

Université du Québec
INRS-IAF

**Effets de certains composés présents dans la
fumée du tabac sur la viabilité et la
prolifération des lymphocytes**

Par
Martin Poirier

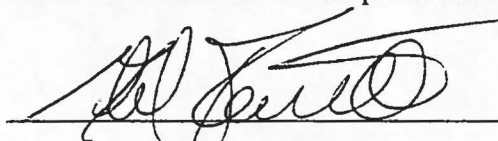
Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade Maître ès sciences
en Sciences Expérimentales de la Santé

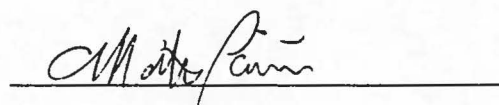
Jury d'évaluation

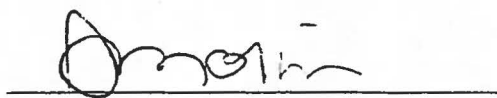
Examineur interne	Christiane Ayotte, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	André Castonguay, Université Laval
Directeur de recherche	Michel Fournier, INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	André Morin, Imperial Tobacco Canada LTD.

RÉSUMÉ

De plus en plus d'études démontrent que la fumée de cigarette peut moduler le système immunitaire chez le fumeur et ceux qui l'entourent. Toutefois, peu d'études ont tenté d'identifier les substances responsables de tels effets. Nos travaux consistent en un criblage de treize composés présents dans la fumée de cigarette, de façon à identifier ceux qui présentent des effets sur le système immunitaire et à les classer par ordre de toxicité selon les CI_{50} qui furent obtenues. Les tests de viabilité cellulaire par cytométrie de flux et de transformation lymphoblastique furent utilisés afin d'évaluer les effets de ces composés sur la viabilité et la prolifération des lymphocytes, la prolifération étant une fonction importante de ces derniers. Nos résultats montrent que l'acroléine et le crotonaldéhyde ont eu des effets inhibiteurs sur la viabilité et la prolifération. L'acrylonitrile, le formaldéhyde, le catéchol, l'hydroquinone et le propionaldéhyde ont seulement affecté la prolifération, tandis que les 6 dernières substances n'ont présenté aucun effet significatif sur la viabilité et la prolifération des lymphocytes dans les conditions expérimentales utilisées. Nous avons aussi observé que certains mélanges de composés ont causé des effets plus prononcés sur la prolifération que chacun des composés seuls. Cette étude montre donc que certains constituants de la fumée de cigarette peuvent avoir des effets sur la viabilité et la prolifération des lymphocytes et contribue à combler le manque de données *in vitro* sur le sujet.


Directeur de recherche


Étudiant


Codirecteur de recherche

REMERCIEMENTS

Premièrement, j'aimerais apporter mes plus sincères remerciements à mon directeur de recherche M. Michel Fournier, ainsi qu'à mon codirecteur M. André Morin, pour toute l'aide qu'ils m'ont fournie lors de mes recherches et de la rédaction de l'article et de ce mémoire.

Je tiens également à remercier:

Mme Pauline Brousseau pour ses petits conseils et commentaires constructifs qui m'ont permis de progresser rapidement.

M. Andrew Porter pour ses conseils et son oeil critique sur nos résultats.

L'INRS-Institut Armand-Frappier pour son soutien financier durant mes études.

Finalement, à toute l'équipe du laboratoire, particulièrement à Stéphane, Marlène, Lucie, Mélanie, Annie et Régina.

À tous, un gros merci!

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iii
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	x
Introduction	11
Chapitre 1: État des connaissances	12
1.1 La fumée de cigarette.....	12
1.2 Toxicité des principales composantes de la fumée.....	14
1.3 Grandes lignes du projet de recherche	17
Chapitre 2: Article: Effect of volatile aromatics, aldehydes and phenols in tobacco smoke on viability and proliferation of mouse lymphocytes	18
Contribution personnelle	18
Résumé français de l'article	18
Article	19
Chapitre 3 : Discussion générale	52
1. Comparaison avec les données disponibles dans la littérature.....	52
1.1 Généralités et revue des résultats	52
1.2 Le benzène et ses dérivés	53
1.3 Les aldéhydes	54
1.4 Le catéchol et l'hydroquinone	54
2. Signification des résultats	55
3. Explications possibles aux effets observés et mécanismes sous-jacents	57
3.1 Le benzène et ses dérivés	57
3.2 Les aldéhydes	58

Conclusion	59
Bibliographie	61
Appendice A : Courbes concentration-réponse des mitogènes	67
Appendice B : Autres résultats non publiés	70

LISTE DES FIGURES

Mémoire

Figure 1. Principaux composants de la fumée de cigarette, page 12.

Figure 2. Détermination de la concentration optimale de mitogène Con A, page 68.

Figure 3. Détermination de la concentration optimale de mitogène LPS, page 69.

Figure 4. Courbe concentration-réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés à l'acétaldéhyde, page 71.

Figure 5. Courbe concentration-réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés à l'acrylonitrile, page 72.

Figure 6. Courbe concentration-réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés au butyraldéhyde, page 73.

Figure 7. Courbe concentration-réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés au catéchol, page 74.

Figure 8. Courbe concentration-réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés à l'hydroquinone, page 75.

Figure 9. Courbe concentration-réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés à l'isoprène, page 76.

Figure 10. Courbe concentration-réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés au formaldéhyde, page 77.

Figure 11. Courbe concentration-réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés au propionaldéhyde, page 78.

Figure 12. Courbe concentration-réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés au styrène, page 79.

Figure 13. Courbe concentration-réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés au toluène, page 80.

Article

Figure 1. Time- and concentration-response curves of the percentage of viability for mice splenocytes exposed to crotonaldehyde at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M, page 39.

Figure 2. Time- and concentration-response curves of the percentage of viability for mice splenocytes exposed to acrolein at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M, page 40.

Figure 3. Time- and concentration-response curves of the percentage of viability for mice splenocytes exposed to benzene at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M, page 41.

Figure 4. Effect of acetaldehyde on Con A- and LPS-induced proliferation of mice splenocytes after 3 hours of exposure as determined by 3 H-methyl-thymidine incorporation, page 42.

Figure 5. Effect of formaldehyde on Con A- and LPS-induced proliferation of mice splenocytes after 3 hours of exposure as determined by 3 H-methyl-thymidine incorporation, page 43.

Figure 6. Effect of 3 hours exposure to hydroquinone on splenocyte viability and mitogen-induced proliferation expressed in percentage of control, page 45.

Figure 7. Effect of mixture 1 (catechol + hydroquinone) on Con A-induced proliferation of mice splenocytes after 3 hours of exposure as determined by 3 H-methyl-thymidine incorporation, page 46.

Figure 8. Effect of mixture 2 (Acrolein + Crotonaldehyde + Propionaldehyde) on Con A-induced proliferation of mice splenocytes after 3 hours of exposure as determined by

³H-methyl-thymidine incorporation, page 47.

Figure 9. Effect of mixture 3 (Acrolein + Formaldehyde + Propionaldehyde) on Con A-induced proliferation of mice splenocytes after 3 hours of exposure as determined by ³H-methyl-thymidine incorporation, page 48.

Figure 10. Effect of mixture 4 (Crotonaldehyde + Formaldehyde + Propionaldehyde) on Con A- induced proliferation of mice splenocytes after 3 hours of exposure as determined by ³H-methyl-thymidine incorporation, page 49.

Figure 11. Effect of mixture 5 (Acrolein + Crotonaldehyde + Formaldehyde) on Con A-induced proliferation of mice splenocytes after 3 hours of exposure as determined by ³H-methyl-thymidine incorporation, page 50.

LISTE DES TABLEAUX

Mémoire

Tableau 1: Caractéristiques physico-chimiques des 13 composés auxquels nous nous sommes intéressés, page 13.

Tableau 2: Quantités de chaque composé retrouvées dans la fumée de cigarette, page 15.

Article

Table 1: IC₅₀ values of all tested compounds for the viability and mitogenic assay after 3h exposure, page 44.

Table 2: Summary of statistical significance for mixtures and individual compounds, page 51.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

CI₅₀: Concentration provoquant 50 % d'inhibition

CO₂: Dioxyde de carbone

Con A: Concanavalin A

DMSO: Sulfoxyde de diméthyle

FBS: Sérum de boeuf foetal (*Fætal bovine serum*)

HCN: Cyanure d'hydrogène

HLA-DR: *Human leukocyte activator, DR chain*

HTL: Lymphoblaste T Humain (*Human T lymphoblast*)

IL-1: Interleukine-1

IL-2: Interleukine-2

LPS: Lipopolysaccharide

NK: (*Natural killer*)

Pen-Strep: Pénicilline-Streptomycine

PHA: Phytohémagglutinine

PI: Iodure de propidium (*Propidium iodide*)

PWM: (*Pokeweed mitogen*¹)

¹ Nous avons conservé les abréviations de certains termes anglais, car ce sont les termes généralement utilisés dans toute la littérature, y compris dans la littérature française.

INTRODUCTION

L'usage de la cigarette, si répandu soit-il dans le monde, représente, sans aucun doute, un danger pour le fumeur et pour son entourage. Des études ont démontré que la cigarette pouvait jouer un rôle dans le développement de maladies graves comme le cancer du poumon, l'emphysème, l'athérosclérose et les maladies cardiaques. Depuis quelques années, des observations tendent à démontrer qu'en plus des diverses maladies du cœur et du poumon que peut occasionner l'usage de la cigarette, celle-ci pourrait avoir certains effets sur les défenses immunitaires de l'organisme. Une étude a en effet démontré que le fait de fumer la cigarette pouvait jouer un rôle dans l'incidence de diverses infections respiratoires et de l'influenza. Plusieurs autres études tendent à indiquer des effets variés sur différentes fonctions immunitaires et différentes cellules, comme nous le verrons un peu plus loin. Tout ceci nous amène à étudier les toxiques contenus dans la fumée, seuls et en combinaison, en examinant les atteintes sur la viabilité et le fonctionnement des lymphocytes utilisés comme cellules modèles du système immunitaire.

Cet ouvrage est divisé en trois chapitres. Le premier chapitre se veut une revue de la littérature exposant l'état actuel des connaissances. Le deuxième chapitre consiste en un article soumis pour publication. Tous les résultats présentés proviennent de mes travaux de recherche et constituent le corpus principal de ce mémoire.

Enfin, le troisième chapitre consiste en une discussion générale de l'ensemble des résultats obtenus dans ce projet de recherche, qui mettra l'emphasis sur la signification des résultats par rapport aux données de la littérature et l'analyse de ces résultats dans leur ensemble. Cette section se termine par les conclusions générales et les retombées de la recherche. Les résultats non publiés sont présentés en annexe au présent travail.

Chapitre 1

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 La fumée de cigarette

La fumée de cigarette comprend la fumée primaire (*Mainstream smoke*), qui est respirée par le fumeur, et la fumée secondaire (*Sidestream smoke*), relâchée directement dans l'environnement par le bout allumé de la cigarette, le papier et le filtre. Bien que la composition de la fumée primaire soit la plus connue, la fumée secondaire est réputée plus nocive étant donné qu'elle ne passe pas par le filtre et que quelques composés deviennent plus réactifs en s'oxydant au contact de l'oxygène de l'air et (Perfetti, Coleman et Smith, 1998: 95).

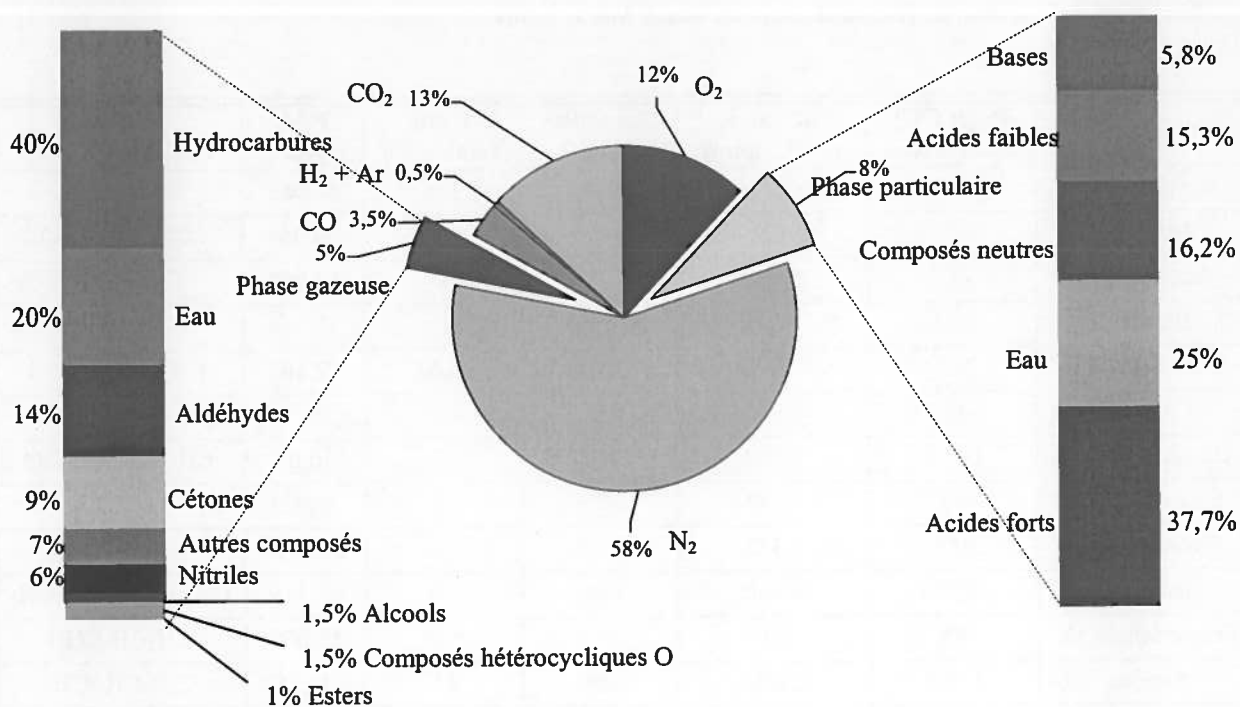


Figure 1. Principaux composants de la fumée de cigarette. Ce graphique montre les principaux constituants de la fumée de cigarette, et détaille la composition des phases gazeuse et particulaire.

La fumée principale de cigarette se divise en deux phases: une phase gazeuse et une phase particulaire. La phase particulaire contient majoritairement des acides faibles, des acides forts, des bases, des composés neutres et de l'eau tandis que la phase gazeuse contient la majeure partie des 5000 substances retrouvées dans la fumée de cigarette (Perfetti, Coleman et Smith, 1998: 95; Mendez-Alvarez et al., 1998: 443). Plusieurs classes de composés sont retrouvées dans la phase gazeuse dont des hydrocarbures, des aldéhydes, des cétones, des nitriles et plusieurs autres (IARC. 1986; 83 ; Stedman, 1968: 153). Nous pouvons voir à la figure 1 un résumé des grandes classes de composés que l'on retrouve dans la fumée de cigarette ainsi que leurs proportions approximatives. Il est toutefois important de noter que la composition exacte de la fumée de cigarette dépend des conditions dans lesquelles la

Tableau 1: Caractéristiques physico-chimiques des 13 composés auxquels nous nous sommes intéressés. Diverses caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans ce tableau, les plus utiles à nos recherches étant le point d'ébullition et la solubilité dans l'eau, paramètres dont il a fallu tenir compte dans l'élaboration du protocole. (Données tirées du Merck Index, 1998)

Composé	Point (°C) d'ébullition	Densité (20°C, g/ml)	Solubilité in H ₂ O	Point éclair (°C)	P.M. (g/mol)	Structure
Acétaldéhyde	21	0,788 (16°C)	100%	-38	44,053	CH ₃ CHO
Acroléine	52,5	0,8389	50%	< -18	56,064	CH ₂ =CHCHO
Acrylonitrile	77,3	0,8060	7,35%	0	53,064	CH ₂ =CHCN
Benzène	80,1	0,8787 (15°C)	0,188%	-11	78,114	C ₆ H ₆
Butyraldéhyde	74,8	0,8016	7,1%	-6,67	72,107	CH ₃ (CH ₂) ₂ CHO
Catéchol	245,5	1,344	43%	- - -	110,112	o-C ₆ H ₄ (OH) ₂
Crotonaldéhyde	104,0	0,853	18,1%	13	70,09	CH ₃ CH=CHCHO
Formaldéhyde	96	1,083	37%	60	30,021	HCHO
Hydroquinone	286	1,332	7,1%	- - -	110,112	p-C ₆ H ₄ (OH) ₂
Isoprène	34,067	0,6805	≈ 0%	-48	68,119	CH ₂ =CCH ₃ CH=CH ₂
Propionaldéhyde	49	0,8071	20%	< -6	58,080	CH ₃ CH ₂ CHO
Styrène	145,5	0,9059	≈ 0%	31	104,152	C ₆ H ₅ CH=CH ₂
Toluène	110,6	0,866	0,067%	4,4	92,141	C ₆ H ₅ CH ₃

cigarette est fumée, du type de papier enveloppant le tabac, du type de filtre, des additifs que l'on ajoute au tabac et des propriétés physiques et chimiques du mélange de tabac utilisé (Perfetti, Coleman et Smith, 1998: 95 ; Mendez-Alvarez et al., 1998: 443). Une variété de processus chimiques et physiques se produit dans la zone riche en H_2 et pauvre en O_2 du cône de combustion d'une cigarette allumée. La majorité des constituants de la fumée de cigarette provient de la zone de pyrolyse-distillation située juste derrière la zone de combustion (Perfetti, Coleman et Smith, 1998: 95 ; Mendez-Alvarez et al., 1998: 443). Il est donc important de retenir que beaucoup de substances présentes dans la fumée de cigarette sont formées par le processus de combustion et ne sont pas retrouvées lors d'une analyse chimique de la feuille de tabac (Stedman, 1968: 153). Par exemple, la majorité du cyanure d'hydrogène (HCN) retrouvé dans la fumée est formée durant la combustion au contact de l'azote (N_2) de l'air et par dégradation de certains acides aminés, notamment la glycine et la proline (Mendez-Alvarez et al., 1998: 443 ; Stedman, 1968: 153).

1.2 Toxicité des principales composantes de la fumée

La toxicité de certaines de ces substances a déjà fait l'objet de revues. En effet, nous savons qu'une exposition au benzène provoque des effets néfastes sur le système hématopoïétique et peut entraîner une destruction partielle de la moelle osseuse. Il en résulte généralement une baisse du nombre de certains types de cellules sanguines, dont les cellules immunitaires (Casarett and Doull's Toxicology ; 1991). Aussi, le formaldéhyde est connu pour provoquer des réactions d'hypersensibilité et semble être associé au développement de l'asthme chez des travailleurs qui y sont exposés dans l'exercice de leurs fonctions (Casarett and Doull's Toxicology ; 1991).

Bien que les effets de la fumée de cigarette et de quelques constituants majeurs comme les substances aromatiques, les aldéhydes et les phénols sur la cancérogenèse et la mutagenèse soient bien documentés par différentes études (Hoffmann et al., 1985: 239 ; Eder, Schuler et Budiawan, 1999: 219 ; Melendez-Colon et al., 1999:1885), ses effets sur le

système immunitaire sont moins bien connus. Certaines études montrent toutefois que la fumée de cigarette et ses composantes peuvent avoir un effet sur différentes fonctions immunitaires. En effet, diverses études effectuées à partir de la fumée totale, d'extraits de fumée ou de composés contenus dans la fumée ont montré des effets sur la phagocytose (Braun et al., 1998: 136), la prolifération (Berntorp, Ekman et Berntorp, 1989: 73 ; Wu et Pruett, 1996: 1325 ; Li et al., 1997: 158 ; Rozen, Snyder et Albert, 1984: 343), la production d'anticorps (Savage et al., 1991: 523 ; Aoyama, 1986: 92), la cytotoxicité NK (Baj et al., 1994: 186 ; Hughes et al., 1985: 459 ; Meliska et al., 1995: 901) et la production d' H_2O_2 (Braun et al., 1998: 136). Des études, en utilisant des modèles de résistance, ont aussi montré

Tableau 2: Quantités de chaque composé retrouvées dans la phase gazeuse de la fumée primaire de cigarette. Les niveaux de chaque composé retrouvés dans les cigarettes canadiennes sont exprimés en μg . Par exemple, la fumée d'une cigarette contenant 12,1 mg de goudron renferme 579 μg d'acétaldéhyde. (Données fournies par Imperial Tobacco Canada LTD.).

	<i>Niveaux observés par cigarette (μg)</i>		
	<i>Cigarette 1 mg goudron</i>	<i>Cigarette 12,1 mg goudron</i>	<i>Cigarette 17 mg goudron</i>
Acétaldéhyde	191	579	751
Acroléine	15	63	84
Acrylonitrile	1,4	9	12,4
Benzène	14	46	60
Butyraldéhyde	10	31	41
Catéchol	24	83	109
Crotonaldéhyde	6	23	31
Formaldéhyde	3	49	70
Hydroquinone	23	76	100
Isoprène	63	173	222
Propionaldéhyde	13	45	59
Styrène	2	16	22
Toluène	16	69	92

des effets tant sur l'immunité antibactérienne qu'antivirale telle qu'une susceptibilité accrue à l'influenza A (Chang, Distler et Kaplan, 1990: 514), à *Streptococcus Zooepidemicus* (Aranyi et al., 1985: 103) et à *Listeria monocytogenes* (Jakab, 1993: 167) après exposition à la fumée de cigarette ou aux substances qui la composent.

Même si ces études nous apportent quelques éléments d'information quant à l'impact de la cigarette sur le système immunitaire, les données disponibles sont toutefois assez limitées compte tenu du fait qu'elles ont été effectuées sur différentes espèces, selon différentes méthodes expérimentales et sur un nombre relativement restreint de substances. Beaucoup reste à faire pour identifier des substances spécifiques qui sont susceptibles de moduler certaines fonctions immunitaires parmi les constituants de la fumée de cigarette. Il pourrait aussi s'avérer utile de tenter d'élucider les mécanismes qui se cachent derrière ces effets.

Bien que toutes les fumées de combustion ont généralement une composition similaire, la fumée de cigarette contient plusieurs éléments spécifiques au tabac. En effet, bien que la composition exacte dépende de la nature du combustible, certains composés ou familles de composés sont retrouvés dans plusieurs types de fumées (Dost, 1991: 1 ; Pryor, 1992: 659). Les sources de fumée de combustion communes sont variées et comprennent notamment les foyers, les barbecues, les émissions des véhicules et la cigarette.

Considérant le fait que nous sommes tous exposés, à différents degrés, à au moins une de ces sources, que l'usage de la cigarette est très répandu dans la société et que, tel que mentionné précédemment, la fumée de cigarette affecte aussi les gens dans l'entourage du fumeur, il apparaît important d'évaluer le potentiel toxique de certaines des substances parmi les plus abondantes dans la fumée de cigarette.

Ce projet de recherche porte donc sur l'impact de certaines composantes de la fumée de cigarette sur certaines fonctions immunitaires, plus particulièrement la viabilité cellulaire et la prolifération, une fonction importante du lymphocyte. Le tableau 1 montre les

substances auxquelles nous nous sommes intéressés dans cette étude, ainsi que certaines de leurs caractéristiques physico-chimiques. Ces substances ont été choisies parce qu'elles sont parmi les plus abondantes dans la fumée de cigarette et que, selon les données de la littérature, les aldéhydes et les métabolites du benzène semblent jouer un rôle dans les divers effets de la fumée de cigarette sur le système immunitaire. Le benzène, et non ses métabolites, fut choisi pour cette étude afin de vérifier si un effet direct sur la viabilité ou la prolifération est décelable.

1.3 Grandes lignes du projet de recherche

Cette étude a pour objectif principal d'évaluer la toxicité de ces 13 substances envers le système immunitaire. Pour arriver à cette fin, nous avons, dans un premier temps, évalué la cytotoxicité de ces 13 substances *in vitro* envers les cellules immunitaires par cytométrie de flux, pour ensuite déterminer la capacité de ces produits, suite à des expositions *in vitro*, à moduler la prolifération des lymphocytes par le test de transformation lymphoblastique. Des expositions *in vitro* ont aussi été effectuées avec des mélanges de quelques substances. Finalement, les substances ont été classées en ordre de toxicité à l'aide des valeurs de CI_{50} . La souris de type C57/BL6, un modèle classique en immunologie, fut utilisée comme modèle animal pour ces expérimentations. Un intervalle de concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} fut utilisé pour tous les composés afin d'établir une courbe concentration-réponse.

Cette étude se veut donc un premier criblage visant à cibler plus particulièrement certaines substances de la fumée de cigarette afin de déterminer si les effets immunomodulateurs observés peuvent être imputés à une seule substance, à quelques composés, à un groupe de composés précis ou à un éventail de substances plus large formant un mélange hétérogène. De telles données pourront être utiles aux compagnies de cigarettes, afin de développer des procédés mieux ciblés pour diminuer la toxicité des cigarettes, soit en améliorant le filtre ou en améliorant les méthodes de traitement du tabac. De plus, ces données permettront d'enrichir nos connaissances sur la toxicité de la fumée de combustion en général et une meilleure protection des populations exposées. À titre d'exemple, nous pouvons signaler le cas des pompiers qui sont fréquemment exposés à de la fumée contenant divers aldéhydes, du benzène, du HCN, et plusieurs autres composés (Brandt-Rauf et al., 1988: 606 ; Cohen et Guzzardi, 1983: 628 ; Lees, 1995: 691).

Chapitre 2

ARTICLE :EFFECT OF VOLATILE AROMATICS, ALDEHYDES AND PHENOLS IN TOBACCO SMOKE ON VIABILITY AND PROLIFERATION OF MOUSE LYMPHOCYTES

Contribution personnelle

Tout d'abord, permettez-moi de préciser ma participation dans l'ensemble des travaux présentés. Cette contribution personnelle comprend la recherche bibliographique, la planification des expérimentations, les manipulations, la collecte et la compilation des données, l'analyse statistique, la synthèse des résultats ainsi que la rédaction de l'article.

Résumé de l'article (français)

Nous avons évalué les effets de treize composés présents dans la fumée de cigarette sur la viabilité et la prolifération des lymphocytes *in vitro*. L'acétaldéhyde, le benzène, le butyraldéhyde, l'isoprène, le styrène et le toluène n'ont provoqué aucun effet sur la viabilité et la prolifération après 3 heures d'exposition. Le formaldéhyde, le catéchol, l'acrylonitrile, le propionaldéhyde et l'hydroquinone ont inhibé la prolifération des lymphocytes B et T avec des valeurs de CI_{50} allant de $1,19 \times 10^{-5}$ à $8,20 \times 10^{-4}$ M après 3 heures d'exposition. L'acroléine et le crotonaldéhyde ont inhibé la prolifération des lymphocytes B et T, mais ont aussi affecté la viabilité cellulaire avec des CI_{50} allant de $2,06 \times 10^{-5}$ à $4,26 \times 10^{-5}$ M. Des mélanges d'acroléine, de formaldéhyde, de crotonaldéhyde et de propionaldéhyde furent aussi évalués et des effets interactifs furent observés à 0,5 et 1,0 x CI_{50} . Deux mélanges ont particulièrement affecté la prolifération des cellules T à 0,1 x CI_{50} par rapport au contrôle. Cette étude montre que certains composés connus de la fumée de cigarette peuvent agir sur la viabilité et la prolifération des lymphocytes *in vitro*.

Cet article est sous presse dans le *Journal of Toxicology and Environmental Health*.

Article

Title : Effects of volatile aromatics, aldehydes and phenols in tobacco smoke on viability and proliferation of mouse lymphocytes.

Short Title : Effects of tobacco smoke chemicals on lymphocytes.

Authors : Martin Poirier ¹, Michel Fournier^{1*}, Pauline Brousseau² and André Morin³

¹ INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER- Human Health Research Center

245 boul. Hymus

Pointe-Claire (Québec) H9R 1G6

CANADA

²BIOPHAGE

6100 Royalmount

Montréal (Québec) H4P 2R2

CANADA

³ IMPERIAL TOBACCO CANADA Ltd

3810 St-Antoine Street

Montréal (Québec) H4C 1B5

CANADA

* To whom all correspondence should be sent

Tel: (514) 630-8800 ext.#8824

Fax: (514) 630-8850

E-mail: Michel.Fournier@inrs-sante.quebec.ca

ABSTRACT

Thirteen chemicals present in tobacco smoke were assessed for their effect on viability and proliferation of mouse lymphocytes *in vitro*. Acetaldehyde, benzene, butyraldehyde, isoprene, styrene and toluene produced no effect on either viability or proliferation after 3 hours of exposure. Formaldehyde, catechol, acrylonitrile, propionaldehyde and hydroquinone significantly inhibited T-lymphocyte and B-lymphocyte proliferation with IC_{50} values ranging from 1.19×10^{-5} M to 8.20×10^{-4} M after 3 hours of exposure. Acrolein and crotonaldehyde not only inhibited T-cell and B-cell proliferation, but also acted on viability with IC_{50} values ranging from 2.06×10^{-5} M to 4.26×10^{-5} M. Mixtures of acrolein, formaldehyde and propionaldehyde or crotonaldehyde were tested and interactive effects at 0.5 and 1 x IC_{50} were observed. Two mixtures significantly inhibited T-cell proliferation when compared to the control at 0.1 x IC_{50} concentration. The present study shows that some chemicals known to be present in tobacco smoke exert an effect on lymphocyte viability and proliferation *in vitro*.

INTRODUCTION

Common sources of combustion smoke include barbecues, fireplaces, burning plant material such as tobacco smoke, and vehicle emissions. Considering the number of people exposed to one or more of these sources, it is important that potential toxicological effects on the immune system be investigated.

Perhaps the best-studied smoke is that from tobacco which contains about 5000 identified components (Hoffmann and Hoffmann, 1997; Baker and Proctor, 2001; Perfetti *et al*, 1998; IARC 1986). The tobacco smoke components are distributed between a gas phase (N₂, CO₂, O₂, CO, H₂ and Ar), a particulate phase, and a vapor phase (IARC, 1986). The particulate phase consists mainly of strong and weak acids, bases, water and neutral compounds. The vapor phase contains a wide range of chemical classes including aldehydes, hydrocarbons, ketones, nitriles, alcohols and many other types of compounds (IARC 1986, Stedman, 1968, Hoffmann and Hoffmann, 1997).

While the carcinogenic and mutagenic properties of some major smoke constituents, particularly those in the particulate phases are well documented (Hoffmann and Hoffmann, 1997; Eder *et al*, 1999, Melendez-Colon VJ, 1999), there is less information known about their effects on the immune system. Some volatile aromatics such as benzene decreased the T- and B-cell number and inhibited antibody production in mice (Aoyama, 1986; Snyder, 2000). Benzene also induced a significant decrease of phytohemagglutinin-induced blastogenesis of T-cell and lipopolysaccharide-induced B-cell blastogenesis in male C57/BL mice *in vivo* (Rozen *et al*, 1984). Mice exposed to

toluene by inhalation had their total lymphocyte count reduced and displayed increased susceptibility to *Streptococcus zooepidemicus* probably due to adverse effects on pulmonary macrophages (Aranyi *et al*, 1985). Toluene also produced cytotoxic effects on rat and rabbit pulmonary macrophages *in vitro* (Suleimann, 1987). Catechol and hydroquinone inhibited human helper T lymphocyte proliferation without affecting cell viability (Li *et al*, 1997).

Some aldehydes are also known to affect the immune system. Formaldehyde produced a significant decrease in T-cell number (Thrasher *et al*, 1987) and decreased natural killer cell (NK) activity (Baj *et al*. 1994). Acetaldehyde induced a concentration-dependant decrease of NK activity *in vitro* (Wu and Pruett, 1996). In host resistance experiments, acrolein reduced *Staphylococcus* ingestion by macrophages (Green, 1985) and interfered with *Listeria monocytogenes* and Influenza A elimination in the lung, indicating an impact on both anti-bacterial and anti-viral activity (Jakab, 1993).

All the substances mentioned above had significant effects on the immune response in a variety of species, including rat, mouse and human. Generally, inhibition or suppression of immune functions for different cell types was observed after exposure to whole smoke, smoke extracts, or smoke constituents. However these studies were performed on a limited number of compounds, on different species and using different experimental approaches to assess different functions. Thus it is difficult to compare and rank the effect of different compounds. There is even less information available on the relative toxicological effects of mixing two or more chemicals.

The aim of our study was to assess the effects of thirteen compounds found in tobacco smoke on the immune system. A viability assay was first used to determine the cytotoxic potential of the substances. Then, a mitogenic assay was performed to investigate their effect on lymphocyte proliferation. Time- and concentration-response curves for these compounds were used to rank them according to their relative bioactivities.

MATERIAL AND METHODS

Substances under investigation

The following thirteen substances known to be present in tobacco smoke were selected: acetaldehyde, acrolein, acrylonitrile, benzene, butyraldehyde, catechol, crotonaldehyde, formaldehyde, hydroquinone, isoprene, propionaldehyde, styrene and toluene. DMSO was used at 0.1% in order to dissolve poorly water-soluble compounds.

Preparation of cell suspensions

C57/BL6 female mice were obtained from Charles River Canada Inc. (QC, Canada). They were aged 8 weeks and weighted approximately 20-25 g each. The mice were killed by CO₂ inhalation and the spleen was removed in a laminar flow hood under sterile conditions. A cell suspension was made using RPMI 1640 (BioMedia) supplemented with 10% foetal bovine serum (BioMedia) and 1% Pen/Strep (BioMedia). The suspension was adjusted to 1×10^7 viable cells/ml.

Exposure protocol

For the viability assay, suspensions containing 5×10^6 cells/ml were exposed in 15 ml. sterile Falcon tubes to concentrations of 10^{-9} to 10^{-3} M of each substance in order to obtain a concentration-response curve. Cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for up to 24 hours. For the mitogenic assay, the same concentrations of the chemicals were used and the incubation conditions were identical except that cells were exposed for only 3 hours. We chose a 3 hour exposure to match the 3 hour endpoint of the viability assay, for which effects could already be observed for some compounds, and because viability was too low beyond that point for the cytotoxic compounds. This

exposure was done in closed 15 ml. sterile Falcon tubes in order to obtain reproducible results with the volatile compounds. After 3 hours of exposure, cells were washed twice by centrifugation (10 min, 250 g) and then resuspended in the original volume of the culture medium in order to reach 5×10^6 cells/ml. Vehicle controls (DMSO) were also included. For both the viability and the mitogenic assays, the number of replicates was three ($n=3$) for all treatment groups.

Substances affecting cell proliferation and causing 50% inhibition (IC_{50}) were used to prepare mixtures. Five mixtures of different compounds were tested as described above using concentrations of 0.1, 0.5 and $1 \times IC_{50}$. The first mixture was catechol and hydroquinone. Each of the four other mixtures consisted of three different aldehydes. Controls consisting of the individual components of the mixtures were included. The effect of the mixtures on proliferation was determined with ConA as the mitogen.

Cell viability using flow cytometry

A 100 μ l aliquot was taken at 3, 6, 12 and 24 hours and 1 μ g/ml of propidium iodide was added. Viability was determined by flow cytometry with a FACScan (Beckton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA). The background noise was adjusted to be below 10^1 FL2 and a marker (M1) was created to include fluorescence from 10^1 to 10^4 FL2. The data was analyzed with the Lysis II software. The percentage of cells below M1 is the percentage of dead cells. We didn't observe any modification of cell size on the FSC vs. SSC dot plot for any of the tested compounds.

Cell proliferation assay

Cells (5×10^5) were plated in flat bottom 96 well-plates under sterile conditions. Controls consisting in the RPMI medium alone and the culture medium with the mitogen were used. Concanavalin A (ConA), a T-cell mitogen, was used at 2.5 $\mu\text{g/ml}$ and lipopolysaccharide (LPS), a B-cell mitogen at 5 $\mu\text{g/ml}$. After a 48 hour incubation period (37°C , 5% CO_2), 0.5 μCi of ^3H methyl-thymidine (ICN, 6.7 Ci/mmol) was added to each well. The incubation was resumed for another 18 hours under the same conditions. Cells were then collected on Skatron Filtermat filters using a cell harvester (Skatron Instruments model #11019) and allowed to dry. Filters were put individually into scintillation vials with 3.5 ml of CytoScint scintillation cocktail (ICN) and counted in a β counter (LKB Wallac 1217 Rackbeta).

Statistical analysis

The differences between the control cells and those exposed to the different concentrations of each substance or mixture were tested for significance using a Dunnett's test with a P value of less than 0.05. Determination of IC_{50} values was performed with Excel by linear regression ($y = a + bx$) with at least 3 points chosen in a linear section of the concentration-response curve.

RESULTS

Cell viability after exposure to selected combustion smoke constituents

For the viability assay, only acrolein and crotonaldehyde induced a cytotoxic effect. Both chemicals produced a concentration and time dependant significant effect on splenocyte viability as determined by PI dye exclusion. At 10^{-5} M and higher concentrations, the significant suppressive effect was already observed after 3 hour exposure (Figures 1 and 2). A longer incubation period with acrolein and crotonaldehyde at the highest concentrations resulted in the death of almost all cells (Figures 1 and 2). The other eleven compounds produced no cytotoxic effects on splenocytes after a 3-hour exposure. For instance, benzene had no significant effect on splenocyte viability (Figure 3). No differences in percentage of viability were observed for any concentration when compared to the control for all incubation periods.

Effects of some combustion smoke constituents on cell proliferation

Of the thirteen tested compounds, acetaldehyde (Figure 4), benzene, butyraldehyde, isoprene, styrene and toluene had no marked effects on cell proliferation with either ConA or LPS mitogens. For the other seven chemicals, significant inhibitory effects on splenocyte proliferation as determined by ^3H methyl-thymidine incorporation were observed. The concentrations at which the inhibition occurred and extent varied depending on the substance. For instance, a significant inhibition of Con A- and LPS-induced proliferation of splenocytes was observed at 5×10^{-4} M and 1×10^{-3} M of formaldehyde (Figure 5) as compared to the control.

IC₅₀ determination

Linear regressions were performed on the data in order to obtain IC₅₀ values for the viability and the cell proliferation assay. Three types of effects were observed: 1. No effect of the substance on viability and proliferation; 2. An inhibition of proliferation without any significant effect on viability after 3 hours; 3. Reduction of viability and an inhibition of proliferation. No effects on viability and cell proliferation were observed for acetaldehyde, benzene, butyraldehyde, isoprene, styrene and toluene. For all substances where an effect was observed and an IC₅₀ could be calculated, IC₅₀ values were in the range of 10⁻⁵ M to 10⁻³ M (Table 1). Catechol and acrylonitrile IC₅₀ values were slightly lower for the LPS cell proliferation assay than for the ConA cell proliferation assay. Hydroquinone was the most toxic towards lymphocyte proliferation, with IC₅₀ values of 1.19x10⁻⁵ and 2.32 x 10⁻⁵ M for ConA and LPS-induced proliferation. We can see in figure 6 the effect of hydroquinone on viability and proliferation of splenocytes. Hydroquinone significantly inhibited both B- and T-cell proliferation in the 10⁻⁵ to 10⁻³M concentration range, while no effect can be observed on viability, though a slight, non-significant decrease is seen at 10⁻³ M.

Crotonaldehyde with IC₅₀ values of 2.01 x 10⁻⁵ and 2.47 x 10⁻⁵ M and acrolein with IC₅₀ values of 2.06 x 10⁻⁵ and 3.16 x 10⁻⁵ M for ConA and LPS-induced proliferation, respectively, were only slightly less toxic than hydroquinone. However, since acrolein affected both viability and mitogenic activity, it would be judged more toxic than hydroquinone which had no marked effect on viability.

Mixtures of different compounds

Mixtures of compounds were made in order to examine if there was any interactive effect. A mixture of catechol and hydroquinone was tested, as well as four mixtures of three aldehydes with all possible combinations at the IC_{50} values as in Table 1. The mitogenic assay for the different mixtures was made with ConA as a T-cell mitogen. A significant difference of the stimulation index (proliferation of mitogen-stimulated test cells divided by the proliferation of control, non-stimulated cells) for all mixtures at concentrations of $0.5 \times IC_{50}$ and $1.0 \times IC_{50}$ was observed when compared to the control (Figures 7 to 11). For mixtures 3 (Figure 9) and 5 (Figure 11), a significant difference from the control was observed at $0.1 \times IC_{50}$. For all five mixtures, cell proliferation was almost completely inhibited at $1 \times IC_{50}$ concentration, which could be considered as a positive control. Statistical significance for mixtures as compared to individual compound are summarized in Table 2.

DISCUSSION

Of the thirteen compounds studied, hydroquinone was the most toxic for the ConA and LPS cell proliferation assay (Table 1), which is consistent with a study comparing the effects of catechol, phenol and hydroquinone on natural cytotoxicity. This study showed that hydroquinone was the most toxic of the three both *in vitro* and *in vivo* (Taysse *et al*, 1995). Furthermore, it is known that hydroquinone and catechol can be further oxidized to p-benzoquinone, a compound also present in smoke and known to inhibit IL-2 production, interleukin involved in lymphocyte activation (Li *et al*, 1997). Our results indicates that hydroquinone can effectively inhibit B- and T-cell proliferation induced by mitogens, while having no significant effect on cell viability (Figure 6).

Six compounds produced no cytotoxic or anti-proliferative effects under our experimental conditions: acetaldehyde, benzene, butyraldehyde, isoprene, styrene and toluene. This indicates that cell viability as well as T and B-cell proliferation were unaffected by these compounds under our experimental conditions. Even though benzene is known to inhibit T-cell B-cell blastogenesis *in vivo* (Rozen *et al*, 1984), any inhibition on either T-cells or B-cells *in vitro* was not observed using the same mouse strain. This may indicate the need for some bioactivation in order to observe inhibition, since it is generally accepted that the toxic property of benzene is manifested mostly by it's metabolites (Li *et al*, 1997). While toluene produced cytotoxic effects *in vitro* in rat and rabbit pulmonary macrophages (Suleiman, 1987), no cytotoxic effects were observed on mice splenocytes under our experimental conditions. Possible explanations could be that toluene acts preferentially on macrophages, or that 3 hours of exposure was insufficient to observe any effect.

Acrolein and crotonaldehyde induced a cytotoxic effect after 3 hours of exposure at the highest concentrations and inhibited both T-cell and B-cell proliferation. The anti-proliferative effect of crotonaldehyde and acrolein could partly be explained by their cytotoxic effects, the IC_{50} values of the viability and mitogenic assays being within the same range.

In the presence of formaldehyde, catechol, hydroquinone, acrylonitrile and propionaldehyde, an inhibition of T-cell and B-cell proliferation was observed without any effect on cell viability. The IC_{50} value for the ConA mitogenic assay is in the same range as the IC_{50} for the LPS mitogenic assay, except for acrylonitrile and catechol which seemed to affect B-cells more, as shown by the lower IC_{50} values for the LPS mitogenic assay. This could be explained by a preferential effect on a B-cell specific signaling pathway such as the CD40 pathway (Kishimoto and Hirano, 1989). While hydroquinone was the most toxic chemical for lymphocyte proliferation, acrolein was the most toxic compound for lymphocyte viability. It was also shown that various aldehydes inhibited HLA-DR (human leukocyte antigen- DR chain) expression and interfered with the development of immune reaction by decreasing MHC II antigen presentation in human monocytes (Rhodes and Tite, 1988). This could explain the anti-proliferative effects observed for crotonaldehyde, acrolein, formaldehyde and propionaldehyde.

The IC_{50} values we obtained for hydroquinone are very similar to those previously on human lymphocytes (Li et al, 1998). This paper also mentions that the amount of hydroquinone delivered to the lungs by a typical cigarette is sufficient to generate 18 ml

of a 50 μ M solution, which is more concentrated than the IC_{50} values obtained. According to previously reported results (Li et al, 1998; IARC, 1986; Stedman, 1968), the IC_{50} values we obtained seems to be relevant with the amount that can be effectively delivered to the lungs.

For mixtures 1 (Figure 7), 2 (Figure 8), 3 (Figure 9), 4 (Figure 10), 5 (Figure 11) interactive effects were observed at $0.5 \times IC_{50}$ and $1 \times IC_{50}$ concentrations. At these concentrations, the effects observed on T lymphocyte proliferation were higher for the mixture than for each of its constituents alone. The two mixtures 3 and 5 inhibited also lymphocyte proliferation at a concentration of $0.1 \times IC_{50}$, for which no significant effect could be observed for any of the individual mixture constituents. The interactive effects observed could be due to substances producing an effect on different lymphocyte sub-populations or to a difference in the inhibition mechanism.

Our results indicate that some combustion products exert an effect on cell viability and lymphocyte proliferation following 3 hours of exposure. This suggests that some of these substances have adverse effects on important lymphocyte functions. Compounds specifically inhibiting lymphocyte proliferation without affecting cell viability may create favorable conditions for tumor cell growth. Infectious agents may also be able to proliferate more effectively. Further experiments are required in order to investigate the effects of these compounds on other immunologic functions such as phagocytosis, NK cytotoxic activity and antibody production.

REFERENCES

Aoyama K. 1986, Effects of benzene on lymphocyte subpopulations and immune response in mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85, 92-101.

Aranyi C, O'Shea WJ, Sherwood RL, Graham JA, Miller FJ, 1985, Effects of toluene inhalation on pulmonary host defenses of mice, *Toxicol. Lett.* 25, 103-110.

Baj Z, Majewska E, Zeman K, Pokoca L, Dworniak D, Paradowski M, Tchorzewski H, 1994, The effects of chronic exposure to formaldehyde, phenol and organic chlorohydrocarbons on peripheral blood cells and the immune system in humans, *J. Invest. Allerg. Clin. Immunol.* 4, 186-191.

Baker R and Proctor C, 2001, Where there's smoke, *Chemistry in Britain*, January, pp 38-41.

Eder E, Schuler D, Budiawan, 1999, Cancer risk assessment for crotonaldehyde and 2-hexenal: an approach, *IARC Sci. Publ.* 150, 219-232.

Green GM, 1985, Mechanisms of tobacco smoke toxicity on pulmonary macrophage cells, *Eur. J. Respir. Dis. Suppl.* 139, 82-85.

Hoffmann D, Hoffmann I, 1997, The changing cigarette, 1950-1995, *J. Toxicol. Environ. Health.* 50, 307-364.

IARC monographs : Chemistry and analysis of tobacco smoke, 1986, vol 38, Lyon : Intl. Agency Research Cancer pp 83-121.

Jakab GJ, 1993, The toxicologic interactions resulting from inhalation of carbon black and acrolein on pulmonary antibacterial and antiviral defenses, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 121, 167-175.

Kishimoto T and Hirano T, 1989, B lymphocyte activation, *Fundamental Immunology* 2nd edition, William E. Paul, pp 394-396, New York, Raven Press.

Li Q, Aubrey MT, Christian T, Freed BM, 1997, Differential inhibition of DNA synthesis in human T cells by the cigarette tar components hydroquinone and catechol, *Fundam. Appl. Toxicol.* 38, 158-165.

Li Q, Kasten-Jolly J, Yen Y, and Freed BM, 1998, Reversal of hydroquinone-mediated suppression of T cell proliferation by transfection of the M2 subunit of ribonucleotide reductase, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 150, 154-157.

Melendez-Colon VJ, Luch A, Seidel A, Baird WM, 1999, Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than purinic sites, *Carcinogenesis* 20, 1885-1891.

Perfetti TA, Coleman WM, Smith WS, 1998, Determination of mainstream and sidestream cigarette smoke components for cigarettes of different tobacco types and a

set of reference cigarettes, Beiträge zur Tabakforschung International 18, 95-113.

Rhodes J and Tite J, 1988, Functional abolition of monocyte HLA-DR by aldehyde treatment. A novel approach to studies of class II restriction elements in antigen presentation, J. Immunol. 140, 3344-3351.

Rozen MG, Snyder CA, Albert RE, 1984, Depressions in B- and T-lymphocyte mitogen-induced blastogenesis in mice exposed to low concentrations of benzene, Toxicol. Lett 20, 343-349.

Snyder R, 2000, Overview of the toxicology of benzene, J. Toxicol. Environ. Health, 61, 339-346.

Stedman RL, 1968, The chemical composition of tobacco and tobacco smoke, Chem. Rev. 68, 153-198.

Suleiman SA, 1987, Petroleum hydrocarbon toxicity in vitro : effect of n-alkanes, benzene and toluene on pulmonary alveolar macrophages and lysosomal enzymes of the lung, Arch. Toxicol. 59, 402-407.

Taysse L, Troutaud D, Khan NA, Deschaux P, 1995, Structure-activity relationship of phenolic compounds (phenol, pyrocatechol and hydroquinone) on natural lymphocytotoxicity of carp (*Cyprinus carpio*), Toxicology 98, 207-214.

Thrasher JD, Wojdani A, Cheung G, Heuser G, 1987, Evidence for formaldehyde antibodies and altered cellular immunity in subjects exposed to formaldehyde in mobile homes, Arch. Environ. Health 42, 347-350.

Wu W-J, Pruett SB, 1996, Suppression of splenic natural killer cell activity in a mouse model for binge drinking. 1. Direct effects of ethanol and its major metabolites are not primarily responsible for decreased natural killer cell activity, J. Pharmacol. Exp. Ther.. 278, 1325-1330.

Legends of Figures

Figure 1. Time- and concentration-response curves of the percentage of viability for mice splenocytes exposed to crotonaldehyde at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M. * denotes a significant difference when compared to the control with $p < 0.05$.

Figure 2. Time- and concentration-response curves of the percentage of viability for mice splenocytes exposed to acrolein at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M. * denotes a significant difference when compared to the control with $p < 0.05$.

Figure 3. Time- and concentration-response curves of the percentage of viability for mice splenocytes exposed to benzene at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M.

Figure 4. Effect of acetaldehyde on ConA- and LPS-induced proliferation of mice splenocytes after 3 hours of exposure as determined by 3 H-methyl-thymidine incorporation.

Figure 5. Effect of formaldehyde on ConA- and LPS-induced proliferation of mice splenocytes after 3 hours of exposure as determined by 3 H-methyl-thymidine incorporation. * denotes a significant difference when compared to the control with $p < 0.05$.

Figure 6. Effect of 3 hours exposure to hydroquinone on splenocyte viability and mitogen-induced proliferation expressed in percentage of control. *denotes a significant difference when compared to the control with $p < 0.05$.

Figure 7. Effect of mixture 1 (catechol + hydroquinone) on ConA-induced proliferation of mice splenocytes after 3 hours of exposure as determined by ^3H -methyl-thymidine incorporation. *denotes a significant difference when compared to the control with $p < 0.05$.

Figure 8. Effect of mixture 2 (Acrolein + Crotonaldehyde + Propionaldehyde) on ConA-induced proliferation of mice splenocytes after 3 hours of exposure as determined by ^3H -methyl-thymidine incorporation. * denotes a significant difference when compared to the control with $p < 0.05$.

Figure 9. Effect of mixture 3 (Acrolein + Formaldehyde + Propionaldehyde) on ConA-induced proliferation of mice splenocytes after 3 hours of exposure as determined by ^3H -methyl-thymidine incorporation. * denotes a significant difference when compared to the control with $p < 0.05$.

Figure 10. Effect of mixture 4 (Crotonaldehyde + Formaldehyde + Propionaldehyde) on ConA-induced proliferation of mice splenocytes after 3 hours of exposure as determined by ^3H -methyl-thymidine incorporation. * denotes a significant difference when compared to the control with $p < 0.05$.

Figure 11. Effect of mixture 5 (Acrolein + Crotonaldehyde + Formaldehyde) on ConA-induced proliferation of mice splenocytes after 3 hours of exposure as determined by ^3H -methyl-thymidine incorporation. * denotes a significant difference when compared to the control with $p < 0.05$.

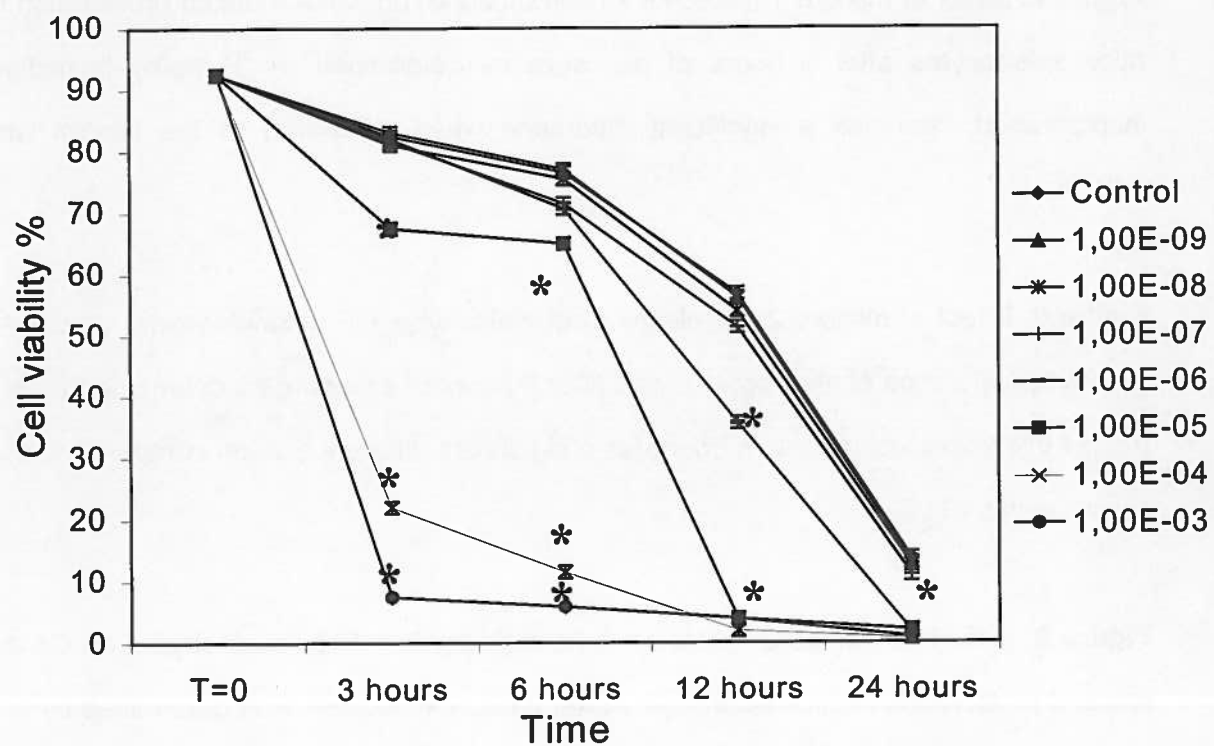


Figure 1.

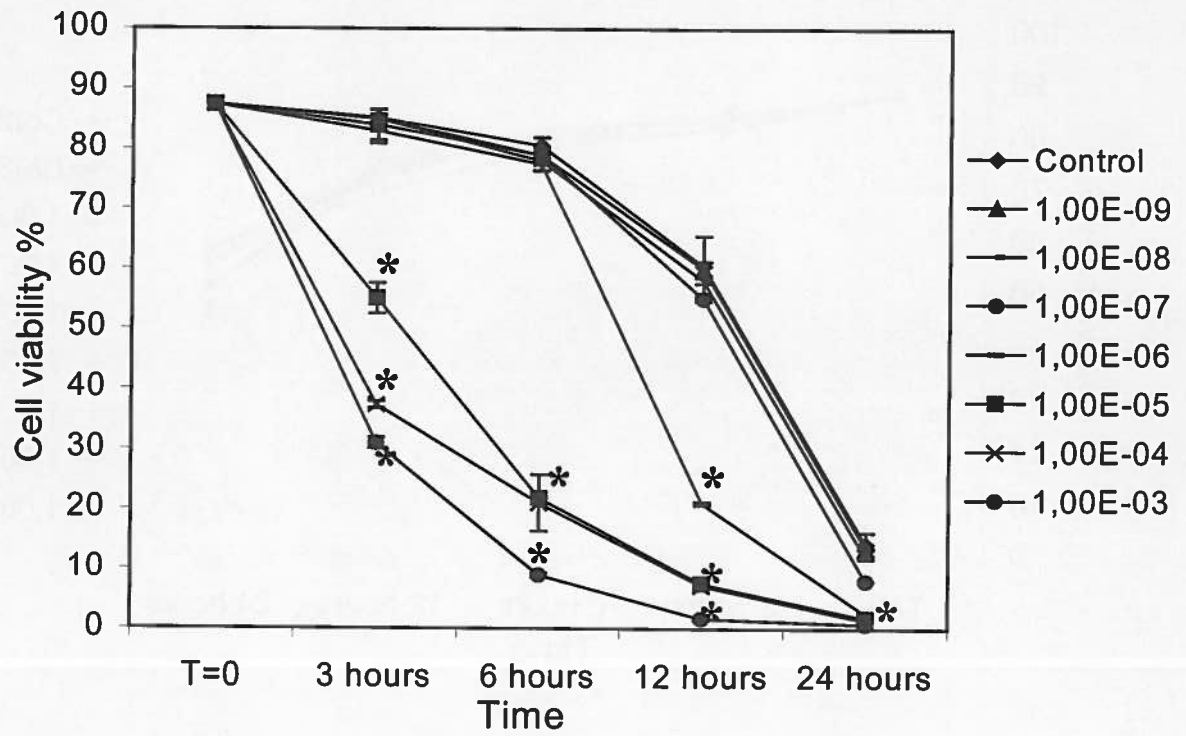


Figure 2.

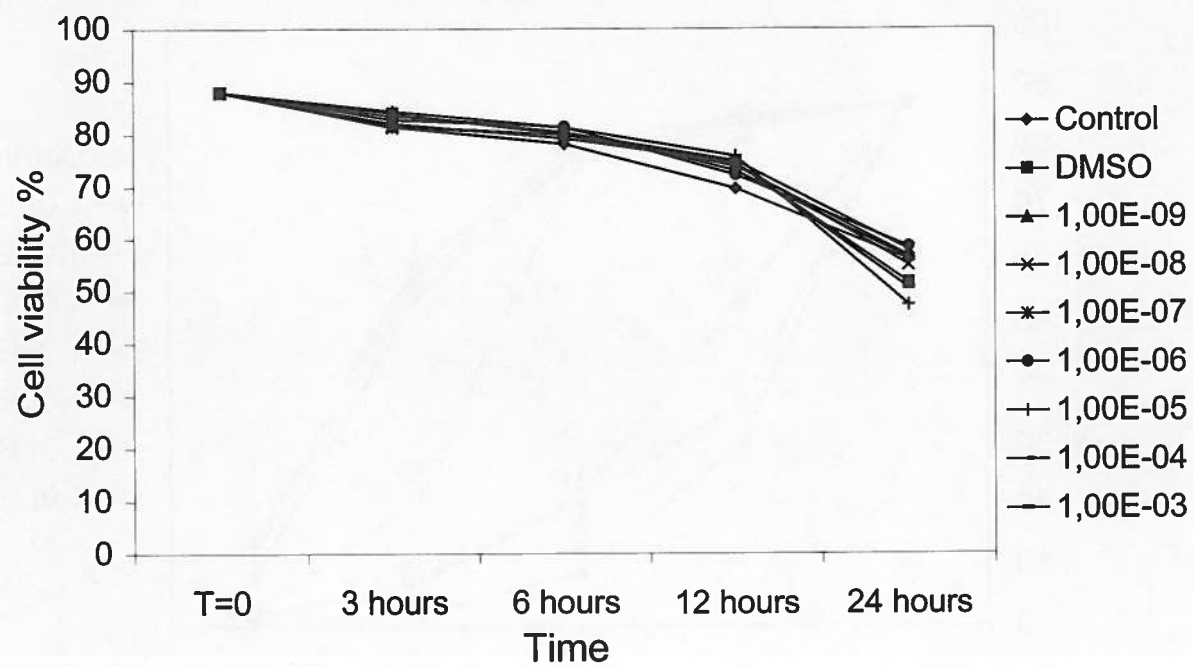


Figure 3.

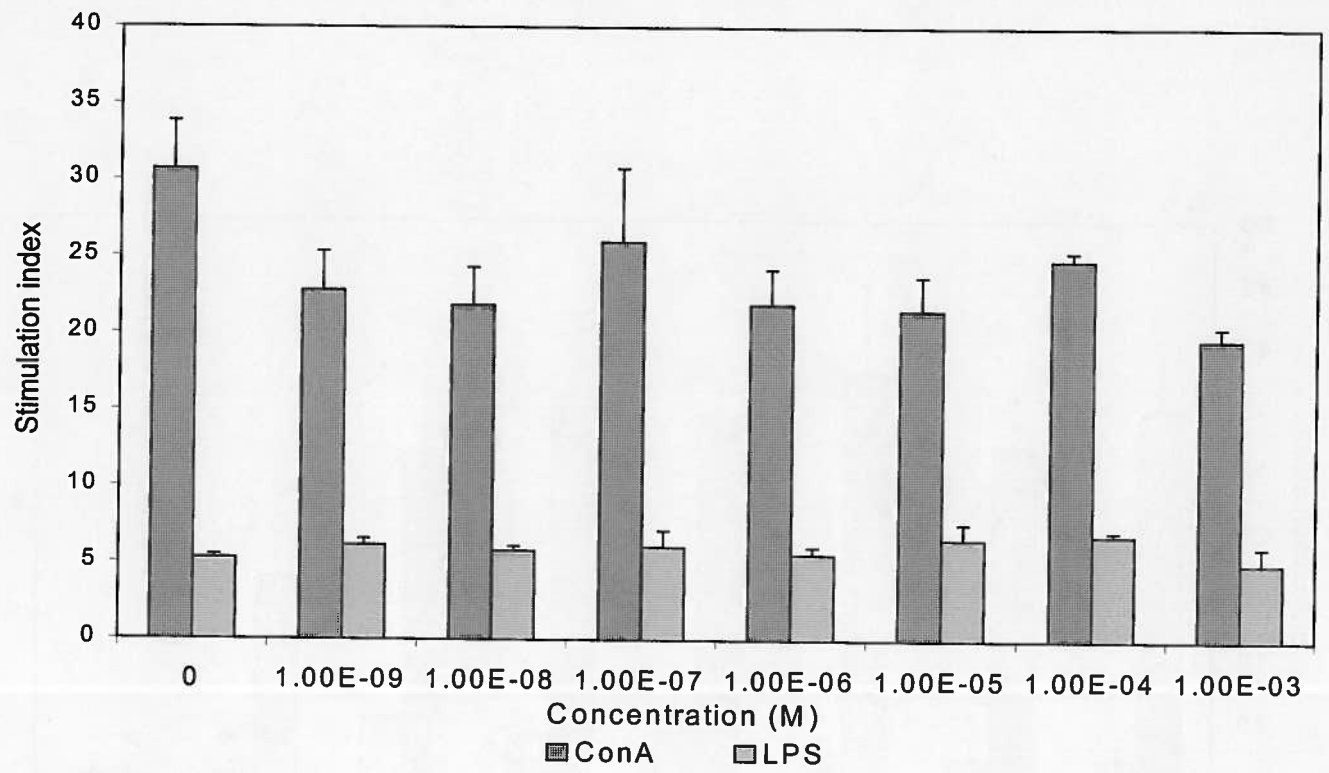


Figure 4.

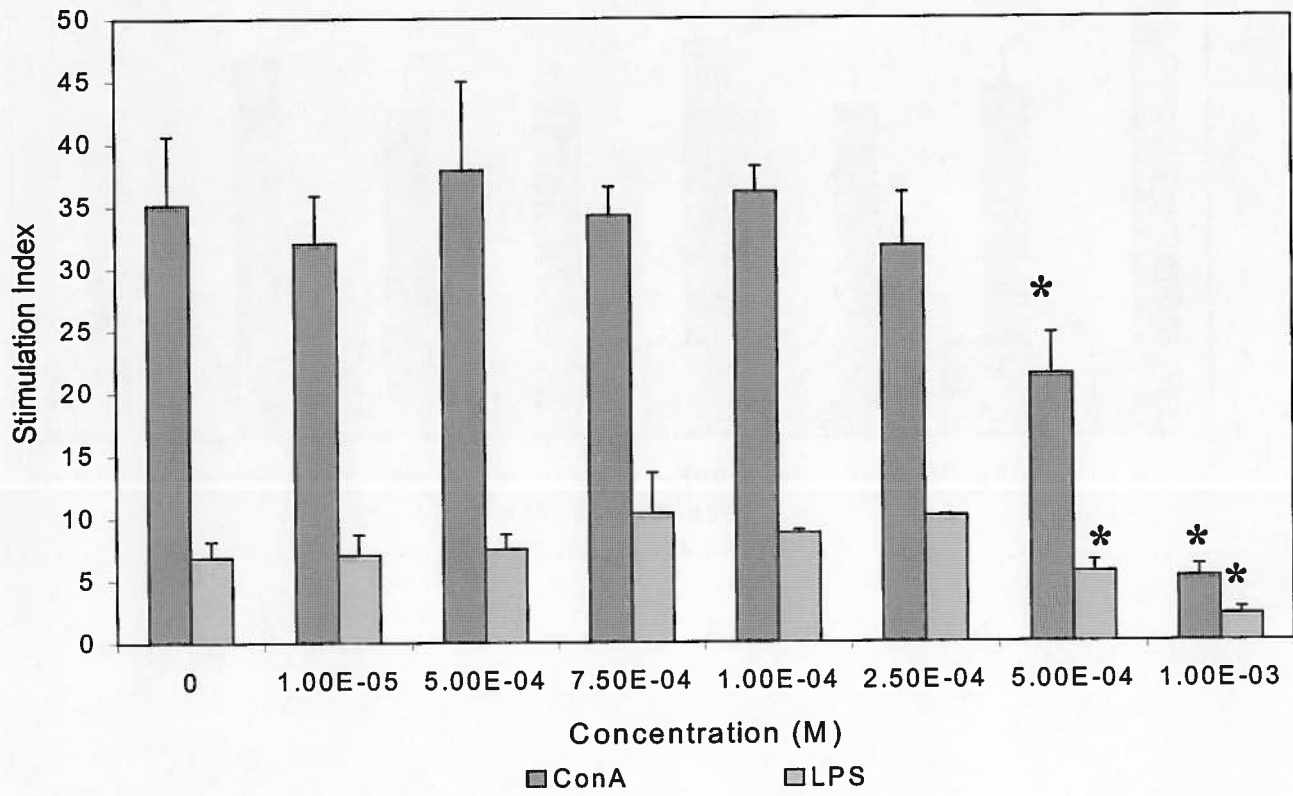


Figure 5.

Table 1. IC₅₀ values of all tested compounds for the viability and mitogenic assay after 3h exposure.

	IC ₅₀ viability (M)	IC ₅₀ ConA (M)	IC ₅₀ LPS (M)
Formaldehyde	no effect	5,86x10 ⁻⁴	8,20x10 ⁻⁴
Catechol	no effect	4,28x10 ⁻⁴	7,98x10 ⁻⁵
Acrylonitrile	no effect	4,24x10 ⁻⁴	1,05x10 ⁻⁴
Propionaldehyde	no effect	3,36x10 ⁻⁵	2,77x10 ⁻⁵
Acrolein	2,70x10 ⁻⁵	2,06x10 ⁻⁵	3,16x10 ⁻⁵
Crotonaldehyde	4,26x10 ⁻⁵	2,01x10 ⁻⁵	2,47x10 ⁻⁵
Hydroquinone	no effect	1,19x10 ⁻⁵	2,32x10 ⁻⁵

Compounds are ranked from the least to the most toxic according to the ConA mitogenic assay IC₅₀ value. No effect means that within the tested concentration range (10⁻⁹ to 10⁻³ M), viability or proliferation was unaffected as compared with the control group. Tested compounds not shown in the table had no effect on viability and proliferation.

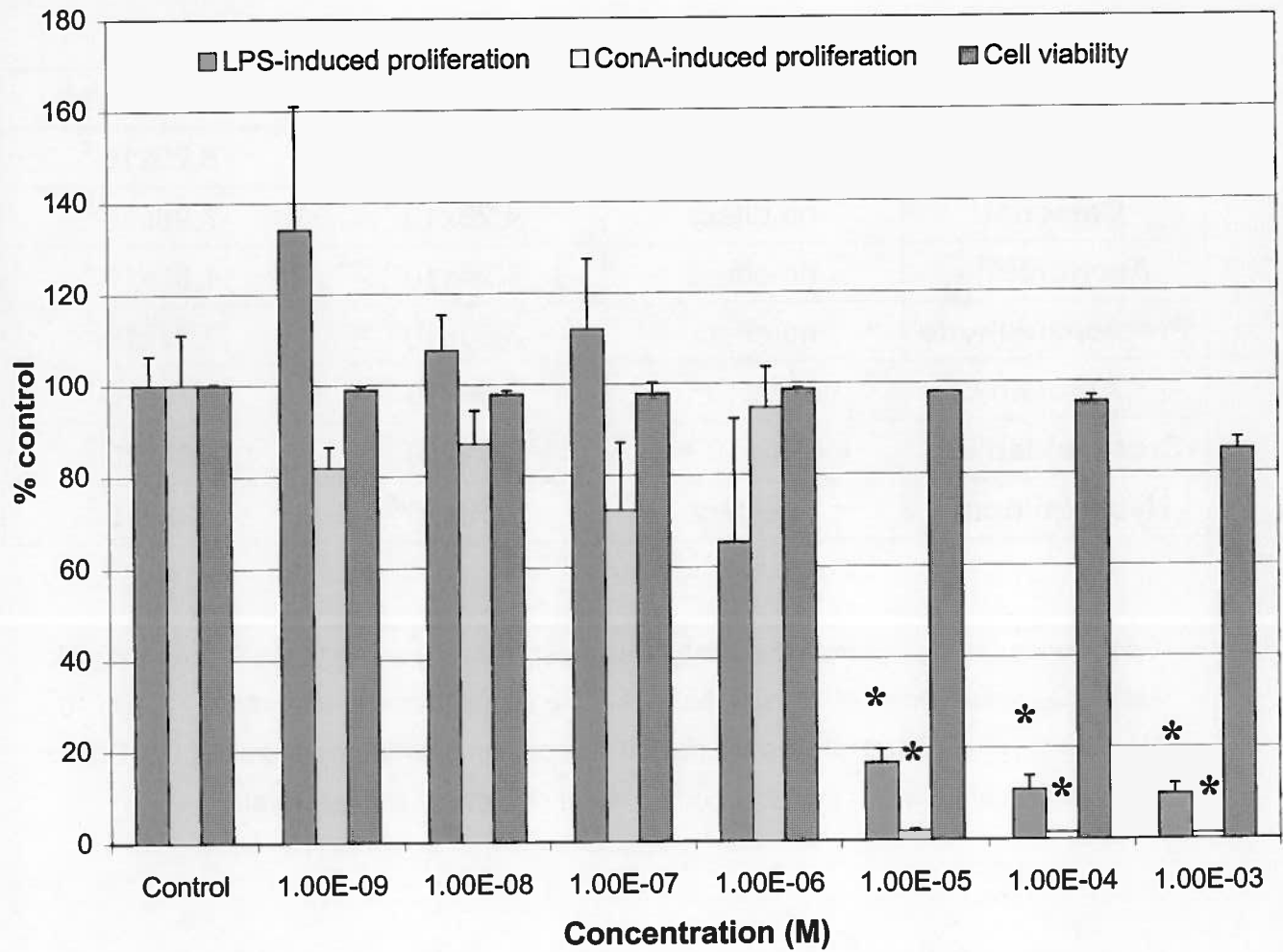


Figure 6.

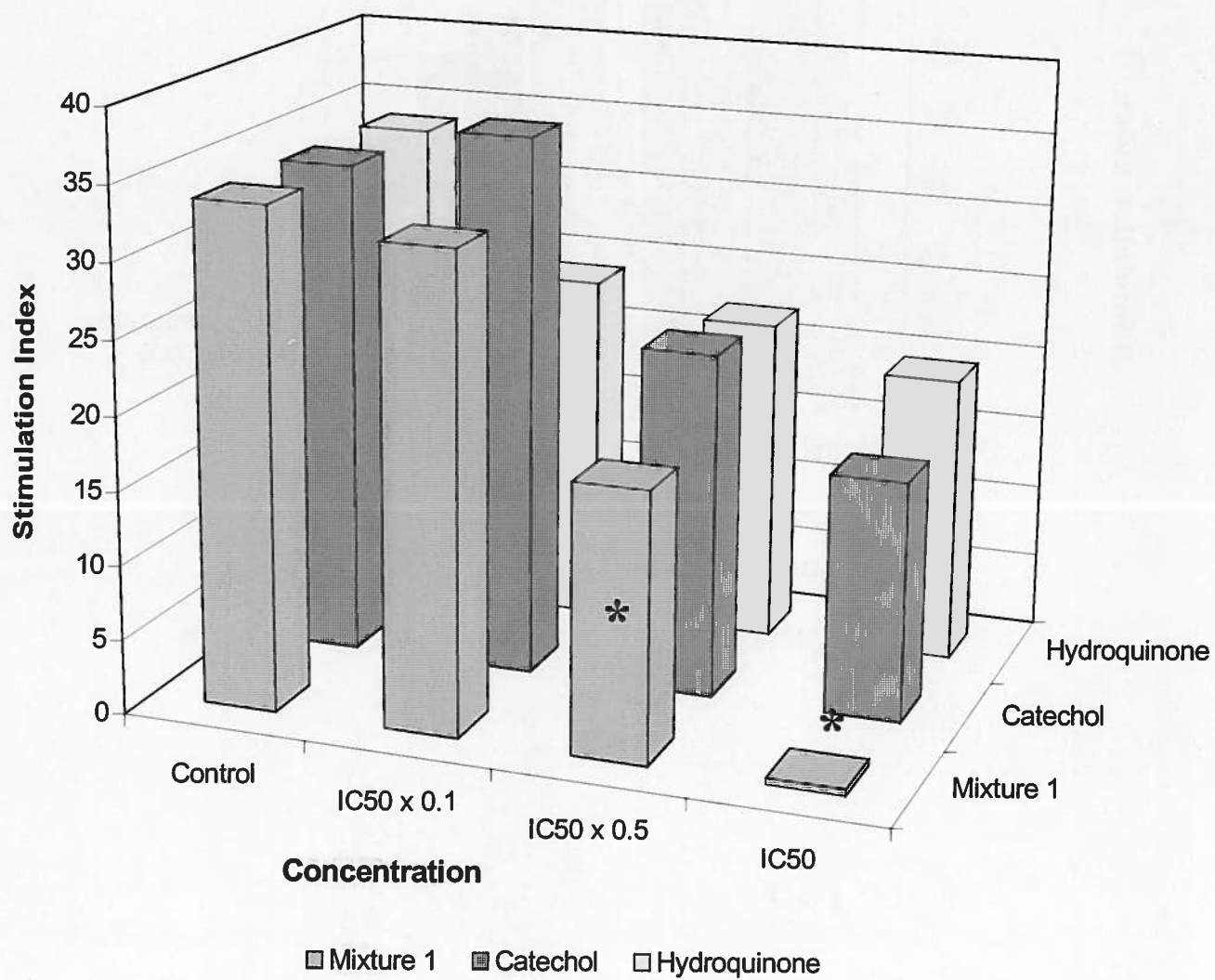


Figure 7.

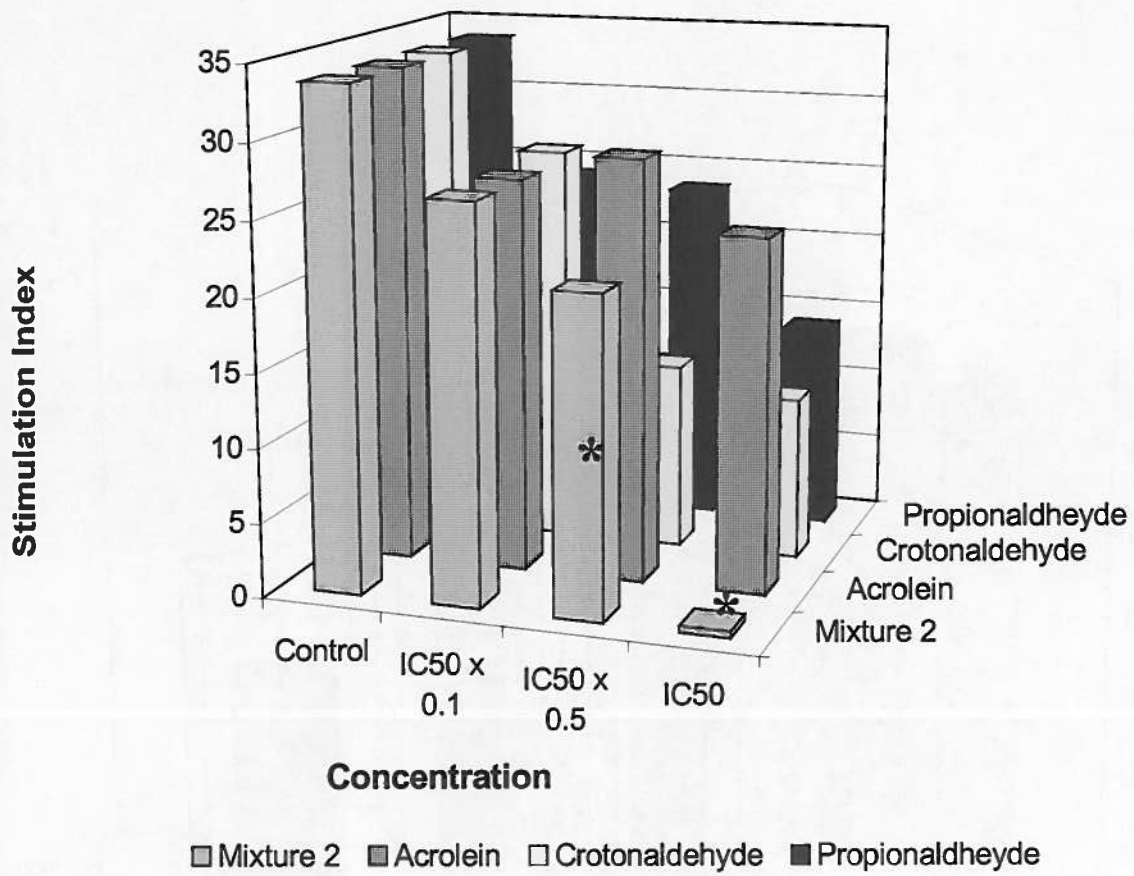


Figure 8.

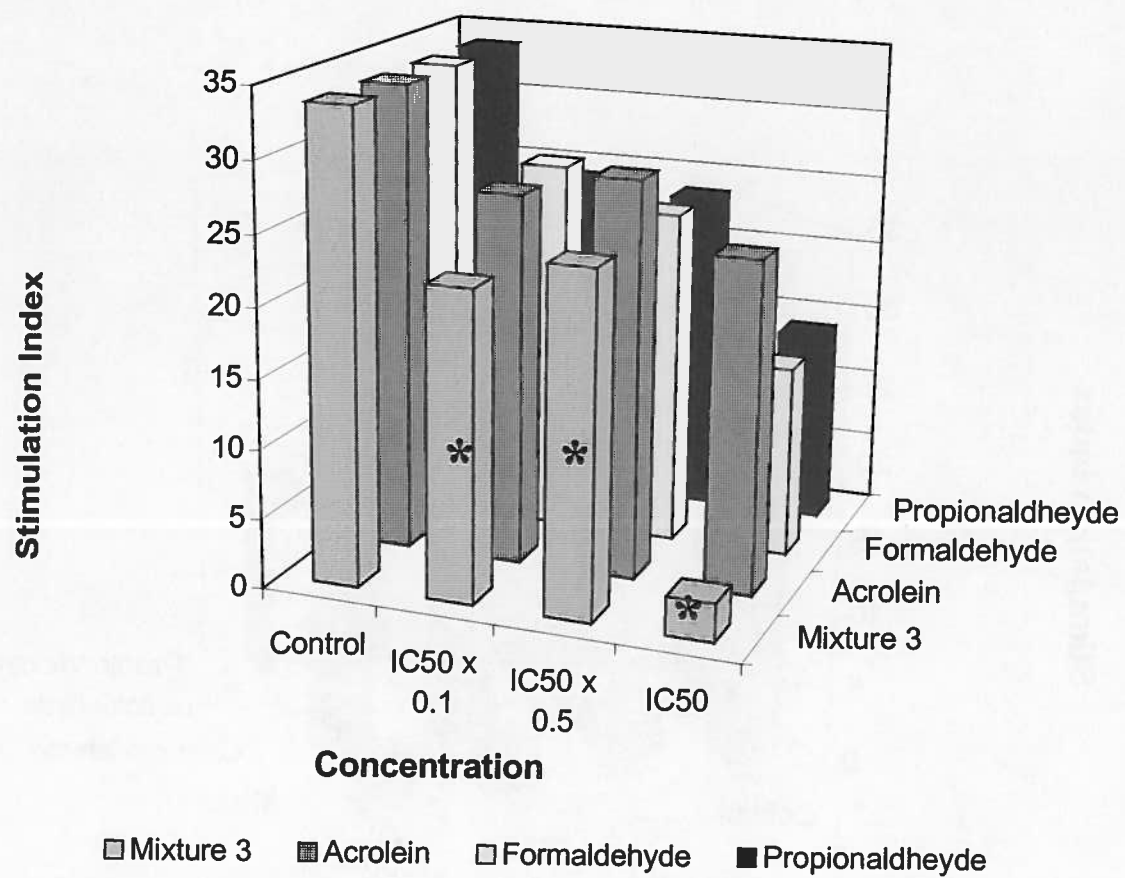


Figure 9.

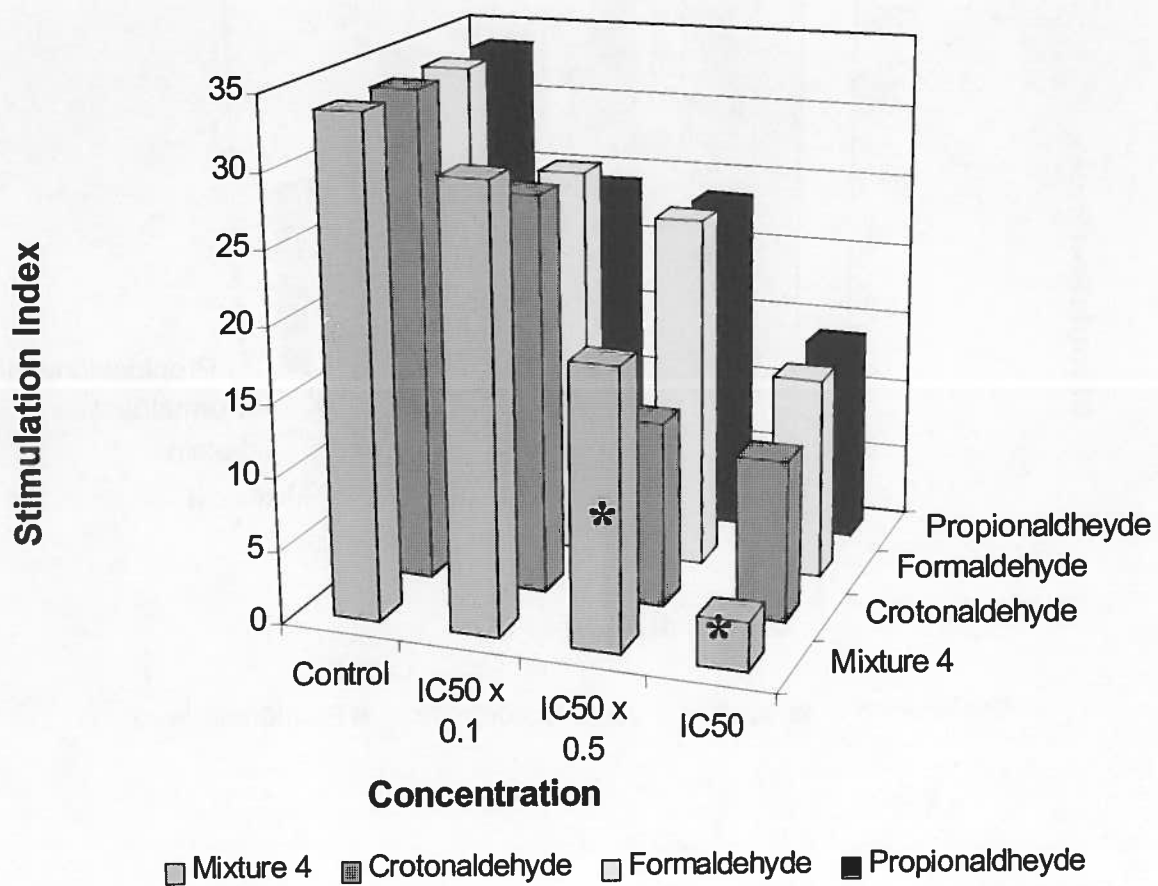


Figure 10.

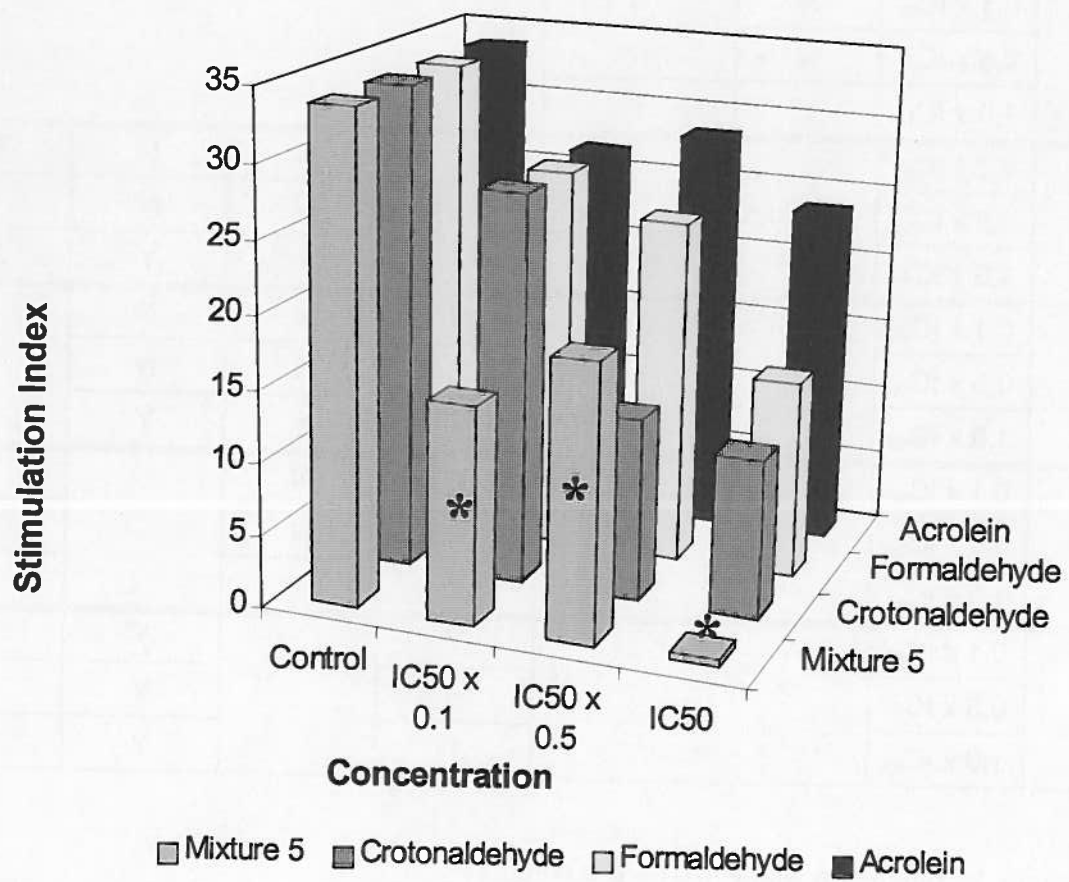


Figure 11.

Table 2 : Summary of statistical significance for mixtures and individual compounds.

Mixtures	IC ₅₀	Catechol	Hydroqui- none	Formalde -hyde	Propional -dehyde	Acrolein	Crotonal- dehyde
M1	0,1 x IC ₅₀	N	N				
	0,5 x IC ₅₀	N	N				
	1,0 x IC ₅₀	Y	Y				
M2	0,1 x IC ₅₀				N	N	N
	0,5 x IC ₅₀				N	N	Y
	1,0 x IC ₅₀				Y	Y	Y
M3	0,1 x IC ₅₀			N	N	N	
	0,5 x IC ₅₀			N	N	N	
	1,0 x IC ₅₀			Y	Y	Y	
M4	0,1 x IC ₅₀			N	N		N
	0,5 x IC ₅₀			N	N		Y
	1,0 x IC ₅₀			Y	Y		Y
M5	0,1 x IC ₅₀			Y		Y	Y
	0,5 x IC ₅₀			N		Y	Y
	1,0 x IC ₅₀			Y		Y	Y

Significance for difference with $P < 0,05$ are noted Y.

Chapitre 3

DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans ce chapitre, nous tenterons de dégager l'essentiel des connaissances apportées par les résultats obtenus des diverses expériences qui ont eu lieu tout au long de ce projet de recherche. Nous essaierons de saisir la signification de ces résultats en créant des liens avec certains travaux, certaines études retrouvées dans la littérature. Certaines explications ou mécanismes seront proposés quant au comportement des lymphocytes en présence de certaines substances, le tout appuyé par des données de la littérature.

1. Comparaison aux données disponibles dans la littérature

1.1 Généralités et revue des résultats

Comme mentionné précédemment, les travaux publiés concernant les effets des composés contenus dans la fumée de cigarette sont relativement peu nombreux. Il a par conséquent été impossible, pour certains des composés testés, de trouver des données dans la littérature, limitant donc, pour certains composés, la mise en perspectives de nos résultats avec d'autres études.

Pour toutes les substances testées, aucune diminution significative de la viabilité cellulaire et la prolifération ne fut observé dans les conditions décrites dans l'article présenté au chapitre 2 (matériel et méthodes) pour les 6 composés suivants : acétaldéhyde, benzène, butyraldéhyde, isoprène, styrène et toluène. L'acroléine et le crotonaldéhyde ont eu des effets significatifs sur la viabilité cellulaire et sur la prolifération, tandis que les 5 dernières substances, soient l'acrylonitrile, le formaldéhyde, le catéchol, l'hydroquinone et le propionaldéhyde ont seulement inhibé la prolifération.

1.2 Le benzène et ses dérivés

Le benzène n'a montré aucun effet sur la viabilité cellulaire et sur la prolifération dans les conditions expérimentales utilisées. Une étude montre pourtant que le benzène peut inhiber la prolifération des lymphocytes *in vivo* chez la souris C57/BL (Rozen, Snyder et Albert, 1984: 343). Cette étude démontre que des souris exposées par inhalation à 10 ppm de benzène 6h/jour pendant 6 jours ont montré une inhibition de la prolifération des cellules B au LPS et des cellules T au PHA, sans effets sur le nombre de cellules B et T. Une autre étude plus récente montre cependant que chez la souris exposée au benzène par inhalation pour 8 semaines avec des concentrations de 1 à 200 ppm, la concentration de 10 ppm n'a provoqué aucun effet significatif sur le nombre et la prolifération des lymphocytes (Farris et al., 1997: 137). Les concentrations de 100 et 200 ppm ont par contre augmenté de 6 à 15 fois le nombre de cellules en apoptose. Une dernière étude démontre que le benzène et le toluène présentent, *in vitro*, un effet cytotoxique sur les macrophages alvéolaires pulmonaires du rat et du lapin. Les macrophages alvéolaires pulmonaires sont, par leur localisation, susceptibles d'être exposés aux composants de la fumée. Cette étude rapporte une CI_{50} de 10 mM pour le benzène et le toluène chez le rat et de 5 mM chez le lapin (Suleiman, 1987: 402). Ces concentrations sont situées à l'extérieur de l'intervalle de concentrations utilisé lors de nos recherches, ce qui pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas observé d'effets. De plus, on remarque que les effets diffèrent d'une espèce à l'autre, et il est fort probable que ces effets seraient aussi différents sur la souris, modèle animal que nous avons privilégié pour nos recherches.

Une étude effectuée sur la souris CD-1, exposée oralement au toluène via l'eau, a mis en évidence une inhibition significative de la prolifération des splénocytes aux mitogènes LPS, PWM, Con A et PHA à 405 mg/l, soit environ 4,3 mM (Hsieh, Sharma et Parker, 1989: 93). Encore une fois, la concentration utilisée est plus élevée que celles que nous avons utilisées lors de nos recherches, ce qui pourrait expliquer le fait qu'aucun effet ne fut observé sur nos lymphocytes de souris *in vitro*.

L'exposition de souris au styrène par voie orale a entraîné une diminution de la viabilité cellulaire dans les ganglions lymphatiques (Dogra et al., 1989: 577), effet que nous n'avons pas observé *in vitro* lors de nos travaux .

Les données de la littérature en ce qui concerne le benzène, toluène et styrène sont issues de manipulations effectuées *in vivo*, tandis que nos expérimentations furent toutes réalisées *in vitro*. Plusieurs mécanismes de bioactivation ou biotransformation peuvent modifier l'action ou la disponibilité d'un composé *in vivo*. Par conséquent, nous ne pouvons pas vraiment comparer nos données obtenues *in vitro* à celles obtenues *in vivo* trouvées dans la littérature en espérant qu'elles concordent parfaitement. En ce sens, nos données tendent à combler le manque de données *in vitro* concernant les effets de ces substances sur la viabilité et la prolifération des lymphocytes, et pourraient permettre d'élucider les mécanismes derrière les inhibitions observées *in vitro*. Il ne faut cependant pas oublier que dans la plupart des cas, le benzène nécessite une activation métabolique afin de provoquer des effets toxiques, il ne faut cependant pas s'empresse de conclure que ce dernier n'est pas toxique parce que nous n'avons pas observé d'effets significatifs sur les paramètres observés. Une activation métabolique est aussi requise pour le styrène et probablement pour le toluène.

1.3 Les aldéhydes

Une étude montre que des travailleurs exposés au formaldéhyde par inhalation ont présenté une diminution de la prolifération au PHA et aux alloantigènes (Baj et al., 1994: 186), diminution qui fut aussi observée lors de nos expérimentations (voir tableau 1 de l'article, chapitre 2).

1.4 Le catéchol et l'hydroquinone

Les données disponibles en ce qui concerne le catéchol et l'hydroquinone sont plus complètes que pour les autres substances, plusieurs chercheurs s'étant intéressés à ces

composés. Une concentration de 50µM de catéchol ou d'hydroquinone, des métabolites du benzène, ont causé 90% d'inhibition de la synthèse d'ADN IL-2-dépendante chez des HTL stimulés au PHA *in vitro* (Li et al., 1997:158). On rapporte aussi une diminution de la prolifération des splénocytes de rat au PHA à 10µM de catéchol ou d'hydroquinone, sans effet sur la viabilité (Li et al., 1997:158). Nos observations montrent plutôt une inhibition plus modérée aux concentrations mentionnées par cette étude. Il faut toutefois rappeler que notre choix de limiter l'exposition à une période de 3 heures explique probablement le fait que l'on observe des inhibitions de la prolifération à des concentrations un peu plus élevées, et le fait que nous utilisons des souris et non des HTL peut faire une différence. Cependant, une autre étude de ce groupe de chercheurs rapporte une valeur de CI_{50} de 16µM pour l'hydroquinone, soit une valeur similaire à nos résultats (Li et al, 1998:154).

2. Signification des résultats

Nos résultats apportent des informations quant aux valeurs de CI_{50} de certains composés retrouvés dans la fumée de cigarette, mais les concentrations que nous avons utilisées correspondent-elles aux quantités effectivement absorbées par le fumeur? Ces concentrations représentent-elles un véritable danger pour la santé des fumeurs ? Pour répondre à ces questions, nous pouvons comparer des valeurs de CI_{50} obtenues avec les quantités de chaque composé qu'une cigarette peut apporter aux poumons. Le tableau 2 présente les quantités en µg retrouvées dans la fumée de cigarette pour chacune des substances testées, classées selon la teneur en goudron de la cigarette. Il faut aussi tenir compte du phénomène de bioaccumulation, les fumeurs ne se contentent habituellement pas d'une seule cigarette. Une étude (Ghilarducci et Tjeerdema, 1995: 95) effectuée chez des pompiers, exposés à diverses substances de la fumée de combustion, a montré que ces derniers ne subissent qu'une faible bioaccumulation de l'acroléine, à cause de la bonne solubilité de l'acroléine dans l'eau (voir tableau 1, solubilité). À l'inverse, les composés ayant une faible solubilité dans l'eau ont tendance à s'accumuler dans l'organisme.

Un groupe de chercheurs rapporte qu'une cigarette peut déposer jusqu'à 100 µg d'hydroquinone et 280 µg de catéchol² dans les poumons et qu'étant donné le faible volume de liquide dans les poumons, les concentrations de catéchol et d'hydroquinone peuvent facilement atteindre les 50 µM (Li et al., 1997:158). En effet, les 100 µg d'hydroquinone déposés dans les poumons par une cigarette seraient suffisants pour générer 18 ml d'une solution de 50 µM, une concentration pouvant potentiellement favoriser la croissance des cellules tumorales en inhibant sélectivement la prolifération des lymphocytes (Li et al, 1998:154).

Le phénomène d'interaction entre différentes substances augmente aussi la gravité des effets observés pour chacun des composés. Les données obtenues pour les mélanges de composés semblent indiquer que des mélanges simples, de deux ou trois composés, peuvent être plus néfastes que les composés seuls (voir figures 6 à 10 de l'article présenté au chapitre 2). Le mélange de quelques milliers de composés contenus dans la fumée de cigarette comprend probablement quelques combinaisons particulièrement nocives pour le fumeur. Pour les mélanges 3 et 5 (se référer à l'article présenté au chapitre 2 pour la composition exacte des mélanges), des effets significatifs par rapport au contrôle étaient déjà visibles à $0,1 \times CI_{50}$, concentration qui n'aurait pas dû provoquer une inhibition aussi marquée.

Ces données semblent indiquer un certain danger pour le système immunitaire du fumeur, du moins pour les composés moins solubles, qui ont tendance à s'accumuler dans l'organisme à un taux qui dépend du nombre de cigarettes fumées par jour.

² Ces données sont issues d'observations sur des cigarettes américaines et peuvent, par conséquent, différer des données rapportées dans le tableau 2.

3. Explications possibles aux effets observés et mécanismes sous-jacents

3.1 Le benzène et ses dérivés

Bien que le benzène n'ait pas présenté de toxicité sous nos conditions expérimentales, il est généralement admis que le benzène doit subir une activation métabolique afin de provoquer des effets néfastes (Li et al., 1997:158). De plus, des études montrent que les dérivés simples du benzène comme le catéchol et l'hydroquinone peuvent être davantage oxydés en quinones, notamment en p-benzoquinone, substance aussi retrouvée dans la fumée de cigarette. L'exposition au catéchol et/ou à l'hydroquinone engendre donc une toxicité due à ces substances, mais aussi une toxicité due à leur dégradation en p-benzoquinone, une étude ayant démontré que ce dernier pouvait inhiber la prolifération en bloquant la production d'IL-2 (Geiselhart et al., 1997: 30).

Le fait que nous n'ayons pas observé d'effets avec le benzène est probablement dû au milieu de culture utilisé, qui ne contenait pas les éléments nécessaires à la biotransformation du benzène en métabolites plus réactifs, ou en contient si peu qu'une exposition plus longue aurait été requise.

L'étude qui s'est intéressée aux effets du catéchol et de l'hydroquinone sur la synthèse d'ADN (Li et al., 1997:158) suggère que le catéchol agisse en inhibant une étape importante de la synthèse d'ADN. En effet, les auteurs de cette étude ont bloqué cette inhibition en ajoutant du FeCl_3 , laissant croire que le catéchol produit son effet en chélatant le Fe^{3+} , une propriété connue du catéchol. Le fer est un important cofacteur de l'activité ribonucléotide réductase (Li et al., 1997:158). L'effet de l'hydroquinone, lui, n'est pas bloqué par l'ajout de FeCl_3 dans le milieu. On propose plutôt l'hypothèse que l'hydroquinone puisse masquer un radical tyrosyl de la sous-unité M2 de la ribonucléotide réductase de façon similaire à celle

proposée pour l'hydroxyurée et autres composés hydroxylés (Li et al., 1997:158). De plus, l'hydroquinone est reconnue pour inhiber la synthèse d'ARN et de protéines de façon dose-dépendante chez les monocytes sanguins, diminuant ainsi le relâchement de l'IL-1 (Carbonnelle et al., 1995: 220).

Des travaux apportent un autre point de vue sur l'action du catéchol, de l'hydroquinone et du p-benzoquinone, suggérant que la suppression de la blastogenèse par ces composés soit un processus sulfhydryle-dépendant. Ces composés interféreraient sélectivement avec des fonctions cellulaires dépendant des microtubules, probablement en réagissant avec des groupes sulfhydryles nucléophiles essentiels à la fixation du guanosine triphosphate à la tubuline (Irons, 1985: 673).

3.2 Les aldéhydes

Les aldéhydes semblent agir selon un tout autre processus. Un groupe de chercheurs a observé que certains monosaccharides exercent une action inhibitrice sur les lymphocytes et que cette action se manifeste via les groupements aldéhydes de ces monosaccharides. On suggère aussi que des aldéhydes exogènes puissent produire le même effet (Rhodes, Zheng et Lifely, 1992: 626).

D'autres travaux montrent aussi qu'un traitement à faibles concentrations d'un mélange de divers aldéhydes engendre une diminution de l'expression de HLA-DR chez des monocytes humains et interfère avec la présentation d'antigènes de classe II. Le mécanisme de cette inhibition implique probablement une modification de la structure tertiaire de la protéine Ia (Rhodes et Tite, 1998: 3344). Enfin, une dernière étude confirme l'inhibition de la prolifération au PHA chez des lymphocytes périphériques humains exposés à divers aldéhydes, et que cette inhibition intervient même sur des lymphocytes pré-activés (Tessitore et al., 1987:217).

CONCLUSION

Cette étude avait pour but d'évaluer l'effet d'une sélection de substances présentes dans la fumée du tabac sur la viabilité et la prolifération des lymphocytes *in vitro*, de façon à obtenir des données toxicologiques sur quelques-uns des principaux composants de la fumée de cigarette.

Nous avons donc montré que certains composés (acroléine et crotonaldéhyde) peuvent effectivement provoquer une inhibition de la viabilité *in vitro* et ces effets sont déjà visibles après 3 heures d'exposition. Plusieurs composés ont aussi inhibé la prolifération des lymphocytes, et pour certains d'entre eux, cet effet n'était pas dû à un effet cytotoxique.

Les transformations lymphoblastiques effectuées avec des mélanges de composés montrent que certaines combinaisons de substances peuvent provoquer des effets plus prononcés sur la prolifération des lymphocytes que chacune des substances individuelles. C'est le cas notamment des mélanges 3 et 5 (se référer à l'article présenté au chapitre 2 pour la composition exacte des mélanges) pour lesquels des effets significatifs furent observés à $0,1 \times \text{CI}_{50}$ (voir figures 8 et 10 de l'article présenté au chapitre 2).

Ces résultats viennent combler le manque de données *in vitro* concernant les effets sur le système immunitaire que peuvent avoir certains composés ou mélange de composés provenant de la fumée de cigarette. Ces données peuvent également s'appliquer à la fumée de combustion en général, plusieurs des substances testées se retrouvant dans pratiquement tous les types de fumée, comme le formaldéhyde et l'acroléine (Dost, 1991: 1). Ces résultats s'ajoutent aussi aux données recueillies par d'autres équipes lors d'expérimentations effectuées *in vivo* sur diverses espèces.

Les mélanges de substances testés tout au long de nos recherches n'ont, au meilleur de nos connaissances, pas encore été étudiés quant à leurs effets sur la prolifération. Ces résultats constituent donc, en ce sens, de nouvelles données qui pourraient servir de base à des études ultérieures.

Des travaux s'intéressant à d'autres fonctions des cellules immunitaires, telles la phagocytose, l'activité NK, la production d'anticorps et la présentation de l'antigène pourraient venir s'ajouter aux données que nous avons obtenues avec la sélection de composés utilisés. Des études *in vivo* seraient aussi souhaitables afin de constater l'effet du benzène et des composés qui requièrent une biotransformation dans l'organisme. Finalement, des études de mécanisme pourraient venir compléter les données disponibles quant au mode d'action du benzène et ses dérivés, ainsi que des aldéhydes dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes.

BIBLIOGRAPHIE

Amdur, M.O., Doull, J, Klaassen, C.D., Eds.: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Pergamon Press, New York, 1991 Fifth Edition, McGraw-Hill, 1996, 1111 p.

Aoyama K. 1986, "Effects of benzene on lymphocyte subpopulations and immune response in mice", Toxicol. appl. pharmacol. vol 85, pp92-101.

Aranyi C, O'Shea WJ, Sherwood RL, Graham JA, Miller FJ, 1985, "Effects of toluene inhalation on pulmonary host defenses of mice", Toxicol. Lett. vol 25, pp 103-110.

Baj Z, Majewska E, Zeman K, Pokoca L, Dworniak D, Paradowski M, Tchorzewski H, 1994, "The effects of chronic exposure to formaldehyde, phenol and organic chlorohydrocarbons on peripheral blood cells and the immune system in humans", J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. vol 4, pp 186-191.

Baker R and Proctor C, 2001, "Where there's smoke", Chemistry in Britain, January, pp 38-41.

Berntorp K, Ekman M, Berntorp E, 1989, " Cigarette smoke impairment of human lymphocyte function by inhibition of transglutaminase", J Intern Med Aug;226(2):73-9.

Brandt-Rauf PW, Fallon LF, Tarantini T, Idema C, Andrews L, 1988, "Health hazards of fire fighters : exposure assessment", Br. J. Ind. Med. Sept. Vol 45(9), pp 606-12.

Braun KM, Cornish T, Valm A, Cundiff J, Pauly JL, Fan S, 1998, " Immunotoxicology of cigarette smoke condensates: suppression of macrophage responsiveness to interferon

gamma", Toxicol Appl Pharmacol Apr;149(2):136-43.

Brousseau P, Payette Y, Tryphonas H, Blakley B, Boermans H, Flipo D, Fournier M, 1998, "Manual of Immunological Methods", CRC editions, 141 p.

Carbonnelle P, Lison D, Leroy JY, Lauwerys R, 1995, " Effect of the benzene metabolite, hydroquinone, on interleukin-1 secretion by human monocytes *in vitro*", Toxicol Appl Pharmacol Jun;132(2):220-6.

Chang JC, Distler SG, Kaplan AM, 1990, "Tobacco smoke suppresses T cells but not antigen-presenting cells in the lung-associated lymph nodes", Toxicol Appl Pharmacol Mar 1;102(3):514-23.

Cohen MA, Guzzardi LJ, 1983, "Inhalation of products of combustion", Ann. Emerg. Med. Oct vol 12(10), pp 628-32.

Dogra RK, Khanna S, Srivastava SN, Shukla LJ, Shanker R, 1989, " Styrene-induced immunomodulation in mice", Int J Immunopharmacol ;11(5):577-86.

Dost FN, 1991, "Acute toxicology of components of vegetation smoke", Rev. Environ. Contam. Toxicol. Vol 119, pp 1-46.

Eder E, Schuler D, Budiawan, 1999 "Cancer risk assessment for crotonaldehyde and 2-hexenal : an approach", IARC Sci. Publ vol 150, pp 219-32.

Farris GM, Robinson SN, Wong BA, Wong VA, Hahn WP, Shah R, 1997, "Effects of benzene on splenic, thymic, and femoral lymphocytes in mice", Toxicology Mar 28;118(2-3):137-48.

Geiselhart LA, Christian T, Minnear F, Freed BM, 1997, " The cigarette tar component p-benzoquinone blocks T-lymphocyte activation by inhibiting interleukin-2 production, but not CD25, ICAM-1, or LFA-1 expression", Toxicol Appl Pharmacol Mar;143(1):30-6.

Ghilarducci DP, Tjeerdema RS, 1995, "Fate and effects of acrolein", Rev. Environ. Contam. Toxicol. Vol 144, pp 95-146.

Hoffmann D, Melikian A, Adams JD, Brunnemann KD, Haley NJ, 1985, "New aspects of tobacco carcinogenesis", Carcinog. Compr. Surv., vol 8 pp 239-56.

Hsieh GC, Sharma RP, Parker RD, 1989, " Immunotoxicological evaluation of toluene exposure via drinking water in mice", Environ Res. Jun;49(1):93-103.

Hughes DA, Haslam PL, Townsend PJ, Turner-Warwick M, 1985, " Numerical and functional alterations in circulatory lymphocytes in cigarette smokers" Clin Exp Immunol Aug;61(2):459-66.

IARC Monographs, 1986, " Chemistry and analysis of tobacco smoke", vol 38, Lyon : Intl. Agency research cancer, pp 83-121.

Irons RD, 1985, " Quinones as toxic metabolites of benzene" J Toxicol Environ Health;16(5):673-8.

Jakab GJ, 1993, "The toxicologic interactions resulting from inhalation of carbon black and acrolein on pulmonary antibacterial and antiviral defenses", Toxicol. app. pharmacol. vol 121, pp 167-175.

Kishimoto T and Hirano T, 1989, "B lymphocyte activation", Fundamental Immunology 2nd

edition, William E. Paul, pp 394-396, New York, Raven Press.

Lees PS, 1995, "Combustion products and other firefighter exposures", Occup. Med. Oct-Dec vol 10(4), pp 691-706.

Li Q, Aubrey MT, Christian T, Freed BM, 1997, "Differential inhibition of DNA synthesis in human T cells by the cigarette tar components hydroquinone and catechol", Fund. App. Toxicol. vol 38, pp 158-165.

Li Q, Kasten-Jolly J, Yen Y, Freed BM, 1998, "Reversal of hydroquinone-mediated suppression of T cell proliferation by transfection of the M2 subunit of ribonucleotide reductase ", Toxicol. Appl. Pharmacol. vol 150, pp 154-157.

Melendez-colon VJ, Luch A, Seidel A, Baird WM, 1999, "Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites", Carcinogenesis, Oct, vol 20, pp 1885-91.

Meliska CJ, Stunkard ME, Gilbert DG, Jensen RA, Martinko JM, 1995, " Immune function in cigarette smokers who quit smoking for 31 days", J Allergy Clin Immunol Apr;95(4):901-10.

Mendez-Alvarez E, Soto-Otero R, Sanchez-Sellero I, Lopez-Rivadulla Lamas M, 1998, "*In vitro* inhibition of catalase activity by cigarette smoke: Relevance of oxydative stress, J Appl Toxicol Nov-Dec;18(6):443-8.

Perfetti TA, Coleman WM, Smith WS, 1998, "Determination of mainstream and sidestream cigarette smoke components for cigarettes of different tobacco types and a set of reference cigarettes", Beiträge zur Tabakforschung International vol 18, pp 95-113.

Pryor WA, 1992, "Biological effects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke from plastics : the use of electron spin resonance", Free Radic. Biol. Med. Dec. Vol 13(6), pp 659-76.

Rhodes J, Zheng B, Lifely MR, 1992, " Inhibition of specific T-cell activation by monosaccharides is through their reactivity as aldehydes", Immunology Apr;75(4):626-31.

Rhodes J, Tite J, 1998, " Functional abolition of monocyte HLA-DR by aldehyde treatment. A novel approach to studies of class II restriction elements in antigen presentation", J Immunol May 15;140(10):3344-51.

Rozen MG, Snyder CA, Albert RE, 1984, "Depressions in B- and T-lymphocyte mitogen-induced blastogenesis in mice exposed to low concentrations of benzene", Toxicol. Lett vol 20, pp 343-349.

Savage SM, Donaldson LA, Cherian S, Chilukuri R, White VA, Sopor ML, 1991, " Effects of cigarette smoke on the immune response. II. Chronic exposure to cigarette smoke inhibits surface immunoglobulin-mediated responses in B cells.", Toxicol Appl Pharmacol Dec;111(3):523-9.

Stedman RL, 1968, "The chemical composition of tobacco and tobacco smoke", Chemical Reviews vol 68, pp 153-207.

Suleiman SA, 1987, "Petroleum hydrocarbon toxicity *in vitro* : effect of n-alkanes, benzene and toluene on pulmonary alveolar macrophages and lysosomal enzymes of the lung", Arch. Toxicol vol 59, pp 402-407.

Tessitore L, Matera L, Bonelli G, Baccino FM, Dianzani MU, 1987, " Aliphatic aldehydes

inhibit the proliferative response of human peripheral blood lymphocytes to phytohemagglutinin and alloantigens", Chem Biol Interact ;62(3):217-26.

Wu W-J, Pruett SB, 1996, "Suppression of splenic natural killer cell activity in a mouse model for binge drinking. 1. Direct effects of ethanol and its major metabolites are not primarily responsible for decreased natural killer cell activity", J. Pharmacol. Exp. Therapeutics. vol 278, pp 1325-1330.

APENDICE A

Courbes concentration-réponse pour les mitogènes

Avant même d'effectuer des transformations lymphoblastiques avec les substances à tester, la concentration optimale de mitogène à utiliser doit être déterminée. Cette concentration optimale correspond à la concentration de mitogène la plus élevée avant celle provoquant l'effet maximal sur un graphique représentant l'index de stimulation en fonction de la concentration de mitogène. La figure 2 nous montre un exemple d'un tel graphique dans le cas d'une détermination de concentration optimale de mitogène.

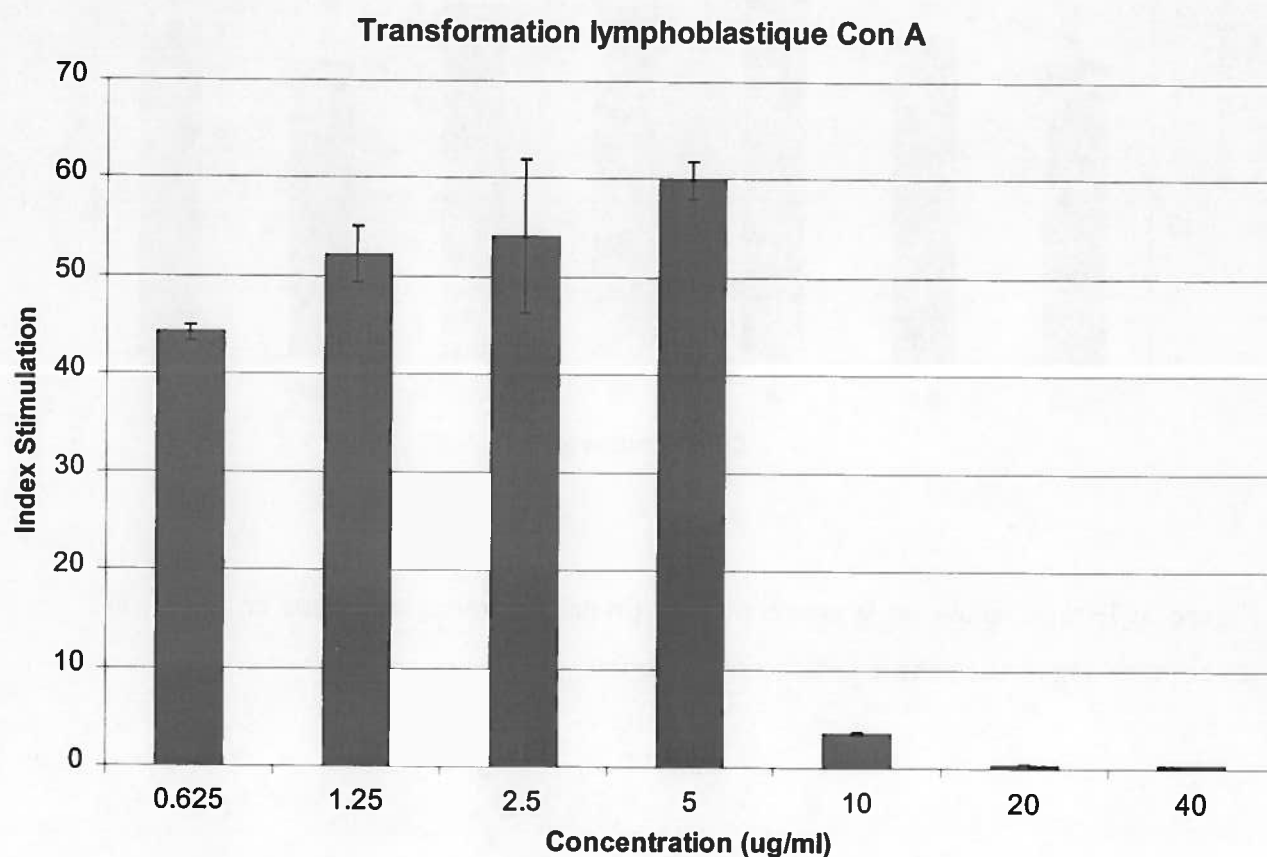


Figure 2: Détermination de la concentration optimale de mitogène. Dans ce cas ci, la concentration optimale pour la Con A, serait 2,5 $\mu\text{g/ml}$

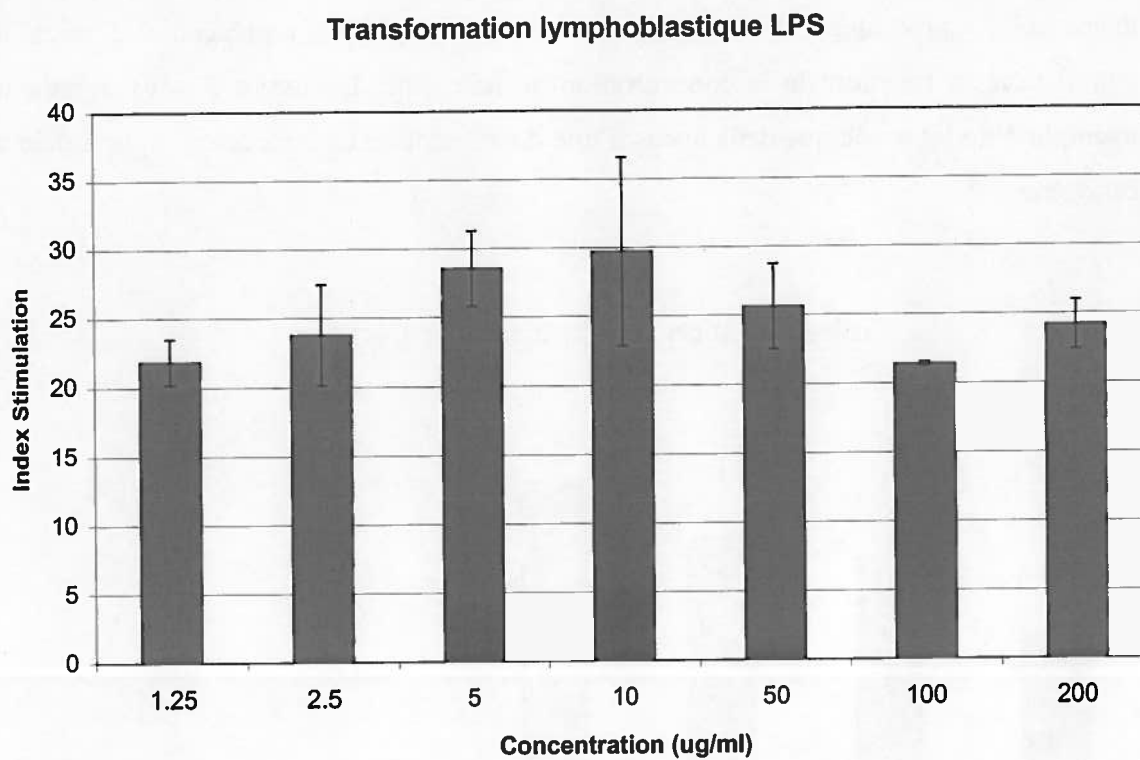


Figure 3: Détermination de la concentration optimale de mitogène. Dans ce cas ci, la concentration optimale pour le LPS, serait 5,0 $\mu\text{g/ml}$

APPENDICE B

Résultats non publiés

Les prochains graphiques montrent les données recueillies lors du test de viabilité cellulaire et qui n'ont pas été incluses dans l'article, afin d'éviter une répétition de graphiques semblables pour les différents composés. Les résultats suivants montrent donc, les pourcentages de viabilité obtenus pour chacun des temps d'exposition (3, 6, 12, 24 heures) en fonction de la concentration du composé.

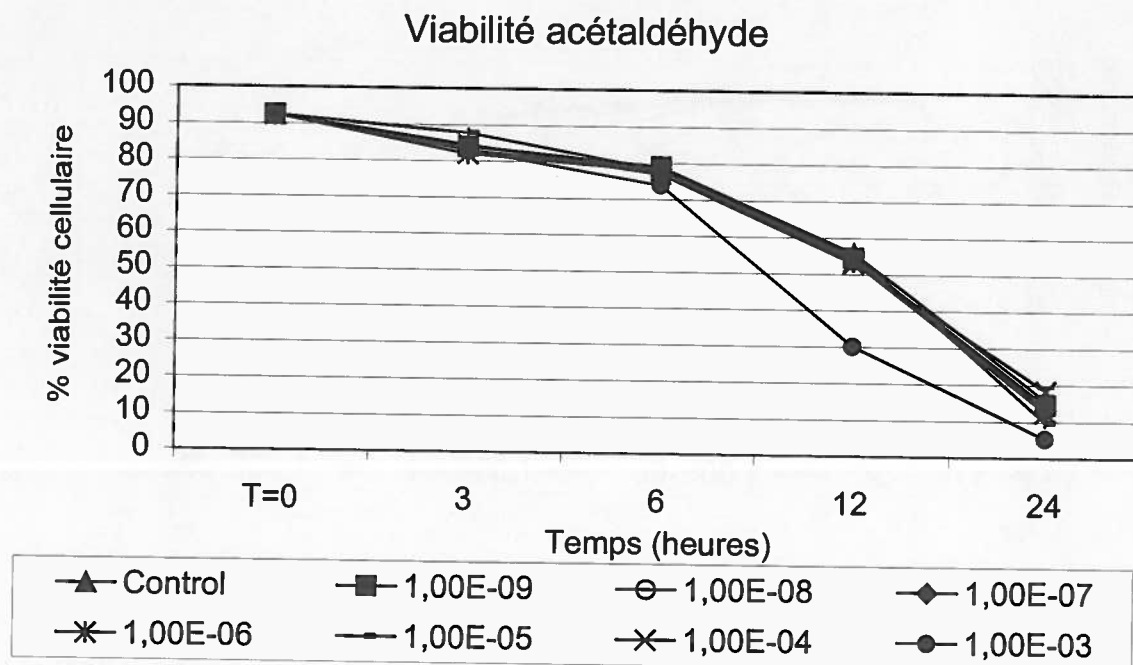


Figure 4: Courbe concentration -réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés à l'acétaldéhyde à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M.

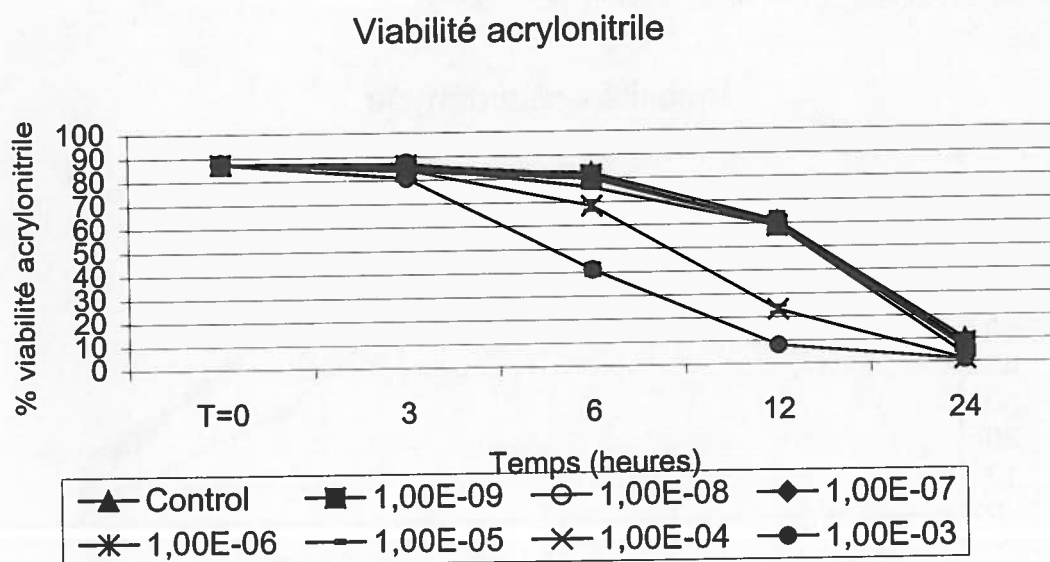


Figure 5: Courbe concentration -réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés à l'acrylonitrile à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M.

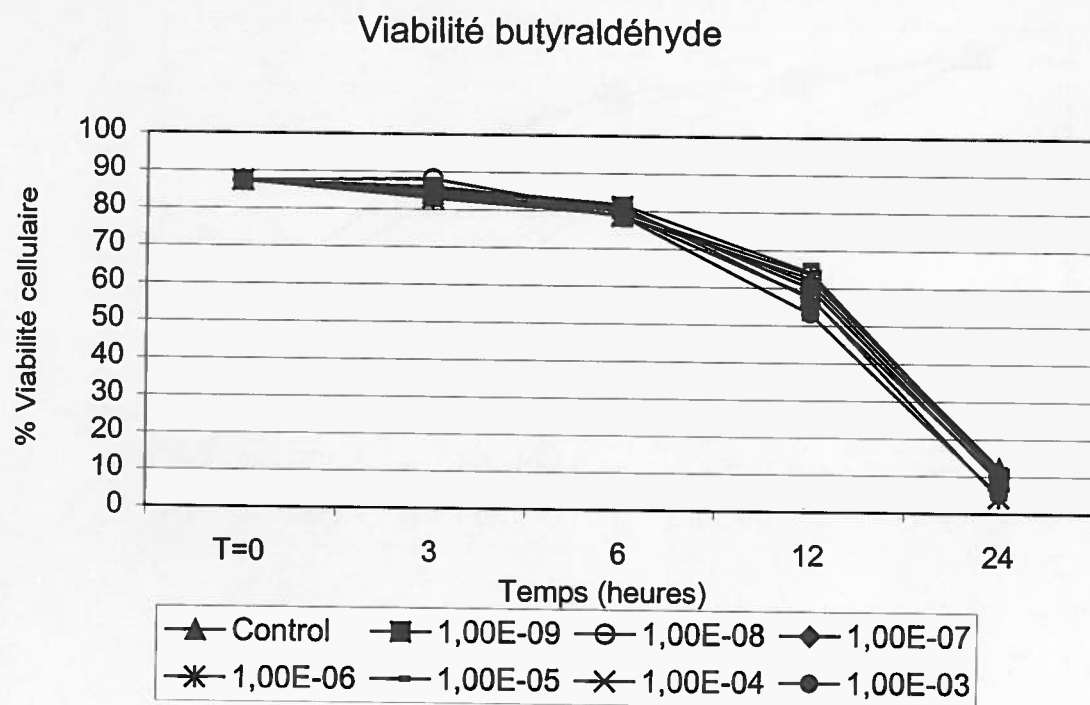


Figure 6: Courbe concentration -réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés au butyraldéhyde à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M.

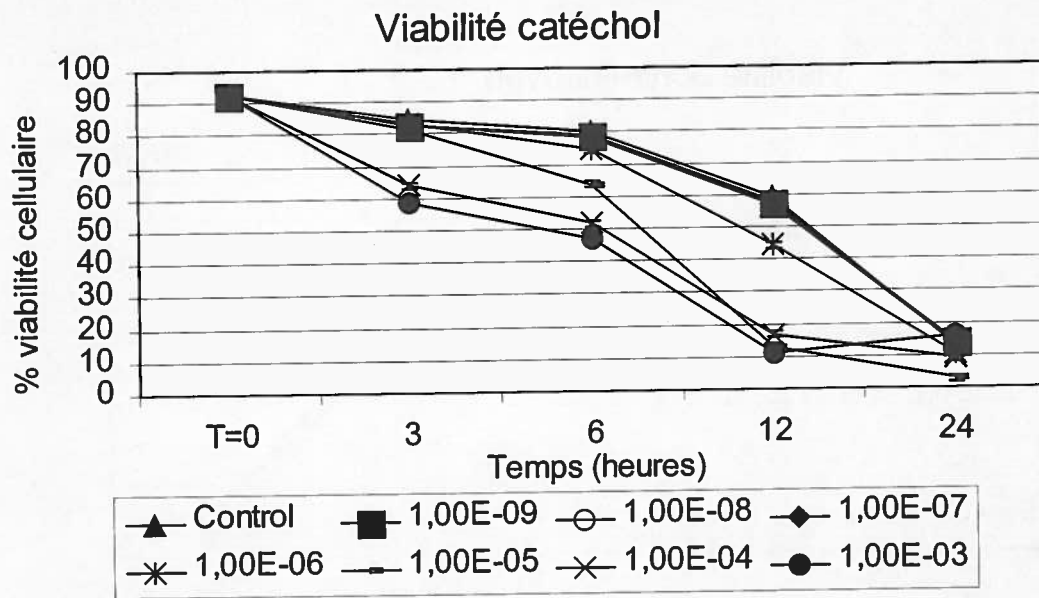


Figure 7: Courbe concentration -réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés au catéchol à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M.

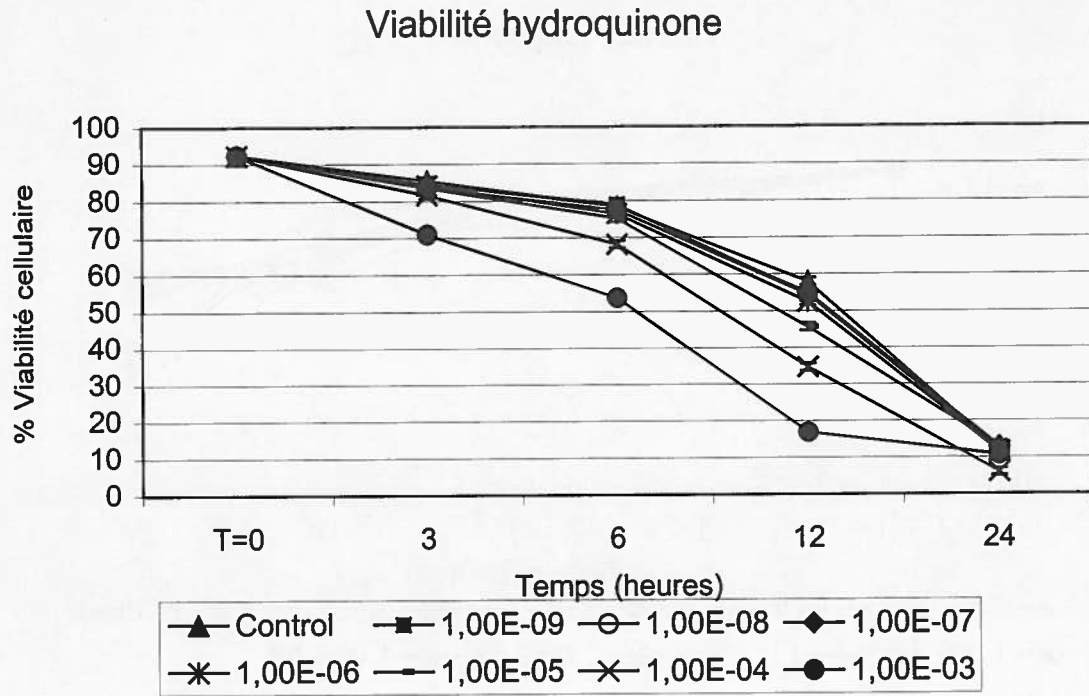


Figure 8: Courbe concentration -réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés à l'hydroquinone à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M.

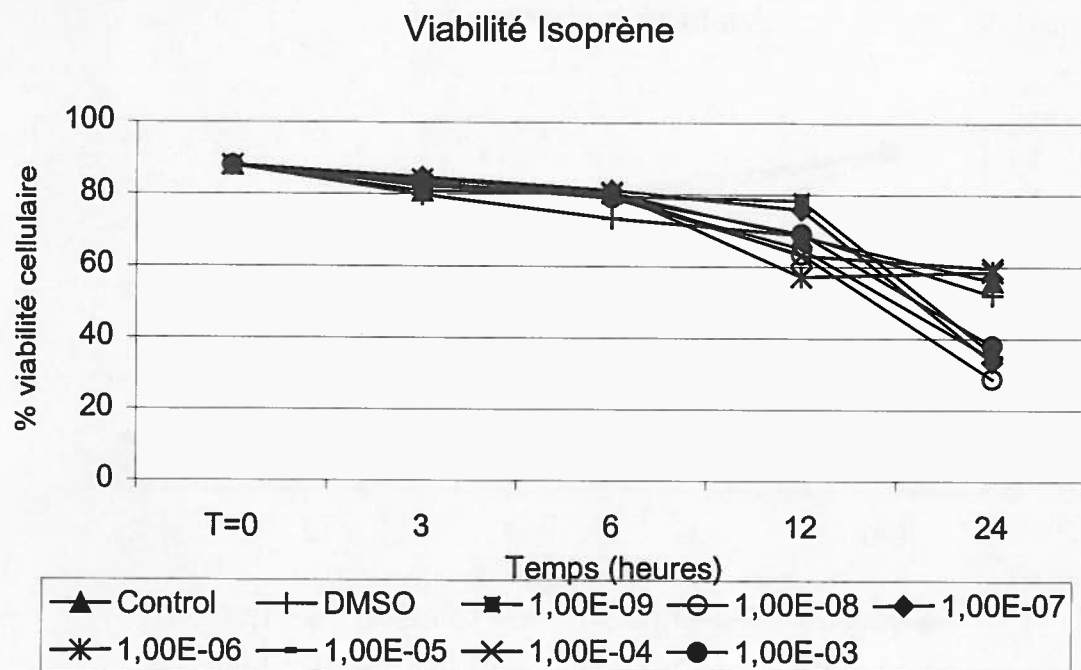


Figure 9: Courbe concentration -réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés à l'isoprène à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M.

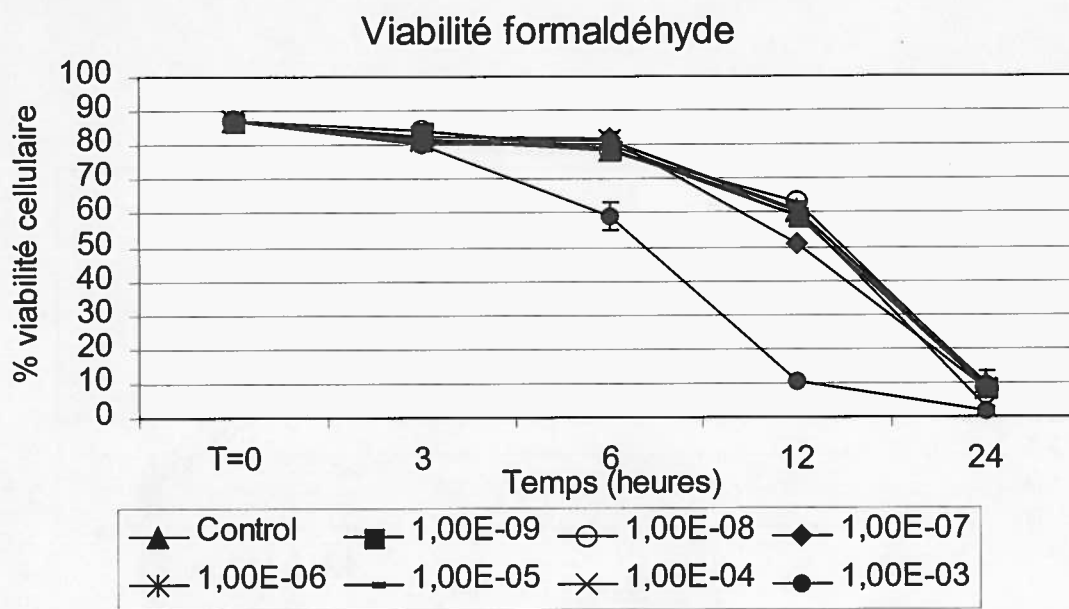


Figure 10: Courbe concentration -réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés au formaldéhyde à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M.

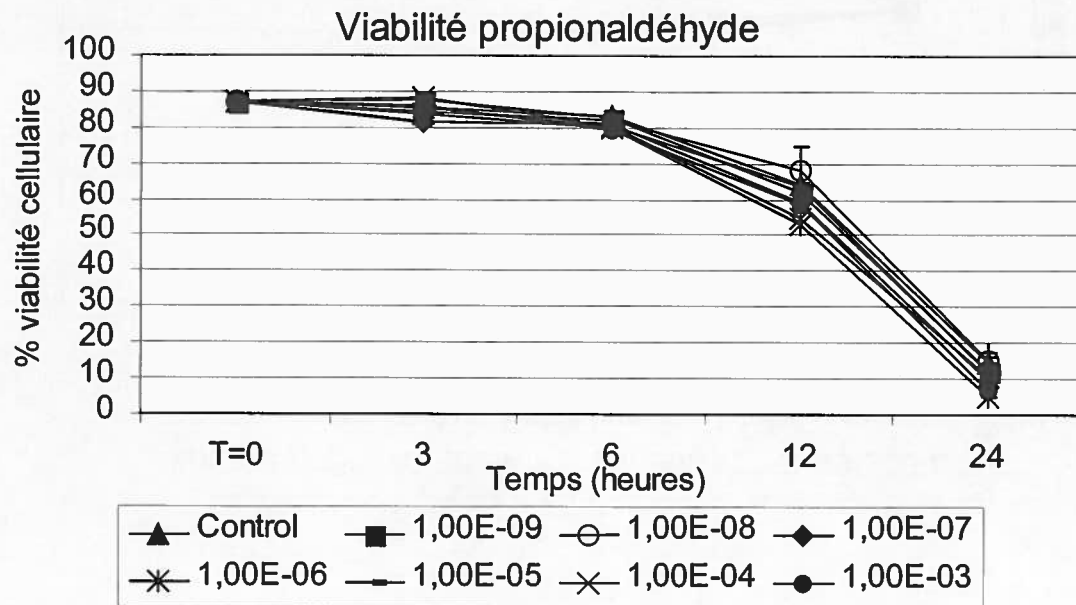


Figure 11: Courbe concentration -réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés au propionaldéhyde à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M.

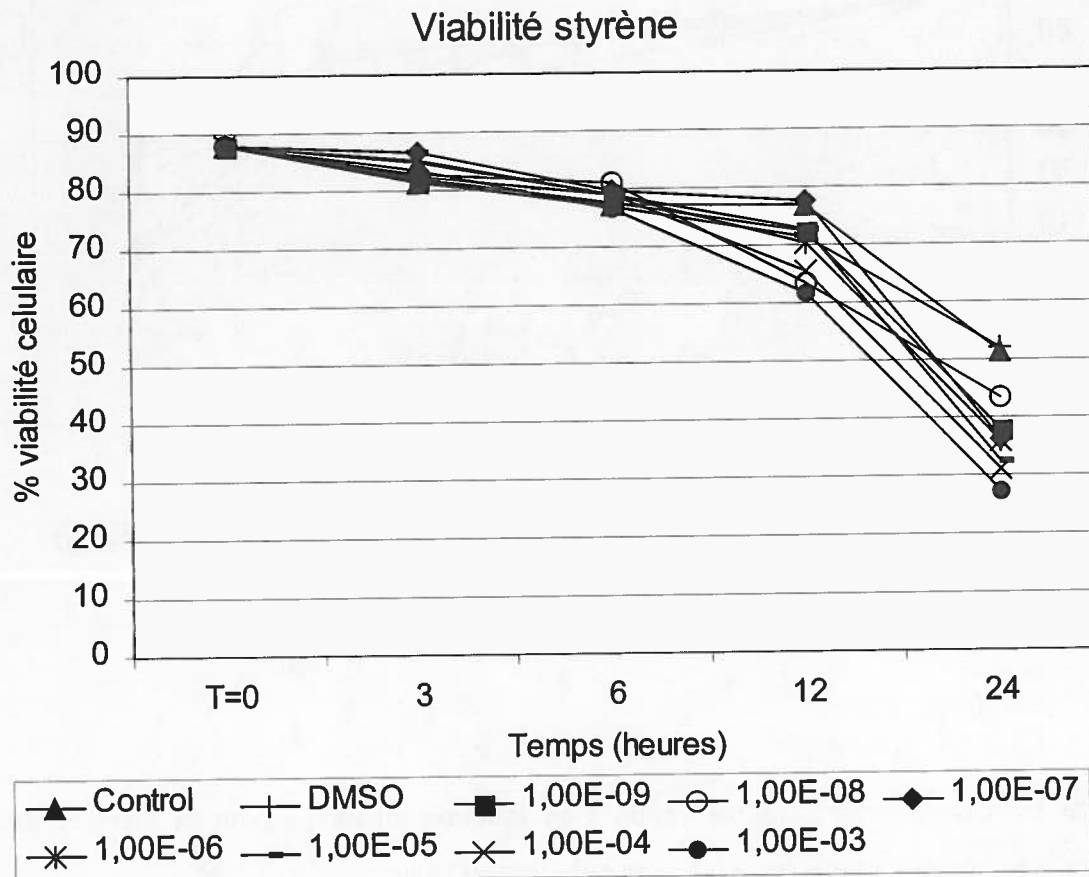


Figure 12: Courbe concentration -réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés au styène à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M.

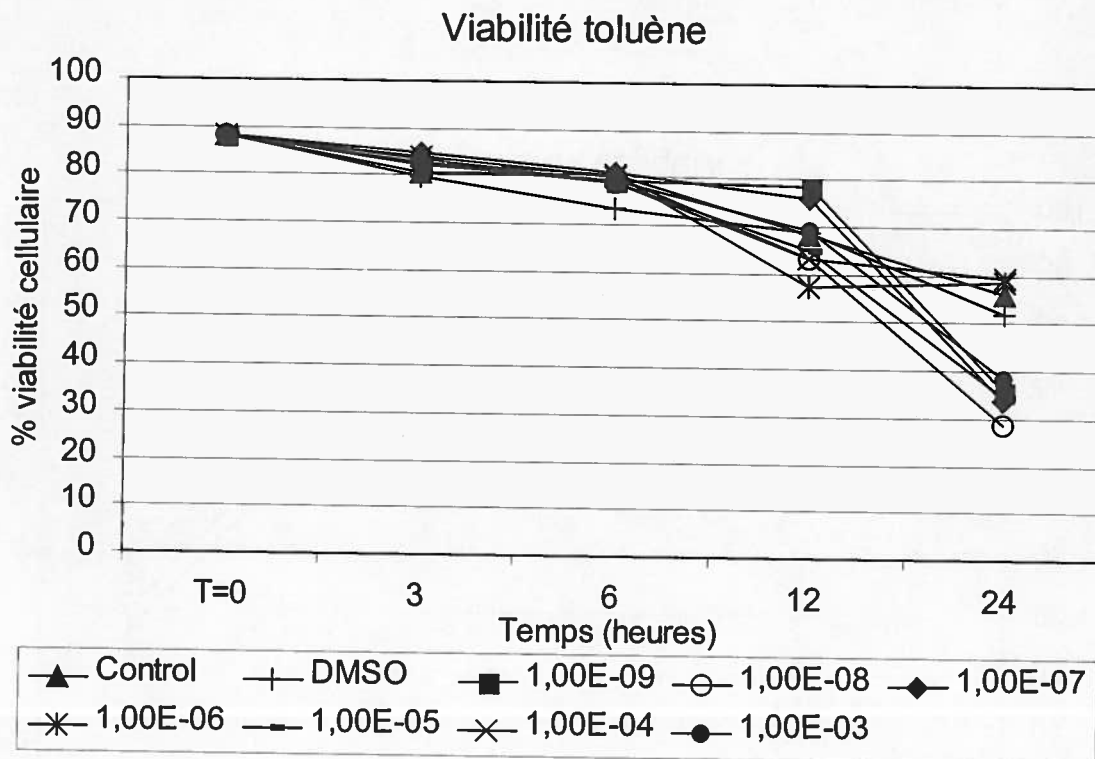


Figure 13: Courbe concentration -réponse en fonction du temps pour la viabilité des splénocytes exposés au toluène à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M.

