

Écotoxicologie

VARIATION DES PARAMÈTRES HÉMATOLOGIQUES DU RAT ALIMENTÉ PAR *HEXAPLEX TRUNCULUS* AFFECTÉ PAR LE PHÉNOMÈNE D'IMPOSEX

par

MENJLI Chokri¹, BEN RHOUMA Khémais²,

BEN HASSINE Fethy³ et TRIGUI EL-MENIF Najoua¹

Les êtres humains sont exposés aux composés organostanniques principalement par la prise de nourriture d'origine marine. La présente étude s'intéresse à l'effet d'un régime alimentaire, fourni à des rats, composé de biscuits mélangé à la chair d'*Hexaplex trunculus* affecté par le phénomène d'imposex collecté dans une station à trafic maritime intense (I %: 100, VDSI: 4.23). Après une contamination sub-chronique, des analyses sanguines ont été effectuées afin de déterminer les paramètres hématologiques. Les résultats ont montré une diminution hautement significative de la concentration en hémoglobine, le nombre des leucocytes (WBC), des érythrocytes (RBC), des plaquettes (PLT) et de l'hématocrite.

Mots-clés : Composés organostanniques, Tributylétain, perturbateur endocrinien, *Hexaplex trunculus*, paramètres hématologiques.

Variations in haematological parameters of rats fed on imposex-affected *Hexaplex trunculus*

Humans are exposed to organotin compounds primarily through the intake of food of marine origin. The present study deals with the effect of a diet composed of biscuit mixed with the flesh of imposex-affected *Hexaplex trunculus*, on the hematological parameters of the rat. Whelks were collected from an intensive shipping traffic station where a high imposex level was recorded (I%: 100, VDSI: 4.23). After a subchronic exposure, blood analyses were carried out in order to determine the hematological parameters. The results showed highly significant decrease in hemoglobin concentration, blood cell count (BC), platelet number (PLT) and hematocrit.

Key words: Butyltin compounds, Tributyltin, Endocrine disruption, *Hexaplex trunculus*, Hematological parameters.

Introduction

Les triorganoétains sont intensivement utilisés comme stabilisateurs pour la production du plastique, dans l'agriculture (pesticides, fongicides, acaricides), dans la préservation des textiles et dans les peintures antisalissures (FENT, 1996).

Certains travaux mentionnent que les butylétains, à des concentrations élevées dans le milieu récepteur, peuvent être accumulés par les animaux marins comme les poissons (SHAWKY & EMONS, 1998), les oiseaux (KANNAN *et al.*, 1999a) et les mammifères (KANNAN *et al.*, 1999b). YANG *et al.* (2006), ont également mis en évidence l'accumulation considérable des organoétains dans des organismes situés à des niveaux supérieurs de la chaîne alimentaire, y compris les mollusques. La toxicité des organoétains a été démontrée sur des animaux du laboratoire (WHO, 1999) et sur des êtres humains (FORTEMPS *et al.*, 1978).

La diminution de l'utilisation de peinture antisalissure à base de TBT en France et l'interdiction de l'utilisation de produits à base de TBT au Japon a entraîné une réduction très significative des taux de ce biocide dans le milieu récepteur (KONSTANTINOÛ & ALBANIS, 2004).

La position stratégique de la Tunisie, qui s'ouvre aussi bien sur le bassin oriental qu'occidental, se trouve malheureusement exposée à un trafic maritime important et par conséquent à une pollution par le TBT. D'ailleurs, les travaux de MZOUGHJI *et al.* (2005) qui ont travaillé sur le sédiment et la chair de la moule *Mytilus galloprovincialis* prélevé dans plusieurs stations de la lagune et du canal de Bizerte ont montré une contamination importante par le TBT, DBT et le MBT. La moule *Mytilus galloprovincialis*, espèce bio-indicatrice de la qualité du milieu, est parmi la proie préférée du gastéropode *Hexaplex trunculus*. Cette dernière espèce est donc sujette à une contamination par le TBT suite à un transfert de ce biocide à travers la chaîne alimentaire. D'ailleurs, les travaux de TRIGUI EL-MENIF *et al.* (2007) ont signalé que la totalité de la population d'*Hexaplex trunculus* du canal est anormale. D'après BRYAN *et al.* (1986), les spécimens femelles manifestant un tractus génital mâle est dû à la présence du TBT et de ses dérivés dans le milieu récepteur. La bioaccumulation de ce biocide dans la chair d'*Hexaplex trunculus* varie de 35 à 48 ng de Sn/g de matière sèche dans une station Italienne (Malamocco) dont VDSI moyen est de 4.2 (PELLIZZATO *et al.*, 2004), valeur très proche de celle enregistrée par TRIGUI EL-MENIF *et al.* (2007) qui ont travaillé sur la même espèce collectée dans le canal de Bizerte (VDSI = 4.23).

L'absorption humaine des organoétains, par le biais des poissons et des fruits de mer, présente certainement une menace pour la santé humaine puisque le TBT, produit toxique, a été détecté dans des échantillons de sang humain (KANNAN *et al.*, 1999b).

La présente étude consiste à mettre en évidence les effets d'un régime alimentaire à base du Néogastéropode *Hexaplex trunculus* affecté par un stress environnemental (différenciation d'un tractus génital mâle chez la femelle) sur les paramètres hématologiques du rat.

Paramètres hématologiques

Matériel et méthodes

Matériel biologique

Le murex : *Hexaplex trunculus*

Les échantillons, d'une longueur variant de 40 à 60 mm sont collectés en septembre 2004 dans la station de la cimenterie située dans le canal de Bizerte. Ce milieu est caractérisé par un trafic maritime intense. Le VDSI (*vas deferens* sequence index) moyen calculé étant de 4,23.

Le rat Winstar

Les animaux adultes et de même âge utilisés dans cette étude proviennent d'un élevage de *R. norvegicus*, de souche Winstar, mis en place dans l'animalerie de la Faculté des Sciences de Bizerte.

Préparation du régime alimentaire

L'aliment des rats est préparé au préalable. La chair du murex est broyée dans un peu d'éthanol absolu (Panreac Quimica Sa., 99,5 %, PS). Deux concentrations sont utilisées dans cette étude. La première concentration C1 est constituée de 50 % de broyat et 50 % de biscuits normaux fournis aux rats d'élevage. La seconde concentration C2 est composée de 70 % de broyat et 30 % de biscuits normaux. Il est à signaler que l'éthanol s'évapore lors du séchage des biscuits d'alimentation à l'étuve à 40°C. L'aliment est par la suite stocké dans des sachets. Il est à noter que les témoins sont nourris uniquement de biscuits normaux.

Traitement des animaux

Après sexage, les animaux, d'un nombre total de 30, sont placés séparément dans six cages en polycarbonate, à raison de 5 rats par cage et sont soumis à 12 heures de lumière par 24 heures (7-19h). Le premier lot est composé de trois cages contenant chacune cinq rats mâles et le second lot est composé de trois autres cages contenant chacune cinq femelles. Pour chaque lot, une cage est prise comme témoin. L'expérience a démarré au mois de décembre 2004. Le renouvellement de la litière et le nettoyage des cages sont effectués à raison de deux fois par semaine. L'aliment journalier fournit est *ad libitum* aussi bien pour les témoins que pour les lots à C1 et à C2.

Prélèvement sanguin

L'hémogramme est réalisé sur un prélèvement sanguin, par ponction réalisée au niveau du sinus rétro-orbital (VAN HERCK *et al.*, 2001). Ce prélèvement, effectué après 12 mois de traitement, nous a permis d'étudier les paramètres hématologiques.

Un volume de 1 ml de sang est mis dans un tube à EDTA-K3 afin d'éviter la formation de caillot. L'hémogramme ou numération de la formule sanguine est réalisé grâce à un automate: Cellydyne-1700 analyser.

Calculs statistiques

Les données sont analysées par un logiciel statistique (Statistica 6.0). Les résultats expérimentaux sont exprimés par la moyenne accompagnée de l'erreur standard (\pm SEM). La comparaison entre les moyennes est faite à l'aide du test *t* de Student. L'analyse de variance (ANOVA) a été effectuée afin d'évaluer l'interaction dose-sexe.

Résultats

Les résultats obtenus montrent que cette exposition induit une diminution significative de la concentration en hémoglobine, en leucocytes (WBC), en érythrocytes (RBC), en plaquettes (PLT) et en hématocrite (HCT) (tableau 1).

Tableau 1

Paramètres hématologiques des rats témoins et traités (moyenne \pm S.E.M)^a.

HGB : hémoglobine ; RBC : érythrocytes ; MCV : volume corpusculaire moyen ; MCH : teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine ; WBC : leucocytes ; HCT : hématocrite ; PLT : plaquettes ; C1 : rats nourris par un aliment composé de 50 % de broyat et 50 % de biscuits normaux ; C2 : rats nourris par un aliment composé de 70 % de broyat et 30 % de biscuits normaux.

^a : Prélèvement sanguin par ponction au niveau du sinus rétro-orbital. * : $p < 0,05$ comparé au témoin correspondant (test *t*) ; ** : $p < 0,01$ comparé au témoin correspondant ; *** : $p < 0,001$ comparé au témoin correspondant.

Hematological parameters of control and treated rats (average \pm sd)^b.

HGB: hemoglobin; RBC: erythrocytes; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; WBC: white blood cells (leucocytes); HCT: hematocrit; PLT: platelets; C1: rats fed with food composed of 50% of ground material and 50% of normal biscuits; C2: rats fed with food composed of 70% of ground material and 30% of normal biscuits.

^b * $p < 0,05$ compared to the corresponding control ; ** $p < 0,01$ compared to the corresponding control *t* ; *** $p < 0,001$ compared to the corresponding control.

Paramètres hématologiques	Mâles			Femelles		
	Témoins	C1	C2	Témoins	C1	C2
HGB (gdL ⁻¹)	14,42 \pm 0,05	13,04 \pm 0,04***	10,78 \pm 0,21***	14,12 \pm 0,19	12,284 \pm 0,18***	10,7 \pm 0,23***
RBC (10 ⁶ μ L ⁻¹)	6,74 \pm 0,20	5,12 \pm 0,03***	4,86 \pm 0,02***	6,326 \pm 0,04	4,98 \pm 0,0663***	4,86 \pm 0,04***
WBC (103 μ L ⁻¹)	6,6 \pm 0,17	6,06 \pm 0,06*	5,34 \pm 0,09***	5,9 \pm 0,06	5,6 \pm 0,18	5,02 \pm 0,08***
PLT (10 ³ μ L ⁻¹)	355,2 \pm 11,05	187,2 \pm 5,003*	119,4 \pm 4,70**	323,6 \pm 17,54	211,4 \pm 5,10***	125,2 \pm 6,36***
MCV (fL)	82,6 \pm 0,74	58,4 \pm 0,50***	57,6 \pm 0,24***	81,6 \pm 0,6	55,4 \pm 0,4***	53,6 \pm 0,24***
MCH (Pg)	22,15 \pm 0,08	20,16 \pm 0,05***	18,80 \pm 0,13***	21,74 \pm 0,31	19,87 \pm 0,07***	18,7 \pm 0,16***
HCT (%)	55,8 \pm 0,37	30,52 \pm 0,43 ***	27,06 \pm 0,28***	53,8 \pm 0,37	29,56 \pm 0,20***	26,62 \pm 0,20***

Paramètres hématologiques

Tableau 2

Les paramètres d'analyse de la variance des différentes variables étudiées. HGB : hémoglobine ; RBC : érythrocytes ; MCV : volume corpusculaire moyen ; MCH : teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine ; WBC : leucocytes ; HCT : hématocrites ; PLT : plaquettes ; F : valeur du test de Fisher ; P : probabilité ; dl : degré de liberté ; NS : non significatif ($p > 0,05$).

The parameters of the analysis of variance of the different variables studied. HGB: hemoglobin; RBC: erythrocytes; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; WBC: white blood cells (leucocytes); HCT: hematocrit; PLT: platelets; F: Fisher-test value; P: probability; dl: degrees of freedom; NS: non-significant ($p > 0,05$).

ANOVA		dl		HGB	RBC	WBC	PLT	MCV	MCH	HCT
one-way (à 1 facteur)	Dose	2	F P	161,34 10 ⁻⁶	146,93 10 ⁻⁶	20,63 4.10 ⁻⁶	219,3 10 ⁻⁶	639,64 10 ⁻⁶	184,55 10 ⁻⁶	2488,49 10 ⁻²
	Sexe	2	F P	7,25 NS	5,67 NS	24,44 48.10 ⁻⁶	0,0047 NS	43,83 1. 10 ⁻⁶	5,034 0,034	18,32 259.10 ⁻⁷
two-way (à 2 facteurs)	Dose	2	F P	210,73 10 ⁻⁶	189,20 10 ⁻⁶	38,92 10 ⁻⁶	267,43 10 ⁻⁶	1834,21 10 ⁻⁶	201,21 10 ⁻⁶	4453,43 10 ⁻⁶
	Interaction		F P	2,0053 NS	2,49 NS	1,23 NS	4,46 0,02251	4,79 0,0177	0,20 NS	3 NS

En réponse à la première concentration C1, les résultats ont montré une diminution significative, par rapport aux témoins, de tous les paramètres hématologiques analysés aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Cette diminution s'accroît davantage en nourrissant les rats avec le mélange à concentration C2 (tableau 1).

L'ANOVA à un facteur (one-way ANOVA), montre que pour tous les paramètres étudiés, l'effet du régime alimentaire est dose-dépendant (tableau 2). Par ailleurs, pour les HGB, RBC, WBC, MCH et l'HCT, l'analyse par ANOVA à deux facteurs (two-way ANOVA), n'a révélé aucune interaction. Cela suppose que l'effet du régime alimentaire sur ces paramètres ne varie pas en fonction du sexe. Par contre, l'analyse de la variance révèle une interaction sexe-dose pour les thrombocytes (PLT) et le MCV, suggérant que l'effet du régime alimentaire varie en fonction du sexe et de la dose (tableau 2)

Discussion

La présence des organoétains dans plusieurs échantillons de sang humain (KANNAN *et al.*, 1999b) et de foie (NIELSEN & STRAND, 2002) et la capacité du TBT de franchir la barrière gastro-intestinale humaine (AZENHA *et al.*, 2004) et placentaire (IWAI *et al.*, 1982) font clairement apparaître la toxicité aiguë ou chronique des organoétains pour les organismes vivants les plus évolués, tels que les êtres humains. Le risque d'intoxication dépend essentiellement de l'absorption humaine des organoétains par le biais des poissons et des fruits de mer (SNOEIJ *et al.*, 1987). Nos résultats auxquels nous avons abouti, suite à une contamination des rats Winstar par deux concentrations alimentaires à base de *Hexaplex trunculus* affecté par le phénomène d'imposex, ont montré une variation très significative des paramètres hématologiques du rat.

Bulletin de la Société zoologique de France 133 (1-3)

La diminution du nombre des érythrocytes est accompagnée par une diminution dose-sexe dépendante du volume corpusculaire moyen (MCV) confirmant que l'anémie est microcytaire. Nos travaux sont en accord avec les résultats enregistrés par KRAJNC *et al.* (1984) et VOS *et al.* (1984) qui ont montré que l'administration, par voie orale du TBTO à des rats, à raison de 80 et 320 mg/kg/j dans l'alimentation pendant 4 semaines entraîne une diminution significative des paramètres hématologiques (l'hématocrite, les globules rouges et le taux d'hémoglobine). Cette diminution du nombre des érythrocytes peut être expliquée, d'après GRAY *et al.* (1987) et ORTIZ *et al.* (2005) par le caractère hémolytique du TBT.

La diminution de l'hémoglobine enregistrée dans nos résultats chez les deux sexes est probablement due à une diminution du glutathion GSH. En effet, ce dernier composé, associé à certaines protéines, inhibe complètement l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine par H₂O₂, au sein des érythrocytes du rat (MILLS, 1957). La diminution du contenu cellulaire en glutathion suite à l'exposition au TBT (OKADA *et al.*, 2000) et l'excès de H₂O₂ dans les thymocytes de rats exposés au TBT (SAKAI *et al.*, 2001), sont en faveur de l'implication du stress oxydatif induit par le TBT dans la cytotoxicité et la peroxydation lipidique.

Après une contamination sub-chronique de 12 mois par *H. trunculus* affecté par le phénomène d'imposex, nos résultats montrent une diminution dose-sexe dépendante du nombre des thrombocytes. Plusieurs études indiquent le rôle crucial des caspases dans la mort des thrombocytes et dans le mécanisme de la thrombocytopenie (LI *et al.*, 2000 ; FIGUET *et al.*, 2002).

Le TBT induit une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial et une libération, dans le cytoplasme, du cytochrome C (NISHIKIMI *et al.*, 2001). BERG *et al.* (2003) indiquent que le TBT induit l'activation *in vitro* des caspases-9 au niveau des plaquettes humaines. De même, DE BOTTON *et al.* (2002) ont montré que l'activation des caspases a été détectée durant la thrombopoïèse et dans la fragmentation des prothrombocytes en mégacaryocytes. Cette activation est impliquée dans la thrombocytopenie (BERG *et al.*, 2003). Par ailleurs, les organoétains, notamment le TBT, provoquent une immunotoxicité (WILSON *et al.*, 2004). La diminution des leucocytes, d'après nos résultats, peut être expliquée par l'implication des organoétains dans l'activation des caspases dans les thymocytes du rat (GENNARI *et al.*, 2000), dans les cellules humaines de type NK (natural killer) (WHALEN *et al.*, 1999), dans les lymphocytes périphériques (STRIDH *et al.*, 2001) et dans les neutrophiles (LAVASTE & GIRARD, 2002).

Une détermination des teneurs en TBT et de ses dérivés dans la chair d'*H. trunculus* normal et anormal nous permet d'infirmer ou d'affirmer nos résultats. En plus, la relation entre la libération du cytochrome C, la concentration intracellulaire du calcium et l'activation des caspases dans les thrombocytes et les érythrocytes, suite à ce régime alimentaire, seront nos principaux objectifs ultérieurs.

1. Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement, Unité d'Hydrobiologie, Faculté des Sciences de Bizerte, 7021 Jarzouna, Tunisie.
2. Laboratoire de Physiologie Environnementale, Faculté des Sciences de Bizerte, 7021 Jarzouna, Tunisie.
3. Laboratoire de Biologie Clinique, Polyclinique CNSS de Bizerte, Tunisie.

Paramètres hématologiques

RÉFÉRENCES

- AZENHA, M.A., EVANGELIST,A.R., MARTEL F. & VASCONCELOS, M.T. (2004).- Estimation of the human intestinal permeability of butyltin species using the Caco-2 cell line model. *Food and Chemical Toxicology*, **42**, 1431-1442.
- BERG, C.P., ROTHBART, A., LAUBER, K., STEIN, G.M., ENGELS, I.H., BELKA, C., JÄNICKE, R.U., SCHULZE-OSTHOFF, K. & WESSELBORG, S. (2003).- (TBT) induces ultra-rapid caspase activation independent of apoptosome formation in human platelets. *Oncogene*, **22**, 775-80.
- BRYAN, G.W., GIBBS, P.E., HUMMERSTONE, L.G. & BURT, G.R. (1986).- The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south-west England: Evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *J. Mar. Biol. Ass. (United Kingdom)*, **66**, 611-640.
- DE BOTTON, S., SABRI, S., DAUGAS, E., ZERMATI, Y., GUIDOTTI, J.E., HERMINE, O., KROEMER, G., VAINCHENKER, W. & DEBILI, N. (2002).- Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*, **100**, 1310-1317.
- FENT, K. (1996).- Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.*, **26**, 1-117.
- FORTEMPS, E., AMAND, G., BOMBOIR, A., LAUWERYS, R. & LATERRE, E.C. (1978).- Trimethyltin poisoning-report of two cases. *International Archives Occupational Environmental Health*, **41**, 1-6.
- GENNARI, A., VIVIANI, B., GALLI, C.L., MARINOVICH, M., PIETERS, R. & CORSINI, E. (2000).- Organotins induce apoptosis by disturbance of [Ca²⁺] and mitochondrial activity, causing oxidative stress and activation of caspases in rat thymocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **169**, 185-190.
- GRAY, B.H., PORVAZNIK, M., FLEMMING, C. & LEE, L.H. (1987).- Organotin induced hemolysis, shape transformation and intramembranous aggregates in human erythrocytes. *Cell. Biol. Toxic.*, **3**, 23-38.
- IWAI, H., KOMATSU, S., MANABE, S., MATSUI, H. & ONO, T. (1982).- Butyltin metabolism in pregnant rats and fetuses in relation to placental transfer of butyltin compounds. *J. Toxicol. Sci.*, **7** (Suppl.), 272.
- KANNAN, I.C., SENTHILKUMAR, K., ELLIOTT, J.E., FEYK, L.A. & GIESY, J.P. (1999a).- Occurrence of butyltin compounds in tissues of water birds and sea ducks from the United States and Canada. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **35**, 64-9.
- KANNAN, K., SENTHILKUMAR, K. & GIESY, J.P. (1999b).- Occurrence of butyltin compounds in human blood. *Environmental Science Technology*, **33**, 1776-1779.
- KONSTANTINOOU, I.K., ALBANIS, T.A. (2004).- Worldwide occurrence and effects of antifouling paints booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environmental International*, **30**, 235-248.
- KRAJNC, E.I., WESTER, P.W., LOEBER, J.G., VAN LEEUWEN, F.X., VOS, J.G., VAESSEN, H.A. & VAN DER HEIJDEN, C.A. (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.*, **75** (3), 363-386.
- LAVASTRE, V. & GIRARD, D. (2002).- Tributyltin induces human neutrophil apoptosis and selective degradation of cytoskeletal proteins by caspases. *J. Toxicol. Environ. Health.*, **65**, 1013-1024.
- LI, J., XIA, Y., BERTINO, A.M., COBURN, J.P. & KUTER, D.J. (2000).- The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. *Transfusion*, **40**, 1320-1329.
- MILLS, G.C. (1957).- Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Journal of Biological Chemistry*, **229** (1), 189-197.
- MZOUGH, N., LESPE, G., BRAVO, T.M., DACHRAOUI, M. & POTIN-GAUTIER, M. (2005).- Organotin speciation in Bizerte lagoon (Tunisia). *Science of the Total Environment*, **349**, 211-222.

Bulletin de la Société zoologique de France 133 (1-3)

- NIELSEN, J.B. & STRAND, J. (2002).- Butyltin compounds in human liver. *Environ. Res. A*, **88**, 129-133.
- NISHIKIMI, A., KIRA, Y., KASAHARA, E., SATO, E.F., KANNO, T., UTSUMI, K. & INOUE, M. (2001).- Tributyltin interacts with mitochondria and induces cytochrome c release. *Biochem. J.*, **356**, 621-626.
- OKADA, Y., OYAMA, Y., CHIKAHISA, L., SATOH, M., KANEMARU, K., SAKAI, H. & NODA, K. (2000).- Tri-n-butyltin-induced change in cellular level of glutathione in rat thymocytes: a flow cytometric study. *Toxicol. Lett.*, **117**, 123-128.
- ORTIZ, A., TERUEL, J.A. & ARANDA, F.J. (2005).- Effect of triorganotin compounds on membrane permeability. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1720**, 137-142.
- PIGUET, P.F., KAN, C.D. & VESIN, C. (2002).- Thrombocytopenia in an animal model of malaria is associated with an increased caspase-mediated death of thrombocytes. *Apoptosis*, **7**, 91-98.
- PELLIZZATO, F., CENTANNI, E., MARIN, M.G. & MOSCHINO, V. (2004).- Concentrations of organotin compounds and imposex in the gastropod *Hexaplex trunculus* from the Lagoon of Venice. *Science of the Total Environment*, **332**, 89-100.
- SAKAI, K., OYAMA, Y., OKADA, Y., AKAIKE, N., NAKATA, M. & CHIKAHISA, L. (2001).- Tri-n-butyltin delays the cell death induced by hydrogen peroxide in rat thymocytes. *Env. Toxicol. Pharma.*, **10**, 95-101.
- SHAWKY, S. & EMONS, H. (1998).- Distribution pattern of organotin compounds at different trophic levels of aquatic ecosystems. *Chemosphere*, **36**, 523-35.
- SNOEIJ, N.J., PENNINKS, A.H., SEINEN, W. (1987).- Biological activity of organotin compounds – an overview. *Env. Res.*, **44**, 335-353.
- STRIDH, H., COTGREAVE, I., MULLER, M., ORRENIUS, S. & GIGLIOTTI, D. (2001).- Organotin-induced caspase activation and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 791-798.
- TRIGUI EL-MENIF, N., LAHBIB, Y., RAMDANI, M., LE PENNEC, M. & BOUMAIZA, M. (2007).- Imposéx in the marine neogastropod *Hexaplex trunculus* from tunisian coasts: geographical distribution and development intensity of imposex. *Vie et milieu*, **57** (1/2), 33-39.
- VAN HERCK, H., BAUMANS, V., BRANDT, C.J., BOERE, H.A., HESP, A.P., VAN LITH, H.A., SCHURINK, M. & BEYNEN, A.C. (2001).- Blood sampling from the retro-orbital plexus, the saphenous vein and the tail vein in rats: comparative effects on selected behavioural and blood variables. *Lab. Anim. Apr.*, **35** (2), 131-9.
- VOS, J.G., DE KLERK, A., KRAJNC, E.I., KRUIZINGA, W., VAN OMMEN, B. & ROZING, J. (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.*, **75** (3), 387-408.
- WHALEN, M.M., LOGANATHAN, B.F. & KANNAN, K. (1999).- Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells in vitro. *Environ. Res.*, **81**, 108-116.
- WILSON, S., DZON, L., REED, A., PRUITT, M. & WHALEN, M.M. (2004).- Effects of in vitro exposure to low levels of organotin and carbamate pesticides on human natural killer cell cytotoxic function. *Environ. Toxicol.*, **19**, 554-563.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1999).- Tributyltin compounds. IPCS Inchem-Concise International Chemical Assessment Document 13, International Programme on Chemical Safety Website www.inchem.org/documents/cicads/cicad14.htm.
- YANG, R., ZHOU, Q., LIU, J. & JIANG, G. (2006).- Butyltins compounds in molluscs from Chinese Bohai coastal waters. *Food Chemistry*, **97**, 637-643.