétain (C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>3</sub> Sn Cl			CTBT	Liquide

\* dans les conditions ambiantes habituelles

Source : INERIS, 2005.

Dans l'eau de mer et dans les conditions normales, on rencontre trois dérivés du tributylétain : l'hydroxyde, le chlorure et le carbonate qui sont en équilibre. Le coefficient de partage octanol/eau (log de K<sub>ow</sub>) est compris entre 3,18 et 3,84 dans l'eau distillée et est 3,54 dans l'eau de mer. L'oxyde de tributylétain (OTBT), qui est la forme de TBT la plus utilisée dans la littérature, s'adsorbe fortement aux matières organiques puisque ses coefficients d'adsorption se situent entre 110 et 55 000 (INERIS, 2005)

Le TBT est généralement présent sous forme de sel à la température de la pièce. De plus, il est très peu volatil et peu soluble dans l'eau. À cause de la présence de composés hydrocarbonés dans sa structure, le TBT est hydrophobe. La plupart des organo-étains sont caractérisés par une faible mobilité dans l'environnement aquatique en raison de leur faible solubilité dans l'eau, de leur faible tension de vapeur et de leur affinité élevée envers les sédiments aquatiques (tableau 1.2).

**Tableau 1.2 : paramètres physico-chimiques du TBT**

Propriétés	Oxyde de tributylétain (OTBT)	Chlorure de tributylétain (CTBT)
Masse molaire (g/mol)	596.11	325.49
couleur	Légèrement jaune	Sans couleur
Point de fusion	< -45° C	Pas de donné
Point d'ébullition	180° C à 2 mmHg	145 à 147 ° C à 5 mmHg
Densité (g/cm <sup>3</sup> )	1,17 à 25 ° C	1.20 à 25 ° C
Solubilité dans l'eau (mg/l)	4 mg/l à un pH 7 à 20 ° C	Insoluble dans l'eau froide
Autres solvants	Miscible avec des solvants organiques	Soluble dans des solvants oxygénés, chlorés et aromatiques
Coefficient de partage Octanol/eau	Pas de donné	Pas de donné
Pression de vapeur	7.5 x 10 <sup>6</sup> mmHg à 20 ° C	Pas de donnée
Point d'inflammation	> 212 ° F (100 ° C)	>230 ° F (110 ° C)
Température d'autoignition	Pas de donné	Pas de donné

Source: Toxicological profile of tin, 2005.

La demi-vie du TBT dans l'eau de mer varie de quelques jours à quelques semaines en fonction des conditions du milieu (pH, température, turbidité, luminosité, etc.). Sa dégradation est plus rapide dans les eaux de mer chargées en matières en suspension ; sa demi-vie est de 5,8 jours en période estivale dans des eaux turbides tandis qu'elle augmente à 127 jours en hiver dans des eaux dépourvues de matériel particulaire.

La persistance du TBT s'avère très élevée dans les sédiments ; sa demi-vie y dure entre quelques années et quelques dizaines d'années. Le sédiment constitue ainsi un réservoir de TBT (INERIS, 2005).

## **5. Sources et concentrations du TBT dans l'environnement**

Les dérivés du tributylétain sont homologués comme molluscicides et comme produits antisalissures pour la préservation des coques de bateaux, des appontements, des bouées, des casiers à crabes, des filets et des cages. Ils sont également des enduits de protection du bois, des algicides dans le bâtiment, des désinfectants et des biocides dans les systèmes de réfrigération, les tours de réfrigération des centrales électriques, les usines de pâtes et papiers, les brasseries, les tanneries et les usines textiles (INERIS, 2005).

On a trouvé de fortes concentrations de TBT dans l'eau, les sédiments et les biotes à proximité de marinas, de chantiers navals et de bassins de radoub, de filets et de cages traités au moyen de peintures antisalissures. Ces concentrations de TBT dépendent de la submersion par la marée et de la turbidité de l'eau. On a observé que les concentrations de TBT pouvaient atteindre 1,58 µg/l dans l'eau de mer et les estuaires, 7,1 µg/l dans l'eau douce, 26 300 µg/kg dans les sédiments littoraux, 3 700 µg/kg dans les sédiments d'eau douce, 6,39 mg/kg dans les bivalves, 1,92 mg/kg dans les gastéropodes et 11 mg/kg dans les poissons ( Belfroid et al., 2000). Il ne faut pas considérer ces concentrations maximales comme caractéristiques car un certain nombre de facteurs peuvent donner lieu à des teneurs anormalement élevées (par exemple, la présence de particules de peinture dans des échantillons d'eau et de sédiments). On a constaté que les concentrations de

TBT dans la microcouche de surface des eaux douces et des eaux de mer étaient 100 fois plus élevées que celles qu'on pouvait mesurer juste en dessous de la surface. Toutefois, il convient de noter que la concentration en TBT dans la microcouche de surface peut dépendre partiellement de la technique d'échantillonnage et de son mode de dissémination.

## **6. Transports et transformations du TBT dans l'environnement**

L'oxyde de tributylétain (OTBT) est fortement lié aux particules du sol et il n'est guère lessivé pendant  $\geq 16$  semaines dans des sols argileux, silteux ou sableux (HSDB, 2002); de plus, l'OTBT est peu hydrolysé dans les sols et ne se volatilise pas à partir de leur surface (HSDB, 2002).

Dans l'atmosphère, l'OTBT peut exister théoriquement en phase vapeur. Cependant, il est plus fréquemment présent sous forme particulaire (HSDB, 2002).

L'éventuelle dégradation de l'oxyde de tributylétain implique une débutylation progressive de la substance. La dégradation est complète lorsqu'il ne reste plus que du dioxyde d'étain  $\text{SnO}_2$  (Blunden et Chapman, 1983 ; HEC 15, 1980).

La dégradation abiotique des composés de tributylétain dans l'eau est limitée à la photolyse directe; la demi-vie du cation de tributylétain dans l'eau distillée est supérieure à 89 jours. En l'absence de lumière, dans l'eau distillée et déionisée, conservée à l'obscurité à 20.C, et un pH compris entre 2,9 et 10,3, le cation de tributylétain reste stable plus de 63 jours (EHC 116, 1990 ; HSDB, 2002). Dans l'atmosphère, l'oxyde de tributylétain est sensible à la photooxydation et n'est pas stable : suivant les conditions, sa dégradation peut prendre entre quelques jours et quelques semaines (HSDB, 2002).

La biodégradation de l'oxyde de tributylétain survient en quelques jours à quelques mois selon les conditions du milieu (température, salinité) et selon la concentration à laquelle il est présent dans les divers compartiments de l'environnement.

Dans le compartiment sédimentaire d'eau douce, Maguire et Tkacz (1986) ont établi la demi-vie à 20 semaines dans le port de Toronto. Mais lorsque la concentration de l'oxyde de tributylétain augmente, la toxicité de l'étain sur les microorganismes semble ralentir la vitesse de biodégradation.

La biodégradation de l'OTBT est généralement plus rapide dans les sédiments que dans l'eau, probablement en raison de la différence d'abondance en micro-organismes responsables de sa biodégradation. Elle dépend également de l'état du milieu et de ses caractéristiques telles que sa température, son oxygénation, son pH, sa teneur en éléments minéraux, sa teneur en substances organiques facilement biodégradables pouvant subir une co-métabolisation ainsi que sa microflore et la capacité de celle-ci à s'adapter. Comme dans le cas de la décomposition abiotique, la dégradation biologique du TBT comporte une débutylation oxydante progressive avec rupture de la liaison carbone-étain. Il se forme des dérivés dibutylés dont la dégradation est plus facile que celle du tributylétain. Les monobutylétains sont lentement minéralisés (INERIS, 2005).

La bioaccumulation du TBT s'observe surtout en milieu aquatique. Le TBT y est associé à des particules fines en suspension et (ou) il s'y dépose au fond. Il passe ensuite dans les organismes aquatiques par la consommation d'eau ou de nourriture et s'accumule dans leur graisse à cause de sa liposolubilité. Des recherches faites en laboratoire avec des mollusques et des poissons ont explicité des facteurs de bioconcentration du TBT, des valeurs allant jusqu'à 5 000 mais des valeurs encore plus élevées ont été observées lors d'études de terrain (INERIS, 2005). L'absorption à partir de la nourriture est plus importante que la concentration à partir de l'eau. Des facteurs de bioaccumulation plus élevés observés chez des micro-organismes (entre 100 et 30 000) peuvent s'expliquer par une adsorption plutôt que par une absorption intracellulaire.

La concentration en TBT dans la chair de poisson varie selon l'espèce en fonction du régime alimentaire et de la teneur en gras de leurs tissus. En règle générale, les viscères

(exemple, le foie, les graisses et la peau) sont les principaux sites d'accumulation de ce contaminant.

Des résultats de bioaccumulation de TBT sont présentés au tableau 1.3 pour quelques organismes. Un facteur de bioconcentration de 50 000 a été utilisé autant pour les poissons, pour les mollusques filtreurs (moules) que pour les mollusques non filtreurs (patelles)

**Tableau 1.3 : bioaccumulation (BCF) du TBT chez plusieurs organismes**

<b>Organismes d'exposition</b>	<b>Organes mesurés</b>	<b>Durées + concentrations ou voies d'exposition</b>	<b>BCF</b>
<i>Carassius carassius</i>	Muscle	7 jours	589
	Vertèbres		457
	Foie		5 012
			3 162
<i>Mytilus edulis</i>	Organisme complet	Eau	5 000
	Organisme complet	Nourriture	< 2
<i>Ostrea denticulata</i>	Organisme complet	0,15 µg/l	1 000
	Organisme complet	1,25 µg/l	5 000
<i>Mytilus graynus</i>	Organisme complet		10 500
<i>Mytilus edulis</i>	Organisme complet		10 400

Source : INERIS, 2005.

## 7. Cinétique et métabolisme du TBT

Le TBT est absorbé au niveau intestinal (20 à 50 % selon le véhicule) et au niveau cutané chez les mammifères (environ 10 %). Il peut traverser la barrière hémoméningée et passer du placenta dans le fœtus. Une fois absorbé, il est rapidement et largement diffusé dans l'organisme et se retrouve principalement dans le foie et les reins. Chez les mammifères, la métabolisation du TBT est rapide ; on peut déceler ses métabolites dans le sang dans les 3 heures suivant l'administration.

Des études «*in vitro*» ont montré que le TBT est un substrat pour les oxydases à fonction mixte mais qu'il inhibe ces enzymes à très forte concentration. L'élimination du TBT n'est pas rapide ; de fait, les estimations de sa demi-vie biologique chez les mammifères varient de 23 à environ 30 jours selon la nature du tissu (INERIS, 2005).

Les organismes inférieurs métabolisent également le TBT mais le processus est plus lent, en particulier chez les mollusques, que chez les mammifères. La capacité de bioaccumulation est donc beaucoup plus importante chez les mollusques que chez les mammifères. Les tributylétains inhibent la phosphorylation oxydative et modifient la structure et la fonction des mitochondries (INRS, 1997).

## 8. Toxicités environnementales du TBT

### 8.1 Effets sur les micro-organismes

Le TBT est toxique pour les micro-organismes ; il est d'ailleurs vendu comme bactéricide et algicide. Les concentrations toxiques varient considérablement selon les espèces. Le TBT est plus toxique pour les bactéries gram-positives avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) allant de 0,2 à 0,8 mg/l que pour les bactéries gram-négatives (CMI de 3 mg/l). Il est difficile d'établir la valeur de la dose sans effet observable (« No observed effect concentration », NOEC) mais on pense qu'elle est inférieure à 0,1 µg/l pour certaines espèces. Les concentrations algicides vont de 1,5 µg/l à plus de 1 000 µg/l selon les espèces.

## 8.2 Effets du TBT sur les organismes aquatiques

Le tableau 1.4 donne un relevé d'effets létaux et sublétaux que peuvent produire des concentrations de TBT. Des concentrations supérieures à celles qui produisent des effets toxiques ont été constatés, notamment dans des marinas

**Tableau 1. 4 : toxicité du tributylétain pour des organismes marins**

Organismes	Toxicité
Bivalve (adulte) = <i>Mytilus edulis</i>	CL <sub>50</sub> 66 jours = 0,97 µg/l
Gastéropode = <i>Nucella lapilus</i>	CE <sub>minimum</sub> imposexe = 0,0005 µg/l
Copépode = <i>Acartia tonsa</i> :	CL <sub>minimum</sub> = 0,023 µg/l
Microcrustacé = <i>Palaemonetes pugio</i>	CL <sub>50</sub> 4 jours = 19,5 µg/l
Poisson (juvénile) = <i>Cyprinodon variegatus</i>	CL <sub>50</sub> 4 jours = 16,5 µg/l
Diatomée = <i>Skeletonema costatum</i>	CE <sub>50</sub> croissance = 0,30 µg/l

CL<sub>50</sub> : concentration létale pour 50 % des individus en x jours

CE<sub>50</sub> : concentration d'effet sublétal à 50 %.

Source : Environnement Canada, 1992.

Le tributylétain est très toxique pour les mollusques marins. On a montré expérimentalement qu'il perturbait la formation de la coquille, le développement des gonades, la différenciation sexuelle des huîtres adultes, leur fixation et leur croissance ; en outre, on a noté une mortalité des larves d'huîtres et d'autres bivalves et l'apparition de caractères mâles chez des gastéropodes femelles. La concentration sans effet observable serait de 20 ng/l pour l'espèce d'huître la plus sensible, soit l'huître japonaise *Crassostrea gigas* (OMS-IPCS, 1990). Chez les adultes, il se produit également une déformation de la coquille qui est liée à la concentration de TBT (OMS-ICPS, 1990).

Des effets sur la morphologie coquillière n'ont pas été observés à des concentrations de TBT de 2 ng/l et la concentration sans effet observé pour l'apparition de caractères mâles chez les mollusques femelles du genre *Thais* est inférieure à 1,5 ng/l. Les formes larvaires

sont généralement plus sensibles que les adultes ; la différence est particulièrement marquée dans le cas des huîtres (OMS-ICPS, 1990).

Les copépodes sont plus sensibles que les autres crustacés aux effets létaux aigus du TBT ; les valeurs de la  $CL_{50}$  du TBT envers des copépodes exposés pendant 96 heures sont comprises entre 0,6 et 2,2  $\mu\text{g/l}$ . Ces valeurs sont comparables à celles qui s'appliquent aux larves les plus sensibles des autres groupes de crustacés. Le TBT réduit la capacité de reproduction, la survie néonatale et la vitesse de croissance des crustacés. Dans le cas de la crevette *Acanthomysis sculpta*, un mysidé, la concentration sans effet observable (NOEC) sur la reproduction serait de 0,09  $\mu\text{g/l}$ . La toxicité du tributylétain pour les poissons de mer est très variable ; les valeurs de la  $CL_{50}$  à 96 heures varient entre 1,5 à 36  $\mu\text{g/l}$ . Les stades larvaires sont plus sensibles que les adultes. Les poissons de mer évitent l'oxyde de tributylétain à partir de 1  $\mu\text{g/l}$  (OMS-IPCS, 1990).

Un relevé d'effets létaux et sublétaux des concentrations de TBT en eau douce est exposé au tableau 1.5.

**Tableau 1.5 : toxicité du tributylétain pour des organismes d'eau douce**

Organismes	Toxicité
Cladocère	<i>Daphnia magna</i> : $CL_{50}$ 4 jours = 4,3 $\mu\text{g/l}$
Poissons (juvéniles)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> : $CL_{50}$ 4 jours = 3,12 $\mu\text{g/l}$ <i>Pimephales promelas</i> : $CE_{\text{minimum}}$ 33 jours, croissance = 0,08 $\mu\text{g/l}$
Algue	<i>Scenedesmus quadricamda</i> : $CL_{50}$ 4 jours = 16 $\mu\text{g/l}$

$CL_{50}$  : concentration létale pour 50 % des individus en x jours

CE : concentration d'effet sublétal.

Source : Environnement Canada, 1992.

On a observé la présence de concentrations supérieures à celles qui produisent des effets sublétaux, entre autres dans les marinas. Une concentration d'oxyde de tributylétain de 0,5 mg/l a été mortelle pour des angiospermes d'eau douce et leur croissance était inhibée dès 0,06 mg/l. On ne dispose que de peu de données sur les invertébrés d'eau douce.

Pour divers sels de tributylétain, on a constaté des valeurs de  $CL_{50}$ , 48 heures de 2,3 à 70  $\mu\text{g/l}$  pour la daphnie et de 5,5 à 33  $\mu\text{g/l}$  pour les vers de vase (OMS-IPCS, 1990). La concentration sans effet observé (NOEC) pour la daphnie est évaluée à 0,5  $\mu\text{g/l}$ . On utilise des concentrations allant de 30 à 400  $\mu\text{g/l}$  pour les mollusques adultes qu'on cherche à détruire dans les opérations de lutte contre la schistosomiase. La sensibilité des mollusques au TBT diminue avec l'âge mais les œufs sont plus résistants que les jeunes ou les adultes. La ponte est notablement affectée à une concentration en oxyde de tributylétain de 0,001  $\mu\text{g/l}$ . La toxicité aiguë du TBT ( $CL_{50}$ ) pour les poissons d'eau douce se situe, pour des périodes allant jusqu'à 168 heures, entre 13 et 240  $\mu\text{g/l}$ . Après l'exposition de grenouilles *Rana temporaria* à des concentrations inférieures ou égales à 3  $\mu\text{g/l}$ , on n'a observé aucun effet sur la survie des œufs ni des larves ; en revanche, à la concentration de 30  $\mu\text{g/l}$ , on a noté une mortalité sensible (OMS-IPCS, 1990).

### 8.3 Biotransformation du TBT

La majorité des études faites chez l'humain et l'animal ont utilisé l'oxyde de tributylétain et l'ensemble des informations et des données toxicologiques proviennent de diverses monographies publiées par des organismes reconnus pour la qualité scientifique de leurs documents (OMS-IPCS, 1990; ATSDR, 2005 ; HSDB, 2000 ; INRS, 1997 et USEPA-IRIS, 1997).

#### 8.3.1 Études chez l'humain

Des données relatives à l'absorption ne sont pas disponibles pour l'humain (ATSDR, 1992 et INRS, 1997). Par contre, sa distribution après ingestion orale a été étudiée chez l'humain. L'OTBT se distribue dans les reins, les poumons, le foie, le système lymphatique et surtout les os. Après biotransformation (désalkylation), environ 5 % d'une dose de l'OTBT administrée par voie orale à des volontaires sains sont éliminés par voie urinaire sous forme de dibutylétain. Les taux urinaires de dibutylétain diminuent rapidement dans les jours suivant l'administration. Par voie cutanée, l'application de 23,4 mg de l'OTBT sur le bras d'un volontaire a été suivie par une excrétion d'environ 0,2 %

de la dose dans les urines sous forme de tributylétain (20 %) (Uhl, 1986). L'OTBT est un inhibiteur de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries et perturbe ainsi la synthèse d'ATP (INRS, 1997).

### 8.3.2 Études chez les animaux

Aucune donnée de métabolisme n'est disponible pour l'inhalation de l'OTBT chez des animaux. (OMS-IPCS, 1990 et ATSDR, 2005). Chez le rat, l'absorption par voie orale de l'OTBT est de 20 à 55 % de la dose administrée en fonction du véhicule utilisé (Humpel *et al*, 1986). Chez le rat et la souris, l'OTBT est distribué essentiellement dans le foie, les reins et la rate mais aussi dans les tissus adipeux, les muscles, les poumons, le sang et le système nerveux central. Les barrières hématoencéphalique et placentaire sont traversées par l'OTBT et ses produits de biotransformation (INRS, 1997). Après une administration par voie orale de 16 mg/kg/j de l'OTBT à des rats, les concentrations d'étain les plus élevées (15 mg/kg de tissu sec) sont observées dans le foie et les reins (Krajnc *et al*, 1984). L'administration répétée (jusqu'à 30 jours) d'OTBT radiomarké à faibles doses dans l'eau de boisson à des souris entraîne son accumulation dans le foie, la rate, les reins et le tissu adipeux. Une distribution secondaire est également constatée dans le sang, les poumons, le système nerveux central et les muscles. Quinze jours après l'arrêt de l'administration, l'élimination tissulaire de l'OTBT est 97 % dans le foie, 73 % dans les reins et 30 % dans le tissu adipeux. Aucune trace de l'OTBT n'est retrouvée dans le sang. Son élimination est principalement fécale avec des traces de CO<sub>2</sub> radiomarké dans l'air exhalé (Evans *et al*, 1979). L'OTBT est désalkylé au niveau des systèmes enzymatiques microsomaux hépatiques et rénaux avec une production rapide de di-et monobutylétains.

L'élimination de l'OTBT chez l'animal est essentiellement fécale et secondairement urinaire avec une première phase lente. Une demi-vie de 20 à 30 jours est observée expérimentalement à la suite d'administrations répétées de l'OTBT. Aucune bioaccumulation tissulaire de cette substance ou de ses métabolites n'a été enregistrée (INRS, 1997).

Différentes études de toxicité aiguë et chronique ont été faites en vue d'évaluer les effets toxiques du TBT. Bien qu'il n'existe pas de données relatives à la toxicité chronique chez l'humain de l'OTBT par voie orale et par inhalation, plusieurs de ces études ont utilisé essentiellement les voies orale et nasale chez des animaux de laboratoire (Schweifurth, 1985)

Le système immunitaire étant une cible principale des effets toxiques du TBT, plusieurs études de toxicité chronique chez des animaux de laboratoire ont tenté d'évaluer cet aspect dans le but de déterminer des valeurs de référence des effets du tributylétain sur la santé (WHO, 1999).

### **9. Immunotoxicité du TBT**

Des études d'immunotoxicité du TBT menées chez des mammifères, poissons et mollusques ont montré que le système immunitaire est sensible aux effets du TBT et que ceci affecte la capacité de survie des animaux (Snoeij *et al*, 1987). L'immunotoxicité du TBT a été décrite la première fois chez des mammifères chez lesquels on a constaté une déplétion des lymphocytes et une inhibition de la chimiotaxie et de la phagocytose des leucocytes polynucléaires et des monocytes (Penninks et Siennen, 1984 et Elferink *et al*, 1986). Certains effets immunotoxiques tels que l'atrophie du thymus, la déplétion des lymphocytes dans la rate et les nodules lymphocytaires et la baisse de la résistance de l'hôte aux bactéries pathogènes ont aussi été observés à la suite de l'administration de doses supérieures à 5 mg/kg de TBT (Krajnc *et al*, 1984 ; Vos *et al*, 1984 et IPCS Inchem, 1999). Des études à court terme chez le rat ont permis d'établir que la dose sans effet observé du TBT est de 5 mg/kg de nourriture (soit 0,6 mg/kg de poids corporel).

Lors d'études faites avec le CTBT, on a remarqué des effets analogues au niveau du thymus ; ces effets disparaissaient rapidement lorsqu'on cessait d'administrer la substance (OMS-IPCS, 1990).

La majeure partie des études a utilisé l'OTBT. Ce dernier perturbe les fonctions immunitaires à médiation cellulaire. Les effets immunotoxiques de l'OTBT et d'autres dérivés du TBT chez l'humain et les animaux de laboratoire ont été revus par Boyer (1989).

### 9.1 Animaux aquatiques

L'immunotoxicité du TBT a été étudiée dans des cultures d'hémocytes d'invertébrés marins se nourrissant par filtration d'eau (Cima *et al*, 1998). Ses effets sont une inhibition de la phagocytose et une induction de l'apoptose (Cima *et al*, 2004).

Quelques effets du TBT sur le système immunitaire des poissons ont été aussi rapportés. Chez la truite arc-en-ciel, on a noté une déplétion des splénocytes en fonction de la concentration du TBT. Une injection intrapéritonale du TBT au poisson-chat *Ictalurus punctatus* entraîne une augmentation des neutrophiles dans le sang périphérique et une suppression de la réponse humorale, une réduction de l'activité des cellules cytotoxiques non spécifiques et une baisse de l'activité « oxydative burst » des phagocytes (Rice *et al*, 1995). Des plies « *Platichthys flesus* » exposées à l'OTBT (17,3 µg et 7,2 µg) en laboratoire ont présenté une réduction significative de la résistance non spécifique et une baisse du volume du thymus (Grinwis *et al*, 1998).

### 9.2 Animaux de laboratoire

Parmi les animaux de laboratoire, le rat s'avère l'animal le plus susceptible aux activités immunotoxiques du TBT (Benya, 1997). Il a été également rapporté que des rats au sevrage (âgés de 3 à 24 jours) seraient plus sensibles aux effets immunotoxiques du TBT que des rats adultes (Smialowicz *et al*, 1989).

Des études à court terme faites avec des rats au sevrage exposés à des concentrations de TBT supérieures à 3 mg/kg de poids corporel ont montré plusieurs effets immunotoxiques (Penninks *et al*, 1993). Ces derniers étaient une réduction du poids, des

changements morphologiques des tissus lymphoïdes (spécialement le thymus), une diminution du nombre de lymphocytes circulants et des niveaux des immunoglobulines sériques ainsi qu'une altération des fonctions lymphoïdes (Penninks *et al*, 1993).

L'impact par inhalation de l'OTBT sur le système immunitaire a été évalué en exposant des rats Wistar à des concentrations de 0,03 à 2,8 mg/m<sup>3</sup>, 4 heures/jour, 5 jours sur 7 pendant 4 à 5 semaines. À la plus forte concentration, les animaux morts avaient une thymolyse et des déplétions lymphocytaires spléniques et ganglionnaires (Schering, 1989).

Par voie orale, l'OTBT administré à des rats à raison de 80 et 320 mg/kg/j dans l'alimentation pendant 4 semaines entraîne des diminutions de l'hématocrite et du taux d'hémoglobine, une augmentation des immunoglobulines IgM et une diminution des IgG (Krajnc *et al*, 1984 et Vos *et al*, 1984). Les deux modifications hématologiques précitées ne sont pas rapportées dans une étude de 24 mois avec des doses réduites en OTBT (0,025 à 2,5 mg/kg/j) ; on a alors constaté seulement une légère diminution de lymphocytes périphériques et une augmentation des plaquettes chez les rats femelles après un an d'exposition (Wester *et al*, 1987; 2004).

D'autres études ont montré des altérations de l'état général des animaux avec une relation dose réponse en fonction du temps mais surtout un impact sur le système immunitaire aussi bien chez le rat que chez le chien (Funahashi *et al*, 1980 ; Krajnc *et al*, 1984 ; Wester *et al*, 1987 et Schering, 1989). En effet, pour des doses de 3, 6 et 12 mg/kg/j administrées par véhicule huileux à des rats pendant 13 et 26 semaines, on a observé une réduction des poids relatif et absolu du thymus ainsi qu'une augmentation du poids relatif des surrénales et de l'hypophyse (Funahashi *et al*, 1980).

L'OTBT peut supprimer aussi bien les fonctions immunitaires non spécifiques que celles dépendant des cellules T. Par exemple, des rates de souris exposées dans leur diète à 80 mg/kg d'OTBT durant 6 semaines ont montré une augmentation des comptages

bactériens deux jours après qu'on leur a inoculé des bactéries *L. monocytogenes* ; ces résultats suggèrent que l'OTBT affecte le système phagocytaire des monocytes (Vos *et al.*, 1984). En outre, le nombre de macrophages a baissé aussi bien dans le péritoine que dans la rate des souris traitées à l'OTBT.

Récemment, Tryphonas *et al.* (2004) ont étudié les effets immunotoxiques du CTBT par gavage oral de différentes concentrations (0,025, 0,25 et 2,5 mg/kg de poids corporel/jour) chez des nouveaux nés de rats Sprague-Dawley. Les expositions au CTBT ont débuté *in utero* au 7<sup>e</sup> jour de gestation et ont continué ensuite lors de la lactation et après le sevrage jusqu'à l'âge de 30 jours (mâles et femelles), 60 jours (femelles) et 90 jours (mâles). Après 30 jours, les résultats ont révélé une augmentation du pourcentage des cellules tueuses (NK) dans le groupe de rats femelles et mâles traités à la haute dose de CTBT. Après 60 jours, les rats femelles ont présenté une augmentation des IgM sériques à la faible et haute dose de CTBT. On a aussi constaté une augmentation du pourcentage des cellules (immatures) CD4+ et CD8+ aux doses moyenne et haute et une augmentation de l'activité des cellules NK pour des rapports effecteurs/cibles à 50 : 1 et 100 : 1. Il y a eu aussi une augmentation du nombre moyen des colonies bactériennes de *L. monocytogenes* au 2<sup>e</sup> jour de l'infection. Après 90 jours, les rats mâles ont présenté une baisse des IgA sériques à la dose moyenne, une augmentation des IgM à haute dose et une augmentation de ceux des IgG aux doses moyenne et haute. Une augmentation du pourcentage du nombre des cellules NK et de leur activité a été aussi mentionnée. On a, entre autres, observé une augmentation de la réponse d'hypersensibilité retardée à l'oxazolone à faible et moyenne dose ; par contre, elle baisse à haute dose. L'atrophie du thymus a été remarquée à haute dose de CTBT dans tous les groupes. Ces résultats suggèrent que l'exposition *in utero* et *post partum* des rats F1 aux faibles doses de CTBT a affecté non seulement quelques aspects de l'immunité humorale et celle à médiation cellulaire mais aussi le nombre et la fonction des cellules immunocompétentes qui interviennent dans la surveillance des mécanismes contre les tumeurs et les infections virales de l'hôte. Tryphonas *et al.* (2004).

Une récente étude effectuée par Kimura *et al* (2005) a approfondi les connaissances sur l'immunotoxicité du CTBT dans la génération F1 de souris *in vivo* et *in vitro*. Des souris gravides C57BL/6 ont été exposées via l'eau de boisson à différentes concentrations (0,15 ou 50 µg/l) de CTBT de la naissance au sevrage des souriceaux; ensuite, à la fin de cette période, ils ont été inoculés avec la souche d'*Escherichia coli K-12*. La suppression (« clearance ») des bactéries de la cavité péritonéale et de la rate a été mesurée. Les expériences *in vivo* ont montré une baisse significative de la suppression bactérienne chez les souriceaux allaités par des mères exposées à 15 µg/ml (F1 15 ppm) de CTBT mais pas chez ceux provenant des mères exposées à 50 µg/ml (F1 50 ppm). Les études *in vitro* ont explicité une baisse significative de l'activité tueuse des neutrophiles chez les souriceaux F1 15 ppm mais pas chez les F1 50 ppm. Ces résultats suggèrent que l'exposition au CTBT via la lactation affecte l'immunité innée contre l'infection de bactéries non pathogènes chez la génération F1.

Certaines autres études complémentaires ont été effectuées avec des doses journalières variables d'OTBT et des tests *ex vivo* des fonctions immunitaires envers les bactéries *T. spiralis* et *L. monocytogene* (Wester *et al*, 1987 et Vos *et al*, 1990).

### 9.3 Humains

Chez l'humain, l'évaluation de l'immunotoxicité du TBT a utilisé particulièrement les cellules tueuses (NK). Whalen *et al* (2002 a et b) ont montré qu'une exposition des cellules NK au dibutylétain (DBT) peut baisser l'activité des cellules NK ; en effet, une brève exposition (1 heure) a occasionné une perte des fonctions des NK. Cette baisse d'activité serait due à une perte de la fonction cytotoxique des cellules tueuses, laquelle perte est attribuable à une diminution du niveau de protéines destructrices. Thomas *et al* 2004; Catlin *et al* (2005) ont élucidé les mécanismes par lesquels l'exposition au DBT tend à baisser la fonction immunitaire des cellules tueuses humaines. Les résultats de leurs études indiquent que des baisses des niveaux des granzymes et perforines dans les cellules NK sont les conséquences de l'exposition au DTB.

Sur la base d'études d'immunotoxicité menées chez des animaux en laboratoire (Penninks *et al*, 1993), on a calculé la dose journalière admissible (DJA) du TBT qui est temporairement établie à 0,25 µg/kg de poids corporel/jour en utilisant un facteur de sécurité de 100. Cette DJA est basée sur des résultats de la réduction des poids de thymus de rats adultes exposés à une nourriture contenant l'OTBT (Penninks *et al*, 1993). Cette valeur de DJA a servi à l'établissement d'une valeur toxicologique de référence.

Cette dernière appelée dose de référence (RfD) est établie à partir de la relation entre une dose externe d'exposition à une substance dangereuse et un effet néfaste. Les valeurs toxicologiques de référence proviennent de différents organismes dont la notoriété internationale est variable. Sur la base de ces résultats, un NOEL (No observed effect level) de 3 mg/kg/j pendant 13 semaines a été retenu pour l'impact du TBT sur le système immunitaire (INERIS, 2005). Santé Canada a adopté la limite de sécurité recommandée par l'OMS (Organisation mondiale de la santé) pour l'exposition des humains au tributylétain (WHO, 1999). L'USEPA (IRIS) (1997) propose une RfD par voie orale de  $3, 10^{-4}$  mg/kg/j pour une exposition par voie orale. Cette valeur a été établie à partir d'études subchroniques et chroniques chez le rat Wistar intoxiqué via l'alimentation jusqu'à 18 mois consécutifs (Vos *et al*, 1990). Les résultats de ces études d'immunotoxicité ont permis d'établir un NOAEL (No observed adverse effect level = dose sans effet adverses observé) de 0,025 mg/kg/j sur la base d'effets immunosuppresseurs (OMS-IPCS, 1990 et ATSDR, 1992).

Un facteur de 100 est appliqué pour tenir compte de l'extrapolation des données animales à l'humain (facteur de 10) et des populations sensibles chez l'humain (facteur 10).

$$\begin{aligned} \text{Calcul : } & 0,025 \text{ mg/kg/j} * \text{x } 1/100 = 0,00025 \text{ mg/kg/j} \\ & = 0,00025 \text{ mg/kg/j} \times \text{facteur de durée} = 3, 10^{-4} \text{ mg/kg/j (par voie orale)} \end{aligned}$$

À la lumière de cette revue de littérature sur l'immunotoxicité du TBT, notre étude expose, dans leur diète, différentes générations de souris C57BL/6 à du poisson contaminé au TBT. Elle a pour but d'évaluer les effets liés à la consommation de poissons contaminés sur le système immunitaire de populations exposées.

## 10. Hypothèse de recherche

Postulat :

Le TBT présents dans les poissons du fleuve Saint-Laurent a des effets néfastes sur le système immunitaire des populations consommatrices de ces poissons.

Hypothèse:

La consommation de poissons contaminés au TBT a des effets néfastes sur le système immunitaire des mammifères en fonction du sexe et du stade de développement de l'individu.

## 11. Objectifs

Pour vérifier l'hypothèse de recherche, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- déterminer des relations de cause à effet entre l'ingestion de poisson contaminé au CTBT et des changements au niveau du système immunitaire ;
- enrichir les connaissances sur la sensibilité des populations adultes et jeunes au TBT.

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons nourri des souris C57BL/6 avec une diète contenant (20 %) de poissons (filets de truites de pisciculture lyophilisés) contaminés au CTBT à raison de 400 µg/kg de nourriture. Deux différents stades de développement ont été utilisés pour ces expériences : des souris juvéniles et des adultes.

## **Chapitre 2**

### **Matériel et méthodes**

## 2.1 Justification du choix du matériel d'expériences

Pour notre étude, nous avons choisi d'utiliser **des souris C57BL/6** car c'est la souche de souris la plus employée pour différents types de recherche en laboratoire dont des tests immunologiques aussi. La souris C57BL/6 est sujette à très peu de changements comportementaux face à son environnement, on le considère relativement résistant au stress (Flint et Tinkle , 2001). De plus, cette souche de souris est souvent utilisé parce qu'il présenterait des mécanismes physiologiques au stress émotionnel se rapprochant de celui de l'humain, car le stress entraîne des perturbations au niveau du système immunitaire (Dhabhar et al. 2000 a; b). C'est pour ces raisons que nous avons choisi les souris C57BL/6 afin de permettre une extrapolation plus adaptée de nos résultats à l'humain.

**La truite de pisciculture** a été retenue pour nos expériences en vue de minimiser l'interférence de plusieurs toxiques concomitants présents dans le fleuve Saint-Laurent et ses poissons. En plus ce poisson contient très peu de gras 7%, 22% de protéine, et pas de glucide (ces valeurs en pourcentages proviennent du rapport entre la substance en g sur 100 g de poisson frais). ([www.bioweight.com/proteines\\_g.htm](http://www.bioweight.com/proteines_g.htm)) La truite Arc-en-ciel fait partie des poissons capturés souvent lors de la pêche sportive. Les filets de truite arc-en-ciel lyophilisés nous ont permis d'obtenir la poudre de poisson que nous avons mélangé plus facilement à la nourriture de base AIN-76A (en poudre) et au CTBT dilué dans de l'huile d'olive purifiée.

**La nourriture de base AIN-76A purifiée** a été utilisée dans notre expérience comme nourriture de base pour son avantage en terme de coût, de flexibilité de sa formulation et fournit une qualité nutritive complète et adéquate afin d'atteindre des objectifs pour des études spécifiques l'AIN-76A contient essentiellement 5% d'huile de maïs, 20% de caséine, 15% de poudre de maïs, 50% de sucrose et 5% de cellulose. Aussi, il assure un niveau relativement bas de contaminants tels que les métaux lourds et les pesticides

(L'AIN-76A est dépourvue de phytoestrogène qui aurait pu influencer les réponses immunitaires de nos souris. ([www.testdiet.com/PDF/58B0.pdf](http://www.testdiet.com/PDF/58B0.pdf)).

Le CTBT (96% Sn) a été retenu pour nos expériences, car sa conversion en d'autres composés de TBT est quelque peu plus facile qu'avec le l'OTBT. Le CTBT est plus soluble dans l'huile et stable pour au moins quatre mois (Davies et Smith, 1980) et permet par conséquent une bonne mixibilité de la nourriture d'exposition de nos souris.

La partie méthodes contient plusieurs techniques décrites par Brousseau *et al* (1997;1998) et Fournier *et al* (2000).

## **2.2 Méthodes**

### **2.2.1. Animaux**

Des souris C57BL/6 (Charles River, Québec) mâles et femelles ont été achetées pour les deux expériences (avec des adultes et juvéniles). Les poids des souris à leur arrivée au laboratoire étaient compris entre 22 et 28 g pour les mâles et entre 18 et 22 g pour les femelles chez les adultes et entre 12 et 18 g chez les juvéniles. Après leur identification, les souris ont été placées dans des cages en fer ; les mâles étaient séparés des femelles. Durant la période d'acclimatation de 14 jours, les souris recevaient de la nourriture de base et de l'eau à volonté. Leur milieu était soumis à une température ambiante de 25° C, une humidité entre 45 et 55 % et une photopériode de 10 à 12 heures.

Les souris ont été ensuite réparties de manière aléatoire en deux groupes d'exposition : un groupe témoin et un groupe exposé en fonction du sexe et des expériences (ref. schémas du protocole expérimental).

### **2.2.2 Mélange pour exposition**

Le chlorure de tributylétain (CTBT à 96 % Sn) a été commandé chez Sigma Aldrich (Oakville, On). 400 µg de CTBT ont été mélangés à de l'huile d'olive (Diagnostic Aldrich Canada, Oakville, On) dans une proportion de 50 ml d'huile/kg de diète (Krajnc *et al*, 1984) composée de la truite arc-en-ciel de pisciculture (Canada Changmin co,

Gaspé, Qc) lyophilisée (mise en poudre) mélangé dans une proportion de 20 % (Arnold *et al*, 1998 a,b) à la poudre AIN-76A (Research Diet, USA) servant de nourriture de base aux souris.

Durant les expériences, les souris témoins consommaient de la nourriture standard (AIN-76A) mélangée à 20 % de poisson lyophilisé (Arnold *et al*, 1998 a,b) tandis que celles exposées recevaient la diète des témoins mélangée à 400 µg de CTBT/kg de nourriture (ce qui équivaut à 57 µg/kg de poids corporel pour une souris adulte pesant 35 g) (OMS-IPCS, 1990). Les rations calculées en fonction de la consommation journalière des souris (environ 5 g/jour/souris) et de leur nombre par cage étaient renouvelées trois fois/semaine ; par contre, leurs bouteilles d'eau étaient renouvelées seulement lors du nettoyage de leurs cages une fois par semaine. Les souris étaient pesées une fois dans la semaine et leur état de santé était suivi journalièrement. Le protocole expérimental est détaillé dans les deux schémas ci-dessous :

## Schéma des étapes expérimentales (I et II)

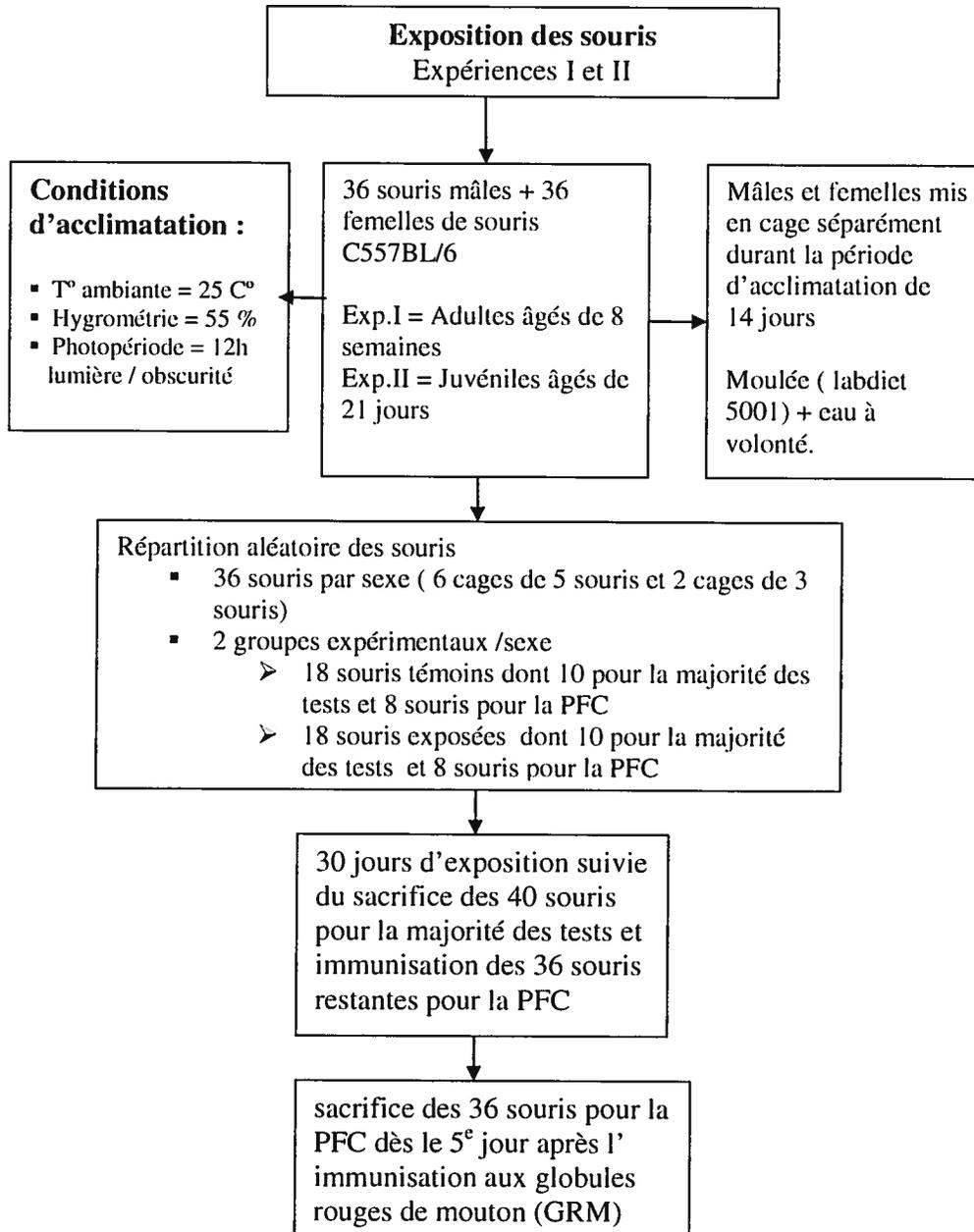


Tableau récapitulatif du protocole expérimental (I et II)

	<b>Expériences I</b> avec des adultes mâles et femelles		<b>Expériences II</b> avec des juvéniles mâles et femelles	
<b>Nombre total de souris</b>	72 souris dont 36 mâles et 36 femelles		72 souris dont 36 mâles et 36 femelles	
<b>Répartition des souris par groupe en fonction du sexe</b>	<b>Témoins</b> 18 mâles 18 femelles	<b>Exposés</b> 18 mâles 18 femelles	<b>Témoins</b> 18 mâles 18 femelles	<b>Exposés</b> 18 mâles 18 femelles
<b>Répartition des groupes en fonction des tests</b>	10 mâles + 10 femelles pour la majorité des tests 8 mâles + 8 femelles pour le PFC	10 mâles + 10 femelles pour la majorité des tests 8 mâles + 8 femelles pour le PFC	10 mâles + 10 femelles pour la majorité des tests 8 mâles + 8 femelles pour le PFC	10 mâles + 10 femelles pour la majorité des tests 8 mâles + 8 femelles pour le PFC
<b>Diète expérimentale en fonction des groupes</b>	AIN-76A + 20 % truite lyophilisée	AIN-76A + 20 % truite lyophilisée + 400 µg de CTBT/kg de nourriture	AIN-76A + 20 % truite lyophilisée	AIN-76A + 20 % truite lyophilisée + 400 µg de CTBT/kg de nourriture
<b>Tests d'évaluation du système immunitaire</b>	- Phagocytose - Cellules tueuses naturelles (NK) - Lymphoprolifération - Plage de lyse (PFC)		- Phagocytose - Cellules tueuses naturelles (NK) - Lymphoprolifération - Plage de lyse (PFC)	
<b>Tests statistiques</b>	- <b>tests de comparaison</b> de deux (2) groupes qui sont : les souris témoins et les souris exposées - <b>test t de Student</b> pour la normalité - test non paramétrique, celui de <b>Wilcoxon Mann-Whitney</b> si normalité non vérifiée			

## **2.3 Sacrifice des souris et évaluation du système immunitaire**

Lors des sacrifices, les souris ont été euthanasiées au CO<sub>2</sub> et elles ont été ensuite disséquées. La rate et le thymus ont été prélevés, pesés et ensuite soumis aux différents tests d'évaluation du système immunitaire retenus. Les modes d'analyse immunologiques utilisés étaient celles du manuel des techniques immunologiques du laboratoire (Brousseau *et al*, 1998).

### **2.3.1 Suspension cellulaire et comptes cellulaires**

Les rates et thymus prélevés dans des conditions stériles sous la hotte, ont été écrasés, à l'aide de la base de seringues de 5 cc dans 5 ml d'une solution stérile de RPMI complet (RPMIc) composé du RPMI 1640 (Sigma, Mississauga, On), enrichi de 10 % de sérum de veau fœtal (Sigma, Mississauga, On), mélangé à 10 mM de HEPES (Sigma, Mississauga, On) pour l'équilibre du pH et complété avec du Pen-Strep à 10 % (= 10 000 U/ml de pénicilline + 10 000 U/ml de streptomycine) (Sigma, Mississauga, On) afin d'empêcher la prolifération microbienne du milieu. Les cellules libérées ont été ensuite filtrées dans un tube à fond conique de 15 ml, le contenu a été rajusté avec du RPMIc dit complet. Après une configuration pendant 10 mn à 250 x g et à 20° C, le surnageant a été ensuite décanté et le culot de la cellule a été remis en suspension dans 5 ml de RPMIc afin de faire le compte cellulaire. Pour effectuer les comptes cellulaires, 20 µl des suspensions cellulaires ont été placés dans des puits de microplaque à fond rond auxquels on a rajouté 80 µl de RPMIc et 10 µl de bleu de trypan, ce qui donne une dilution cellulaire de 1/10<sup>e</sup>. La lecture des cellules nucléées viable a été faite selon la technique d'exclusion au bleu de trypan sur hémacytomètre (Brousseau *et al*, 1998). Chaque échantillon a été compté en double et les moyennes ont servi pour le calcul de réajustement cellulaire pour les différents tests effectués : 5 x 10<sup>6</sup> cellules/ml pour la lymphoprolifération et les cellules tueuses naturelles (NK), 1 x 10<sup>6</sup> pour la phagocytose et 2 x 10<sup>6</sup> pour la plage de lyse (PFC).

### 2.3.2 Tests immunologiques

Quatre différents tests ont été retenus, à savoir :

1. la lymphoprolifération des lymphocytes B pour la production d'anticorps et la réponse humorale et celle des lymphocytes T pour la réponse spécifique cellulaire en utilisant des cellules de la rate (splénocytes) ;
2. la phagocytose par les macrophages;
3. l'activité des cellules tueuses naturelles (NK) pour les réponses non spécifiques en utilisant des splénocytes ;
4. la plage de lyse (PFC) pour évaluer le développement d'une réponse immunitaire primaire en utilisant des splénocytes.

#### 2.3.2-1 Tests de lymphoprolifération

Ces tests mesurent le potentiel de division des splénocytes. Ils utilisent des mitogènes qui sont des substances ayant la capacité d'induire la prolifération des lymphocytes. Les mitogènes comme la concanavaline (ConA) ou la phytohémataglutinine (PHA + lectine de *Phaseolus vulgaris*) entraînent la prolifération des lymphocytes T, tandis que les lipopolysaccharides bactériens (LPS) induisent la prolifération des lymphocytes B. L'incorporation de la thymidine tritiée ( $^3\text{H-Thy}$ ) dans le milieu permet d'estimer le taux de prolifération à l'aide d'un compteur à scintillation.

Les tests de lymphoprolifération ont été effectués dans des microplaques à fond plat de 96 puits en milieu stérile ; la préparation des suspensions cellulaires s'est déroulée en condition stérile. 100  $\mu\text{l}$  de  $5 \times 10^6$  cellules de rate ont été déposés dans des puits auxquels on a rajouté 100  $\mu\text{l}$  de mitogènes, soit : de la ConA (Sigma, Saint-Louis, Mo) à une concentration de 1,25  $\mu\text{g/ml/puits}$  et du LPS à une concentration de 25  $\mu\text{g/ml}$  (Sigma, Mississauga, On).

La préparation s'est faite en triplicata pour chaque échantillon, pour chaque mitogène et pour le contrôle. Les plaques ont été ensuite incubées pendant 48 h à 37° C en atmosphère humide en présence de 5 % de CO<sub>2</sub> avant d'y ajouter 5 µCi de <sup>3</sup>H-Thy (ICN, Montréal, Qc) par puits. Les plaques sont à nouveau remises à incuber pendant 18 h dans les mêmes conditions que précédemment.

Les cellules ont été ultérieurement lysées à l'eau distillée pour libérer l'ADN et le contenu de chaque puits a été transféré sur papier filtre (Filter MAT, Skatron, UK) à l'aide d'un collecteur de cellules (cell harvester, Titertel, USA). Chaque rondelle de papier filtre a été déposée au fond d'un tube de comptage dans lequel on a ajouté 4 ml de liquide de scintillation (Cistocint, ICN, Montréal, Qc). La lecture de chaque tube au compteur à scintillation β permet d'obtenir des résultats exprimés en nombre de désintégration par minute (DPM).

Les tests de prolifération des lymphocytes induits par des mitogènes peuvent servir de contrôle positif pour tester la qualité des cultures des lymphocytes ; en plus, ils servent à mesurer la mitose indirectement par l'incorporation de thymidine tritiée (<sup>3</sup>H).

La division et la différenciation continues des cellules immunocompétentes dans l'organisme protègent l'hôte contre les agents pathogènes. Pour évaluer la prolifération des leucocytes, on détermine la réponse lymphoproliférative des cellules B et T aux mitogènes.

### **2.3.2-2 Tests de phagocytose**

L'activité phagocytaire des macrophages a été décrite pour la première fois par Steinkamp et Stewart (1986) et a ensuite été adaptée par Brousseau *et al* (1998).

Ces tests sont basés sur la capacité des macrophages à phagocyter des billes de latex fluorescentes qui sont ensuite détectées au cytomètre à flux en fonction de la taille et de la complexité de ces macrophages selon la réflexion du faisceau lumineux à leur surface.

Ce rôle de défense de l'organisme par les macrophages est évalué par le nombre de billes phagocytées en fonction du temps.

La phagocytose se déroule selon les trois étapes suivantes :

- la reconnaissance du corps étranger par le phagocyte suivi d'une adhésion entre les deux;
- l'ingestion du corps étranger par le mécanisme d'endocytose cellulaire dans le phagocyte;
- la digestion du corps étranger ou étape de destruction des xénobiotiques dans le phagocyte.

Pour effectuer ces tests, on a déposé 500  $\mu$ l de suspension de splénocytes dans des tubes en polypropylène de 5 ml numérotés au préalable en duplicata pour chaque échantillon. Ces tubes ont été ensuite incubés au bain-marie à 37° C pendant 30 minutes. Après avoir soumis la fiole contenant les billes fluorescentes à 1,52  $\mu$ m de diamètre (Polyscience, Etobicoke, On) aux ultrasons pour les séparer, on a pipeté 5,6  $\mu$ l de billes dans un rapport de 100 billes par cellule qu'on a rajouté dans chaque tube à la fin de l'incubation de 30 minutes.

Les tubes ont été ultérieurement remis à incuber dans les mêmes conditions que précédemment à l'obscurité pendant 45 minutes. On a ensuite prélevé 500  $\mu$ l du mélange qu'on a déposé sur un gradient BSA (Bovine Serum Albumine inc, Montréal, Qc) à 3 % (p/v) dans du RPMI 1640. Une centrifugation a suivi sous une température de 4° C pendant 8 minutes à 150 x g afin d'éliminer les billes qui n'ont pas été phagocytées et qui pourraient interférer avec les résultats de la phagocytose. Après l'élimination du surnageant, le culot a été remis en suspension dans 200  $\mu$ l de formaldéhyde dilué à 5 % dans du « FACS flow » pour une lecture différée au cytomètre « FACS can » (Becton et Dickinson, Los Angeles, Ca).

La lecture s'est effectuée en FL I (fluorescence e verte avec  $\lambda = 530$  nm) selon les paramètres de fluorescence et de diffusion de la lumière. C'est un cytogramme biparamétrique en « Size Scattered Cell » (SSC) sur l'axe des y pour les tailles des cellules versus « Forward Scattered Cell » (FSC) et sur l'axe x pour la complexité des

cellules. L'activité phagocytaire est exprimée en pourcentage de macrophages ayant 3 billes et plus.

Ces tests permettent d'évaluer la fonction de défense de l'organisme par les phagocytes dont la nomenclature varie en fonction de leur localisation dans l'organisme (neutrophiles sanguins et macrophages tissulaires). Les macrophages interviennent autant pour des réponses immunitaires spécifiques que naturelles.

### **2.3.2-3 Activité des cellules tueuses**

Ce test est basé sur la capacité des cellules tueuses (NK) à lyser de manière non spécifique des cellules cancéreuses ou reconnues comme exogènes (du non soi). Cette activité s'avère très importante au niveau de la rate.

Le principe du test consiste à marquer des cellules cancéreuses murines YAC-1 par un colorant de membrane DIO (3,3'-dioctadécylloxycarbocyanine perchlorate (Sigma, Saint-Louis, Mo) qui émet dans la fluorescence verte (FL I). Les cellules lysées ou mortes sont ensuite marquées à l'iodure de propidium (PI) qui émet dans la fluorescence rouge (FL3). La mise en contact des cellules YAC-1 ou cellules cibles (C) avec celles de rate dont les NK ou cellules effectrices (E) entraîne la lyse des cellules cancéreuses par libération des NKCF (Natural Killers Cytotoxic Factors). C'est cette activité de lyse par les cellules NK qui sera mesurée au cytomètre en fonction de la fluorescence émise (Chang *et al*, 1993).

La première étape de ce test consiste à marquer les cellules YAC-1 en utilisant du DIO à 3 nM dans du DMSO (diméthyle sulfoxyde) ; on dépose 10 µl de DIO dans un tube et on y projette vigoureusement 1 ml de suspension de YAC-1 avec 10<sup>6</sup> cellules/ml. Ces cellules sont mises à incuber 20 minutes à 37° C et une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub> avant d'être lavées deux fois dans du PBS pendant 10 minutes à 250 x g à température ambiante. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans du RPMI complet à 10<sup>6</sup> cellules/ml.

La deuxième étape du test est la mise en contact des cellules effectrices (E), les NK avec des cellules cibles (C) et les cellules YAC-1. À cette fin, on établit des courbes d'étalonnage faisant varier le rapport E/C et le temps d'incubation. Les meilleurs résultats du rapport E/C seraient de 100 : 1 et pour une durée d'incubation de 2 heures. Pour nos expériences, nous avons utilisé les rapports 20/1 et 40/1 pour un même temps d'incubation (2 heures).

Un tube contenant  $2 \times 10^5$  de cellules YAC-1 a servi de témoin négatif et a permis les ajustements du cytomètre sur la population des cellules cancéreuses. Dans les autres tubes, on a déposé  $10^4$  de cellules YAC-1 et  $10^5$  de cellules de rate ; ensuite, on y a ajouté 20  $\mu$ l (PI) à 1 mg/ml dans chaque tube à analyser afin d'obtenir une concentration de 100  $\mu$ g/ml. Ces tubes ont ensuite été centrifugés rapidement à 1 000 x g durant 30 secondes afin de favoriser un meilleur contact entre les cellules cibles et effectrices.

À la fin du contact entre les cellules YAC-1 et celles de souris durant 2 heures d'incubation à 37° C et 5 % de CO<sub>2</sub>, on procède à une centrifugation à 250 x g à 20° C pendant 10 minutes afin de concentrer les cellules ; les culots ont été mis en suspension dans 500  $\mu$ l RPMI complet pour procéder ensuite à l'acquisition au cytomètre.

Le rajustement du cytomètre se fait à l'aide des cellules YAC-1 du tube témoin négatif. La fluorescence du DIO permet de préparer la fenêtre d'acquisition des cellules cancéreuses. L'acquisition des échantillons ne tient compte que des cellules qui émettent leur fluorescence dans la longueur d'onde du DIO, donc les cellules YAC-1 (ou cellules cibles). L'acquisition au cytomètre nous a donné quatre types de populations cellulaires :

- les cellules marquées au DIO (DIO +) mais pas au PI (PI -) qui correspondent aux cellules cibles lysées ;
- les cellules marquées au DIO (DIO +) et au PI (PI +) qui correspondent aux cellules mortes ou partiellement lysées ;
- les cellules peu marquées au DIO (DIO-) et qui sont au PI (PI +) qui correspondent aux cellules cibles ayant leur membrane dégradée ;

- les cellules peu marquées au DIO (DIO-) et au PI (PI -) qui correspondent à des fragments de débris cellulaires.

Le pourcentage de lyses se calcule de la manière suivante :

$$\% \text{ lyse} = \frac{(\text{DIO} - \text{PI} +) + (\text{DIO} + \text{PI} +)}{100 - (\text{DIO} - \text{PI} -)}$$

Le test NK permet d'évaluer la résistance de l'organisme aux tumeurs et aux infections virales; les cellules NK jouent un rôle dans la régulation des populations cellulaires lymphoïdes et hématopoïétiques. Elles ne sont pas spécifiques d'un antigène et leur nombre n'augmente pas à la suite d'une immunisation.

#### 2.3.2-4 Test de production d'anticorps

Ce test permet d'évaluer la capacité des lymphocytes B à produire des anticorps contre l'antigène injecté dans les globules rouges de mouton.

Quatre jours après l'immunisation des souris, leurs lymphocytes B sont mis en contact avec des globules rouges de mouton. La phase de fixation des anticorps produits par les lymphocytes B sur l'antigène est suivie par la phase de fixation aux anticorps du complément de cochon d'inde (Gibco, Burlington, On) ajouté au milieu. Ces deux étapes vont provoquer la lyse des globules rouges de mouton autour des lymphocytes B qui secrètent des anticorps formant ainsi la plage de lyses, lequel phénomène est visible à l'œil nu.

Pour nos expériences, nous avons utilisé la technique de Cunningham et Szenberg (1998) légèrement modifiée. Elle est décrite de la manière suivante : à partir de la suspension cellulaire de rate de souris immunisée, on a préparé une suspension cellulaire rajustée à  $2 \times 10^6$ . Parallèlement, une suspension de globules rouges de mouton (GRM) à 25 % a été préparée puis lavée 3 fois dans du PBS et re-suspendue dans du RPMI 1640. Ensuite, pour chaque échantillon, on a mélangé soigneusement dans des tubes en polypropylène

de 5 ml, 60 splénocytes, 20  $\mu$ l de globules rouges de mouton dilués au 1/9 dans du HBSS et 20  $\mu$ l de complément de cochon d'inde (Gibco, Burlington, On) dilués au 1/20<sup>e</sup> dans du HBSS. On pipette 50  $\mu$ l du mélange qu'on dépose dans une chambre entre deux lames de verre (montées au préalable) que l'on scelle à la paraffine; ensuite, on incube 45 minutes à 37° C et à 5 % de CO<sub>2</sub>. À la fin de l'incubation, les plages de lyse ont été dénombrées par visualisation macroscopique et les résultats ont été exprimés en nombre de cellules productrices d'anticorps (PFC)/million de cellules vivantes.

Le test de production d'anticorps permet d'évaluer l'immunité à médiation humorale. Cette réponse a besoin de la participation des lymphocytes B et T et des macrophages. Le déficit d'une de ces populations cellulaires affecte la réponse humorale.

#### 2.4 Analyses statistiques

À partir des résultats bruts obtenus, les moyennes arithmétiques et les écarts types ont été calculés pour chacun des groupes et les résultats ont été exprimés en pourcentage de la réponse normale.

La taille des échantillons de souris des expériences 1 et 2 étant inférieure ou égale à 10, nous utiliserons un **test t de Student** si la normalité de la variable et l'égalité des variances sont vérifiées (le test t de Student exige un minimum de 30 comme taille d'échantillon dans un cas de non normalité).

Dans le cas où la condition de normalité n'est pas vérifiée, nous allons utiliser un test non paramétrique, celui de **Wilcoxon Mann-Whitney** beaucoup plus robuste dans ce cas de figure.

Ces analyses seront faites autant pour les souris adultes que pour les souris juvéniles parallèlement.

Le niveau de signification des tests alpha ( $\alpha$ ) est = 5%, donc un intervalle de confiance de 95%.

Pour la production de nos résultats, nous utiliserons le logiciel statistique SIGMASTAT

## Chapitre 3 : Résultats

### 3.1. Tests statistiques

À partir des données brutes des expériences faites, des statistiques descriptives (moyenne, médiane, écart type, ...) ont été compilées pour chaque groupe de données.

Selon l'hypothèse de recherche, nous avons fait des tests de comparaison de deux (2) groupes qui sont : les souris témoins et les souris exposés.

Nous n'avons pas fait de test d'ANOVA car nous avons juste deux groupes (Témoin et Exposé). Donc, il n'y a pas d'étude de contraste qui nécessite plus que deux groupes. Nous avons pris en compte l'effet d'une possible interaction du TBT avec la variable SEXE en subdivisant nos groupes en Femelle et Mâle pour les analyses.

Ainsi, les tests statistiques que nous avons utilisés, concernent les deux designs suivants :

1. Femelle témoin comparé à Femelle exposée
2. Mâle témoin comparé à Mâle exposée

La taille des échantillons de souris des expériences 1 et 2 étant inférieure ou égale à 10, nous avons utilisé un **test t de Student** pour la normalité de la variable et l'égalité des variances ont été vérifiées (le test t de Student exige un minimum de 30 comme taille d'échantillon dans un cas de non normalité).

Dans le cas où la condition de normalité n'est pas vérifiée, nous avons utilisé un test non paramétrique, celui de **Wilcoxon Mann-Whitney** beaucoup plus robuste dans ce cas de figure. Ces analyses ont été faites autant pour les souris adultes que pour les souris juvéniles parallèlement. Le niveau de signification des tests est  $\alpha = 5\%$ , donc un intervalle de confiance de 95%.

Pour la production de nos résultats, nous avons utilisé le logiciel statistique SIGMASTAT. L'ensemble des résultats statistiques des deux expériences sont présentés dans les tableaux 1 et 2 joints en annexe

### 3.2 Présentation des résultats

Pour nous aider dans l'analyse de nos résultats, nous avons calculé le taux de gain de poids des souris qui provient de la différence de moyenne des poids entre le début et la fin des expériences pour chaque groupe que nous avons rapporté à la moyenne des poids en début de l'expérience et ce rapport est multiplié par 100. Cette variable « % de gain de poids » a été calculée selon la formule suivante :

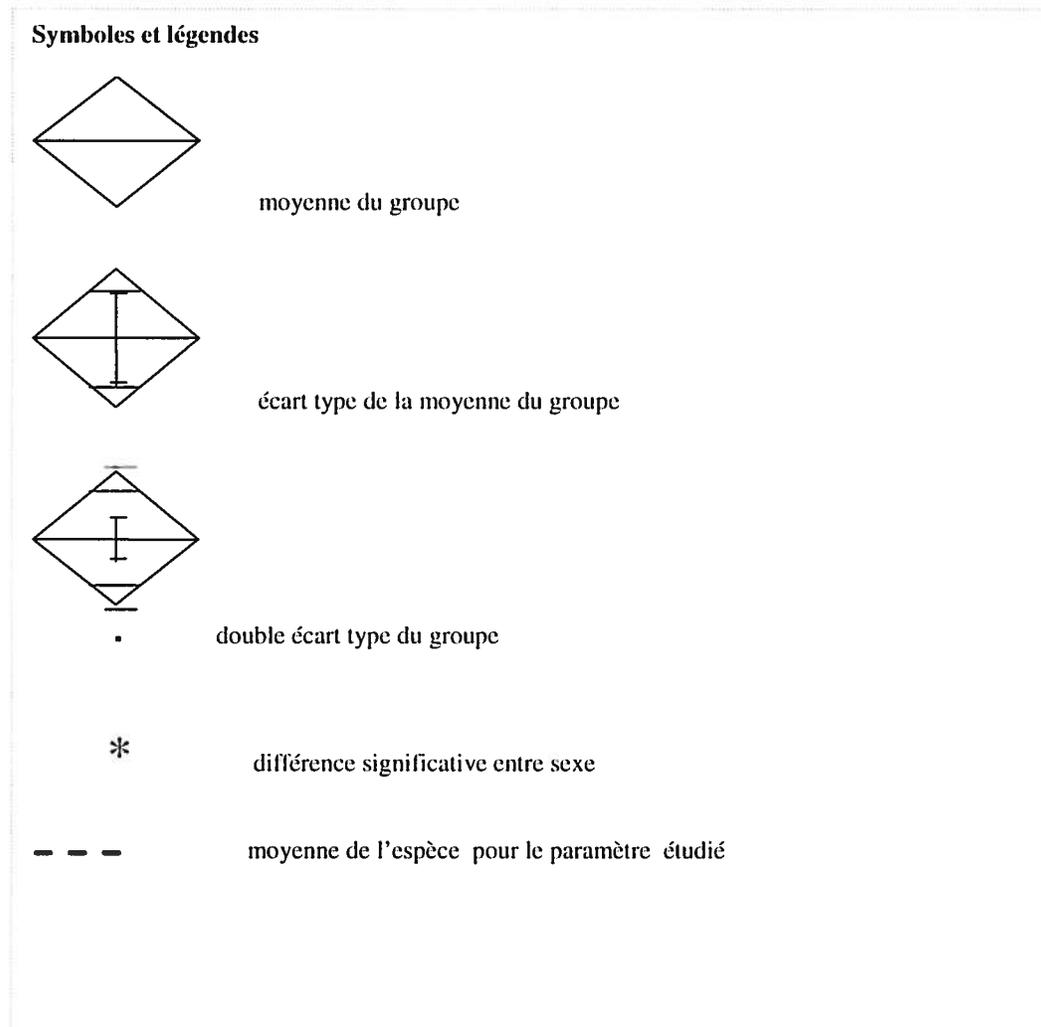
$$\% \text{ gain poids}_i = \frac{100(\text{poids}_{\text{fin}_i} - \text{poids}_{\text{début}_i})}{\text{poids}_{\text{début}_i}}$$

Avec

- $i$  = souris
- $\text{poids}_{\text{début}_i}$  égal au poids de la souris en début d'expérience
- $\text{poids}_{\text{fin}_i}$  égal au poids de la souris en fin d'expérience (la 4<sup>e</sup> semaine pour la majorité des tests et la 5<sup>e</sup> pour le P.F.C.)

Étant donné que les deux expériences ont suivi un même protocole, les résultats seront présentés selon leurs chronologies (adultes puis juvéniles) et regroupés en fonction des tests utilisés pour nos évaluations immunotoxicologiques. Ce choix d'expression des résultats est dans le but de faciliter la comparaison des réponses entre les souris adultes et les juvéniles.

Les légendes des symboles retrouvés dans les diagrammes des résultats sont présentées de la manière suivante :



### 3.3 Souris adultes et juvéniles

#### 3.3.1 Poids des souris adultes

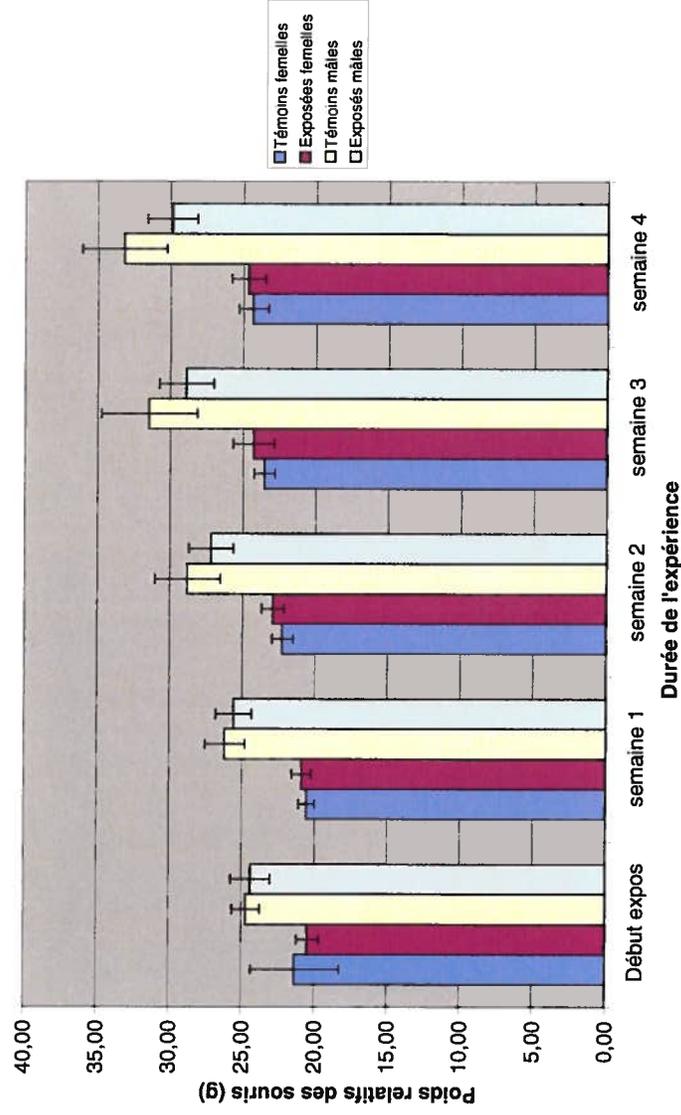
##### 3.3.1. A Majorité des tests

À la fin des quatre (4) semaines d'exposition (histogramme 1), nous n'avons pas noté une différence significative ( $p=34,5\%$ ) dans les gains de poids entre les souris adultes femelles (témoins vs exposées) pour la majorité des tests. Toutefois, nous avons observé un résultat inverse pour les mâles dont le groupe témoin a gagné plus de poids (51%) que

les exposés mais la différence de gain de poids demeure n'est toutefois pas significative. Ce taux de gain de poids chez les femelles serait attribuable à un effet systémique, tandis que ceux des mâles serait dû à l'effet du TBT dans la diète d'exposition. Ce résultat nous montre que l'exposition des souris adultes femelles au CTBT n'a pas affecté le poids des souris adultes femelles et mâles.

### Histogramme 1

Prise de poids des souris durant l'expérience1 (majorité des tests)



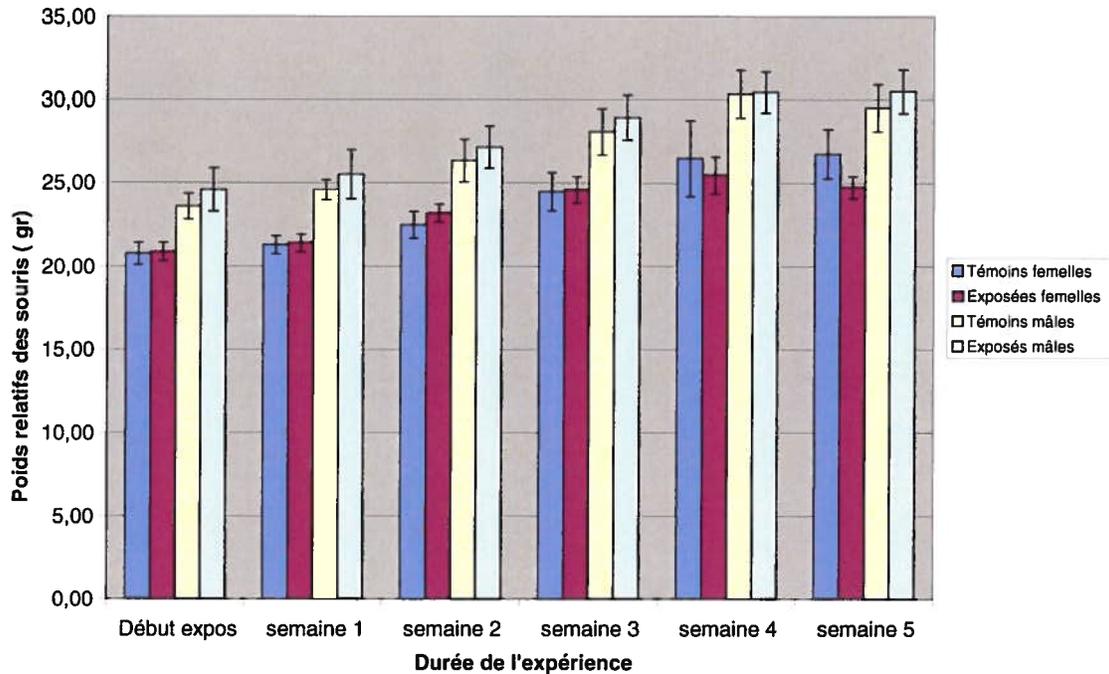
Expérience 1 = souris adultes

### 3.3.1.B PFC

Pour le PFC (histogramme 2), les souris adultes femelles n'ont pas présenté une

## Histogramme 2

Prise de poids des souris durant l'expérience 1 (PFC)



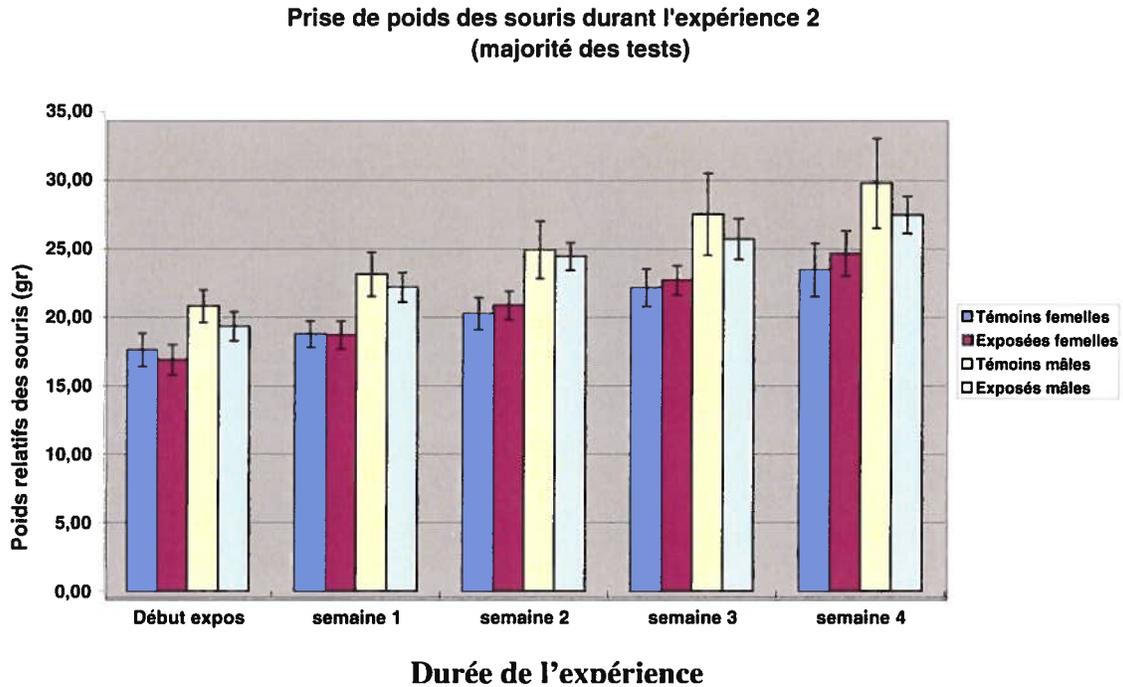
Expérience 1 = souris adultes

### 3.3.2 Poids des souris juvéniles

#### 3.3.2.A Majorité des tests

Les souris juvéniles pour la majorité des tests ne présentent pas de différence significative pour les gains de poids autant chez les femelles que chez les mâles à la fin des quatre (4) semaines d'exposition (histogramme 3). Mais nous avons observé que les femelles exposées ont gagné 38% plus de poids que les témoins. Ces résultats montrent que le CTBT n'a pas affecté les poids des souris juvéniles femelles et mâles.

### Histogramme3



Expérience 2 = souris juvéniles

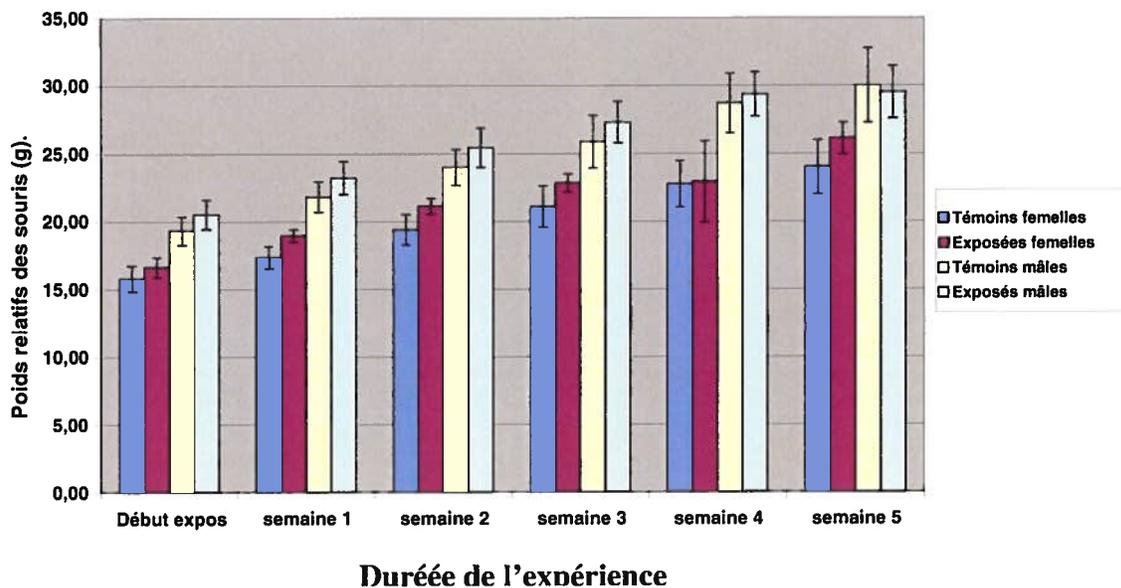
#### 3.3.2-B PFC

Nous n'avons pas noté de différence significative dans les gains de poids entre les souris juvéniles femelles témoins et les exposées utilisées pour le test PFC (histogramme 4). Par contre le gain de poids entre les souris juvéniles mâles (témoins vs exposées) s'avère significatif ( $p=0,008$ ) : les souris mâles exposées ont gagné 26% plus de poids que les témoins.

L'exposition des souris juvéniles femelles au CTBT n'a pas affecté le poids de celle-ci lors du test PFC. Par contre, le CTBT a affecté le poids des souris juvéniles mâles.

## Histogramme 4

Prise de poids des souris durant l'expérience II (PFC)

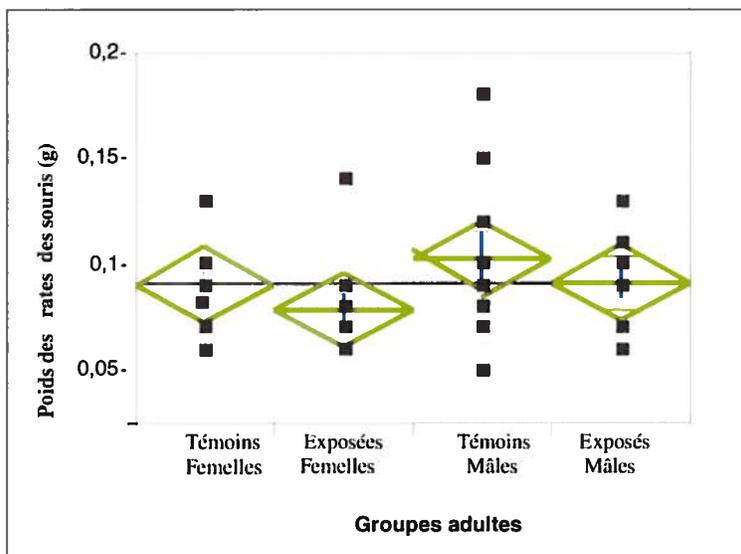


Expérience 2 = souris juvéniles

### 3.3.3 Poids des organes

#### 3.3.3.1 Poids des rates des souris adultes

Le poids des rates des souris adultes (mâles et femelles) utilisées dans la majorité des tests (figure 3.3.3.1) ne montrent pas de différence significative entre les exposées comparativement aux témoins pour les deux sexes.

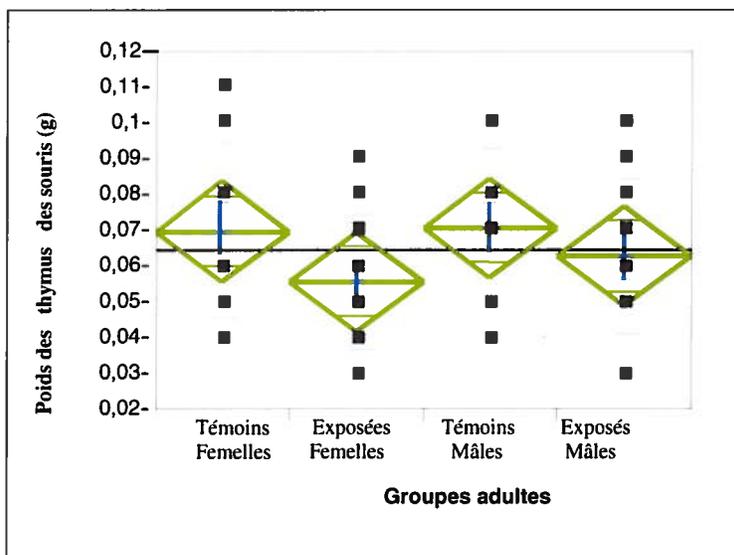


**Figure 3.3.3.1** poids des rates de souris adultes femelles et mâles.

### 3.3.3.2 Poids des thymus des souris adultes

On pas observé non plus de différences significatives pour le poids des thymus (figure 3.1.2.B) entre les exposées et les témoins chez les deux sexes des souris. Le CTBT n'a pas affecté les poids des rates de manière significative.

Autant pour les poids des rates que ceux des thymus, ces résultats montrent que le CTBT n'a pas affecté ces organes chez les adultes

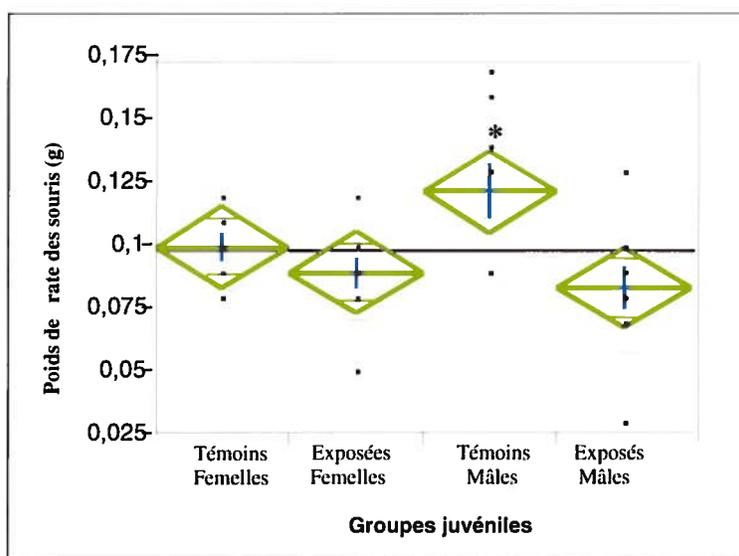


**Figure 3.3.3.2** : poids des thymus de souris adultes femelles et mâles

### 3.3.3.3 Poids des rates des souris juvéniles

Excepté les souris juvéniles mâles où on a observé une différence significative ( $p = 0,013$ ) entre le groupe témoin et le groupe exposé, il faut noter que pour les souris utilisées dans la majorité des tests (figure 3.1.2.C), les femelles ne montrent aucune différence significative pour les poids des rates chez les souris juvéniles.

Ces résultats montrent que l'exposition des souris juvéniles (mâles et femelles) au CTBT n'a pas affecté le poids de la rate de manière significative.

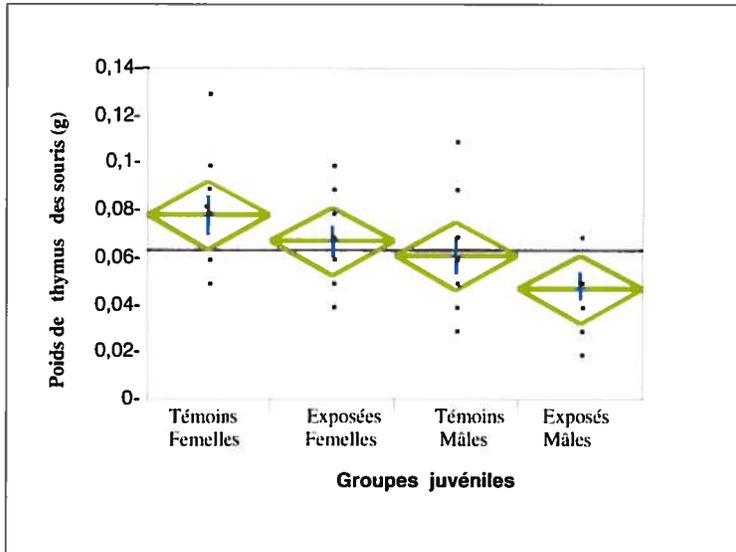


**Figure 3.3.3.3** : poids des rates de souris juvéniles femelles et mâles

### 3.3.3.4 Poids des thymus des souris juvéniles

Les souris adultes juvéniles (figure 3.1.2.D) n'ont pas montré de différences significatives pour les poids du thymus entre les témoins et les exposés des deux sexes.

En conclusion, l'exposition des souris juvéniles (mâles et femelles) au CTBT n'a pas affecté le poids du thymus de manière significative.



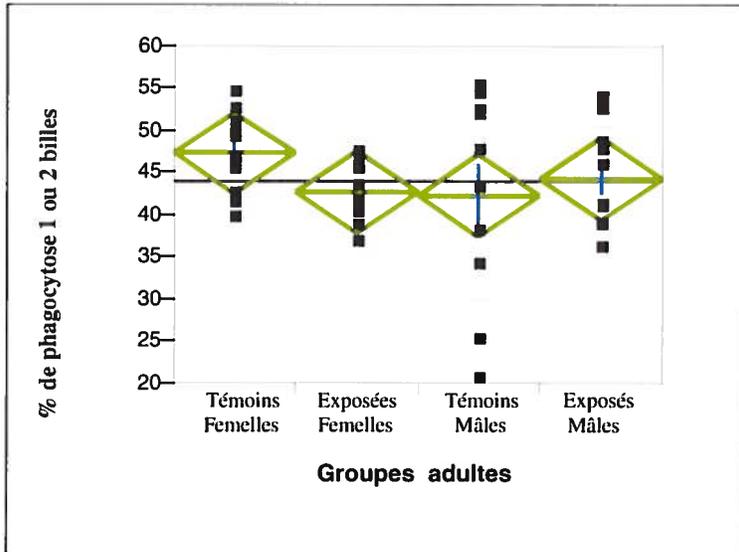
**Figure 3.3.3.4** : poids des thymus de souris juvéniles femelles et mâles.

### 3.3.4 La phagocytose

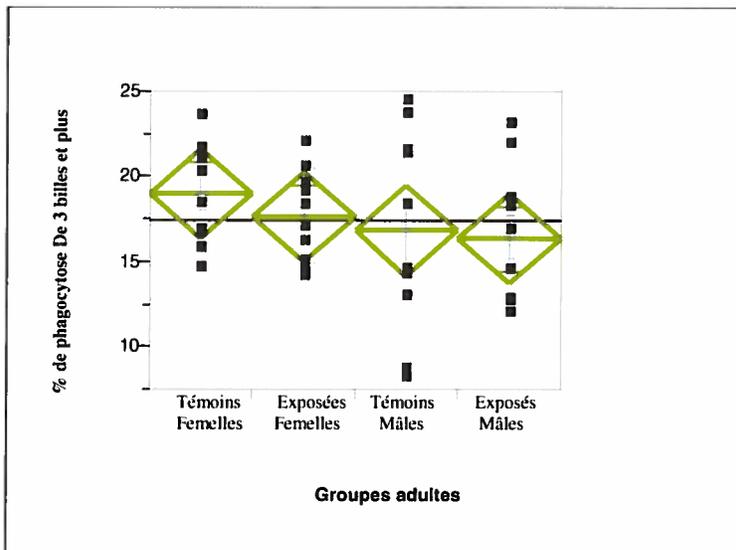
#### 3.3.4.1 Souris adultes

Pour la phagocytose de 1 ou 2 billes chez les souris adultes (figure 3.3.4.1-A) seules les femelles indiquent une différence significative ( $p=0.03$ ) entre les témoins et les exposées. On a noté une baisse de phagocytose chez les souris adultes femelles exposées au CTBT comparativement aux témoins. L'exposition des souris adultes mâles au CTBT n'a pas affecté de manière significative, le pouvoir des macrophages à phagocyter 1 à 2 billes.

D'autre part, on n'a pas observé de différences significatives entre les groupes chez les souris des deux sexes (mâles et femelles) en ce qui concerne la phagocytose de 3 billes et plus (figure 3.3.4.1-B).



**Figure 3.3.4.1-A :** % de phagocytose chez les adultes (1 ou 2 billes)



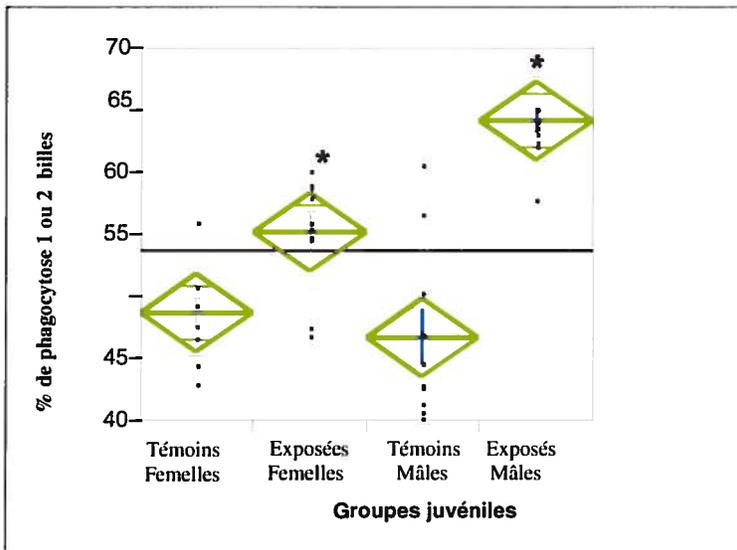
**Figure : 3.3.4.1-B:** % de phagocytose chez les adultes (3 billes et +)

### 3.3.4.2 Souris juvéniles

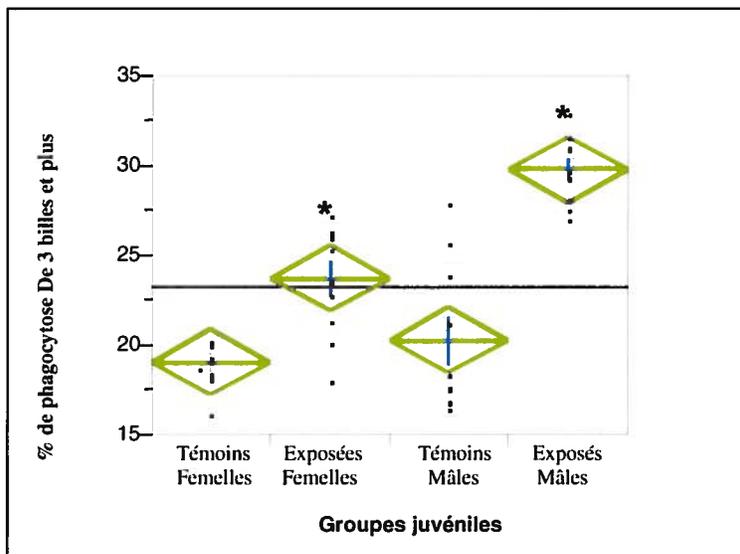
Le pouvoir des souris juvéniles à phagocyter 1 ou 2 billes (figure 3.3.4.2-A) , montre une différence statistiquement significative ( $p=0,003$ ) chez les femelles témoins comparativement aux exposées. Il en est de même, chez les souris juvéniles mâles où cette différence est statistiquement très significative ( $p<0,001$ ) entre les témoins et les exposées.

Pour la phagocytose de 3 billes et plus (figure 3.3.4.2-B), nous observons également une différence significative aussi bien chez les souris femelles ( $p= 0.005$ ) que pour les mâles ( $p=0,001\%$ ) entre les témoins et les exposées

Ces résultats montrent que l'exposition des souris adultes juvéniles au CTBT a stimulé le pouvoir des macrophages à phagocyter 1 ou 2 billes et 3 billes et plus, particulièrement chez les exposées mâles des deux sexes comparativement aux témoins.



**Figure 3.3.4.2.A: % de phagocytose chez les juvéniles (1 ou 2 billes)**



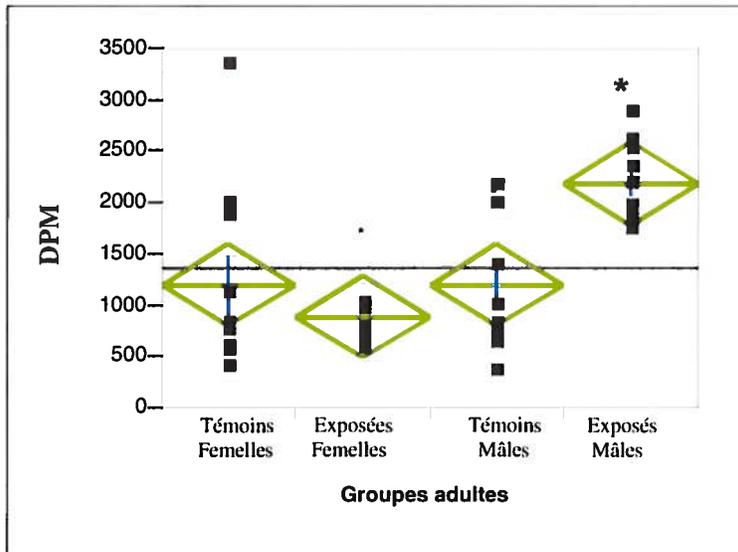
**Figure 3.3.4.2-B : % de phagocytose chez les adultes (3 billes et plus)**

### 3.3.5. Transformation lymphoblastique des splénocytes

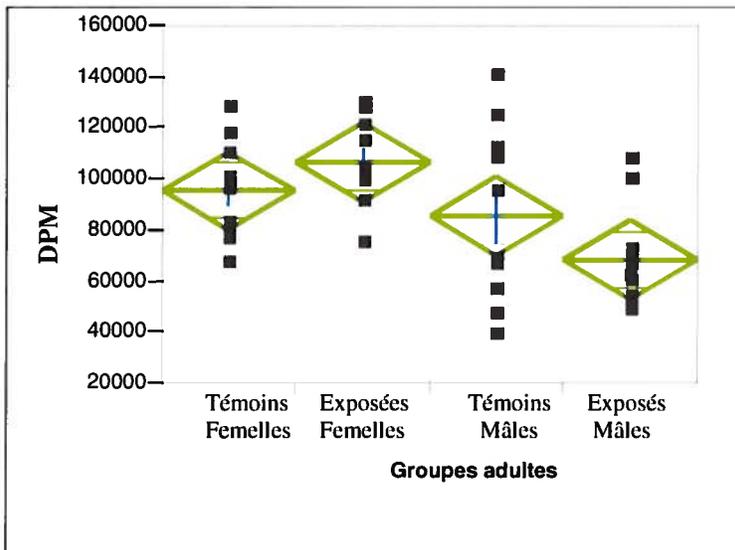
#### 3.3.5.1 Souris adultes

On note une stimulation significative de la lymphoprolifération des splénocytes en présence du mitogène Con A, (figure 3.1.4.A-1) chez les souris adultes mâles exposées au CTBT par rapport aux témoins ( $p=0,007$ ). Le CTBT n'a pas affecté de manière significative la stimulation des lymphocytes T en présence de la CON A chez les souris adultes femelles ( $p=0,001$ ).

Par contre, la lymphoprolifération des splénocytes en présence du mitogène LPS (figure 3.1.4.A.2) n'a pas été significative pour les souris adultes exposées comparées aux témoins chez les deux sexes.



**Figure 3.3.5.1. A:** transformation lymphoblastique de splénocytes des souris adultes (CON A)

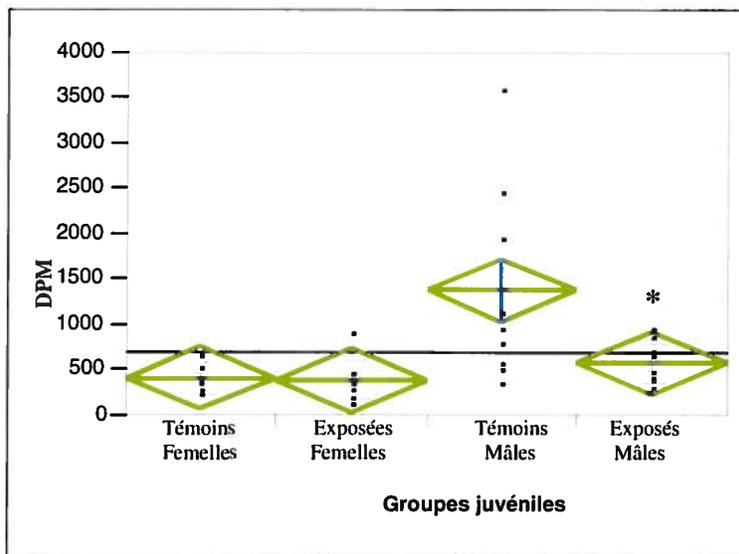


**Figure 3.3.5.1.B:** Transformation lymphoblastique de splénocytes de souris adultes (LPS)

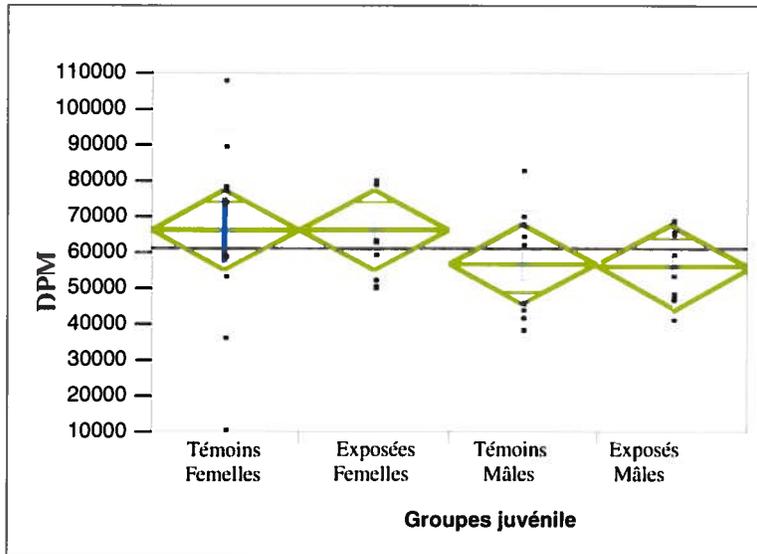
### 3.3.5.2 Souris juvéniles

La lymphoprolifération des lymphocytes T en présence du mitogène ConA (figure 3.3.5.2.A) chez les souris juvéniles n'a pas été significative pour les souris femelles. Mais, bien qu'il ait eu une très faible stimulation des splénocytes en présence de la ConA dans l'ensemble des groupes des souris juvéniles nous avons toutefois noté une stimulation significative (0,001) chez les souris juvéniles mâles témoins par rapport aux exposées au CTBT.

En présence du mitogène LPS (figure 3.3.5.2.B), l'exposition au CTBT n'a pas eu d'effet significatif sur la lymphoprolifération des splénocytes entre les groupes de souris juvéniles chez les sexes.



**Figure 3.3.5.2.A:** Transformation lymphoblastique de splénocytes de souris juvéniles (CON A)



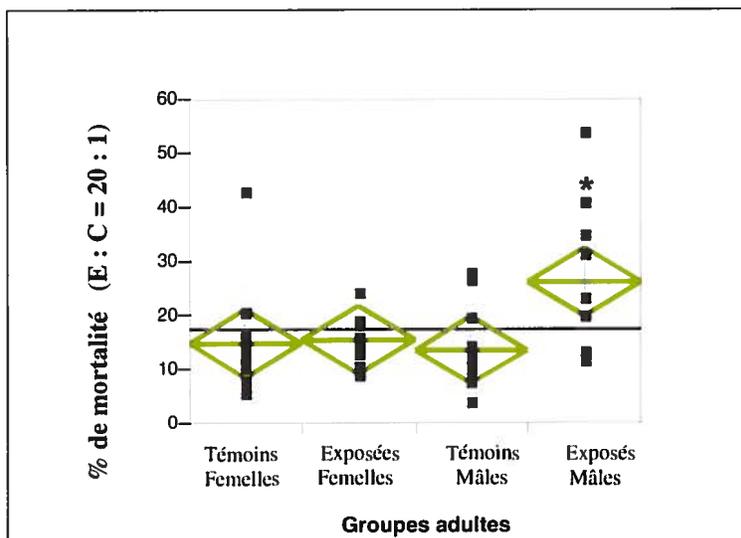
**Figure 3.3.5.2.B:** Transformation lymphoblastique de splénocytes de souris juvéniles (LPS).

### 3.3.6 Test des cellules tueuses naturelles (NK)

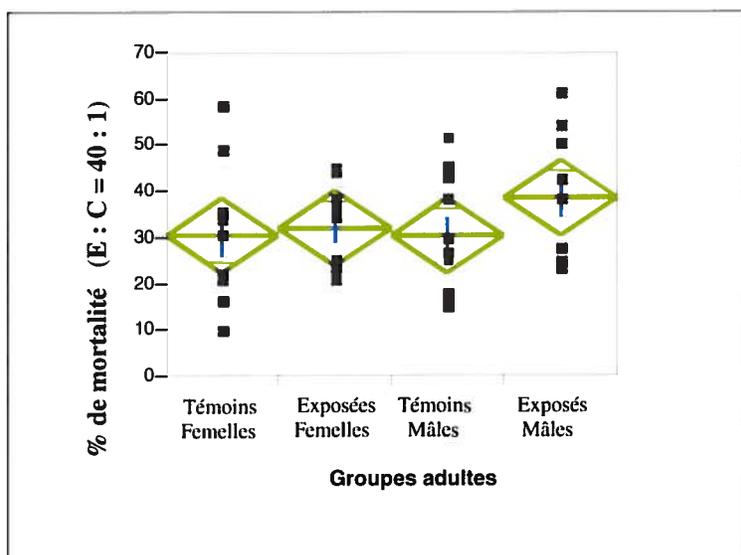
#### 3.3.6.1 Souris adultes

L'activité de lyse cellules NK pour le paramètre E : C = 20 :1 (Figure 3.3.6.1.A), a été significative ( $p=0,023$ ) chez les souris adultes mâles entre les témoins et les exposées où on a noté une activité de lyse plus prononcée chez les exposées au CTBT. Les femelles n'ont présenté de différence pour ce paramètre.

Pour le rapport E : C = 40 :1 (3.3.6.1.B), on n'observe pas une différence significative au niveau des souris adultes femelles et mâles mais on observe toutefois une activité de lyse des NK plus élevée chez dans le groupe des souris mâles exposées au CTBT.



**Figure 3.3.6.1.A:** % de lyses par les cellules tueuses naturelles (NK) des souris adultes E : C=20 :1

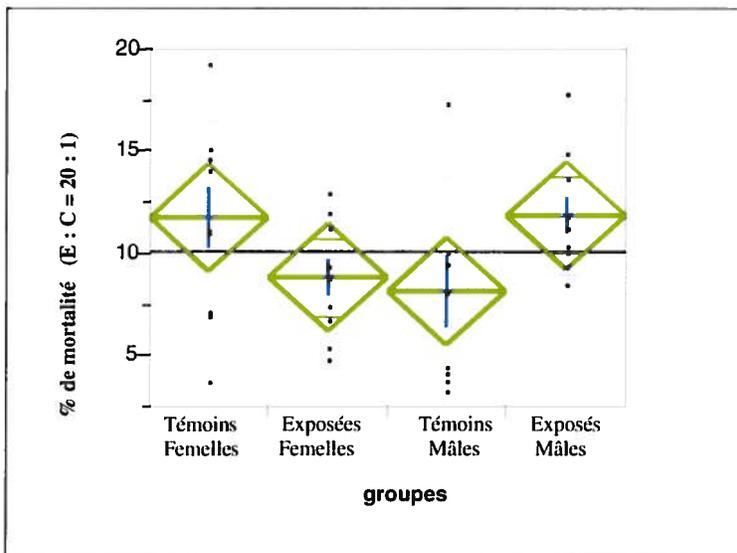


**Figure 3.3.6.1.B:** % de lyses par les cellules tueuses naturelles (NK) de souris adultes E : C =40 :1

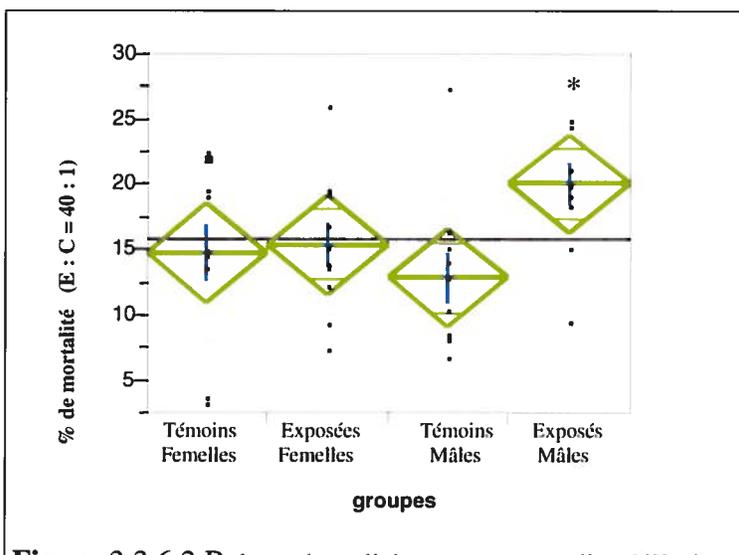
### 3.3.6.2 Souris juvéniles

On n'a pas observé de différences significatives pour l'activité des NK pour le paramètre (E : C = 20 : 1) chez les souris juvéniles femelles et mâles (Figure 3.3.6.2.A).

Pour le paramètre E : C = 40 : 1 (figure 3.3.6.2.B) on observe une différence significative ( $p=0,022$ ) entre le groupe témoin et le groupe exposé des souris juvéniles mâles dont les exposées au CTBT ont montré une activité de lyse de NK plus élevée que les témoins. Toutefois, on n'a pas noté pas de différence significative chez les souris adultes femelles, bien qu'on remarque une activité de lyse des NK plus élevées chez les témoins.



**Figure 3.3.6.2.A:** lyses des cellules tueuses naturelles (NK) de souris juvéniles

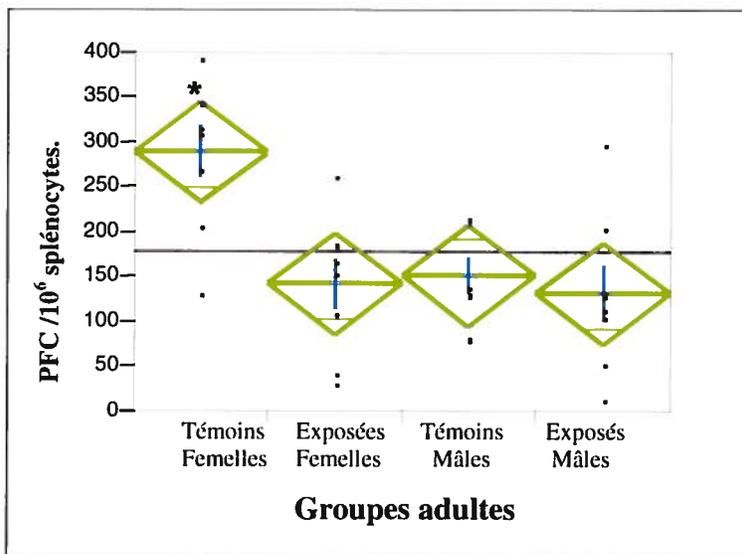


**Figure 3.3.6.2.B:** lyses des cellules tueuses naturelles (NK) de souris juvéniles

### 3.3.7 Détermination du nombre de cellules productrices d'anticorps (PFC)

#### 3.3.7.1 Souris adultes

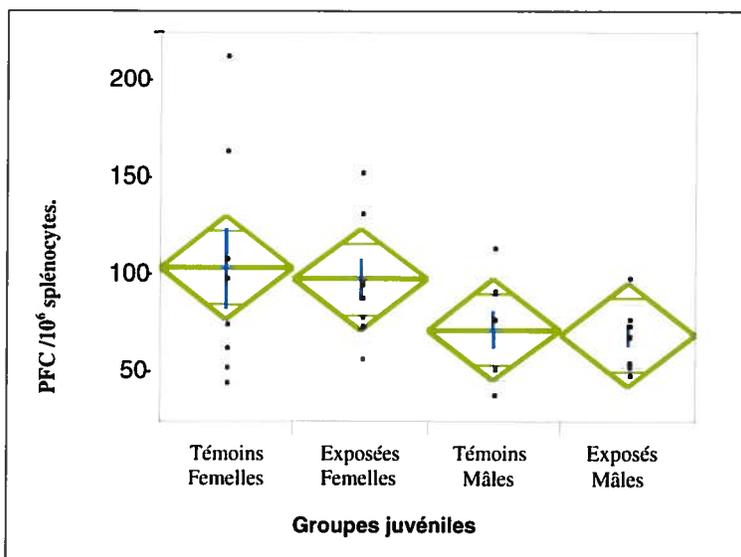
On observe un résultat statistiquement significatif ( $p=0,003$ ) pour le nombre de PFC chez les souris femelles adultes témoins comparées aux exposées au CTBT. Seules les souris femelles témoins ont eu un nombre élevé de PFC tandis qu'il est resté bas pour le reste des groupes, s'agissant des souris adultes femelles exposées et les mâles des deux groupes. On n'a pas noté de différence significative chez les souris adultes mâles exposées comparativement aux témoins. (figure 3.3.7.1).



**Figure 3.3.7.1** : nombre de cellules productrices d'anticorps PFC chez les souris adultes.

### 3.3.7.2 Souris Juvéniles

Aucune différence significative en nombre de PFC n'a été observée chez les souris juvéniles exposées au CTBT et les témoins.



**Figure 3.3.7.2**: nombre de cellules productrices d'anticorps PFC chez souris juvéniles exposées au CTBT.

## **Chapitre 4**

### **Discussion et conclusion**

## 4.1 Discussion

Étant donné l'objectif visé dans notre étude, à savoir celui d'évaluer les relations de cause à effet entre l'ingestion de poisson contaminé au CTBT et les changements engendrés au niveau du système immunitaire en fonction de l'âge, les résultats de nos tests utilisés pour évaluer l'immunotoxicité du CTBT chez les souris C57BL/6 adultes et juvéniles nous ont permis de déterminer la tendance immunotoxique de ce composé organostannique chez ces deux groupes d'âge de souris. La seule concentration de 400 µg/kg de nourriture utilisée et qui correspond à 57 µg /kg de poids corporel d'une souris adulte est au dessus du seuil de la dose journalière admissible de 0,25 µg/kg de poids corporel calculée à partir des études menées majoritairement chez des rats exposés à l'OTBT par voie orale.

Les données qui résultent de nos expériences n'ont montré aucun signe de morbidité ni de stress pour toutes les manipulations durant les expériences autant chez les souris adultes que chez les juvéniles.

Les gains de poids corporel chez les individus des groupes de souris étudiées présentaient une tendance généralement similaire, avec une différence entre les deux sexes de chacun des groupes mais pas entre les souris témoins et celles exposées. Le CTBT n'a pas eu réellement d'impact sur le gain de poids des deux groupes de souris adultes et juvéniles.

Pour la majorité des tests et le PFC, nos résultats n'ont donc pas montré de différences significatives pour le gain de poids chez les souris adultes entre les témoins et les exposées. Nous avons toutefois observé un effet inverse du CTBT sur le poids des souris des deux sexes autant chez les adultes que chez les juvéniles en fonction du temps.

Ces observations rejoignent celles rapportées par les travaux de Cooke *et al.* (2004) ayant administré différentes doses (0,025; 0,25 et 2,5mg/kg de poids corporel) de CTBT par gavage à des rats Sprague- Dawley femelles gravides, ainsi que les études de Kimura *et al.* (2005) qui ont exposé des souris gravides C57Bl/6 à 15 ou 50 µg du CTBT dans l'eau de boisson.

A la lumière des gains de poids, nous allons analyser les résultats des évaluations immunotoxiques du CTBT pour les différents paramètres mesurés.

Nos résultats suggèrent que le CTBT n'a pas affecté les poids des rates des souris adultes mâles et femelles. Par contre, seules les souris juvéniles mâles exposées présentaient un faible poids des rates comparativement aux témoins.

Bien que le thymus ait été rapporté par la majorité des études comme étant la cible principale des effets immunotoxiques du TBT, nos expériences n'ont montré aucune différence significative pour les poids des thymus entre les souris témoins et exposées adultes. Par contre, les souris juvéniles exposées ont présenté une faible baisse de poids des thymus comparativement aux témoins, bien qu'il n'y ait pas eu de différence significative entre les groupes. Ces résultats suggèrent que la faible concentration de CTBT (400 ug /kg de nourriture) dans notre expérience a pu affecter le poids des thymus des souris juvéniles.

Nos résultats chez les adultes ne concordent pas avec ceux de Vos *et al.*(1990) et Smialowicz *et al.*; (1989) qui ont noté une baisse du poids du thymus chez des rats adultes exposés dans leur diète à 2.5 mg/kg/poids corporel d' OTBT. Toutefois, nos observations chez les souris juvéniles rejoignent les résultats de précédents travaux de Seinen et Willems., (1976) qui ont déjà rapportées une sévère atrophie du thymus chez des rats sevrés (mâles et femelles) nourris dans leur diète à une concentration de 50 à 150 ppm de CDBT. Seinen *et al.* (1977 a) ont relevé une baisse de poids du Thymus (50-80% comparativement aux témoins). Nos résultats s'accordent également ceux de Tryphonas *et al.*, (2004) qui ont noté l'atrophie du thymus chez les jeunes rats exposés in utero et via le lait maternel. La baisse du poids des thymus chez les juvéniles dans notre étude peut être expliquée par les observations de Snoej *et al.*, (1988 a,b) qui ont mentionné que le CTBT exercerait un effet antiprolifératif à faible dose ou affecterait négativement le flux des cellules précurseurs des thymocytes depuis la périphérie ou leur maturation normale à l'intérieure du thymus (Penninks *et al.* 1985). D'autres auteurs ont plutôt privilégié la voie la voie de l'apoptose comme étant le mécanisme qui induirait la baisse de poids du thymus par inhibition sélective de la prolifération des thymocytes immatures en présence du TBT (Raffray et Cohen, 1991, 1993a,b ,1998 ; Gennari *et al.* 1997, 2000,2002).

En outre, la défense de l'hôte contre les infections bactériennes joue un important rôle dans l'immunité innée aux premiers stades de l'infection. L'augmentation de la réponse immunitaire peut provenir de l'activation des macrophages. L'évaluation du pouvoir

phagocytaire des macrophages spléniques dans notre étude n'a pas révélé de différences significatives entre Les témoins et les exposés aussi bien chez les femelles que les mâles adultes. Toutefois, l'activité de phagocytose de 1 ou 2 billes chez les souris juvéniles a été significativement stimulée chez les exposés au CTBT comparativement aux témoins des deux sexes. On a observé des résultats similaires pour la phagocytose de plus de trois billes chez les souris adultes. Nos résultats ne concordent pas avec les observations de Vos *et al.*, (1984) qui ont rapporté une baisse de l'activité phagocytaire (20-30%) des macrophages spléniques chez des rats exposés à 80 ppm d'OTBT dans leur diète. Par contre, Kimura *et al.*(2005) N'ont pas observer de différence d'activité phagocytaire chez des souriceaux exposés à différentes doses (15 µg , 50 µg) de CTBT via le lait maternel.

Bien que Kiergosen *et al.* ((1998) ont noté une augmentation de l'activité sécrétrice des macrophages péritonéaux exposés *in vitro* respectivement à l'OTBT et le CTBT nous disposons de peu de données de littérature qui élucideraient les effets du TBT sur les fonctions des macrophages

Dans l'ensemble de nos résultats, la stimulation mitogénique des splénocytes n'a pas montré de différences significatives aussi bien chez les adultes que chez les juvéniles pour le pouvoir mitogénique de la CON A sur les lymphocytes T que celui du LPS sur les cellules B. Toutefois, les adultes mâles exposés ont montré une stimulation significative de la lymphoprolifération des lymphocytes T en présence de la CON A. Chez les juvéniles, la réponse lymphoproliférative à la CON A était très faible chez les deux sexes. Nos observations rejoignent celles rapportées par Vos *et al.*, (1990) chez des rats sevrés exposés dans leur diète pendant deux ans à différentes concentrations d'OTBT ( 0, 0,5, 5 ou 50 mg /kg de nourriture).

Nos résultats s'expliqueraient par l'âge des souris et la dose de TBT utilisée dans notre expérience et certains facteurs intrinsèques qui interviennent dans la stimulation des lymphocytes. Corbeil et Melcher, (1983) ont rapporté que les activités stimulatrices de la CON A et du LPS requièrent l'implication de certaines fonctions macrophagiques dont l'interleukine1 qui va favoriser la sécrétion de l'interleukine2 activatrice des lymphocytes. Par ailleurs, une étude plus récente de Nielsen et Rasmussen ( 2004) a confirmé l'inhibition de la lymphoprolifération par le TBT en exposant des lymphocytes humains *in vitro* à 10 nmol de CTBT. Mais le mécanisme par le quel se produit cette

inhibition n'a pas encore été élucidé. La voie, la durée d'exposition et le type de rongeur utilisé expliqueraient les différences de résultats observés entre les nôtres et ceux des autres chercheurs.

L'évaluation de la fonction immunitaire de défense de l'organisme contre les tumeurs et les infections virales a montré que le CTBT a entraîné une baisse de l'activité des cellules tueuses (NK) sur les YAC-1, particulièrement chez les souris adultes pour les deux rapports (E:C=20:1 ou E:C=40:1) sans différence significative entre les femelles témoins et les exposées, tandis que les mâles exposés ont eu une augmentation de l'activité des cellules tueuses comparativement aux témoins. Toutefois, les souris juvéniles ont présenté une activité des cellules NK à l'opposé de celle des adultes. Nous n'avons pas noté de différence dans l'activité des NK chez les souris juvéniles femelles témoins par rapport aux exposées pour les deux rapports (20:1 et 40:1) contrairement aux souris juvéniles mâles exposées dont l'augmentation de l'activité de lyse des NK a été significative pour les deux ratios.

Nos résultats chez les adultes ne sont pas conformes à ceux de précédentes études de Smialowicz et al., (1989) où l'activité des NK n'a pas été affectée les adultes et non plus avec ceux de Triphonas *et al.*(2004) qui ont plutôt montré une augmentation de cette activité de manière dose- dépendante. D'autres chercheurs ont également rapporté une baisse de l'activité des NK en présence du TBT (Smialowicz *et al.* 1989 ; Van Loveren *et al.*,1990 ; Vos *et al.*, 1984 , 1990). Ces résultats pourraient s'expliquer par la capacité lytique des cellules NK face aux tumeurs chez les murins *in vitro* et *in vivo* (Ghoneum *et al.* 1990) et chez l'humains *in vitro* ont montré une inhibition de l'activité de ces cellules tueuses en présence du TBT (Whalen *et al.* 1999, 2002 a, b ; Wilson *et al.* 2004 ; Dudimah *et al.* 2007 a ,b). Toutefois nos résultats chez les adultes décelant une inhibition de l'activité lytique des cellules NK concordent bien avec ceux des tests menés par la majorité certains auteurs pour expliquer le mécanisme par lequel l'exposition au TBT entraînerait la baisse de fonction immunitaire des cellules NK, Thomas *et al.* (2004). Ils ont noté une baisse significative dans la phosphorylation de CREB suite à l'exposition des cellules NK à 300nM de TBT. Dudimah *et al.* (2007 a, b) ont suggéré, quant à eux, la baisse du niveau de l'ATP cellulaire comme étant le mécanisme responsable de la perte

de fonction cytolytique des cellules NK en présence du TBT. Les divergences de nos résultats par rapport à ceux des autres auteurs résideraient dans le protocole expérimental utilisé, en l'occurrence la souche de rongeur, la concentration et le dérivé de TBT utilisé ainsi que la voie et la durée d'exposition au toxique.

Contrairement aux observations de Smialowicz *et al.* (1989, 1990) qui ont rapporté une augmentation du nombre des plages de lyse chez des rats Fischer adultes exposés par gavage à l'OTBT, nos résultats ont présenté plutôt une baisse du nombre de plages de lyse chez les souris adultes exposés au CTBT. Nous avons toutefois noté une différence hautement significative entre les femelles exposées et leurs témoins. Aucune stimulation de la formation des plages de lyse (PFC) n'a été observée chez les juvéniles, autant chez les mâles que chez les femelles, et pas de différence statistiquement significative entre les témoins et les exposés. Nous ne saurons comment expliquer cette différence de réponse entre les femelles adultes témoins et exposées mais la différence qui existe entre nos résultats et ceux de Smialowicz serait attribuable à la méthodologie utilisée. Très peu de travaux ont été menés l'activité du TBT sur le PFC afin de nous permettre une meilleure interprétation de nos résultats.

## 4.2 Conclusions

La majorité des études de toxicité du TBT ont rapporté que le système immunitaire est la principale cible des effets de cette substance organostannique. Ces différents effets notés sur les fonctions immunitaires ont servi de support pour l'analyse de nos résultats.

L'exposition des souris adultes et juvéniles C57BL/6 femelles et mâles à la seule concentration de 400 µg CTBT/kg de nourriture a montré une immunomodulation de certains paramètres mesurés.

Comparativement à ce qui a été rapporté par d'autres auteurs, nos résultats s'expliqueraient par la faible concentration de CTBT que nous avons utilisée pour notre expérience, la sensibilité entre les souris adultes et juvéniles face à cette substance et la durée d'exposition. Le métabolisme du TBT par les différents types de rongeurs serait la principale raison qui soutient cette différence de réponse observée.

En perspective, compte tenu des résultats de nos études, il est souhaitable que d'autres recherches soit entreprises utilisant la même concentration environnementale de TBT contenu dans le poisson (400 ug de CTBT /kg de nourriture) sur une durée plus longue allant de trois mois à deux ans, utilisant les différents groupes d'âges (adultes, juvéniles et *in utero*) et tenant compte des mêmes conditions expérimentales que nous avons utilisées. Ces données permettront de mieux apprécier l'impact des effets de la consommation de poisson contaminé au TBT sur le système immunitaire dans le but d'établir un seuil de DJA et des bases pour l'évaluation de risques liés à la consommation de poissons chez les populations se nourrissant en majeure partie de produits halieutiques contaminés par cette substance.

## Bibliographie

Anderson D.P. et M.G. Zeeman. 1995. Immunotoxicology in fish in Fundamentals of aquatic toxicology :effects, environmental fate and risk assessment. 2<sup>nd</sup> edition 1995. 1125 p. Taylor and Francis Ltd, UK., Vol.12, p. 371-397.

Anderson, J. M. et J. J. Langone. 1999. Issues and perspectives on the biocompatibility and immunotoxicity evaluation of implanted controlled release systems. Journal of Controlled Release, vol.57no.2, p.107-113.

Arnold, D.L., F. Bryce, D. Miller, R. Stapley, S. Malcolm, et S. Hayward. 1998 a. The toxicological effects following the ingestion of chinook salmon from the Great Lakes by Sprague-Dawley rats during a two-generation feeding-reproduction study. Regul Toxicol Pharmacol, vol. 27, p.18-27.

Arnold, D.L., R. Stapley, F. Bryce, et D. Mahon. 1998 b. A multigeneration study to ascertain the toxicological effects of Great Lakes salmon fed to rats: study overview and design. Regul Toxicol Pharmacol, vol 27, p.1-7.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1992. Toxicological profile for tin. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

ATSDR. 2005. Toxicological profiles for tin and compounds. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA: U.S department of Health and Human Services, Public Health Services, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>.

Austen M.C. et A.J. McEvoy. 1997. Experimental effects of tributyltin (TBT) contaminated sediment on a range of meiobenthic communities. Environ Pollut. vol. 96, no.3, p.435-444.

Bach, J.F. et L Chatenoud. 2002. Immunologie 4<sup>e</sup> édition. Medecine-Sciences, Flammarion

Bailey, S.K. et I.M. Davies. 1988. Tributyltin contamination around an oil terminal in Sullom Voe (Shetland). Environ Pollut., vol.55no.3, p.161-172.

Bailey, S.K. et I.M Davies. 1989. The effects of tributyltin on dogwhelks (Nucella

lapillus) from Scottish coastal waters. Journal of the Marine Biology Association UK., vol.69, p. 335–354.

Baken KA, J. Arkusz, J.L. Pennings, R.J. Vandebriel et H. van Loveren. 2007 a  
In vitro immunotoxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) studied by  
toxicogenomics. Toxicology, Vol.237,no.1-3, p.35-48.

Baken KA, R.J. Vandebriel, J.L. Pennings, J.C Kleinjans et H.van Loveren. 2007 b  
Toxicogenomics in the assessment of immunotoxicity. A review. Methods, Vol.41,  
no.1, p.132-41.

Belfroid, A.C., Purperhart, M. et F. Ariese. (2000) Organotin levels in seafood.  
Marine Pollution Bulletin, vol 40, no.3, p. 226-232

Bellas, J. 2006. Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos  
and larvae of marine invertebrates. Sci Total Environ, vol. 367, p. 573-585.

Bellas, J., A. Hilvarsson, et A. Granmo. 2005. Sublethal effects of a new antifouling  
candidate on lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)  
larvae. Biofouling, vol. 21, p. 207-216.

Belles-Isles M, Ayotte P, Dewailly E, J.P. Weber et R. Roy . 2002. Cord blood  
lymphocyte functions in newborns from a remote maritime population exposed to  
organochlorines and methylmercury. J Toxicol Environ Health A, vol. 25;65, no.2, p. 165-  
182.

Benya, T.J. 1997. Bis(tributyltin) oxide toxicology. Drug Metab Rev, vol.29,  
p.1189-1284.

Bernier, J., P. Brousseau, K. Krzystyniak, H. Tryphonas, et M. Fournier. 1995.  
Immunotoxicity of heavy metals in relation to Great Lakes. Environ Health  
Perspect vol.103, no.9, p. 23-34.

Blaney, S., M. Thibault et D. Gauvin. 1997. Synthèse de la contamination du poisson  
du fleuve Saint-Laurent et évaluation des risques à la santé. Centre de santé publique  
de Québec, Québec, 111 pages.

Blunden S.J. et A.H. Chapman 1983. The environmental degradation of organotin  
compounds. A review. Environ.Technol. Lett., vol.3 p. 267-272.

Belles-Isles M, Ayotte P, Dewailly E, Weber JP, Roy R . 2002. Cord blood

lymphocyte functions in newborns from a remote maritime population exposed to organochlorines and methylmercury. J Toxicol Environ Health A. vol. 25; 65, no. 2, p.165-182.

Birchenough A.C., N. Barnes, S.M. Evans, H. Hinz, I. Kronke et C. Moss. 2002. A review and assessment of tributyltin contamination in the North Sea, based on surveys of butyltin tissue burdens and imposex/intersex in four species of neogastropods. Mar Pollut Bull, vol. 44, no.6, p.534-543.

\*\*Blunsen et Chapman, 1983

Bouchard, B., C.J. Ormandy, J.P. Di Santo, et P.A. Kelly. 1999. Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice. J Immunol, vol.163, p.576-182.

Boyer, I.J. 1989. Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. Toxicology, vol.55, p. 253-298.

Brousseau, P., M. Dunter, P. Deschaux, S. de Guise, K. Krzystyniak et M. Fournier. 1997. Marqueurs immunologiques. Dans : biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. Edit. Masson, Paris, vol.13, p. 287-314.

Brousseau, P., Y. Payette, H. Tryphonas, B. Blackey, H. Boermans, D. Flipo et M. Fournier. 1998. Manual of immunological methods, Boston, CRC Press, 149 pages.

Brown S.L, et S.L. Morrison. 1989. Regulation of the production of secretory and membrane immunoglobulin during lymphocyte development. Clin Immunol Immunopathol, vol. 50 no.2, p.155-170.

Catlin R., H. Shah, A.D. Bankhurst et M.M. Whalen. 2005. Dibutyltin exposure decreases granzyme B and perforin in human natural killer cells. Environ Toxicol Pharmacol., vol. 20 p.395–403.

Chang, L., G.A. Gusewitch, D.B. Chritton, J.C. Folz, L.K. Lebeck, et S.L. Nehlsen-Cannarella. 1993. Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity. J Immunol Methods, vol. 166 p. 45-54.

Chimini G. et P. Chavrier. 2000 Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. Centre d'Immunologie INSERM-CNRS de Marseille-Luminy, Nat Cell Biol.vol.2 no.10, p.191-196

- Cima, F. et L. Ballarin. 2004. Tributyltin-sulfhydryl interaction as a cause of immunotoxicity in phagocytes of tunicates. Ecotoxicol Environ Saf, vol. 58, p. 386-395.
- Cima, F., M.G. Marin, V. Matozzo, L. Da Ros, et L. Ballarin. 1998. Immunotoxic effects of organotin compounds in *Tapes philippinarum*. Chemosphere, vol. 37, p. 3035-3045.
- Clark, D.A., J. Gauldie, M.R. Szewczuk, et G. Sweeney. 1981. Enhanced suppressor cell activity as a mechanism of immunosuppression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Proc Soc Exp Biol Med, vol. 168, p. 290-299.
- Cooke, G. M., Tryphonas, H., Pulido, O., Caldwell, D., Bondy, G. S. et D. Forsyth., 2004. Oral (gavage), in utero and postnatal exposure of Sprague-Dawley rats to low doses of tributyltin chloride. Part 1: Toxicology, histopathology and clinical chemistry. Food and Chemical Toxicology, vol. 42, no.2, p.211-220
- \*Corbeil et Melcher, 1983
- \*Cunningham et Szenberg, 1998
- Davies, A.G. et Smith P.J. 1980. Recent advances in organotin chemistry. Advances in organotin chemistry and radiochemistry, vol. 23, p. 1-77
- Dean, J. H. 1994. Immunotoxicology: An overview. Toxicology in Vitro, vol. 8, no.5, p. 933-937.
- Descotes, J. 2000. Autoimmunity and toxicity testing. Toxicol Lett vol.112-113, p. 461-465.
- Descotes, J., G. Choquet-Kastylevsky, E. Van Ganse, et T. Vial. 2000. Responses of the immune system to injury. Toxicol Pathol vol. 28, p. 479-481.
- Dewailly, E., P. Ayotte, S. Bruneau, S. Gingras, M. Belles-Isles, and R. Roy. 2000. Susceptibility to infections and immune status in Inuit infants exposed to organochlorines. Environ Health Perspect vol. 108, p. 205-211.

Dewailly, É., C. Laliberté, G. Lebel, P. Ayotte, J.-P. Weber, and B. Holub. 1998. Évaluation de l'exposition prénatale aux organochlorés, aux métaux lourds et aux acides gras oméga-3 des populations de la Moyenne et de la Basse-Côte-Nord du Saint-Laurent (St. Lawrence Vision 2000 Report).

Dhabhar, F. S. 2000 a. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity. The role of stress hormones and leukocyte trafficking. Ann NY Acad Sci, vol. 917, p. 876-893.

Dhabhar, F. S. A. R. Satoskar, H. Bluethmann, J. R. David et B. S McEwen. 2000 b. Stress-induced enhancement of skin immune function: A role for gamma interferon. Proc Natl Acad Sci, U S A. vol. 97, no. 6, p. 2846-2851

Dougherty, C. P., S. H. Holtz, J.C. Reinert, L. A. Panyacosit, A. Daniel., et T. J. Woodruff,. 2000 Dietary Exposures to Food Contaminants across the United States. Environmental Research vol. 84, no. 2, p. 170-185.

Dudimah, F.D., C. Gibson, et M.M. Whalen. 2007 a. Effect of dibutyltin on ATP levels in human natural killer cells. Environ Toxicol. vol. 22, p. 117-123.

Dudimah, F.D., S.O. Odman-Ghazi, F. Hatcher, et M.M. Whalen. 2007 b. Effect of tributyltin (TBT) on ATP levels in human natural killer (NK) cells: relationship to TBT-induced decreases in NK function. J Appl Toxicol vol. 27, p. 86-94.

Elferink, J.G., M. Deierkauf, et J. Van Steveninck. 1986. Toxicity of organotin compounds for polymorphonuclear leukocytes: the effect on phagocytosis and exocytosis. Biochem Pharmacol vol. 35, p. 3727-3732.

Environnement Canada. 1992. Canadian water quality guideline for organotins. Environment Canada, Ottawa, scientific series, 191p.

Environnement Canada. 1996 a. L'état de l'environnement au Canada. ISBN 0-660-95212-2 No de cat. En21-54/1996F-IN; www.environment-canada.ca/.../1996report/default.cfm -

Environnement Canada, 1996, b. Rapport-synthèse sur l'état du Saint-Laurent. Éditions MultiMondes, Sainte-Foy, 2 vol., pagination multiple, 200 fig., 119 tabl., 121 × 27,5 cm, ISBN 2-921146-26-6 (vol. 1) et ISBN 2-921146-27-4 (vol. 2).

Environmental Health Criteria 15. 1980. Tin and organotin compounds. World Health Organization Geneva, 1980. ISBN 92 4 154075 3.  
[www.inchem.org/documents/.../ehc015.htm](http://www.inchem.org/documents/.../ehc015.htm)

Environmental Health criteria 116, 1990. World Health Organization Geneva, 1990. [www.inchem.org/documents/.../ehc116.htm](http://www.inchem.org/documents/.../ehc116.htm)

Evans JG, K.A. Chavez-Rueda, A. Eddaoudi, A. Meyer-Bahlburg, D.J. Rawlings, M.R. Ehrenstein et Mauri C. 2007. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. J Immunol. Vol.15; 178, no.12, p.7868-7878.

Evans W.H., N.F. Cardelli et D.J. Smith. 1979. Accumulation and excretion of [ $^{14}\text{C}$ ] bis(tri-n-butyltin) Oxide in mice. Journal of toxicology vol 5, p. 871-877

Feeley, M. M. et J.A. Scott. 1998 a. Dietary and Tissue Residue Analysis and Contaminant Intake Estimations in Rats Consuming Diets Composed of Great Lakes Salmon: A Multigeneration Study. Regulatory Toxicology and Pharmacology, vol. 27, no.1, p.8-17.

Feeley, M. M., J., A. Scott. et G. P, Andrew. 1998 b. The Health Canada Great Lakes Multigeneration Study--Summary and Regulatory Considerations. Regulatory Toxicology and Pharmacology, vol. 27, no.1, p. 90-98.

Flint MS, et S.S. Tinkle. 2001. C57BL/6 mice are resistant to acute restraint modulation of cutaneous hypersensitivity. Toxicol Sci., vol. 62, no 2, p.250-256

Fournier, M., V. Degas, T. Colborn, F.O. Omara, F. Denizeau, E.F. Potworowski, et P. Brousseau. 2000. Immunosuppression in mice fed on diets containing beluga whale blubber from the St Lawrence estuary and the Arctic populations. Toxicol Lett., vol. 112-113, p. 311-317.

Funahashi, N., I. Iwasaki, and G. Ide. 1980. Effects of bis (tri-n-butyltin) oxide on endocrine and lymphoid organs of male rats. Acta Pathol Jpn, vol 30, p. 955-966.

Gennari A, M. W. Bol, Seinen, A. Penninks et R. Pieters. 2002. Organotin-induced apoptosis occurs in small CD4(+)CD8(+) thymocytes and is accompanied by an increase in RNA synthesis. Toxicology, Vol.175, no.1-3, p.191-200.

Gennari A, M. Potters, W. Seinen et R Pieters. 1997. Organotin-induced apoptosis as observed in vitro is not relevant for induction of thymus atrophy at antiproliferative doses. Toxicol Appl Pharmacol., vol.147, no.2, p.259-266.

Gennari A, B. Viviani, C.L. Galli, M. Marinovich, R. Pieters, et E. Corsini. 2000. Organotins induce apoptosis by disturbance of  $[Ca^{2+}]_i$  and mitochondrial activity, causing oxidative stress and activation of caspases in rat thymocytes. Toxicol Appl Pharmacol., vol.2, p.185-190.

Gobeil F, W. X.K. Neugebauer, Nguyen-Le, S. Nea Allogho, L.H. Pheng, D. Blouin, E.T. Whalley et D. Regoli. 1997. Pharmacological profiles of the human and rabbit B1 receptors. Can J Physiol Pharmacol. vol.75, no.6 p.591-595.

Goldsby RE, J.G. Morgan, M.J. Egger et J. Feusner. 1997. Lymphoblast morphology in predicting leukemic meningeal relapse with low chamber count and lymphoblasts. Med Pediatr Oncol., Vol. 292, p.98-102.

Grinwis, G. C. M., Boonstra, A., van den Brandhof, E. J., Dormans, J. A. M. A., Engelsma, M., Kuiper, R. V., van Loveren, H., Wester, P. W., Vaal, M. A., Vethaak, A. D., et Vos, J. G. 1998. Short-term toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide in flounder (*Platichthys flesus*): Pathology and immune function. Aquatic Toxicology, vol. 42, no.1, p.15-36.

Hagmar, L., T. Hallberg, M. Leja, A. Nilsson, et A. Schutz. 1995. High consumption of fatty fish from the Baltic Sea is associated with changes in human lymphocyte subset levels. Toxicol Lett., vol. 77, p. 335-342.

Harino, H., M. Fukushima, Y. Yamamoto, S. Kawai, et N. Miyazaki. 1998a. Organotin compounds in water, sediment, and biological samples from the port of Osaka, Japan. Arch Environ Contam Toxicol., vol. 35, p. 558-564.

Harino H, M. Fukushima, Y. Yamamoto, S. Kawai et N. Miyazaki. 1998b. Contamination of butyltin and phenyltin compounds in the marine environment of Otsuchi Bay, Japan. Environ Pollut., vol.101, no.2, p. 209-214.

Horiguchi T. 2006 a. Masculinization of female gastropod mollusks induced by organotin compounds, focusing on mechanism of actions of tributyltin and triphenyltin for development of imposex .Review. Environ Sci. vol.13, no.2, p.77-87.

Horiguchi T, M. Kojima, F. Hamada, A. Kajikawa, H. Shiraishi, M. Morita et M. Shimizu. 2006 b. Impact of tributyltin and triphenyltin on ivory shell (*Babylonia japonica*) populations. Environ Health Perspect., Vol. 114, no.1, p.13-19.

HSDB. 2000. Bis((tributyltin) oxide. Hazardous substances data bank, National Library of Medicine, <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>.

HSDB. 2002. Bis(tributyltin) oxide. Hazardous Substances Data Bank, National Library of Medicine, <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>.

HSDB 2003. Bis(tributyltin) oxide. Hazardous Substances Data Bank, National Library of Medicine, <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>.

Humpel M., G. Kuhne, U. Tauber and P.E Schulze. 1986 - Studies on the kinetics of bis(tris-n-butyl-113tin) oxide (TBOT). Toxicology and analytics of the tributyltins - The present status. Berlin, ORTEP, p. 122-142.

INERIS 2005. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, Oxyde de tributyl étain INERIS -DRC-02-25590-02DF52.doc . Version n°2

INRS 1997. Fiche toxicologique n°173 - Oxyde de bis(tributyl)étain. Institut National de Recherche et de Sécurité, <http://www.inrs.fr/index fla.html>.

International Convention on the Control of Harmful Antifouling Systems 2001. Référence : [www.imo.org](http://www.imo.org)

IPCS INCHEM. 1999 Home Concise International Chemical Assessment Document 13 Triphenyltin ... The International Programme on Chemical Safety (IPCS), [www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad13.htm](http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad13.htm) - 216k -

Jorundsdottir, K., J. Svavarsson, et K.M. Leung. 2005. ImPOSEX levels in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.)--continuing improvement at high latitudes. Mar Pollut Bull., vol. 51, p. 744-749.

Kannan, K., N. Kajiwara, M. Watanabe, H. Nakata, N.J. Thomas, M. Stephenson, D.A. Jessup, et S. Tanabe. 2004. Profiles of polychlorinated biphenyl congeners, organochlorine pesticides, and butyltins in southern sea otters and their prey. Environ Toxicol Chem., vol. 23, p. 49-56.

Kergosien, D.H. and C.D. Rice. 1998. Macrophage secretory function is enhanced by low doses of tributyltin-oxide (TBTO), but not tributyltin-chloride (TBTCI). Arch Environ Contam Toxicol., vol. 34, p. 223-228.

Kimura, K., K. Kobayashi, H. Naito, Y. Suzuki, et Y. Sugita-Konishi. 2005. Effect of lactational exposure to tributyltin chloride on innate immunodefenses in the F1 generation in mice. Biosci Biotechnol Biochem., vol. 69, p. 1104-1110.

Kosatsky, T., B. Shatenstein, R. Przybysz, S. Lussier-Cacan, J.P. Weber, R. Larue, et B. Armstrong 1998. Risques et bénéfices de la consommation du poisson de pêche sportive dans le fleuve Saint-Laurent. Direction de la santé publique de Montréal-Centre, 602 p.

Kouassi, E. 2003. Immunotoxicologie ; In Environnement et santé publique; fondements et pratiques, Edisem 2003. inc, Edition TEC and DOC Canada p. 680-690.

Krajnc, E.I., P.W. Wester, J.G. Loeber, F.X. van Leeuwen, J.G. Vos, H.A. Vaessen, et C.A. van der Heijden. 1984. Toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide in the rat. I. Short-term effects on general parameters and on the endocrine and lymphoid systems. Toxicol Appl Pharmacol., vol. 75, p. 363-386.

Krzystyniak, K., H. Tryphonas, et M. Fournier. 1995. Approaches to the evaluation of chemical-induced immunotoxicity. Environ Health Perspect vol.103, no 9, p. 17-22.

Lee CC, T. Wang, C.Y Hsieh et C.J. Tien. 2005. Organotin contamination in fishes with different living patterns and its implications for human health risk in Taiwan. Department of Environmental and Occupational Health, Medical College, National. Environ Pollut., Vol.137, no 2, p.198-208.

Li Z, F. Pradera, T. Kammertoens, B. Li, S. Liu et Z. Qin. 2007 Cross-talk between T cells and innate immune cells is crucial for IFN-gamma-dependent tumor rejection. J Immunol., Vol. 179, no 3, p.1568-1576.

Luebke, R.W., D.H. Chen, R. Dietert, Y. Yang, M. King, et M.I. Luster. 2006. The comparative immunotoxicity of five selected compounds following developmental or adult exposure. J Toxicol Environ Health B Crit Rev., vol.9, p.1-26.

- Maguire R.J., R.J Tkacz., Y.K., Chau G.A., Bengert et P.T.S. Wong 1986. Occurrence of organotin compounds in water and sediments in Canada, Chemosphere, vol 15, p. 253-260.
- Nielsen, J.B. et T.H. Rasmussen. 2004. Antiproliferative effect of butyltin in MCF-7 cells. Environ Res vol. 96, p. 305-310.
- Oliveira SJ, R.L. Mamoni, C.C. Musatti, P.M. Papaiordanou et M.H. Blotta. 2002 Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. Microbes Infect., Vol.4, no 2, p.139-144.
- OMS IPCS 1990 -: Tributyltin compounds. World Health Organisation, International Programme on chemical Safety. Environmental Health Criteria n.116 <http://www.inchem.org/fullist.htm>.
- Oshima, M., M. Hayakari, J.L. Middlebrook, et M.Z. Atassi. 1997. Immune recognition of botulinum neurotoxin type A: regions recognized by T cells and antibodies against the protective H(C) fragment (residues 855-1296) of the toxin. Mol Immunol., vol. 34, p.1031-1040.
- Penninks, A.H. 1993. The evaluation of data-derived safety factors for bis(tri-n-butyltin)oxide. Food Addit Contam., vol. 10, p. 351-361.
- Penninks, A., F. Kuper, B.J. Spit, et W. Seinen. 1985. On the mechanism of dialkyltin-induced thymus involution. Immunopharmacology., .vol.10, p. 1-10.
- Penninks, A.H. et W. Seinen. 1980. Toxicity of organotin compounds. IV. Impairment of energy metabolism of rat thymocytes by various dialkyltin compounds. Toxicol Appl Pharmacol, vol.56, p. 221-31.
- Penninks, A.H. 1993. The evaluation of data-derived safety factors for bis(tri-n-butyltin)oxide. Food Addit Contam vol. 10: 351-361.
- Penninks, A.H. et W. Seinen. 1984. Mechanisms of dialkyltin induced immunopathology, vol. 6, p. 209-215.
- Raffray, M. et G.M. Cohen. 1991 a. Bis(tri-n-butyltin)oxide induces programmed cell death (apoptosis) in immature rat thymocytes. Arch Toxicol., vol. 65, p. 135-

139.

Raffray, M. et G.M. Cohen. 1993. Thymocyte apoptosis as a mechanism for tributyltin-induced thymic atrophy in vivo. Arch Toxicol, vol. 67, p. 231-236.

Raffray, M. et G.M. Cohen. 1998. Re: Organotin-induced apoptosis as observed in vitro is not relevant for induction of thymic atrophy at antiproliferative doses. (Article No. TO978265). Toxicol Appl Pharmacol., vol. 153: 136-138.

Raffray, M., D. McCarthy, R.T. Snowden, et G.M. Cohen. 1993 b. Apoptosis as a mechanism of tributyltin cytotoxicity to thymocytes: relationship of apoptotic markers to biochemical and cellular effects. Toxicol Appl Pharmacol., vol. 119, p. 122-130.

Rice, C.D., M.M. Banes, et T.C. Ardelt. 1995. Immunotoxicity in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, following acute exposure to tributyltin. Arch Environ Contam Toxicol., vol. 28, p. 464-470.

Saint- louis, R. C. Gobeil, et E. Pelletier. 1997. Tributyltin and its degradation products in the St. Lawrence Estuary\_Canada.. Environ Technol., Vol.18, p.1209-1218.

Saint- louis, R. S.J. de Mora, Pelletier E et al, 1997. Recent butyltin contamination in Beluga whales *Delphinapterus leucas*. from the St. Lawrence Estuary and Northern Quebec. Canada. Appl Organomet Chem.

Saint -Jean S.D., S.C. Courtenay, E. Pelletiere et R Saint-Louis. 1999. Butyltin concentrations in sediments and blue mussels *Mytilus edulis* of the southern Gulf of St. Lawrence, Canada. Environ Technol. Vol.20, p.181-189.

Santé Canada. 2003. Examen spécial des peintures antisalissures à base d'organoétain pour les coques de navires. Annonce SRA2000-01.

Santos, M.M. 2006. Comments to "Imposex in Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus (Gastropoda: Muricidae) from the Ria Formosa Lagoon (Algarve coast-southern Portugal)". Mar Pollut Bull.

Santos, M.M., J. Micael, A.P. Carvalho, R. Morabito, P. Booy, P. Massanisso, M.

Lamoree, et M.A. Reis-Henriques. 2006. Estrogens counteract the masculinizing effect of tributyltin in zebrafish. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol., vol. 142, p. 151-155.

Santos, M.M., M.A. Reis-Henriques, M.N. Vieira, and M. Sole. 2006. Triphenyltin and tributyltin, single and in combination, promote imposex in the gastropod *Bolinus brandaris*. Ecotoxicol Environ Saf., vol.64, p. 155-162.

Schweinfurth H.1985 - Toxicology of tributyltin compounds. Tin Uses, Vol 43, 9-

Schering,1989. TBTO-4 week oral (diatary administration) toxicity study in the rat. Bergkamen, Federal Republic of Germany Schering Inc. Report No.280118 by Hazelton, France, Study No.14/502.

Seinen, W. et A. Penninks. 1979 a. Immune suppression as a consequence of a selective cytotoxic activity of certain organometallic compounds on thymus and thymus-dependent lymphocytes. Ann N Y Acad Sci., vol. 320, p. 499-517.

Seinen, W., J.G. Vos, R. Brands, et H. Hooykaas. 1979 b. Lymphocytotoxicity and immunosuppression by organotin compounds. Suppression of graft-versus-host reactivity, blast transformation, and E-rosette formation by di-n-butyltindichloride and di-n-octyltindichloride. Immunopharmacology vol. 1, p. 343-355.

Seinen, W., J.G. Vos, R. van Krieken, A. Penninks, R. Brands, et H. Hooykaas. 1977 a. Toxicity of organotin compounds. III. Suppression of thymus-dependent immunity in rats by di-n-butyltindichloride and di-n-octyltindichloride. Toxicol Appl Pharmacol., vol. 42, p. 213-224

Seinen, W., J.G. Vos, I. van Spanje, M. Snoek, R. Brands, et H. Hooykaas. 1977 b. Toxicity of organotin compounds. II. Comparative in vivo and in vitro studies with various organotin and organolead compounds in different animal species with special emphasis on lymphocyte cytotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol., vol. 42, p.197-212.

Seinen W et M.I. Willems. 1976. Toxicity of organotin compounds. I. Atrophy of thymus and thymus-dependent lymphoid tissue in rats fed di-n-octyltindichloride. Toxicol Appl Pharmacol., vol.35, no1, p.63-75.

- Smialowicz, R.J., M.M. Riddle, R.R. Rogers, R.W. Leubke, C.B. Copeland, and G.G. Ernst. 1990. Immune alterations in rats following subacute exposure to tributyltin oxide. Toxicology, vol. 64: 169-78.
- Smialowicz, R.J., M.M. Riddle, R.R. Rogers, R.W. Luebke, et C.B. Copeland. 1989. Immunotoxicity of tributyltin oxide in rats exposed as adults or pre-weanlings. Toxicology, vol. 57, p. 97-111.
- Smialowicz, R.J., M.M. Riddle, R.R. Rogers, D.G. Rowe, R.W. Luebke, L.D. Fogelson, et C.B. Copeland. 1988. Immunologic effects of perinatal exposure of rats to dioctyltin dichloride. J Toxicol Environ Health, vol. 25, p. 403-422.
- Snoeij, N.J., M. Bol-Schoenmakers, A.H. Penninks, et W. Seinen. 1988a. Differential effects of tri-n-butyltin chloride on macromolecular synthesis and ATP levels of rat thymocyte subpopulations obtained by centrifugal elutriation. Int J Immunopharmacol., vol.10, p. 29-37.
- Snoeij, N.J., A.H. Penninks, et W. Seinen. 1987. Biological activity of organotin compounds--an overview. Environ Res, vol. 44, p. 335-353.
- Snoeij, N.J., A.H. Penninks, et W. Seinen. 1988b. Dibutyltin and tributyltin compounds induce thymus atrophy in rats due to a selective action on thymic lymphoblasts. Int J Immunopharmacol., vol 10, p. 891-899.
- Snoeij, N.J., A.A. van Iersel, A.H. Penninks, et W. Seinen. 1985. Toxicity of triorganotin compounds: comparative in vivo studies with a series of trialkyltin compounds and triphenyltin chloride in male rats. Toxicol Appl Pharmacol vol. 81, p. 274-286.
- Steinkamp, J. et A. Stewart, C. C. 1986. Dual-laser, differential fluorescence correction method for reducing cellular background autofluorescence. Cytometry. Vol 7 no.6, p. 566-574
- Stewart, P., J. Pagano, D. Sargent, T. Darvill, E. Lonky, et J. Reihman. 2000 a. Effects of Great Lakes fish consumption on brain PCB pattern, concentration, and progressive-ratio performance. Environ Res., vol. 82, p.18-32.
- Stewart, P., J. Reihman, E. Lonky, T. Darvill, et J. Pagano. 2000 b. Prenatal PCB exposure and neonatal behavioral assessment scale (NBAS) performance. Neurotoxicol Teratol., vol. 22, p. 21-29.

Svensson, B.G., T. Hallberg, A. Nilsson, A. Schutz, et L. Hagmar. 1994. Parameters of immunological competence in subjects with high consumption of fish contaminated with persistent organochlorine compounds. Int Arch Occup Environ Health, vol. 65, p. 351-358.

Table des protéines sur les poissons et crustacés ainsi que leurs teneurs en lipides, glucides et calories. [www.bioweight.com/proteines\\_g.html](http://www.bioweight.com/proteines_g.html)

Thomas, L.D., H. Shah, S.A. Green, A.D. Bankhurst, et M.M. Whalen. 2004. Tributyltin exposure causes decreased granzyme B and perforin levels in human natural killer cells. Toxicology, vol. 200, p 221-233.

Thompson, M.R., M. Luttrell, G. Overmann, et R.A. Giannella. 1985. Biological and immunological characteristics of 125I-4Tyr and -18Tyr Escherichia coli heat-stable enterotoxin species purified by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem vol. 148, p. 26-36.

Toxicological Profile for Tin and Tin Compounds. 2005.. US Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. [www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp55-p.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp55-p.pdf)

Tryphonas, H., G. Cooke, D. Caldwell, G. Bondy, M. Parenteau, S. Hayward, et O. Pulido. 2004. Oral (gavage), in utero and post-natal exposure of Sprague-Dawley rats to low doses of tributyltin chloride. Part II: effects on the immune system. Food Chem Toxicol., vol. 42, p. 221-235.

Tryphonas, H., Fournier, M., Lacroix, F., McGuire, P., Hayward, S., Bryce, F., Flipo, D., and Arnold, D. L1998 a. Effects of Great Lakes Fish Consumption on the Immune System of Sprague-Dawley Rats Investigated during a Two-Generation Reproductive Study: II. Quantitative and Functional Aspects. Regulatory Toxicology and Pharmacology vol. 27[1], S40-S54..

Tryphonas, H., McGuire, P., Fernie, S., Miller, D., Stapley, R., Bryce, F., Arnold, D. L., et Fournier, M. 1998 b. Effects of Great Lakes Fish Consumption on the Immune System of Sprague-Dawley Rats Investigated during a Two-Generation Reproductive Study: I. Body and Organ Weights, Food Consumption, and Hematological Parameters. Regulatory Toxicology and Pharmacology, vol.27, no.1, p. 28-39.

Uhl S. 1986. Population exposure to the environmental chemical pentachlorophenol (PCP) and bis(tri-n-butyltin) oxide (TBOT). Zurich, Gottingen, vol.145.

Uqar.quebec.ca/jpellerin/seme/.../chaines\_trophiques\_sensibles.htm

USEPA (IRIS) 1997 - Tributyltin oxide - Reference dose for chronic oral exposure (RfD) ERU eau, <http://www.epa.gov/ngispgm/iris/>.

Van Loveren, H., E.I. Krajnc, P.J. Rombout, F.A. Blommaert, et J.G. Vos. 1990. Effects of ozone, hexachlorobenzene, and bis(tri-n-butyltin)oxide on natural killer activity in the rat lung. Toxicol Appl Pharmacol., vol.102, p. 21-33.

Van Loveren, H., P.A. Steerenberg, et J.G. Vos. 1995. Early detection of immunotoxicity: from animal studies to human biomonitoring. Toxicol Lett., vol. 77, p. 73-80.

Verdier, F., M. Virat, H. Schweinfurth, et J. Descotes. 1991. Immunotoxicity of bis(tri-n-butyltin) oxide in the rat. J Toxicol Environ Health, vol. 32, p. 307-17.

Viglino, L., E. Pelletier, et L.E. Lee. 2006. Butyltin species in benthic and pelagic organisms of the Saguenay Fjord (Canada) and Imposex occurrence in common whelk (*Buccinum undatum*). Arch Environ Contam Toxicol., 50, p. 45-59.

Vos, J.G. 1977. Immune suppression as related to toxicology. CRC Crit Rev Toxicol., vol. 5, p. 67-101.

Vos, J.G., A. de Klerk, E.I. Krajnc, W. Kruizinga, B. van Ommen, et J. Rozing. 1984. Toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide in the rat. II. Suppression of thymus-dependent immune responses and of parameters of nonspecific resistance after short-term exposure. Toxicol Appl Pharmacol., vol. 75, p. 387-408.

Vos, J.G., A. De Klerk, E.I. Krajnc, H. Van Loveren, and J. Rozing. 1990. Immunotoxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide in the rat: effects on thymus-dependent immunity and on nonspecific resistance following long-term exposure in young versus aged rats. Toxicol Appl Pharmacol vol. 105: 144-55.

Vos J.G., E.I. Krajnc et P.W. Wester.1985. Immunotoxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide. In: Dean J,ed.Immunotoxicology and immunopharmacology, New York, Raven Press, p 327-340.

Vos, J.G., J.G. Kreeftenberg, B.C. Kruijt, W. Kruizinga, et P. Steerenberg. 1980. The athymic nude rat. II. Immunological characteristics. Clin Immunol Immunopathol., 15, p. 229-237.

Weisglas-Kuperus, N., S. Patandin, G.A. Berbers, T.C. Sas, P.G. Mulder, P.J. Sauer, et H. Hooijkaas. 2000. Immunologic effects of background exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch preschool children. Environ Health Perspect., vol. 108, p.1203-1207.

Weisglas-Kuperus, N., T.C. Sas, C. Koopman-Elseboom, C.W. van der Zwan, M.A. De Ridder, A. Beishuizen, H. Hooijkaas, et P.J. Sauer. 1995. Immunologic effects of background prenatal and postnatal exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls in Dutch infants. Pediatr Res., vol. 38, p. 404-410.

Wester, P.W. et E.I. Krajnc, et C.A. van der Heijden. 1987. Chronic toxicity and carcinogenicity study with bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) in rats. Unpublished report submitted to the U.S. EPA Office of Toxic Substances, with cover letter dated 5/18/87. Document Control Number: FYI-OTS-0687-0550 Sequence A.

Wester, P.W., E.I. Krajnc, F.X. van Leeuwen, J.G. Loeber, C.A. van der Heijden, H.A. Vaessen, et P.W. Helleman. 1990. Chronic toxicity and carcinogenicity of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) in the rat. Food Chem Toxicol., vol. 28, p. 179-196.

Wester, P.W., L.T. van der Ven, et J.G. Vos. 2004. Comparative toxicological pathology in mammals and fish: some examples with endocrine disrupters. Toxicology, vol. 205, p. 27-32.

Wester, P.W., A.D. Vethaak, et W.B. van Muiswinkel. 1994. Fish as biomarkers in immunotoxicology. Toxicology, vol. 86, p. 213-232.

Whalen, M.M., S. Ghazi, B.G. Loganathan, et F. Hatcher. 2002 a. Expression of CD16, CD18 and CD56 in tributyltin-exposed human natural killer cells. Chem Biol Interact., vol. 139, p. 159-176.

Whalen, M.M., S.A. Green, et B.G. Loganathan. 2002 b. Brief butyltin exposure induces irreversible inhibition of the cytotoxic function on human natural killer cells, in vitro. Environ Res vol., 88, p. 19-29.

Whalen, Margaret M., Loganathan, Bommanna G., et Kannan, Kurunthachalam. 1999 Immunotoxicity of Environmentally Relevant Concentrations of Butyltins on Human Natural Killer Cells in Vitro. Environmental Research, vol. 81, no 2, p.108-116.

WHO, 1999. World Health Organization 1999. Triphenyltin compounds. IPCS Inche Concise International Chemical Assessment Document 13, International Programme on Chemical Safety website. Available; [www.inchem.org/documents/cicads/cicad14.htm](http://www.inchem.org/documents/cicads/cicad14.htm).

Wilson, S., L. Dzon, A. Reed, M. Pruitt, and M.M. Whalen. 2004. Effects of in vitro exposure to low levels of organotin and carbamate pesticides on human natural killer cell cytotoxic function. Environ Toxicol., vol. 19, p. 554-563.

[www.bioweight.com/proteines\\_g.html](http://www.bioweight.com/proteines_g.html). Table des protéines sur les poissons et crustacés ainsi que leurs teneurs en lipides, glucides et calories.

[www.hc-sc.gc.ca/.../pdf/pubs/contaminants/psl1-lsp1/non\\_pest\\_org\\_comp/organotin-organostanniques\\_f.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/.../pdf/pubs/contaminants/psl1-lsp1/non_pest_org_comp/organotin-organostanniques_f.pdf)

[www.testdiet.com/PDF/58B0.pdf](http://www.testdiet.com/PDF/58B0.pdf). Test diet AIN-76A purified diet formulation for rat or mouse.

Tableau A : synthèse générale des effets immunotoxiques du CTBT

	Souris femelles		Souris mâles		Différences intersexe et interâge	
	Juveniles	Adultes	Juveniles	Adultes	Juveniles	Adultes
Effet sur le poids des animaux	Aucune perturbation généralisée de l'état de santé des souris					
Effet sur le poids des organes Thymus Rate			Hypotrophie du thymus Diminution de la taille (immunosuppression) des centres germinatifs de la rate		Les souris juvéniles mâles sont plus sensibles que les juvéniles femelles.	Les souris juvéniles mâles sont plus sensibles que les adultes mâles.
Effet sur la phagocytose Phagocytose d'1 bille Phago-3 billes et plus	Immunostimulation Immunostimulation		Immunostimulation Immunostimulation		Les souris juvéniles mâles sont plus sensibles que les femelles juvéniles et adultes.	Les souris juvéniles mâles sont plus sensibles que les adultes mâles.
Effet sur la transformation lymphoblastique ConA LPS		Immunostimulation	Immunosuppression	Immunostimulation Immunosuppression	Les juvéniles mâles sont plus sensibles que les adultes mâles.	Les femelles sont plus résistantes que les mâles.
Effet sur les cellules tueuses naturelles NK NK (E : C = 20 : 1) NK (E : C = 40 : 1)			Immunostimulation	Immunostimulation		Immunostimulation Immunosuppression
Effet sur la PFC		Immunosuppression	Immunostimulation			Immunostimulation Immunosuppression

**Tableau B : synthèse générale des effets immunotoxiques du CTBT (seuil de signification statistique)**

	Souris femelles		Souris mâles		Différences intersexes	
	Juveniles	Adultes	Juveniles	Adultes	Juveniles	Adultes
	Effet sur le poids des animaux	NS (p> 0,05)	NS (p> 0,05)	NS (p> 0,05)	NS (p> 0,05)	THS (p< 0,001)***
Effet sur le poids des organes						
Thymus	NS (p> 0,05)	NS (p> 0,05)	S (p< 0,05) *	NS (p> 0,05)	S (p< 0,05) *	NS (p> 0,05)
Rates	NS (p> 0,05)	NS (p> 0,05)	HS (p< 0,01) **	NS (p> 0,05)	HS (p< 0,01) **	NS (p> 0,05)
Effet sur la phagocytose						
Phagocytose d'1 bille	HS (p< 0,01) **	NS (p> 0,05)	THS (p< 0,001)***	NS (p> 0,05)	THS (p< 0,001)***	NS (p> 0,05)
Phago-3 billes et plus	HS (p< 0,01) **	NS (p> 0,05)	THS (p< 0,001)***	NS (p> 0,05)	THS (p< 0,001)***	NS (p> 0,05)
Effet sur la transformation lymphoblastique						
ConA	NS (p> 0,05) *	NS (p> 0,05)	S (p< 0,05) *	HS (p< 0,01)**	S (p< 0,05)*	HS (p≤ 0,01) **
LPS	NS (p> 0,05)	S (p< 0,05) *	NS (p> 0,05)	S (p< 0,05) *	NS (p> 0,05)	HS (p< 0,01) **
Effet sur les cellules tueuses naturelles NK						
NK (E : C = 20 : 1)	NS (p> 0,05)	NS (p> 0,05)	NS (p> 0,05)	S (p< 0,05) *	NS (p> 0,05)	S (p< 0,05)*
NK (E : C = 40 : 1)	NS (p> 0,05)	NS (p> 0,05)	S (p< 0,05) *	NS (p> 0,05)	NS (p> 0,05)	NS (p> 0,05)
Effet sur la PFC	NS (p> 0,05)	THS(p<0,001)***	NS (p> 0,05)	NS (p> 0,05)	NS (p> 0,05)	THS (p< 0,001)***

**Légende tableau B :** NS : différence statistique non significative, S (\*) : différence statistique significative (p < 0,05); HS (\*\*): différence très significative (p < 0,01); THS (\*\*\*) : différence très hautement significative (p < 0,001);

Tableau C : Analyse de la variance des paramètres immunotoxiques chez les souris adultes

Paramètres	Traitements ou types de diète				Souris mâles exposés	Souris mâles témoins	Souris femelles exposées	Souris femelles témoins	Probabilité statistique	
	Souris mâles exposés	Souris mâles témoins	Souris femelles exposées	Souris femelles témoins					Différences intra-groupes	Différence inter sexes
					Ain + poisson+ 400 ug CTBT/ kg de diète	témoins nourries avec Ain +poisson			Proba	Proba
PA (g)	X ECT	24,3120 1,01228	24,6530 1,16214	33,1750 2,90153	29,8730 1,79320					p < 0,0001***
PR (g)	X ECT	0,091000 0,019120	0,079000 0,024244	0,103000 0,040014	0,092000 0,023476					
PTh (g)	X ECT	0,070000 0,024037	0,056000 0,018974	0,071000 0,021833	0,063000 0,021628					
RConA (DPM)	X ECT	164263 38411,1	141881 16867,0	139350 41237,7	181559 15691,7				p < 0,01** (mâles)	p < 0,01 **
RLPS (DPM)	X ECT	95532 19252,8	106795 17029,9	85775 34918,2	68548 20008,4				p < 0,01** (mâles et	p < 0,01**
PhagM1 (% de phago - cytose)	X ECT	47,3500 5,0172	42,7520 3,5922	42,2650 12,4300	44,4090 6,1513					
PhagM3 (% de phago - cytose)	X ECT	19,0120 2,95188	17,6680 2,69453	16,8340 5,92441	16,3610 4,04025					
NKur20 (% de mortalité.NIK)	X ECT	14,7830 10,7039	15,4720 4,4543	13,6510 8,0411	26,1220 13,7151				p < 0,05* (mâles)	p < 0,05 *
NKur40 (% de mortalité.NIK)	X ECT	30,6350 14,8521	31,9590 9,1068	30,495 12,9338	38,7870 13,3503				p < 0,05* (mâles)	
PFC (PFC /10 <sup>6</sup> splénocytes)	X ECT	290,000 84,7104	142,787 77,7351	151,750 56,5805	131,438 87,8312				p < 0,01** (femelles)	** 0,009 < 0,01

**Légende tableau C :** valeurs  $f$  de la variable de Fisher-Snédecor  $F(3 ; 36)$  ayant la probabilité 0,05 et 0,01 d'être dépassées ;  $F_{théor}(5\%) = 2,87$ ,  $F_{théor}(1\%) = 4,48$

( $\bar{X}$ ) : moyenne; (ECT) : écart type; (Proba) : probabilité du  $F$  théorique; (\*) : différence statistique significative ( $p < 0,05$ ); (\*\*) : différence très significative ( $p < 0,01$ ); (\*\*\*) : différence très hautement significative ( $p < 0,001$ ); (PA) : poids des animaux; (PR) : poids des rates; (PTH) : poids des thymus; (PF), (PhagM1) et (PhagM2) : pourcentage de phagocytose des macrophages d'une bille ou de trois billes fluorescentes et plus; (NKur20) et (NKur40) : pourcentages de mortalité induite par cytotoxicité (E : C = 20 : 1) et (E : C = 40 : 1); (PFC) : (nombres de cellules productrices, d'anticorps /millions de splénocytes), (RConA) (RLPS) : transformation lymphoblastique des splénocytes induite respectivement par la ConA, LPS.;

**Tableau D : Analyse de la variance des paramètres immunotoxiques chez les souris juvéniles**

Paramètres	Traitements ou types de diète				Probabilité statistique	
	Souris femelles témoins avec Ain +poisson	Souris femelles exposées Ain + poisson+ 400 ug CTBT/ kg de diète	Souris mâles témoins avec Ain +poisson	Souris mâles exposés Ain + poisson+ 400 ug CTBT/ kg de diète	Différences intragroupes	Différence inter sexes
PA (g)	X ECT	23,4550 1,97135	24,6620 1,64654	29,8000 3,08402	27,4980 1,36939	p < 0,001***
	X ECT	0,099000 0,017288	0,089000 0,018529	0,121000 0,034464	0,083000 0,026268	
PTh (g)	X ECT	0,078000 0,026162	0,067000 0,020575	0,061000 0,023781	0,047000 0,018288	0,009 < 0,01*** 0,03 < 0,05 *
	X ECT	34810,3 23425,6	43962,8 32410,5	62388,6 17782,4	34890,6 13009,6	
RLPS (DPM)	X ECT	66324,7 27571,5	66395,5 12669,7	57055,3 15035,3	56124,4 9495,9	p < 0,05 * (mâles)
	X ECT	48,7680 3,72571	55,2070 4,62006	46,7870 7,06627	64,2570 3,35656	
PhagM3 (% de phago - cytose)	X ECT	19,0970 1,55572	23,7370 3,06822	20,2970 4,19827	29,7850 1,87391	p < 0,0001*** p < 0,001***
	X ECT	11,7520 4,64964	8,8380 2,73533	8,1920 5,50574	11,8810 2,88384	
NKur40 (% de mortalité NK)	X ECT	14,8210 6,74338	15,4260 5,41572	12,9010 6,12835	20,0770 5,09519	p < 0,05 * (mâles)
	X ECT	104,188 58,4624	98,338 31,3696	72,750 26,3425	69,625 16,1018	

**Légende du tableau D:** valeurs  $f$  de la variable de Fisher-Snédecor  $F(3; 36)$  ayant la probabilité 0,05 et 0,01 d'être dépassées :  $F_{théor}(5\%) = 2,87$ ,  $F_{théor}(1\%) = 4,48$

( $X$ ) : moyenne; (ECT) : écart type; (Proba) : probabilité du  $F$  théorique; (\*) : différence statistique significative ( $p < 0,05$ ); (\*\*) : différence très significative ( $p < 0,01$ ); (\*\*\*) : différence très hautement significative ( $p < 0,001$ ); (PA) : poids des animaux; (PR) : poids des rates; (PTh) : poids des thymus; (PF) , (PhagM1) et (PhagM2) : pourcentage de phagocytose des macrophages d'une bille ou de trois billes fluorescentes et plus; (NKur20) et (NKur40) : pourcentages de mortalité induite par cytotoxicité (E : C = 20 : 1) et (E : C = 40 : 1) ; (PFC) : (nombres de cellules productrices, d'anticorps /millions de splénocytes), (RConA) (RLPS) : transformation lymphoblastique des splénocytes induite respectivement par la ConA, LPS.;

