

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier-Santé humaine

Séquence atypique de la mort des neutrophiles humains exposés au mercure

Par
Nhi Nguyen

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Denis Girard Centre de santé humaine
Examineur externe	Raynald Roy Laboratoire d'immunologie et transplantation, CHUL
Directeur de recherche	Edouard Kouassi Centre de recherche en santé humaine

©droits réservés de Nhi Nguyen, 2001

Remerciements

Je désire tout d'abord exprimer ma reconnaissance au Docteur Edouard Kouassi pour l'encadrement et le support tout au long de la réalisation de ce projet de maîtrise.

Merci au Docteur Denis Girard pour ses précieux conseils sur les neutrophiles, ainsi que ses commentaires constructifs tout au long du projet.

Un projet ne se réalise pas sans l'aide de nombreuses personnes. Je tiens à remercier particulièrement Sylvie Arbour pour ses conseils tout en travaillant comme assistante de recherche et à Josée Tessier pour son aide technique au début de ma maîtrise. Je tiens aussi à témoigner ma grande reconnaissance à Sophie Ouellet pour son aide en cytométrie en flux.

Je m'en voudrais de ne pas mentionner les différents étudiants : Alain Gendron, Mohammed Abdouh, Khadija Iken, Ousmane Diallo ainsi que la technicienne Chantal Cossette. J'espère qu'ils en garderont un bon souvenir et je leur souhaite tout le succès qu'ils méritent pour l'avenir.

Je tiens également à remercier toute ma famille ainsi que mon petit « Puppit » et « Golden » pour m'avoir supportée durant mes études supérieures tout en amenant de la joie, la gaieté et l'amour.

Une mention d'honneur à ma meilleure amie Paula Santos que je connais depuis au moins 10 ans et qui m'a endurée dans les meilleurs et les pires moments.

Pour terminer, je désire témoigner ma reconnaissance envers la Fondation Armand-Frappier pour m'avoir accordé la bourse Armand-Frappier.

Table des matières

Titre et identification du jury.....	ii
Remerciements.....	iii
Liste des abréviations.....	vii
Listes des figures.....	ix
Listes des tableaux.....	x
Sommaire.....	xi
Introduction.....	1

CHAPITRE PREMIER : REVUE DE LITTÉRATURE

1.0 Apoptose et nécrose : distinction morphologiques, moléculaires et méthodologique	4
1.1 L'apoptose.....	4
1.1.1 Caractéristiques morphologiques des cellules apoptotiques.....	5
1.1.2 Mécanismes de l'apoptose.....	6
1.1.3 Mécanismes de l'apoptose spécifiquement chez les neutrophiles...	9
1.1.4 Facteurs inducteurs et inhibiteurs de l'apoptose.....	10
1.2 La nécrose cellulaire.....	13
1.2.1 Nécrose primaire.....	13
1.2.2 Nécrose secondaire.....	13
1.3 Séquence classique de la mort des PMN.....	14

2.0 Le mercure et ses effets sur les cellules du système immunitaire.....	15
2.1 Formes de mercure.....	15
2.1.1 Mercure élémentaire.....	16
2.1.2 Mercure inorganique.....	16
2.1.3 Mercure organique.....	16
2.2 Sources de mercure.....	16
2.2.1 Sources naturelles.....	17
2.2.2 Sources reliées aux activités humaines.....	17
2.3 Utilisations du mercure.....	17
2.4 Métabolisme du mercure organique.....	18
2.4.1 Absorption.....	18
2.4.1.1 Voie orale.....	18
2.4.1.2 Voie pulmonaire.....	18
2.4.1.3 Voie cutanée.....	18
2.4.2 Distribution.....	19
2.4.3 Biotransformation.....	19
2.4.4 Élimination.....	19
2.5 Localisation du mercure dans les cellules.....	20
2.6 Toxicité du MeHg.....	21
2.6.1 Effets sur le système nerveux.....	21
2.6.2 Effets sur le système rénal.....	22
2.7 Effets du mercure sur le système immunitaire.....	23
2.7.1 Immunotoxicité du mercure à faibles concentrations.....	23
2.7.1.1. Lymphocytes.....	23
2.7.1.2 Neutrophiles.....	24
2.7.1.3 Autres types de cellules immunitaires.....	25

2.7.2 Cytotoxicité du mercure à fortes concentrations.....	26
2.7.2.1 Lymphocytes.....	26
2.7.2.2 Neutrophiles.....	29
2.7.2.3 Autres types de cellules immunitaires.....	29
CHAPITRE DEUXIÈME : ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	30
Discussion et conclusion.....	69
Bibliographie.....	76
Annexe	88

Liste des abréviations

AM:	acetoxyméthyl ester
AIF :	apoptosis-inducing factor
APO-1 :	apolipoprotéine-1
BAPTA :	bis (<i>o</i> -aminophenoxy) ethana-N, N, N', N'-tetraacetate
Ca ²⁺ :	calcium
(Ca ²⁺) _i :	calcium intracellulaire
CdCl ₂ :	dichlorure de cadmium
Con A :	concanavaline A
CTC :	chlorotétracycline
EGTA :	ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acide
GM-CSF :	facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
Gro-α:	growth-related oncogene alpha
GSH:	glutathion
GSNO:	S-nitrosoglutathione
Hg ⁰ :	mercure élémentaire
HgCl ₂ :	dichlorure de mercure
ICE :	interleukine-1β converting enzyme
IL :	interleukine
JC-1 :	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide
LPS :	lipopolysaccharide
NAC:	N-acétylcystéine

MeHg :	méthylmercure
MeHgCl :	chlorure de méthylmercure
Mg ²⁺ :	manganèse
PARP :	poly (ADP) ribose polymérase
PHA :	phytohémagglutinine
PI :	iodure de propidium
PMA :	phorbol 12-myristate 13-acetate
PMN :	polymorphonucléaires
PS :	phosphatidylsérine
ROS:	espèces réactives de l'oxygène ou dérivés oxygénés
SH:	sulphydryle
TNF- α :	tumor necrosis factor- α
Zn ²⁺ :	zinc
$\Delta\Psi_m$:	potentiel membranaire mitochondriale

Liste des figures

- Figure 1 : Régulation de l'apoptose.....7
- Figure 2 : Représentation schématique des mécanismes potentiels
d'induction de l'apoptose par MeHgCl dans les lymphocytes humains...28

Liste des tableaux

Tableau 1 : Inducteurs et inhibiteurs de l'apoptose des lymphocytes.....11

Tableau 2 : Inducteurs et inhibiteurs de l'apoptose des polymorphonucléaires.....12

Sommaire

Le mercure est reconnu pour ses actions neurotoxiques, mais il est capable d'induire aussi des effets immunotoxiques incluant des maladies auto-immunes et un état d'immunosuppression entraînant une incidence accrue des maladies infectieuses. Le but de cette étude était d'évaluer les effets du chlorure de méthylmercure (MeHgCl) sur la séquence des événements au cours de l'apoptose et de la nécrose des polymorphonucléaires (PMN) neutrophiles humains et d'identifier les mécanismes de cytotoxicité impliqués. Pour ce faire, les neutrophiles humains ont été mis en culture *in vitro* durant différentes périodes de temps (0 à 3 jours) en présence ou non de MeHgCl (10^{-12} - 10^{-3} M). Nous avons d'abord utilisé le double marquage à l'annexine-V-FITC et à l'iodure de propidium (PI) suivi d'une analyse en cytométrie en flux pour évaluer l'apoptose et la nécrose. Par la suite, le marquage avec Hoechst 33342 et PI a été effectué afin de mieux distinguer entre les phases de nécrose primaire et de nécrose secondaire. Les altérations morphologiques typiques de l'apoptose ont été analysées par microscopie optique. Le calcium intracellulaire (Ca^{2+})_i a été mesuré par cytométrie en flux à l'aide de la sonde spécifique Fluo-3. L'implication du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) a été étudiée également en cytométrie en flux à l'aide du marqueur sélectif JC-1 (5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraéthylbenzimidazolcarbocyanine iodide). Nos résultats démontrent qu'en présence de MeHgCl à des concentrations supérieures à 10^{-5} M, la majorité des neutrophiles vont rapidement en apoptose, en moins de 15 minutes. Les neutrophiles progressent ensuite vers la nécrose primaire après 1-2 h d'incubation en présence de MeHgCl. Les cellules non traitées vont spontanément en apoptose à partir de 8 h d'incubation et elles se trouvent en majorité dans cette phase après 24 h. Cette apoptose spontanée est suivie de la nécrose secondaire qui apparaît après 24-96 h. Une exposition des neutrophiles à 56°C induit la nécrose primaire, mais pas l'apoptose. Ces résultats révèlent pour la première fois que le mercure induit une séquence de mort cellulaire atypique incluant d'abord l'apoptose, puis la nécrose primaire. De plus, le mercure induit des changements biochimiques précoces, incluant une augmentation du niveau de $[Ca^{2+}]_i$ et une diminution du potentiel membranaire, suggérant l'implication de ces deux signaux intracellulaires dans la mort cellulaire induite par le mercure. Les conséquences de la séquence particulière de la mort des neutrophiles humains en présence de mercure ne sont pas connues en terme d'immunotoxicité. Cependant, nos résultats supportent l'idée que

contrairement au concept traditionnel, les phénomènes de mort cellulaire par apoptose et par nécrose primaire ne représentent pas des entités diamétralement opposées, et qu'un même toxique peut induire d'abord l'apoptose puis la nécrose primaire.

Introduction

Le mercure est un contaminant présent dans l'environnement et il se présente sous diverses formes assimilables par les organismes vivants : le mercure inorganique élémentaire (Hg^0) le mercure inorganique oxydé (Hg^+ , Hg^{++}) et le mercure organique (MeHg^+) (Rischer et DeWaskin, 1999). Les émissions de mercure dans l'environnement sont soit d'origines naturelles (activité volcanique, évaporation marine, etc) ou soit d'origine humaine (activité minière, combustion fossile, etc) (Rischer et DeWaskin, 1999). L'utilisation du mercure dans les amalgames dentaires et la consommation d'aliments contaminés représentent des risques d'exposition de la population. Ceci suscite quelques inquiétudes alors que l'impact réel d'une telle exposition sur la santé humaine n'est pas encore connu avec certitude. La forme MeHgCl est la plus toxique chez les animaux et les humains du à sa grande liposolubilité (Robinson et Tuovinen, 1984). Les composés mercuriels peuvent, sous forme aiguë, induire une toxicité rénale responsable de lésions tubulaires (Gritzka et Trump, 1968) mais, administrés sous une forme chronique, ils peuvent induire des désordres auto-immunitaires comme la glomérulonéphrite à complexes immuns (Kibukamusoke, Davies et Hutt, 1974). Une exposition faible et chronique déclencherait des effets insidieux associés à une immunosuppression. Quelque soit la forme d'exposition au mercure, ce métal lourd peut perturber le système immunitaire en induisant une auto-immunité ou une immunosuppression augmentant le risque à des infections. À de fortes doses, il est cytotoxique et peut entraîner la mort chez les animaux et chez les humains. En effet, le mercure réduit la viabilité des lymphocytes (Shenker et al., 1992a), des monocytes (Shenker et al., 1992b) et des macrophages (Contrino et al., 1992) en causant la mort cellulaire par apoptose. L'apoptose est un processus naturel qui permet l'élimination de cellules endommagées sans causer d'inflammation (Brach et al., 1992). La nécrose, par contre, est un phénomène passif causé par une perte d'homéostasie entraînant une réaction inflammatoire (Carbonari et al., 1994).

Les neutrophiles constituent la première ligne de défense contre les maladies infectieuses (Cohen et al., 1992). Ils pourraient être une cible importante des effets

cytotoxiques du mercure. De plus, ces cellules sont idéales pour étudier la cytotoxicité du mercure puisqu'elles meurent spontanément par apoptose après quelques heures et qu'elles se dirigent ensuite en nécrose secondaire (Hébert et al., 1996). Dans certaines conditions de stress, comme une exposition à 56°C pendant 1-2 h, les neutrophiles peuvent aussi mourir par nécrose primaire.

Le but de ce travail était d'évaluer le potentiel cytotoxique du MeHgCl sur les neutrophiles humains en culture. Notre **hypothèse de recherche** était que MeHgCl induisait l'apoptose et la nécrose sur les neutrophiles humains via des mécanismes d'action spécifiques. Nos **objectifs** étaient de (i) vérifier l'existence d'effets toxiques du MeHgCl sur la viabilité des neutrophiles humains; (ii) déterminer la cinétique des événements; (iii) distinguer les phases d'apoptose, de nécrose primaire et de nécrose secondaire; et (iv) identifier le(s) mécanisme(s) qui pourrai(en)t expliquer cette cytotoxicité.

Afin de montrer des effets toxiques du MeHgCl, nous avons vérifié si ce dernier induisait l'apoptose ou la nécrose chez les neutrophiles humains. Pour vérifier cette hypothèse, des neutrophiles humains ont été incubés, *in vitro*, avec différentes concentrations de MeHgCl (10^{-12} à 10^{-3} M) à des périodes de temps variant de 5 minutes à 3 jours. Les neutrophiles apoptotiques et nécrotiques ont été comparés à des neutrophiles non traités et ont été détectés par cytométrie en flux à l'aide d'un marqueur spécifique des phosphatidylsérines (annexine-V) et d'un marqueur intercalant d'ADN (PI). Afin de mieux distinguer entre la phase d'apoptose, de nécrose primaire et de nécrose secondaire, un double marquage avec le Hoescht 33342 et le PI a été effectué pour ensuite être analysé par cytométrie en flux. De plus, l'apoptose a été vérifiée par microscopie optique afin d'observer les changements morphologiques. La mobilisation du $(Ca^{2+})_i$ et le potentiel membranaire mitochondrial ont été mesurés en cytométrie en flux à l'aide des sondes Fluo-3 et JC-1, respectivement.

CHAPITRE PREMIER : REVUE DE LITTERATURE

CHAPITRE PREMIER : REVUE DE LITTERATURE

1.0 Apoptose et nécrose : Distinction morphologiques, moléculaires et méthodologique

Il existe un débat sur la nomenclature de la mort cellulaire concernant l'utilisation des termes apoptose et nécrose dans les études de toxicité (Levin et al., 1999). Toutefois, les scientifiques reconnaissent l'existence de deux formes de mort cellulaire chez les organismes vivants, soit l'apoptose et la nécrose.

1.1 L'apoptose

Le mot «apoptose » vient du Grec et il signifie la chute des feuilles des arbres à l'automne. L'apoptose joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire. Le processus de mort cellulaire par apoptose permet la reconnaissance et l'ingestion de cellules apoptotiques par les macrophages ou par des cellules avoisinantes (Brach et al., 1992). L'ingestion des cellules apoptotiques par les macrophages n'induit pas la libération d'enzymes protéolytiques. La fragmentation cellulaire se fait sans libération du contenu cellulaire vers le milieu externe, donc ne cause pas d'inflammation. Le phénomène de l'apoptose se déroule durant l'embryogénèse et aussi durant le processus de développement normal des tissus. Il existe plusieurs exemples d'apoptose : formation de kératinocytes dans les cellules somatiques, atrophie de la prostate après castration, mort des neutrophiles matures.

1.1.1 Caractéristiques morphologiques des cellules apoptotiques

Le processus de l'apoptose se fait en trois étapes.

La première étape consiste en la distribution irrégulière de la chromatine, c'est-à-dire qu'elle se déplace près de la membrane interne du noyau, et elle se condense de façon homogène. Les fibres et les granules nucléaires sont dispersées dans le nucléoplasme. Dans le cytoplasme, les organites se rapprochent et s'agglomèrent, surtout les mitochondries, ainsi que les filaments du cytosquelette et les ribosomes libres. Les desmosomes sont détruits et les espaces intercellulaires s'élargissent, permettant à la cellule de prendre un aspect plus arrondi (Wyllie, Kerr et Currie, 1980). Les mitochondries et le réticulum endoplasmique restent intacts, les lysosomes ne sont pas altérés et la membrane cytoplasmique reste imperméable aux colorants vitaux (Feldmann, 1995).

La deuxième étape, qui peut chevaucher la première, est caractérisée par la présence d'un crénelage de la membrane nucléaire annonçant une fragmentation nucléaire et cytoplasmique suivie de la formation de fragments cellulaires plus ou moins volumineux encore reliés entre eux par la membrane cytoplasmique. Ces fragments contiennent des reliquats nucléaires, des organites apparemment encore intacts ou un mélange de débris nucléaires et cytoplasmiques. La cellule devient plus petite et condensée par rapport à la normale. Chez les thymocytes, une réduction de 30% du volume cellulaire a été observée par Ohyama, Yamada et Watanabe (1981). Les fragments cellulaires ou corps apoptotiques se détachent de la cellule pour être phagocytés par les macrophages ou des cellules avoisinantes (Kerr, Wyllie et Currie, 1972). Cependant, certains auteurs soulignent que l'altération d'ADN peut être détectée dans toutes les cellules en apoptose, mais la fragmentation en oligonucléosomes n'est pas toujours observée, car elle dépend de la nature de la cellule-cible. Par exemple, les lymphoblastes B ne produisent pas de bris d'ADN double-brin lors de l'apoptose induite par les cellules cytolytiques. Par contre, les cellules non hématopoïétiques murines ont montré des fragments d'ADN simple-brin détectés par le test «nick» (Sellins et Cohen, 1991). L'absence de fragmentation d'ADN pourrait être expliquée par une déficience dans l'activité des enzymes responsables du clivage de l'ADN (Cohen et al., 1992). Chez les thymocytes, Alnemri et Litwack (1989), ont rapporté l'absence de l'enzyme endonucléase dans

le noyau de ces cellules. Ils ont proposé que l'endonucléase était probablement sous forme non activable par les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} où elle était synthétisée *de novo* lors de l'apoptose.

La troisième étape est la dégradation des corps apoptotiques, ce qui entraîne des lésions de la membrane cytoplasmique qui ont pour conséquence de rendre la cellule perméable aux colorants vitaux suivi d'une destruction des reliquats cytoplasmiques et nucléaires par les macrophages (Wyllie, Kerr et Currie, 1980).

1.1.2 Mécanismes de l'apoptose

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apoptose ne sont pas encore totalement élucidés. Cependant, plusieurs mécanismes ont été proposés; nous aborderons ici quelques-uns parmi les mieux établis, notamment la cascade des événements induits par les interactions FasLigand/Fas et TNF- α /TNF récepteur, incluant le rôle des caspases, du calcium intracellulaire, et des mitochondries.

L'apoptose spontanée des neutrophiles est induite par des interactions ligand-récepteur à leur surface (Figure 1). Ainsi, les récepteurs FAS (APO-1) et TNFR1, retrouvés à la surface des neutrophiles et de plusieurs autres types cellulaires, seraient responsable de l'apoptose. FAS et TNFR1 sont liés par leurs ligands physiologiques FasL et TNF- α respectivement, et la partie cytoplasmique du récepteur, appelée domaine de mort, active plusieurs composants menant à l'apoptose. Le domaine de mort du récepteur FAS et TNFR1 recrutent la caspase 8 (FLICE / MACH) via des protéines membranaires FADD / MORT1 et TRADD. FLICE est une «interleukine-1 β converting enzyme» (ICE) qui active une cascade de protéases appelées caspases. Il existe deux types de caspases : (i) les caspases initiatrices sont celles qui sont associées aux récepteurs membranaires et qui peuvent déclencher l'activation d'autres caspases; (ii) les caspases effectrices sont celles qui ont des substrats comme la poly (ADP) ribose polymérase (PARP) nécessaire dans la réparation de l'ADN (Nagata, 1997; Koester et Bolton, 1999).

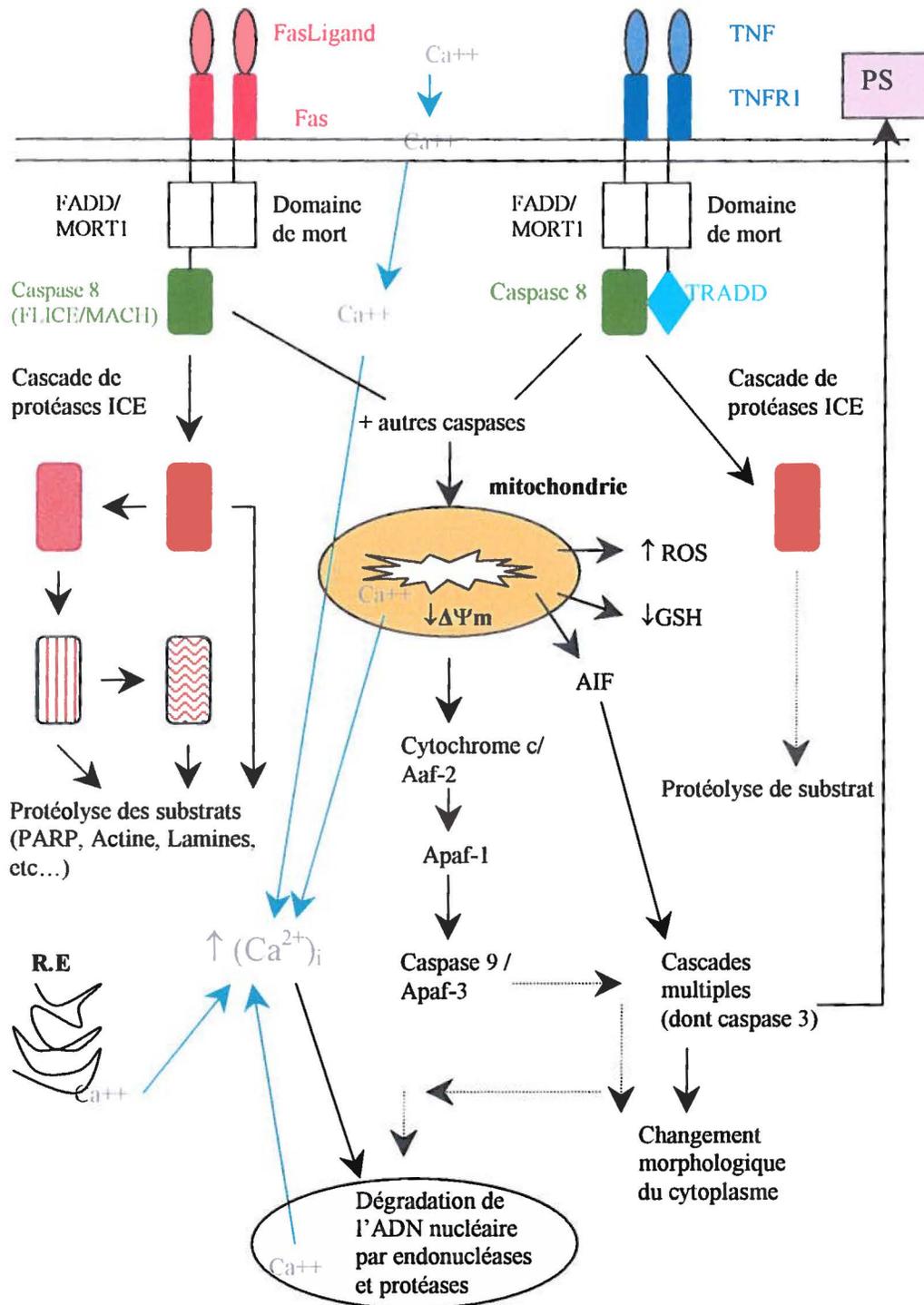


Figure 1: Régulation de l'apoptose. Adapté de Trump et Berezsky, 1995; McConkey, 1996; Nagata, 1997; Koester et Bolton, 1999.

.....> Plusieurs étapes intermédiaires

Une fois que la caspase 8 est activée, elle active d'autres caspases pour induire une chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$). Ce potentiel est le résultat de la distribution asymétrique des ions à travers la membrane interne des mitochondries (InSug et al., 1997). Cette dépolarisation de la membrane mitochondriale permet la libération rapide du cytochrome c / Apaf-2 dans le cytoplasme. Ce dernier se lie à Apaf-1 pour activer la caspase 9 / Apaf-3 qui à son tour engendre une série de cascades amenant à des changements morphologiques de la cellule et à la dégradation de l'ADN (Koester et Bolton, 1999). En effet, cette série d'événements conduit à une désorganisation du cytosquelette cytoplasmique, une augmentation de la concentration du $(Ca^{2+})_i$, une activation des endonucléases et protéases (Trump et Berezsky, 1995), et déclenchent la chromatinolyse et la nucléolyse (Kroemer et al., 1995). Une chute $\Delta\Psi_m$ génère aussi la libération de ROS (espèces réactives de l'oxygène) et libère le facteur induisant l'apoptose (AIF) qui active des caspases effectrices (caspases 3, 4, 6, 7, 13) responsables des changements morphologiques et biochimiques dans la cellule. Un des changements morphologiques est l'apparition de la phosphatidylsérine (PS) à l'extérieur de la membrane plasmique qui est un phénomène universel des cellules en apoptose. Les PS servent de signal pour que les cellules apoptotiques soient phagocytées par des macrophages empêchant une réponse inflammatoire. Le phénomène de l'apoptose est aussi relié à un faible niveau de glutathion (GSH). Le GSH est un tripeptide essentiel protégeant les cellules contre des agents oxydants et des radicaux libres qui peuvent endommager les cellules. Le GSH est essentiel aux mitochondries pour maintenir l'homéostasie du Ca^{2+} (Beatrice, Stiers et Pfeiffer, 1984) et il fournit le groupement thiol nécessaire à la régulation de la perméabilité de la membrane interne des cellules (Kosower et Kosower, 1983). Étant donné que les mitochondries ne possèdent pas de γ -glutamyl-cystéinyl synthétase, le GSH mitochondrial provient du cytosol. Comme les mitochondries sont exemptes de catalase pour la détoxification des hydroperoxydes, elles dépendent entièrement de la GSH peroxydase (Chance, Sies et Boveris, 1979). De plus, le déclenchement de l'apoptose dépend du niveau de $(Ca^{2+})_i$. Le calcium peut provenir du milieu externe, de la membrane plasmique, du noyau (Pettit et Hallett, 1998), des réticulums endoplasmiques, des granules lysosomales des neutrophiles humains et des mitochondries (Caswell et Warren, 1972; Luthra et Olson, 1976). Le calcium stimule les enzymes de dégradation (endonucléases, protéases, phospholipases) menant à l'apoptose (Zychlinsky et al., 1991; McConkey et al., 1989). L'endonucléase est une enzyme localisée dans le noyau et son activité est augmentée par une variété de stimuli. Les trois formes d'endonucléases (A, B et C) associées à

l'apoptose sont toutes $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dépendantes. Cette enzyme scinde, à des endroits spécifiques, l'ADN double-brin en plusieurs petits fragments de 180 paires de bases (Wyllie, Kerr et Currie, 1980).

1.1.3 Mécanismes de l'apoptose spécifiquement chez les neutrophiles

Durant l'apoptose, les neutrophiles montrent des caractéristiques particulières comme la diminution du volume cellulaire, la condensation de la chromatine et le bourgeonnement de la membrane. Les cellules phagocytaires voisines reconnaissent les cellules apoptotiques et les ingèrent sans causer d'inflammation (Wyllie, Kerr et Currie, 1980). Le mécanisme précis de la phagocytose des cellules apoptotiques n'est pas encore bien connu. Par contre, plusieurs récepteurs phagocytaires sembleraient être impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques (Giles, Hart, Haslett et al., 2000). Savill, Hogg et Haslett (1992) ont montré que les macrophages reconnaissent les neutrophiles apoptotiques par les récepteurs de vitronectine $\alpha_v \beta_3$ et en concert avec le récepteur CD36 du thrombospondine. D'autres mécanismes ont été suggérés dont l'apparition des phosphatidylsérines à la surface des cellules apoptotiques qui seraient reconnus par les macrophages (Fadok, Savill et Haslett, 1992).

1.1.4 Facteurs inducteurs et inhibiteurs de l'apoptose

Plusieurs facteurs ont été rapportés comme étant des inducteurs ou inhibiteurs de l'apoptose des lymphocytes (Tableau 1) ou des PMN (Tableau 2). Nous ne mentionnons ici que quelques uns de ces facteurs.

Les hormones glucocorticoïdes sont des inducteurs d'apoptose, *in vitro*, sur les thymocytes des rongeurs. La dexaméthasone, un produit de la famille des glucocorticoïdes, à la concentration de 1 μM , augmente l'apoptose des lymphocytes T jusqu'à 45% après 6 heures d'incubation par rapport à une apoptose spontanée qui est de 15% (Zucker et al., 1994).

Les cytokines comme le TNF- α stimulent aussi l'apoptose sur les cellules U937, et le N-acetylcystéine (NAC), un antioxydant, peut protéger ces cellules de l'apoptose induite par le TNF- α (Cossarizza et al., 1995).

Brach et al. (1992) ont montré que les facteurs qui stimulent les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) prolongent la survie des PMN humains en culture. Dans certaines conditions *in vivo*, telles que chez les personnes brûlées, on observe une inhibition de l'apoptose des PMN qui activeraient à leur tour la production de GM-CSF (Chitnis et al., 1996). La prévention de l'apoptose par GM-CSF est associée avec l'induction de l'ARN et la synthèse de protéine dans les PMN. L'apoptose spontanée des neutrophiles peut être bloquée par un inhibiteur de caspase z-Asp-2,6-dichlorobenzoloxymethylketone.

S-nitrosoglutathione (GSNO), un donneur d'oxyde nitrique, augmente la fragmentation d'ADN des neutrophiles humains, et donc l'apoptose (Fortenberry, Owens et Brown, 1999).

Tableau 1 : Inducteurs et inhibiteurs de l'apoptose des lymphocytes

STIMULI	INDUCTEUR	INHIBITEUR	AUTEUR
Bcl-2		X	Vaux, Cory et Adams, 1988
mcl-1		X	Reynolds et al., 1994
Anticorps anti-CD3	X		McConkey et al., 1989
TNF- α	X		Cossarizza et al., 1995
dexaméthasone	X		Zucker et al., 1994; Cossarizza et al., 1994
irradiation	X		Garvy et al., 1993
tributylétain	X		Zucker et al., 1994
mercure	X		Shenker et al., 1997
Calcium ionophores (A23187)	X		McConkey et al., 1989; McConkey et al., 1991

Tableau 2 : Inducteurs et inhibiteurs de l'apoptose des PMN

STIMULI	INDUCTEUR	INHIBITEUR	AUTEUR
GM-CSF	X	X	Brach et al., 1992
Milieu alcalin	X		Leblebicioglu et Walters, 1999
Cycloheximide	X		Hébert et al., 1994
Globules rouges		X	Aoshiba et al., 1999
GSNO	X		Fortenberry et al., 1999
IL-8		X	Duncan et al., 2000
Gro-alpha		X	Duncan et al., 2000
Pan-caspase zVAD-fmk		X	Pryde et al., 2000
z-Asp-2,6-		X	Santos-Beneil et Mollinedo, 2000
dichlorobenzoloxymethylketone			

1.2 La nécrose cellulaire

La nécrose est un phénomène passif causé par une perte de l'homéostasie et elle est caractérisée par des mitochondries endommagées, suivi du gonflement, de la rupture de la membrane plasmique et de la lyse cellulaire amenant à la libération du contenu intracellulaire vers le milieu externe (Carbonari et al., 1994).

1.2.1 Nécrose primaire

La nécrose primaire apparaît d'une manière accidentelle ou de façon pathologique. Ce phénomène est peu ou non régulé. Dans les premiers instants, les membranes plasmique et nucléaire sont détruites et les mitochondries se gonflent. Il y a présence d'agrégats de chromatine libre dans le cytoplasme et ensuite la libération du contenu cellulaire qui amène à une inflammation. La nécrose primaire peut être induite en chauffant les cellules à 56°C durant 30 à 60 minutes (Kroemer, Dallaporta et Resche-Rigon, 1998; Hébert et al., 1996).

1.2.2 Nécrose secondaire

La nécrose secondaire apparaît suite à l'apoptose si les cellules n'ont pas été éliminées par les macrophages ou les cellules avoisinantes. Elle est caractérisée par la disparition presque complète du matériel nucléaire ainsi qu'une désintégration partielle de la membrane plasmique. Le contenu intracellulaire est libéré pour causer une inflammation (Kroemer, Dallaporta et Resche-Rigon, 1998; Hébert et al., 1996).

1.3 Séquence classique de la mort des PMN

L'apoptose des PMN est un processus important qui permet de limiter les dommages tissulaires durant l'inflammation. *In vivo*, les macrophages ainsi que d'autres types cellulaires tels que les cellules mésangiales et les cellules épithéliales reçoivent normalement un signal pour phagocyter les cellules en apoptose ou les corps apoptotiques. *In vitro*, par contre, en absence de macrophages, la phase apoptotique entraîne la détérioration de la membrane plasmique (Vermees et al., 1997).

Comme mentionné plus haut, les PMN normaux vont en apoptose après quelques heures durant la culture *in vitro*, et ensuite en nécrose secondaire.

2.0 Le mercure et ses effets sur les cellules du système immunitaire

Les premières intoxications sévères dans la baie de Minamata en 1953-1960 et à Niigata (1965) au Japon ont entraîné des études accentuées sur le mercure et ses effets neurotoxiques, néphrotoxiques, mutagéniques et immunotoxiques, tant chez les humains que chez les autres mammifères. La maladie de Minamata est le premier et le plus important cas de maladies causées par un contaminant de l'environnement présent dans les déchets industriels relargués dans l'eau. Des centaines de résidents ont souffert de troubles neurologiques suite à la consommation de poissons et de fruits de mer contaminés au méthylmercure (MeHg) (Harada, 1995). Quelques années plus tard, en Irak (1971), le mercure est retrouvé dans un fongicide utilisé pour la préservation du blé, et il est à l'origine d'une autre intoxication majeure (Bakir et al., 1973). Depuis ces incidents, les études subséquentes ont démontré que les effets d'une intoxication au méthylmercure varient en fonction, principalement, de la dose et du temps d'exposition. Ainsi, la concentration de MeHg permise dans les poissons qui permet d'éviter des effets toxiques est de 0,48 ppm, et ce, pour une consommation de 0,48 livres de poisson (Clarkson, 1972; Rischer et DeWaskin, 1999). Autrement dit, selon les normes internationales, l'ingestion quotidienne de MeHg à travers les aliments ne doit pas dépasser 0,48 µg/kg de poids corporel chez l'adulte.

Dans les lignes qui suivent, nous donnerons un bref aperçu sur le mercure : ses formes et ses sources, son métabolisme et ses effets sur les systèmes nerveux et rénal. Nous terminerons ce chapitre en abordant les effets du mercure sur le système immunitaire.

2.1 Formes de mercure

Le mercure se retrouve naturellement dans l'environnement et il existe sous trois formes qui peuvent être assimilées par les organismes vivants : les formes élémentaire, inorganique et organique.

2.1.1 Mercure élémentaire (Hg⁰)

Le mercure élémentaire, appelé également mercure métallique, représente la forme la plus pure du mercure c'est-à-dire qu'il n'est pas combiné à d'autres éléments. Il est le seul, parmi les métaux, qui se présente sous forme liquide dans les conditions normales, c'est-à-dire à la température ambiante (20°C) et à une pression d'une atmosphère. Il est doté d'un poids atomique de 200.9, d'une densité spécifique de 13.59, d'une solubilité pratiquement nulle dans l'eau et d'une tension de vapeur élevée favorisant son évaporation dans l'air. Les vapeurs de mercure sont odorantes et colorantes (Rischer et DeWaskin, 1999).

2.1.2 Mercure inorganique (Hg⁺⁺)

La forme inorganique du mercure est une combinaison du mercure avec le chlore, le soufre ou l'oxygène (Rischer et DeWaskin, 1999).

2.1.3 Mercure organique (MeHg⁺)

Le mercure combiné à du carbone est appelé mercure organique ou composé organomercuriel (Rischer et DeWaskin, 1999). Le mercure organique est 100 fois plus toxique que le mercure inorganique dû à la différence d'absorption et de solubilité entre les deux formes (Robinson et Tuovinen, 1984).

2.2 Sources de mercure

Les émissions mercurielles sont d'origine naturelle ou d'origine humaine et constituent une source d'exposition importante pour l'homme et les animaux.

2.2.1 Sources naturelles

Le MeHg est un contaminant omniprésent dans l'environnement qui est généré par le dégazement de la croûte terrestre, par les émissions volcaniques et par l'évaporation de l'eau des grands lacs et des océans. Le mercure entre dans l'environnement comme le résultat de la brisure normale des minéraux dans les roches et la terre. Le niveau de mercure dans l'atmosphère, c'est-à-dire l'air que nous respirons normalement, est très faible et il ne pose pas de problème apparent de santé. Le MeHg est produit principalement par les microorganismes (bactéries et fungi) dans l'environnement par la méthylation du mercure inorganique présent dans l'eau et les sédiments. Le mercure méthylé libéré dans l'eau s'accumule principalement dans les poissons ou dans les fruits de mer. Cette réaction de transformation peut être réalisée par les macrophages et les micro-organismes intestinaux chez les mammifères (Rischer et DeWaskin, 1999).

2.2.2 Sources reliées aux activités humaines

Les activités minières, la combustion fossile, la production de ciment, etc. sont des sources additionnelles de mercure libéré dans l'environnement et celles-ci représentent environ 80% du mercure sous forme élémentaire. Approximativement 15% de ce mercure est libéré dans le sol par les fertilisations, les fongicides et les déchets solides municipaux (piles ou thermomètres). Un 5% additionnel provient des déchets liquides industriels libérés dans l'eau. Au Canada, les principales sources industrielles sont les usines de pâtes et papiers qui utilisent des fongicides mercuriels, ainsi que les usines de production de chlore et d'alkali. (Rischer et DeWaskin, 1999).

2.3 Utilisation du mercure

Le mercure est utilisé dans les industries électriques pour fabriquer des lampes, des instruments industriels de contrôle, des tubes fluorescents et des amalgames dentaires (Frykholm, 1970). De plus, la séparation de l'or et de l'argent ainsi que la fabrication d'appareils scientifiques tels que les thermomètres et les manomètres nécessitent l'utilisation

du mercure (Harrington, 1974). Les peintures et les crèmes cutanées pour blanchir la peau contiennent des dérivés de mercure. Dans l'agriculture, le mercure organique est utilisé abondamment dans la préparation d'insecticides, fongicides et bactéricides (Lauwerys, 1992).

2.4 Métabolisme du mercure organique

2.4.1 Absorption

2.4.1.1 Voie orale

Les composés organomercuriels sont plus facilement absorbés par la voie orale que les formes inorganiques du mercure. En effet, la méthylation biologique du mercure et son accumulation subséquente dans la chaîne alimentaire favorise son absorption chez les mammifères sous forme de MeHg. Le mercure organique est absorbé surtout au niveau du tube gastro-intestinal (Rischer et DeWaskin, 1999). Le pH acide et la grande concentration de chlore dans l'estomac favorisent la formation de MeHgCl non-chargé qui traverse facilement la barrière gastrique à cause de sa liposolubilité (Rabenstein et Evans, 1978).

2.4.1.2 Voie pulmonaire

Le mercure organique peut être inhalé sous forme de particules de vapeur en milieu professionnel, mais ceci est rare. L'absorption par voie pulmonaire est significative surtout pour le mercure inorganique (Rischer et DeWaskin, 1999).

2.4.1.3 Voie cutanée

Comme mentionné précédemment dans la voie pulmonaire, l'absorption par voie cutanée est importante seulement en milieu professionnel. Des études de Friberg et al. (1961) ont montré que la dose optimale de mercure pour une absorption cutanée est de 16 mg/ml mais la capacité d'absorption diminue à des concentrations plus élevées. En effet, à une concentration faible, la saturation de la liaison au groupement sulfhydryl est augmentée, alors qu'à des concentrations fortes, la dénaturation des protéines entraîne une inhibition de l'absorption.

2.4.2 Distribution

Suite à l'absorption, le mercure organique est distribué à travers l'organisme. Grâce à sa grande liposolubilité, le mercure organique se distribue facilement dans les différents organes, surtout dans les reins. La distribution du mercure organique dans les tissus se fait surtout par la circulation sanguine par sa liaison avec les protéines plasmatiques, telles que l'albumine et l'hémoglobine (Ballatori, 1991). Chez les femmes enceintes exposées au mercure, le mercure organique est transporté du sang maternel au fœtus à travers la barrière placentaire et il s'accumule surtout dans le cerveau du bébé.

2.4.3 Biotransformation

Une fois absorbé, le MeHg peut être biotransformé en mercure inorganique dans les tissus par des mécanismes de déméthylation. Cette biotransformation se fait dans les reins (Mottet, Shaw et Burbacher, 1987), dans la rate, par les macrophages et les bactéries qui composent la flore intestinale (Suda et Takahashi, 1986). Ce processus de conversion en mercure inorganique est l'étape clé du processus de l'élimination du mercure (Rischer et DeWaskin, 1999).

2.4.4 Elimination

Le mercure inorganique biotransformé se retrouve dans les reins, le foie, les fèces, la bile et l'urine (Friberg et al, 1979), alors que le mercure organique absorbé chez l'humain est éliminé par le foie dans la bile, sous une forme complexée au glutathion, et ensuite dans les fèces (Rischer et DeWaskin, 1999). L'excrétion par voie biliaire dépend de la disponibilité du GSH et des protéines de transport (Magos, Clarkson et Allen, 1978). Le mercure excrété par la bile peut être réabsorbé dans la circulation entérohépatique, ce qui contribue à une plus longue demi-vie d'élimination du mercure organique et donc, à sa toxicité. L'excrétion du mercure organique peut se faire aussi à l'extérieur de l'organisme par les phanères (ongles, cheveux, etc...) et la transpiration. Le niveau d'élimination du MeHg varie avec l'espèce, la dose, le sexe et la race. Le mercure est aussi excrété dans le lait maternel durant l'allaitement,

ce qui a pour conséquence la diminution de la demi-vie biologique du MeHg jusqu'à 45 jours (Greenwood et al, 1978). À l'inverse, les risques d'intoxication sont augmentés chez le nouveau-né suite à l'allaitement. La demi-vie biologique du MeHg chez l'humain est d'environ 70 jours, mais il y a des variations importantes entre individus (35 à 189 jours) (Al-Shakristani et Shihab, 1974).

2.5 Localisation subcellulaire du mercure

Le mercure a une forte affinité avec les groupes sulphydryles (SH) et le sélénium, formant un complexe qui peut être visualisé par autométallographie (Danscher et Moller-Madsen, 1985). Par cette technique, MeHg et le dichlorure de mercure (HgCl_2) sont retrouvés surtout dans les lysosomes (processus de détoxification) des tubules rénaux (Fowler et al., 1974; Madsen et Christensen, 1978; Baatrup, Nielsen et Danscher, 1986), des hépatocytes (Norseth et Brendeford, 1971; Baatrup, Nielsen et Danscher, 1986) et des neurones (Danscher et Schroder, 1979; Thorlacius-Ussing et Graabaek, 1986). De plus, le mercure est aussi localisé dans le noyau et un peu partout dans le cytoplasme (Christensen, Mogensen et Rungby, 1988). Norseth et Brendeford (1971), ont montré que le mercure inorganique est distribué surtout dans les lysosomes alors que le mercure organique se concentre dans les microsomes des hépatocytes de rat.

2.6 Toxicité du mercure

Le mercure peut affecter plusieurs organes ou tissus comme le cerveau, le rein, le tractus gastro-intestinal, le colon, le foie, le cœur et l'embryon (Mottet, Shaw et Burbacher, 1987). De plus, le MeHg induit des effets néfastes sur la reproduction en diminuant la spermatogénèse et la mobilité des spermatozoïdes (Popescu, 1978). Nous insisterons ici sur les signes cliniques et les mécanismes de toxicité sur les systèmes nerveux et rénal.

2.6.1 Effets sur le système nerveux

Le cerveau représente souvent l'organe-cible pour les effets toxiques du mercure chez l'humain et les animaux (Mottet, Shaw et Burbacher, 1987). Le mercure élémentaire pénètre dans le système nerveux en raison de sa lipophilicité. Alors que le mercure inorganique par ses propriétés d'oxydoréduction et le mercure organique par mimétisme et transport actif sur le système L de la méthionine au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Figure 2) (Aschner et Aschner, 1990). On retrouve le mercure inorganique de façon hétérogène dans le cerveau tandis que l'accumulation du mercure organique est plus homogène. Les sites affectés sont principalement le cortex visuel, le cervelet et les ganglions dorsaux de la moelle épinière. L'effet principal du mercure sur la cellule nerveuse est lié à sa forte interaction avec les groupements -SH des structures cellulaires qui sont ubiquitaires dans les systèmes biologiques (Vahter et al., 1994). Cette liaison permet l'interaction et l'altération du fonctionnement normal de la machinerie cellulaire. Le mercure, indépendamment de ces formes, agit sur la synthèse des acides nucléiques (Nakazawa, Makino et Okada, 1975), le transport des protéines (Aschner, 1986), la membrane cellulaire (Aschner et al., 1993) et sur l'activité de neurotransmission (Atchison, 1988).

Une intoxication au MeHg suite à la consommation d'aliments (pain, poissons ou fruits de mer) contaminés montre des désordres neurologiques. Plusieurs symptômes apparaissent lors des premières intoxications au MeHg : la paresthésie et des picotements autour de la bouche, des lèvres, des doigts et des orteils. Les symptômes subséquents lors d'une intoxication prolongée sont l'ataxie, la dysarthrie, la neurasthénie, la fatigue et les maux de tête (Takizawa, 1979). Les plus vulnérables aux effets toxiques du MeHg sont le fœtus, durant la période prénatale, et les jeunes enfants puisque leur système nerveux est encore en développement. Ainsi, les enfants exposés *in utéro* au MeHg ont des neuropathies majeures qui consistent en une dégénérescence diffuse des neurones et une perte cellulaire dans le cortex cérébral et le cervelet (Matsumoto, Koya et Takeuchi, 1965). Choi et al. (1978) ont rapporté que le MeHg induisait une migration incomplète et anormale des neurones et perturbait l'organisation dans le cerveau. De plus, le mercure inhibe l'absorption des métabolites essentiels chez le fœtus et l'incorporation des acides aminés dans le système nerveux des embryons de rats intoxiqués, en plus de réduire l'ossification des os pariétaux et occipitaux (Fuyuta, Fujimoto et Hirata, 1978; Mottet, Shaw et Burbacher, 1987).

2.6.2 Effets sur le système rénal

Les composés mercuriels peuvent induire une toxicité rénale. Une exposition aiguë serait responsable de lésions tubulaires (Gritzka et Trump, 1968), alors qu'après exposition chronique, ils induisent une glomérulonéphrite à complexes immuns chez les animaux de laboratoire (Kibukamusoke, Davies et Hutt, 1974). Chez les humains, le mercure semble induire une auto-immunité rénale comme chez les animaux de laboratoire (Soleo et al., 1997). Le développement du syndrome néphrotique chez les travailleurs exposés au mercure pourrait être dû à une accumulation croissante de complexes immuns circulants (Stonard et al., 1983) entraînant une glomérulonéphrite (Kibukamusoke, Davies et Hutt, 1974). Des études sur des rongeurs montrent que le mercure induit la formation de complexes immuns contre la membrane basale des glomérules chez certaines souches de rats (Michaelson et al., 1985). L'auto-immunité rénale se développait surtout suite à une production d'anticorps contre les cellules du néphron et contre la membrane basale causant ainsi la glomérulonéphrite (Druet et al., 1978).

Le mercure inorganique (HgCl_2) est le premier composé associé au développement d'une auto-immunité. Des travaux ont montré la relation entre le développement de l'auto-

immunité et la génétique des animaux étudiés (Sapin et al., 1981). Les souris portant l'haplotype H-2^S sont particulièrement plus sensibles au développement de réactions auto-immunitaires induites par le mercure (Hultman et Enestrom, 1987), telles que les souches SJL, ASW ou B10.S (Reuter et al., 1989). Par contre, les souris de souches H-2^b comme les souris C57BL/6 ou BALB/c et H-2^d comme les souris DBA (Hultman et Enestrom., 1992) étaient plus résistants à l'auto-immunité. Les cellules T helper 1 seraient responsables de la résistance des animaux, alors que les T helper 2 confèreraient à la susceptibilité des animaux à l'autoimmunité (Hu, Moller et Abedi-Valugardi, 1999). Donc, dans certains cas, le mercure à lui seul n'induit pas d'auto-immunité, il faut en plus des facteurs génétiques.

2.7 Effets du mercure sur le système immunitaire

Des recherches antérieures ont montré que le mercure perturbe le système immunitaire en induisant des effets immunotoxiques ou des effets cytotoxiques, dépendamment de la concentration utilisée.

2.7.1 Immunotoxicité du mercure à faibles concentrations

Comme mentionné plus haut, le mercure a une forte affinité pour les groupements SH et, par le fait même, peut affecter plusieurs fonctions des cellules du système immunitaire.

2.7.1.1. Lymphocytes

Le MeHgCl s'est avéré 10 fois plus toxique que le HgCl₂ sur les lymphocytes (Shenker et al., 1992a). Ces deux composés mercuriels ont la capacité d'inhiber les fonctions des lymphocytes humains incluant la prolifération cellulaire, l'expression des marqueurs à la surface des cellules activées, la synthèse d'immunoglobulines et la production de cytokines. En effet, le MeHgCl ainsi que le HgCl₂ induisent une diminution de la prolifération des lymphocytes T de façon dose dépendante et inhibent la capacité des cellules à synthétiser et à sécréter l'IL-2. Des études expérimentales *in vitro* sur des cellules provenant d'animaux, surtout sur des rongeurs, montrent que les deux formes de mercure, à des doses variant de 10⁻⁷ M à 10⁻⁵ M (Nakatsuru et al., 1985; Pelletier et al., 1987), induisent une diminution dans la

réponse des lymphocytes spléniques à la phytohématagglutinine (PHA), à la Concanavaline A (Con A) et au lipopolysaccharide (LPS) (Hirokawa et Hayashi, 1980), une inhibition de la synthèse de l'ADN (Nakatsuru et al, 1985) et une altération de la réponse anticorps (Koller, Exon et Arbogast, 1977; Ohi et al., 1976; Blakley, Sisodia et Mukkur, 1980). Une étude sur les lymphocytes humains exposés dans l'environnement ou au travail montre une incidence significative de la brisure des chromosomes (Skerfving, Hansson et Lindsten, 1970) et une anomalie dans la ségrégation chromosomale durant la mitose (Verschaeve et al., 1976).

Le MeHg inhibe la division cellulaire en désassemblant les microtubules formant les fuseaux mitotiques, lesquels représentent une structure importante du cytosquelette. À des concentrations de MeHg variant de 5 à 10 μM ($0,5$ à 10^{-5} M), la majorité des microtubules des cellules HeLa sont désassemblés dans la première heure d'exposition, alors qu'à des doses plus faibles situées entre 1 et 2,5 μM , le phénomène est moins rapide. Un traitement à des doses inférieures à 1 μM ne montre aucun effet même après 48 h d'exposition. Cette gamme de concentrations qui désassemble les microtubules des lymphocytes est similaire à celle qui affecte d'autres cellules de mammifères en culture (Sager, Doherty et Olmsted, 1983; Miura, Inokawa et Imura, 1984). Le MeHgCl peut perturber la fonction lymphoïde par une altération des microtubules (Miura et Imura, 1987), des histones (Dieter, 1982) ou par des modulations dans les processus de tyrosination des tubulines (Ishida et al., 1997), menant alors à une réduction de la synthèse des macromolécules (ADN, ARN et protéines) (Gruenwedel et Cruikshank, 1979).

Le HgCl_2 , de même que le chlorure de cadmium (CdCl_2), inhibent la synthèse d'ADN, d'ARN et des anticorps (IgG) dans les cellules B murines isolées à partir de la rate (Daum, Shepherd et Noelle, 1993).

2.7.1.2 Neutrophiles

Les neutrophiles sont issus de la moelle osseuse et sont relâchés dans la circulation sanguine à un rythme de 10^{11} cellules par jour (Tool et al., 1994). De plus, il y a environ 50×10^9 neutrophiles qui circulent en tout temps dans l'organisme (Cohen et al., 1992) ce qui suppose un «turnover» important. Les neutrophiles représentent environ 70% des leucocytes

sanguins. Ils sont responsables de l'ingestion et de la destruction de particules étrangères à l'organisme. Une exposition au HgCl_2 à des concentrations variant entre 0.01 fM et 1 μM affecte la fonction des neutrophiles humains en supprimant l'adhérence, la polarisation et l'érythrophagocytose (Contrino et al., 1988). De plus, des doses de mercure inorganique situées entre 1 fM et 1 nM inhibent l'explosion respiratoire des PMN humains (Malamud, Dietrich et Shapiro, 1995). Ces effets sont comparables à ceux des autres métaux lourds, comme l'or, le plomb et le cadmium, qui ont aussi des effets inhibiteurs sur la phagocytoses des neutrophiles (Baginski, 1988). Cependant, des effets opposés, à savoir une augmentation de la chemiluminescence et de la production de H_2O_2 ont aussi été observés aux mêmes concentrations de HgCl_2 (Contrino et al., 1988). Les causes de ces résultats contradictoires ne sont pas connues.

2.7.1.3 Autres types de cellules immunitaires

Le MeHg inhibe les fonctions des macrophages telles que la migration et la phagocytose. Il a été démontré, *in vitro*, le HgCl_2 , que ainsi que le plomb (Pb^{2+}) et le cadmium (Cd^{2+}), diminuaient la phagocytose et l'explosion respiratoire des phagocytes mononucléés (Hilbertz et al., 1986; Baginski, 1988). Contrino et al., (1988) ont obtenu des résultats similaires sur les macrophages suite à une exposition de HgCl_2 à des concentrations variant de 10^{-7} M à 10^{-5} M. De plus, HgCl_2 inhibe l'érythrophagocytose des macrophages péritonéaux chez les rats (Contrino et al., 1992). Le mercure affecte aussi la réponse des macrophages alvéolaires en inhibant la consommation d'oxygène et la libération de l'anion superoxide (Castranova et al., 1980).

D'autres métaux lourds comme le lithium, l'aluminium, le zirconium et le manganèse stimulent la fonction phagocytaire des macrophages, alors que l'or, le plomb et le cadmium ont des effets d'inhibition sur la phagocytose des macrophages (Descotes, 1988).

Les monocytes montrent une diminution dans leur capacité phagocytaire en présence de MeHgCl et HgCl_2 (Shenker et al., 1992b). Les cellules NK sont importantes dans la défense contre des virus, des parasites et des tumeurs. Il a été démontré que le méthylmercure

induit une diminution de l'activité des cellules NK provenant de la rate et du sang de souris (Ilback, 1991).

2.7.2 Cytotoxicité du mercure

Le mercure interfère dans l'activité normale des cellules de différentes façons : changements morphologiques, altération de la perméabilité membranaire entraînant une diminution de la viabilité, diminution du potentiel à travers la membrane plasmique et mitochondriale, réduction de l'incorporation de glucose et changement dans le statut redox (Sarafian et Verity, 1991).

2.7.2.1 Lymphocytes

Les effets sur la viabilité des cellules dépendent de la forme chimique du mercure. Le mercure organique est plus toxique que le mercure inorganique. Par sa grande liposolubilité, due à l'alkylation du mercure, celui-ci pénètre dans la cellule et se lie aux groupes réactives dans le noyau, les réticulums endoplasmiques et d'autres organelles. Par contre, le mercure inorganique ne traverse pas facilement la membrane plasmique et les organelles subcellulaires sont donc partiellement protégées de ce métal lourd. Un haut niveau d'exposition au mercure (concentrations de l'ordre du micromolaire) réduit la viabilité des lymphocytes et peut conduire à l'apoptose des cellules, alors qu'une exposition à des concentrations plus faibles (10^{-9} – 10^{-7} M) se traduit par une dépression de la fonction immunitaire (Shenker et al., 1992b).

Shenker, Guo et Shapiro (1998) ont grandement investigué le phénomène d'apoptose sur les lymphocytes humains exposés au MeHgCl. Ils proposent un modèle dans lequel le mercure induit l'apoptose par divers mécanismes (Figure 2). Ils montrent que le MeHgCl induit l'apoptose sur les lymphocytes T humains à des concentrations de l'ordre du micromolaire. De plus, les mitochondries semblent être l'organelle-cible du mercure. En effet, MeHgCl affecte la fonction des mitochondries en diminuant le potentiel membranaire mitochondrial, en générant les ROS et en induisant une réduction de la réserve de thiol mesurée par le niveau de GSH. Le mercure peut former un mercaptide avec le GSH et, par conséquent, diminuer le niveau de GSH. Les lymphocytes qui ont un niveau élevé de GSH étaient plus résistants aux effets cytotoxiques du mercure. À des concentrations fortes de

mercure (HgCl_2), le niveau de GSH dans les cellules T et B a diminué d'environ 70% (Shenker et al., 1993b). Une réduction du niveau de GSH intracellulaire rend les cellules sensibles au stress oxydatif.

Les cellules activées par PHA, PMA, ionomycine ou IL-2 voient leur niveau d'apoptose réduit d'environ 50% chez les cellules T humaines exposées au MeHgCl. Ces effets impliquent une perturbation de la fonction mitochondriale amenant le stress oxydatif et la libération du cytochrome c dans le cytosol (Close, Guo et Shenker, 1999).

À des concentrations approximativement 10 fois nécessaires pour altérer la fonction cellulaire, le mercure cause une perte importante de la viabilité des cellules B et l'effet cytotoxique semble être relié à l'apoptose. Les cellules B semblent plus sensibles aux effets immunotoxiques et cytotoxiques du MeHgCl qu'à HgCl_2 (Shenker et al., 1993a)

Chez les lymphocytes T (Tan et al., 1993) et B (Shenker et al., 1993a), il a été démontré que l'accumulation de $(\text{Ca}^{2+})_i$ se faisait très rapidement avec des concentrations de MeHgCl de l'ordre du micromolaire.

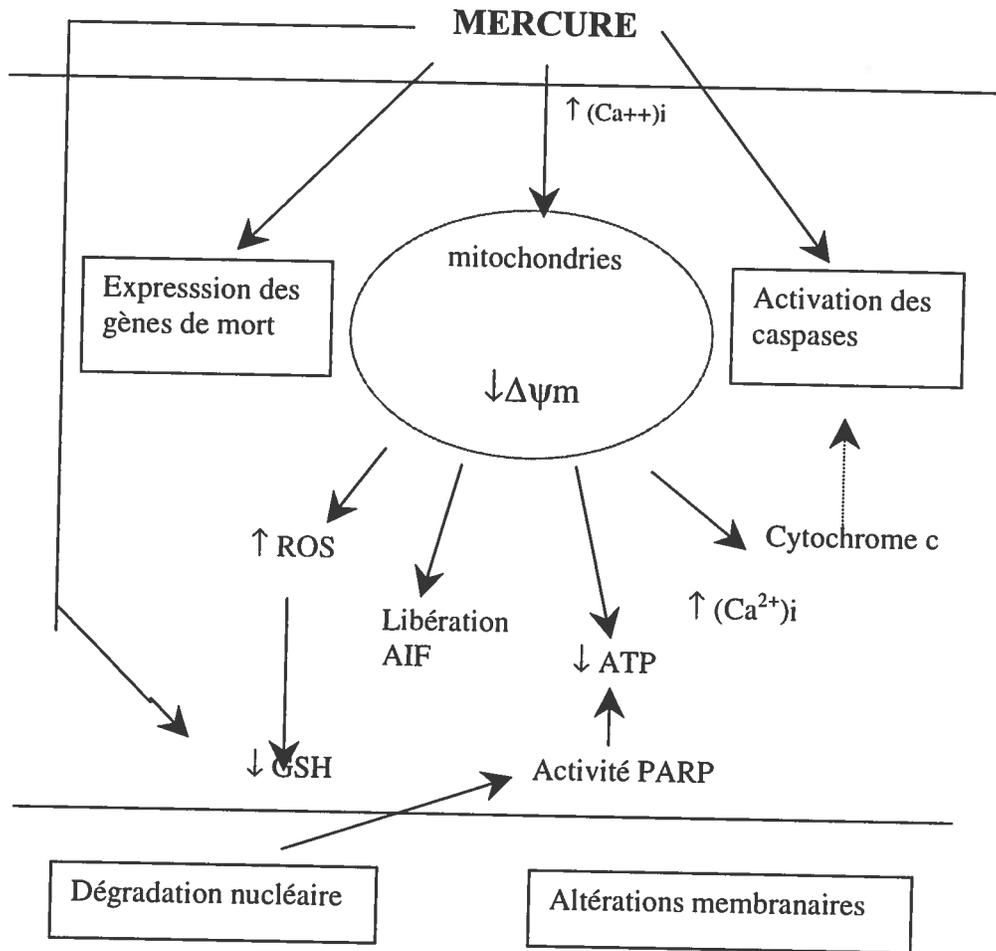


Figure 2: Représentation schématique des mécanismes potentiels d'induction de l'apoptose par MeHgCl dans les lymphocytes humains. Tiré de Shenker, Guo et Shapiro, 1998. L'apoptose peut se dérouler dans trois phases : inductrice (segment du haut), effectrice (segment du milieu) et de dégradation (segment du bas).

2.7.2.2 Neutrophiles

Les neutrophiles ont une courte durée de vie et meurent après avoir phagocyté des particules étrangères à l'organisme. Ils jouent un rôle de premier plan au site inflammatoire et sont généralement retrouvés en grand nombre lors des premières étapes d'une infection. Une variété de facteurs de chimiotactisme, incluant l'interleukine-8 (IL-8), les fragments C5a et le TGF- β , sont responsables du recrutement des PMN au site d'inflammation (Brach et al., 1992). Les neutrophiles utilisent leurs enzymes hydrolytiques et antimicrobiens, leurs radicaux peroxydes et superoxydes, ainsi que leurs protéines bactéricides contenues dans leurs granules pour dégrader complètement les particules.

En absence de stimuli appropriés, les PMN se dirigent spontanément en apoptose. À notre connaissance, aucune étude n'a clairement évalué la viabilité des PMN suite à une exposition au mercure. Il devient alors intéressant d'étudier le phénomène de l'apoptose et de la nécrose chez les neutrophiles humains exposés au MeHgCl et de déterminer les mécanismes de cytotoxicité par lesquels le mercure exerce un effet toxique sur ces cellules.

2.7.2.3 Autres types de cellules immunitaires

Les monocytes traités au MeHgCl à une concentration de 1 à 5 μ M montrent une activité phagocytaire réduite, une augmentation de l'apoptose, une chute du potentiel membranaire mitochondrial, une génération de ROS, une faible réserve de thiol et une baisse de la concentration de GSH (InSug et al., 1997). La dose efficace à 50% est de 2-3 μ M MeHgCl.

CHAPITRE DEUXIÈME : ARTICLE SCIENTIFIQUE

**LE CHLORURE DE MÉTHYLMERCURE INDUIT UNE NÉCROSE PRIMAIRE
QUI SURVIENT PAR-DESSUS L' APOPTOSE DANS LES NEUTROPHILES
HUMAINS**

Ce chapitre reproduit en intégralité l'article intitulé *Methylmercuric chloride-induced primary necrosis supervened over early apoptosis in human neutrophils* par Nhi Nguyen, Sylvie Arbour, Corinne Benquet, Mohammed Abdouh, Denis Girard et Edouard Kouassi soumis pour publication à la revue *Toxicology and Applied Pharmacology*.

Attestation de ma contribution et celle des co-auteurs

Ma contribution : J'ai réalisé toutes les expériences contenues dans l'article, à l'exception des études morphologiques (Fig. 4), et des mesures de calcium intracellulaire (Fig. 7A et 7B). De plus, j'ai participé à toutes les étapes de rédaction du manuscrit. Au total, ma contribution est évaluée à 80%.

Contribution des co-auteurs : *Sylvie Arbour* a réalisé les études morphologiques (Fig. 4), et elle m'a aidé dans les études cinétiques par cytométrie en flux. Elle a contribué aussi à la rédaction du manuscrit. *Corinne Benquet* a été la première à décrire les effets cytotoxiques du mercure sur les neutrophiles humains ; ses observations préliminaires ont servi de base aux études plus détaillées contenues dans cet article. *Mohamed Abdouh* a étudié les effets du mercure sur la mobilisation du calcium intracellulaire (Fig. 7A et 7B). *Denis Girard* nous a aidé dans la purification des neutrophiles humains, et dans les études par microscopie optique ; il a contribué également à la rédaction du manuscrit. *Edouard Kouassi* a conçu le projet, et a supervisé sa réalisation ; il a assumé la responsabilité de la rédaction du manuscrit.

Résumé de l'article

Le résumé de l'article est identique au sommaire qui apparaît à la page xi du mémoire.

Running title: Mercury-induced necrosis supervened over apoptosis

**Methylmercuric chloride-induced primary necrosis supervened over early apoptosis in
human neutrophils**

**Nhi Nguyen,* Sylvie Arbour,* Corinne Benquet,† Mohamed Abdouh,† Denis Girard,*
and Edouard Kouassi*^{‡,1}**

**Human Health Research Center, INRS-Institut Armand-Frappier, Pointe-Claire, PQ,
Canada, †Department of Pharmacology, University of Montreal, Montreal, PQ, Canada, and*

‡ Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, PQ, Canada

¹ To whom correspondence should be addressed:

Edouard Kouassi, Ph.D.
Human Health Research Center
INRS-Institut Armand-Frappier
245 boulevard Hymus
Pointe-Claire, Québec
H9R 1G6
Canada
Tel.: 514-630-8851
Fax: 514-630-8850
E-mail: edouard.kouassi@inrs-sante.quebec.ca

Ma contribution à la rédaction de l'article: Comme premier auteur, j'ai joué un rôle majeur dans la rédaction de l'article, et les résultats qui sont discutés dans cet article sont issus majoritairement de mes travaux.

ABSTRACT

Methylmercuric chloride-induced primary necrosis supervened over early apoptosis in human neutrophils. Nguyen, N., Arbour, S., Benquet, C., Abdouh, M., Girard, D., and Kouassi, E. (2000). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*

The objective of the present study was to characterize the kinetics and dose-response relationships of the cytotoxic effects of methylmercuric chloride (MeHgCl) on human polymorphonuclear neutrophils (PMN) *in vitro*, and to explore the biochemical mechanisms involved. PMN were cultured at 37°C for varying periods of time in the presence or absence of increasing concentrations of MeHgCl, and cell death by apoptosis, secondary or primary necrosis was quantitated by exploiting the fluorescence properties of Hoechst 33342 in conjunction with propidium iodide, and flow cytometry analysis. Results show that doses of up to 10^{-5} M MeHgCl did not induce any cytotoxic effects. At concentrations of 3×10^{-5} to 10^{-3} M, apoptosis was induced very rapidly within 15 min of treatment in almost all the PMN. MeHgCl-induced apoptosis was further confirmed by two other indices, including annexin V-FITC binding to externalized phosphatidylserine, and morphologic counting of pyknotic nuclei. This apoptosis was followed by a primary necrosis phase that was both time- and concentration-dependent, with an LD50 of 6×10^{-5} M after 2 h of incubation. MeHgCl-induced cytotoxicity was associated with early reduction of mitochondrial transmembrane potential, and with early and sustained increases in calcium fluxes. Furthermore, chelation of extracellular and intracellular calcium partially prevented MeHgCl-induced apoptosis and it delayed the onset of primary necrosis. These results reveal that MeHgCl-treated PMN undergo a burst of apoptosis quickly terminated by primary necrosis. Thus, our findings strongly support the existence of a toxicant-induced cell death model where necrosis supervenes over apoptosis in cell types exhibiting low apoptotic threshold.

Key Words : mercury ; cytotoxicity ; primary necrosis ; apoptosis ; secondary necrosis ; cell death modes ; polymorphonuclear leucocytes ; mitochondria ; calcium.

INTRODUCTION

Methylmercury is a widespread toxic environmental pollutant with well recognized deleterious effects on the function of the brain, and the kidney (Clarkson, 1997). In the last decade, toxic effects on other systems have also been reported, the effects on the immune system being of particular concern (Moszczynski, 1997). A number of mechanistic studies have shown that, at noncytotoxic concentrations, mercury can alter *in vitro* T (Shenker *et al.*, 1992b) and B (Shenker *et al.*, 1993) lymphocyte activation and proliferation. Human polymorphonuclear neutrophils (PMN) are also susceptible to the immunotoxic effects of mercury leading to reduced ability of adherence, polarization, chemotaxis, and phagocytosis (Contrino *et al.*, 1988), and inhibition of PMN respiratory burst (Malamud *et al.*, 1985) and bactericidal activity (Obel *et al.*, 1993). At higher levels, mercury exposure have been shown to induce cell death by apoptosis mechanisms in human monocytes (Shenker *et al.*, 1992a; InSug *et al.*, 1997), and lymphocytes (Shenker *et al.*, 1992a; 1993; 1997; Guo *et al.*, 1998), the former being more sensitive than the latter.

We hypothesized that human PMN may differ from monocytes and lymphocytes in their reactions to cytotoxic concentrations of MeHgCl. PMN play a major role in host defense mechanisms against infections and in acute inflammation. Among all leukocytes, PMN possess the shortest lifespan, dying spontaneously by apoptosis as one mechanism of resolution of excessive inflammatory reactions *in vivo*, since changes at the membrane surface of apoptotic cells, such as externalization of phosphatidylserine, target them for phagocytosis by surrounding macrophages (Savill *et al.*, 1990 ; Homburg and Roos, 1996). Isolated PMN retain their constitutive apoptosis death pathway *in vitro*, and in the absence of phagocytosis by macrophages, the apoptotic PMN subsequently progress to secondary necrosis. This apoptotic mode of PMN death is usually opposed to primary necrosis that is

provoked by sudden changes in the environment, leading to rupture of the plasma membrane and release of proinflammatory mediators. Experimentally, the apoptosis, secondary necrosis, and primary necrosis modes of PMN death can be delineated by exploiting the properties of the DNA-binding dyes Hoechst 33342 (HT) and propidium iodide (PI), followed by flow cytometry analysis (Hébert *et al.*, 1996). HT can permeate viable cell membrane and it yields increased fluorescence in apoptotic cells, whereas PI is membrane impermeant and stains only the nuclei of cells with damaged plasma membrane.

The objective of the present study was (i) to characterize the cytotoxic effects of MeHgCl on human PMN by using the HT/PI assay in order to discriminate between the different modes of cell death, and (ii) to explore attendant biochemical changes. Our results indicate that MeHgCl exposure leads to a burst of apoptosis that is followed by induction of primary necrosis, in association with reduced mitochondrial transmembrane potential and increased intracellular calcium mobilization. These results provide further evidence for the existence of a form of cell death where cell types that are prone to undergo constitutive apoptosis display a transient apoptotic response that is quickly terminated by necrotic death following exposure to necrogenic toxicants.

MATERIALS AND METHODS

PMN isolation and culture

Human polymorphonuclear neutrophils (PMN) were isolated from heparinized venous blood drawn from randomly selected healthy volunteers under informed consent. Granulocytes were purified by dextran sedimentation, followed by Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech Inc., Baie d'Urfee, Quebec, Canada) gradient centrifugation and hypotonic lysis of residual erythrocytes (Girard *et al.*, 1998). Cells were collected, washed in phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended at 1×10^6 /ml in RPMI 1640 supplemented with 2 mM glutamine (Gibco Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada), 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan, Utah), 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin (Gibco). Neutrophil preparations were 98% pure with less than 2% eosinophil contamination. Cells were incubated in medium alone (control), or with increasing concentrations of MeHgCl (Alfa Aesar, Ward Hill, MA) diluted in RPMI-1640 (Gibco), for various lengths of time at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The osmolality of cell suspensions were verified (Precision System Inc., Natick, MA) and it did not change with MeHgCl concentrations up to 10^{-3} M. Other chemicals included phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), and *Salmonella minnesota* Re 595 lipid A, all from Sigma Chemical Co. (Oakville, Ontario, Canada). For induction of typical primary necrosis, cells were heated at 56°C in a water bath.

Flow cytometry

Assessment of neutrophil apoptosis, secondary necrosis, and primary necrosis by HT/PI assay

After treatment, PMN were washed to remove excess chemicals, and resuspended in PBS to a final concentration of 1×10^6 cells/ml. Cells were incubated at 37°C for 10 minutes with 2'-(4-ethoxyphenyl) - 5 - (4 - methyl -1 - piperaziny)- 2, 5'-bi-1H - benzimidazole (Hoechst 33342, HT, 1 µg/ml) (Sigma), and washed again to prevent further uptake of HT, and resuspended in 1 ml of PBS. PI (Sigma) was added to each sample to a final concentration of 5 µg/ml, immediately before dual-laser flow cytometry analysis on a FACStar-Plus flow cytometer (Becton Dickinson, San José, CA). HT was excited at 325 nm using an UV laser light, and PI at 488 nm with an Argon laser. HT and PI fluorescences were detected by using 424/44 nm, and 575/26 nm filters, respectively (Hébert *et al.*, 1996).

Assessment of phosphatidylserine externalization by annexin V binding

Cells were washed and resuspended in 1X binding buffer (10 mM Hepes/NaOH pH 7.2, 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂) at a final concentration of 1×10^6 cells/ml. One hundred microliters of this suspension was mixed with 5 µl of annexin V-FITC (Pharmingen, Mississauga, Ontario, Canada) and 10 µl of PI (50 µg/ml) (Molecular Probes, Eugene, OR) (Vermes *et al.*, 1995). The cells were gently vortexed and incubated for 15 min at room temperature in the dark. A volume of 400 µl of binding buffer was added for 15 min, light protected. Cells were then analyzed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with an air-cooled, 15 mW Argon laser emitting at 488 nm. The filters for detection of FITC and PI fluorescences were 530/30, and 575/26 nm, respectively. In some

experiments, cells were triple stained with annexin V-FITC, HT, and PI, and fluorescence was analyzed by dual-laser flow cytometry as described above under HT/PI assay.

Measurement of mitochondrial membrane potential

Cells (1×10^6 /ml) were stained with the selective mitochondrial probe 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1) (Molecular Probes) used at 10 μ g/ml, and JC-1 green (FL1) and orange (FL2) fluorescences were measured on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) (Cossarizza *et al.*, 1993).

Measurement of intracellular calcium mobilization

PMN (1×10^6 /ml) were loaded with the calcium-sensitive dye Fluo-3 acetoxymethylester (Fluo-3 AM ; 1 μ M) (Molecular Probes) in the presence of the nonionic detergent Pluronic F-127 (Molecular Probes), and intracellular calcium was measured on a FACStar-Plus flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with a sample station to provide on-line reagent addition and reduced sample transit time (Goulet *et al.*, 1997). In inhibition experiments with calcium chelators, cells were preloaded with 1,2-*bis*(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid acetoxymethylester (BAPTA AM ; 20 μ M) (Molecular Probes) to chelate intracellular calcium, and/or pretreated with ethylene glycol-*bis*(β -aminoethyl ether)- N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA ; 2 mM) (Sigma) to chelate extracellular calcium, before addition of MeHgCl.

Nuclear morphology

Nuclear morphology was assessed on cytocentrifuge preparations of neutrophils stained with Wright Giemsa (Sigma). Cells were examined by light microscopy at 400X final

magnification and apoptotic neutrophils were defined as cells containing one or more characteristic darkly stained pyknotic nuclei (Girard *et al.*, 1998).

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error (SE) from at least three experiments, and statistical significance was assessed by Student's t-test. In flow cytometry analysis of types of cell death and mitochondria membrane potential, a minimum of 10,000 cells per sample were analyzed.

RESULTS

Rapid induction of apoptosis followed by primary necrosis in MeHgCl-treated PMN

We used HT and PI staining followed by flow cytometry analysis to discriminate between PMN cell death by apoptosis, secondary necrosis, and primary necrosis. Four populations of human PMN could be distinguished (Fig. 1). These included i) PMN displaying low fluorescence with both HT and PI that represent viable neutrophils (cluster A); ii) apoptotic cells exhibiting high fluorescence for HT and low fluorescence for PI (cluster B); iii) PMN displaying low fluorescence with HT and high fluorescence with PI representing cells in secondary necrosis (cluster C); and iv) cells in primary necrosis characterized by high fluorescence with both HT and PI (cluster D). Control PMN (Fig. 1, left panel) asynchronously underwent apoptosis after several hours of incubation, with a consistent percentage of apoptotic cells at 8 h (19% in cluster B), which increased with time and reached a maximum by 16 h (64%). After this spontaneous apoptosis, PMN progressed to secondary necrosis that was detectable after 20 h (11% in cluster C), and increased further upon prolonged incubation for several days (data not shown). There were a few percentages of cells in the primary necrosis cluster that did not change significantly with incubation time (1-6%). Exposure of PMN to MeHgCl (10^{-4} M) led very rapidly to an increased rate of synchronous apoptosis with 80% apoptotic cells within 15 min of treatment (Fig. 1, middle panel). Cells remained in the apoptosis state for 30-45 min, and then progressed to primary necrosis, with 11%, 29%, and 94% of necrotic cells after 45, 60, and 120 min. This sequence of cell death was not found with the classical inducer of primary necrosis, heat shock of 56°C, which induced primary necrosis in a time-dependent manner culminating to 89% necrotic cells after 1 h, without any transition in apoptosis at earlier time points (Fig. 1, right panel).

MeHgCl-induced cytotoxic effects were concentration-dependent, with a threshold concentration of 10^{-5} M in repeated experiments on PMN from at least 3 different donors (Fig. 2). At concentrations above 10^{-5} M, apoptosis was induced rapidly in 80-95% of cells (Fig. 2A). The duration of the apoptosis phase was inversely proportional to the concentration, with cells being in that state during 2 h, 1h, 45 min, and 30 min, in the presence of 3×10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} , and 10^{-3} M MeHgCl, respectively, before entry into primary necrosis. The LD50 of MeHgCl-induced primary necrosis was 6×10^{-5} M at 2 h, and almost all cells were necrotic by 8 h, 4 h, 2h, and 1 h, following exposure to 3×10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} , and 10^{-3} M MeHgCl, respectively (Fig. 2B).

Induction of phosphatidylserine externalization and of characteristic pyknotic nuclei by MeHgCl

To confirm that MeHgCl-treated cells underwent apoptosis before primary necrosis, two other hallmarks of apoptosis were used, including (i) annexin V-FITC binding to monitor phosphatidylserine externalization, and (ii) morphologic counting of pyknotic nuclei. In Fig. 3 (middle panel), cells treated for 15 min with MeHgCl (10^{-4} M) exhibited increased annexin V-FITC fluorescence and remained PI negative, indicating induction of apoptosis. Thereafter, MeHgCl-treated cells became both annexin V-positive and PI-positive, showing induction of necrosis, with all the cells being necrotic after 2 h. As controls, cells incubated in the absence of MeHgCl expressed phosphatidylserine at their surface after several hours, with 23% positive cells after 8 h, increasing to 55% and 72% after 12 h and 16 h, respectively. Part of apoptotic cells in control samples became necrotic (annexin V-positive and PI-positive) after 20 h, with 15% positive cells (Fig. 3, left panel). Cells obtained after heating at 56°C

exhibited both high annexin V and high PI fluorescence, and their proportion increased as a function of time, without any evidence of induction of annexin V-positive and PI-negative cells. Assessment of apoptosis with annexin V/PI assay (Fig. 3) correlated well with that performed with HT/PI (Fig. 1), and the former detected systematically about 10% more positive cells than the latter. Because of their similar level of annexin V-binding, cells in primary and secondary necrosis were not readily distinguishable on the basis of annexin V-FITC fluorescence, consistently with a previous report (Louagie *et al.*, 1998). However, the primary necrotic cells induced by MeHgCl (10^{-4} M) after 2 h (Fig. 3, middle panel), or by heat shock after 1 h (Fig. 3, right panel), displayed about 10-fold greater fluorescence with PI than secondary necrotic cells in control samples (Fig. 3, left panel). In addition, PI fluorescence increased gradually with time in MeHgCl-treated cells (Fig. 3, middle panel), indicating a progressive loss of cell membrane integrity within 2 h of treatment. Triple color staining with annexin V-FITC, HT, and PI, indicated that annexin V-positive and PI positive cells induced by MeHgCl or by heating at 56°C displayed high HT fluorescence and were indeed in the primary necrosis state (data not shown).

In Fig. 4, cytocentrifuge preparations were performed and the morphology of PMN was observed by light microscopy. A control population of freshly isolated normal PMN showed the morphology of intact cells with polysegmented nuclei (Fig. 4A). After 20 h of culture, the PMN displayed pyknotic nuclei with condensation of their chromatin and coalescence of the nuclear lobes (Fig. 4B), a typical characteristics of apoptotic cells (Hébert *et al.*, 1996). In Fig. 4C, cells treated for 15 min with MeHgCl (10^{-4} M) exhibited the same characteristic pyknotic nuclei as cells undergoing constitutive apoptosis. After 2 h treatment with MeHgCl (10^{-4} M), cell swelling and loss of the plasma membrane integrity was

observed, that was similar to the morphology of cells heated at 56°C for 1 h (data not shown), and consistent with the morphology of primary necrotic cells (Hébert *et al.*, 1996).

Differences between MeHgCl and PMA-induced modes of PMN cell death

PMA is a potent activator of PMN, which is known both to accelerate typical apoptosis (Lundqvist-Gustafsson and Bengtsson, 1999), and to induce atypical morphologic changes (Takei *et al.*, 1996) in human PMN. To evaluate whether PMA could also induce an atypical sequence of PMN death similar to that triggered by MeHgCl, we compared the effects of both agents on morphologic features and on the time-course of PMN cell death. Cells treated with PMA (25 ng/ml) for 15 min exhibited numerous mega-vacuoles throughout their cytoplasm (Fig. 4D) that were not seen in MeHgCl-treated cells (Fig. 4C). Flow cytometry analysis indicated time- and dose-dependent increases in cell size and cell complexity in PMA-treated PMN based on forward, and side light scatter properties, respectively, at doses ranging from 10 to 100 ng/ml (data not shown). In addition, apoptosis was increased in PMA-treated cells after 2 h and 4 h, time points that were later than those of MeHgCl-induced apoptosis (Fig. 5A). A moderate level of primary necrosis was induced by PMA, in parallel with induction of apoptosis, and without any evidence of previous transition of these necrotic cells in apoptosis (Fig. 5B).

Reduction of mitochondrial membrane potential and increases in calcium fluxes by MeHgCl

To explore the biochemical changes associated with MeHgCl-induced cytotoxicity, mitochondrial membrane potential and calcium fluxes were investigated by flow cytometry using the selective probes JC-1 and Fluo-3, respectively. As shown in Fig. 6, PMN treated for 15 min with MeHgCl (10^{-4} M) exhibited a reduced mitochondrial membrane potential as compared with control cells. Also, MeHgCl-treated cells appeared to be more homogeneous in their JC-1 fluorescence characteristics as compared with the positive control, valinomycin, and their mean fluorescence intensity was about one log unit lower than that of normal cells. Noncytotoxic concentrations of MeHgCl (10^{-5} M) had no effect on mitochondrial membrane potential (data not shown).

MeHgCl induced a time- and dose-dependent mobilization of intracellular calcium. An early and sustained calcium mobilization was observed at 10^{-4} and 10^{-3} M, peaking at 2 min after addition of the toxic, with more than 90% of cells responding. Only a marginal and relatively late increase in calcium mobilization, which peaked at 8 min, was observed at 10^{-5} M, while no effect was observed at 10^{-6} M (Fig. 7A). MeHgCl-induced calcium mobilization was partially prevented by chelating either intracellular calcium with BAPTA, or extracellular calcium with EGTA, while it was completely abrogated by combination of both chelators (Fig. 7B). In the presence of BAPTA and EGTA, MeHgCl-induced cytotoxicity was partially prevented, as indicated by a greater percentage of viable cells (Fig. 7C) with a concomitant decrease of the percentage of both apoptotic (Fig. 7D) and necrotic (Fig. 7E) cells during the first hour of MeHgCl treatment. However, after 2 h, all MeHgCl-treated cells died by primary necrosis, independently of the presence of BAPTA and EGTA (Fig. 7E).

To evaluate whether any agonist of PMN which increased intracellular calcium levels could reproduce the sequence of cell death induced by MeHgCl, the cytotoxic effects of two other calcium-mobilizing agents, the chemotactic peptide fMLP, and bacterial lipid A (Benquet and Kouassi, 1998) were tested. Both fMLP (10^{-8} - 10^{-3} M), and lipid A (1-100 $\mu\text{g/ml}$) failed to reproduce MeHgCl-induced early apoptosis and subsequent primary necrosis during the first 2 h of incubation (data not shown).

DISCUSSION

In the absence of toxicants, cultured PMN asynchronously undergo apoptosis after several hours of incubation, and secondary necrosis subsequent to apoptosis. Here, we report that MeHgCl-treated PMN present with a different sequence of cell death, involving a burst of synchronous apoptosis, which is followed rapidly by primary necrosis. Our dose-response studies reveal that MeHgCl-induction of apoptosis in PMN is an all-or-none phenomenon, with a threshold concentration of 10^{-5} M. Above this value, more than 80% of cells are apoptotic within 15 min. Thereafter, the percentage of apoptotic cells decreases and that of necrotic cells increases, as a function of both time and MeHgCl concentration, with a LD50 of 6×10^{-5} M for induction of primary necrosis after 2 h treatment. Transition of the cells in apoptosis before entry into primary necrosis is confirmed by three apoptosis hallmarks, including increased HT fluorescence and increased phosphatidylserine externalization, both in the presence of intact membrane integrity as assessed by flow cytometry, and observation of characteristic pyknotic nuclei monitored by light microscopy. The sequence of MeHgCl-treated PMN death is distinct from that of heating the cells at 56°C , which induced primary necrosis in the absence of apoptosis. It is also distinct from that of PMA, which induced rapidly numerous vacuoles in the cytosol accompanied by increases in cell size, and thereafter augmentation of the proportion of both apoptotic and primary necrotic cells, without transition of the latter in apoptosis.

Besides primary necrosis, apoptosis, and secondary necrosis, Raffray and Cohen (1997) have proposed three additional operational forms of cell death caused by toxicants and physical agents, in order to cover most, if not all, circumstances of toxicant cytotoxicity, including those previously reported as being atypical. These include intercurrent apoptosis and necrosis, in which heterogeneous apoptosis and necrosis are seen simultaneously in a

single cell population exposed to a nominally uniform insult ; sequential apoptosis/necrosis, where apoptosis precedes necrosis, or *vice versa*, as for example in two interdependent, but different, cell types, in which apoptosis can be induced in a cell population providing a vital support function for a second cell type, causing necrosis of the latter; and necrosis supervened over apoptosis, in which apoptosis is initiated in highly primed cells, but is soon overwhelmed by collapse of cellular integrity. Raffray and Cohen (1997) have underlined the fact that the latter type of cell death is not indisputably established to date, since the difficulties of following rapid and potentially asynchronous changes in individual cells is experimentally challenging.

Our findings on the kinetics and dose-response of MeHgCl cytotoxicity on human PMN are more compatible with the necrosis supervened over apoptosis form of cell death, than with intercurrent apoptosis and necrosis, or with sequential apoptosis/necrosis. And yet, these findings are not unprecedented, since at least four or five other examples of similar cytolethal effects have been reported previously, although with fewer experimental details on the kinetics of the phenomenon and fewer indices of the modes of cell death. Indeed, in one study using a murine T cell hybridoma, mercuric chloride has been shown to induce both apoptosis and necrosis at concentrations between 1 and 5×10^{-5} M, while only necrosis was observed above 5×10^{-5} M (Aten *et al.*, 1995). In human lymphoblastoid cells, apoptosis was induced by mild hyperthermia up to 43°C; above 43°C (up to 47°C), the same apoptosis reponse was observed, but reproducibility was poor and increasing damage to the cell membrane was evident, presumably due to primary necrosis (Dyson *et al.*, 1986). The results of another study of hyperthermia-induced cell death in a human leukaemic B lymphocyte cell line are indicative of transient apoptosis followed by primary necrosis at temperatures of 42-50°C, and induction of primary necrosis without transition in the apoptosis stage at 56°C (Böhmer, 1985). A fourth example of necrosis following transient apoptosis comes from the

work of Raffray and Cohen (1997) using the rodent thymocyte model where treatment with tributyltin at borderline necrogenic concentrations produces necrotic cells, together with another cell subpopulation exhibiting ultrastructural markers of both apoptosis and necrosis. An intermediary mode of cell death termed aponecrosis, which shares both apoptosis and primary necrosis features, was observed in a rat fibroblastic cell line exposed to borderline necrogenic concentrations of a metabolic poison, antimycin A (Formigli *et al.*, 2000), and this could also be classified as necrosis supervened over apoptosis.

As an attempt to define the biochemical changes associated with MeHgCl-induced cytotoxicity in PMN, we evaluated alterations in mitochondria membrane potential, and in intracellular calcium levels. The results demonstrate that, at cytotoxic concentrations, MeHgCl induces rapid inhibition of mitochondria membrane potential, and early as well as sustained elevation in cytosolic calcium levels. The latter involves both the release of intracellular stores, and transmembrane influx from the extracellular milieu as indicated by inhibition experiments with BAPTA and EGTA. Moreover, in the presence of these calcium chelators, the apoptotic phase of cell death was partially prevented, while the magnitude of primary necrosis was not affected, but only delayed in its onset. This suggests that (i) the apoptosis mode of MeHgCl-induced cell death is more sensitive than primary necrosis to calcium chelators; and (ii) the calcium response is necessary but not sufficient for induction of apoptosis by MeHgCl, thus indicating that additional molecular mechanisms may be involved. Our findings are in agreement with those of previous reports with human monocytes (InSug *et al.*, 1997), B lymphocytes (Shenker *et al.*, 1993), and T lymphocytes (Shenker *et al.*, 1998), showing that mitochondrial damage and/or increases in calcium fluxes are among the biochemical events involved in MeHgCl-induced apoptosis. Also, the fact that blockade of calcium fluxes resulted in prolongation of the time lag between apoptosis and primary necrosis suggests that the calcium signal may play a role in the necrosis type of cell

death as well, consistent with the notion that apoptosis and primary necrosis are regulated by many of the same biochemical changes, including mobilization of intracellular calcium levels (McConkey, 1998) and altered mitochondrial functions (Green and Reed, 1998 ; Kroemer *et al.*, 1998), although the extent to which these mechanisms could be shared between both processes still remains unclear (Raffray and Cohen, 1997).

Because of the relatively high MeHgCl concentrations required to induce human PMN apoptosis and primary necrosis *in vitro*, these cells are probably not a significant target for the cytotoxic effects of mercury *in vivo*. A relative resistance of human PMN to the cytotoxic effects of another heavy metal, cadmium, have been reported previously, despite the absence of metallothionein that could play a cytoprotective role in these cells (Enger *et al.*, 1983). Both the threshold and LD50 of the cytotoxic effects of MeHgCl on PMN are about 10-100-fold higher than those producing apoptosis in human monocytes (InSug *et al.*; 1997) and resting lymphocytes (Shenker *et al.*, 1997), suggesting that PMN may be more resistant than blood mononuclear cells. Interestingly, activated T cells have been shown to exhibit about 50% reduction in their susceptibility to MeHgCl-induced apoptosis, as compared to resting T cells. Additionally, this was associated with an increased expression of the anti-apoptotic protein, Bcl-2, in activated T cells (Close *et al.*, 1999). Similar resistance to mercury cytotoxicity was observed in a murine T cell hybridoma transfected with Bcl-2 (Aten *et al.*, 1995), or activated with interleukin-2 (Prigent *et al.*, 1995). Activation of mature T cells is supposed to lower their apoptotic threshold (Squier *et al.*, 1995). Therefore, the relative resistance of activated T cells, as that of PMN, to mercury-induced apoptosis, raises the possibility that cell types with low apoptotic threshold may be less sensitive to the cytolethal effects of mercury, and probably to those of other heavy metals. Further studies are needed to explore this possibility.

To our knowledge, the present study provides the first detailed evidence for mercury-induced primary necrosis that supervenes over apoptosis, owing to observation of very early flow cytometric, morphologic, and biochemical changes following exposure of PMN to increasing concentrations of MeHgCl. Therefore, our findings contribute to establish more firmly this operational form of necrotic cell death caused by pharmacological and environmental toxicants in cell types, such as immature thymocytes and mature PMN that are highly primed to undergo apoptosis. The data further support the notion that, although distinct on several molecular and morphologic aspects, apoptosis and primary necrosis modes of cell death may not be totally separate.

Acknowledgments

We thank Dr. Marie-Josée Hébert for helpful discussions and critical reading of the manuscript, Drs. Jacques Bernier, Michel Fournier, and Michel Charbonneau for helpful discussions, and Sophie Ouellet for technical assistance with the flow cytometry analysis. This work was supported in part by TSRI Grant 44, FICU Grant 98/PAS/13, and by CNTC Grants. Nhi Nguyen is a recipient of a fellowship from Fondation Armand-Frappier.

REFERENCES

- Aten, J., Prigent, P., Poncet, P., Blanpied, C., Claessen, N., Druet, P., and Hirsch, F. (1995). Mercuric Chloride-Induced Programmed Cell Death of a Murine T Cell Hybridoma. I. Effect of the Proto-Oncogene Bcl-2. *Cell. Immunol.* **161**, 98-106.
- Benquet, C., and E. Kouassi. (1998). Lipid A-induced oxidative stress requires protein tyrosine kinases and protein kinase C activation, but not intracellular calcium mobilization in human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **41**, 207-210.
- Böhmer, R. M. (1985). Flow cytometric detection of a two-step cell death induced by hyperthermia. *Cytometry* **6**, 215-218.
- Christensen, M. M., Ellermann-Eriksen, S., Rungby, J., and Mogensen, S. C. (1993). Comparison of the interaction of methyl mercury and mercuric chloride with murine macrophages. *Arch. Toxicol.* **67**, 205-211.
- Clarkson, T. W. (1997). The toxicology of mercury. *Crit Rev Clin Lab Sci* **34**, 369-403.
- Close, A. H., Guo, T. L., and Shenker, B. J. (1999). Activated human T lymphocytes exhibit reduced susceptibility to methylmercury chloride-induced apoptosis. *Toxicol. Sci.* **49**, 68-77.
- Contrino, J., Marucha, P., Ribaldo, R., Ference, R., Bigazzi, P. E., and Kreutzer, D. L. (1988). Effects of mercury on human polymorphonuclear leukocyte function in vitro. *Am. J. Pathol.* **132**, 110-118.
- Cossarizza A., Baccarani-Contri, M., Kalashnikova, G., and Franceschi, C. (1993). A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide (JC-1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 40-45.
- Dyson, J. E. D., Simmons, D. M., Daniel, J., McLaughlin, J. M., Quirke, P., and Bird, C. C.

- (1986). Kinetic and physical studies of cell death induced by chemotherapeutic agents or hyperthermia. *Cell Tissue Kinet.* **19**, 311-324.
- Enger, M. D., Hilderbrand, C. E., and Stewart, C. C. (1983). Cd²⁺ responses of cultured human blood cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **69**, 214-224.
- Formigli, L., Papucci L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandi, G. E., Capaccioli, S., and Zecchi Orlandini, S. (2000). Aponecrosis : morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J. Cell. Physiol.* **182**, 41-49.
- Girard, D., Boiani, N., and Beaulieu, A. D. (1998). Human neutrophils express the interleukin-15 receptor alpha chain (IL-15Ralpha) but not the IL-9Ralpha component. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **88**, 232-240.
- Goulet A. C., Goldmacher, V. S., Lambert, J. M., Baron, C., Roy, D. C., and Kouassi, E. (1997). Conjugation of blocked ricin to an anti-CD19 monoclonal antibody increases antibody-induced cell calcium mobilization and CD19 internalization. *Blood*, **90**, 2364-2375.
- Green, D. R., and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1316.
- Guo, T. L., Miller M. A., Shapiro, I. M., and Shenker, B. J. (1998). Mercuric chloride induces apoptosis in human T lymphocytes : evidence of mitochondrial dysfunction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **153**, 250-257.
- Hébert, M. J., Takano, T., Holthofer, H., and Brady, H. R. (1996). Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxigenase-derived eicosanoids. *J. Immunol.* **157**, 3105-3115.
- Homburg, C. H., and Roos, D. (1996). Apoptosis of neutrophils. *Curr. Opin. Hematol.* **3**, 94-99.
- Ilback, N. G. (1991). Effects of methyl mercury exposure on spleen and blood natural killer

- (NK) cell activity in the mouse. *Toxicology* . **67**, 117-124.
- InSug, O., Datar, S., Koch, C. J., Shapiro, I. M., and Shenker, B. J. (1997). Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane permeability transition and loss of reductive reserve. *Toxicology* .**124**, 211-224.
- Kroemer, G., Dallaporta, B., and Resche-Rigon, M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 619-642.
- Louagie, H., Cornelissen, M., Philippe, J., Vral, A., Thierens, H., and De Ridder, L. (1998). Flow cytometric scoring of apoptosis compared to electron microscopy in gamma irradiated lymphocytes. *Cell. Biol. Int.* **22**, 277-283.
- Lundqvist-Gustafsson, H., and Bengtsson, T. (1999). Activation of the granule pool of the NADPH oxidase accelerates apoptosis in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 196-204.
- Malamud, D., Dietrich, S. A., and Shapiro, I. M. (1985). Low levels of mercury inhibit the respiratory burst in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**, 1145-1151.
- McConkey, D. J. (1998). Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 775-783.
- Moszczynski, P. (1997). Mercury compounds and the immune system: a review. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* **10**, 247-258.
- Obel, N., Hansen, B., Christensen, M. M., Nielsen, S. L., and Rungby, J. (1993). Methyl mercury, mercuric chloride, and silver lactate decrease superoxide anion formation and chemotaxis in human polymorphonuclear leucocytes. *Hum. Exp. Toxicol.* **12**, 361-364.
- Prigent, P., Poncet, P., Aten, J., Blanpied, C., Chand, A., Février, M., Druet, P., and Hirsch, F. (1995). Mercuric Chloride-Induced Programmed Cell Death of a Murine T Cell Hybridoma. II. Opposite effect of interleukin-2 and interleukin-4. *Cell. Immunol.* **161**, 107-

111.

- Raffray, M., and Cohen, G. M. (1997). Apoptosis and necrosis in toxicology : a continuum or distinct modes of cell death ? *Pharmacol. Ther.* **75**, 153-177.
- Savill, J., Dransfield, I., Hogg, N., and Haslett, C. (1990). Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* **343**, 170-173.
- Shenker, B. J., Berthold, P., Decker, S., Mayro, J., Rooney, C., Vitale, L., and Shapiro, I. M. (1992a). Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. II. Alterations in cell viability. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **14**, 555-577.
- Shenker, B. J., Berthold, P., Rooney, C., Vitale, L., DeBolt, K., and Shapiro, I. M. (1993). Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. III. Alterations in B-cell function and viability. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **15**, 87-113.
- Shenker, B. J., Datar, S. , Mansfield, K., and Shapiro, I. M. (1997). Induction of apoptosis in human T-cells by organomercuric compounds: a flow cytometric analysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **143**, 397-406.
- Shenker, B. J., Guo, T. L., and Shapiro, I. M. (1998). Low-level methylmercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: evidence of mitochondrial dysfunction. *Environ. Res.* **77**, 149-159.
- Shenker, B. J., Rooney, C., Vitale, L., and Shapiro, I. M. (1992b). Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. I. Suppression of T-cell activation. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **14**, 539-553.
- Squier, M. K. T., Sehnert, A. J., and Cohen, J. J. (1995). Apoptosis in leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* **57**, 2-10.
- Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A., and Sendo, F. (1996). Rapid killing of

human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 229-240.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J. Immunol. Methods.* **184**, 39-51.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Representative sequence of PMN death under MeHgCl treatment. PMN (1×10^6 cells/ml) were incubated with buffer (Control; left panel), with 10^{-4} M MeHgCl (middle panel), or heated at 56°C (right panel) for the indicated periods of time. Cells were then stained with HT and PI. PMN from cluster A (normal PMN), B (apoptotic PMN), C (secondary necrotic cells), and D (primary necrotic PMN) were identified by flow cytometry. Numbers indicate the percentage of positive cells in the corresponding cluster. The results are representative of 17, 15, and 6 different experiments for control, MeHgCl-, and heat-treated cells, respectively.

Figure 2. Dose-response of MeHgCl-induced cytotoxicity. PMN were exposed to increasing concentrations of MeHgCl (10^{-5} - 10^{-3} M) for the indicated periods of time, and control cells were let untreated. The percentage of apoptotic cells (A) and primary necrotic cells (B) was determined by FACS analysis after staining the cells with HT and PI. Results represent the mean \pm SE of at least three experiments.

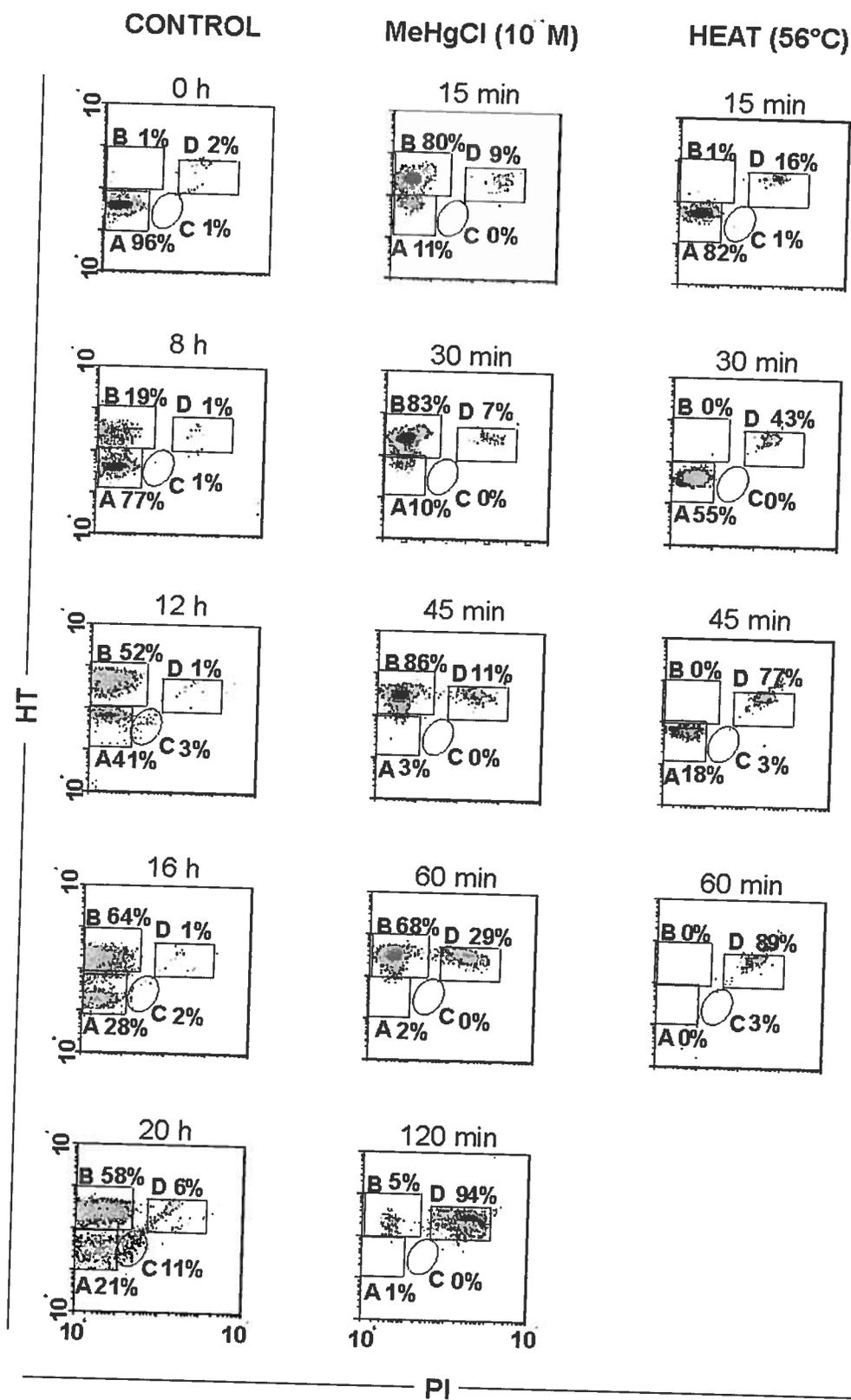
Figure 3. Representative time course of phosphatidylserine externalization detected by annexin V binding. PMN were treated as under Fig. 1, stained with annexin V-FITC and PI, and analyzed by flow cytometry. Indicated are the percentages of cells that were annexin V-negative and PI-negative (lower left quadrant corresponding to viable cells), annexin V-positive/PI-negative (lower right quadrant representing apoptotic cells), annexin V-positive/PI-positive (upper right quadrant, necrotic cells), and annexin V-negative/PI-positive (upper left quadrant). The results are representative of at least 3 experiments.

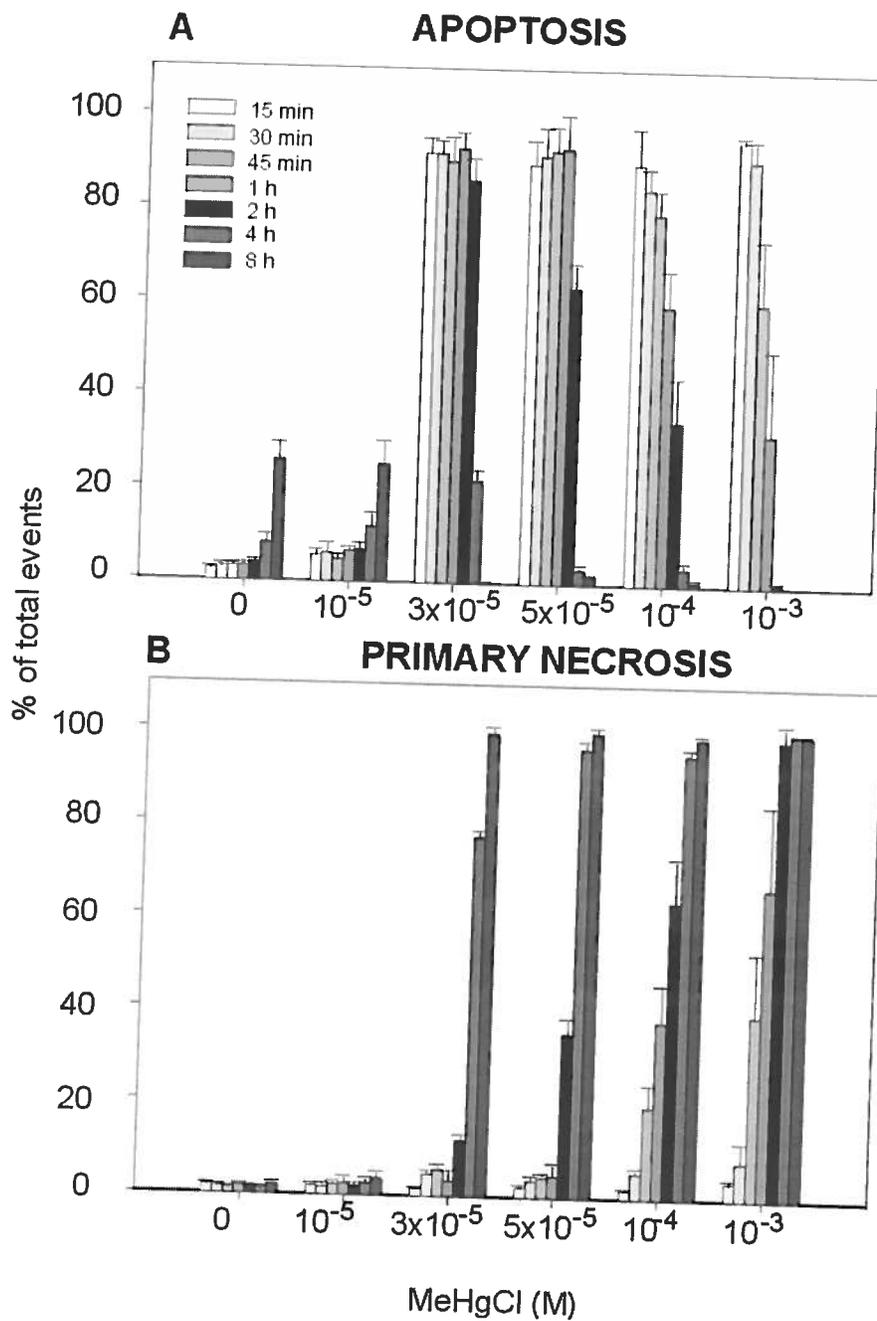
Figure 4. PMN morphology assessed by cytology following MeHgCl and PMA treatment. The cells were stained with Wright-Giemsa and then examined by light microscopy. Control cells (panel A) show normal morphology with polysegmented nucleus (arrows). After 20 h, PMN undergo spontaneous apoptosis (panel B) that is characterized by a condensation of chromatin and coalescence of the nuclear lobes (filled arrowheads). When treated with MeHgCl at 10^{-4} M for 15 min (panel C), a classical morphology of apoptotic cells was induced. Cells treated for 15 min with PMA (25 ng/ml) exhibited numerous megavacuoles throughout the cytoplasm (panel D, open arrowheads), without any morphologic features of classical apoptosis.

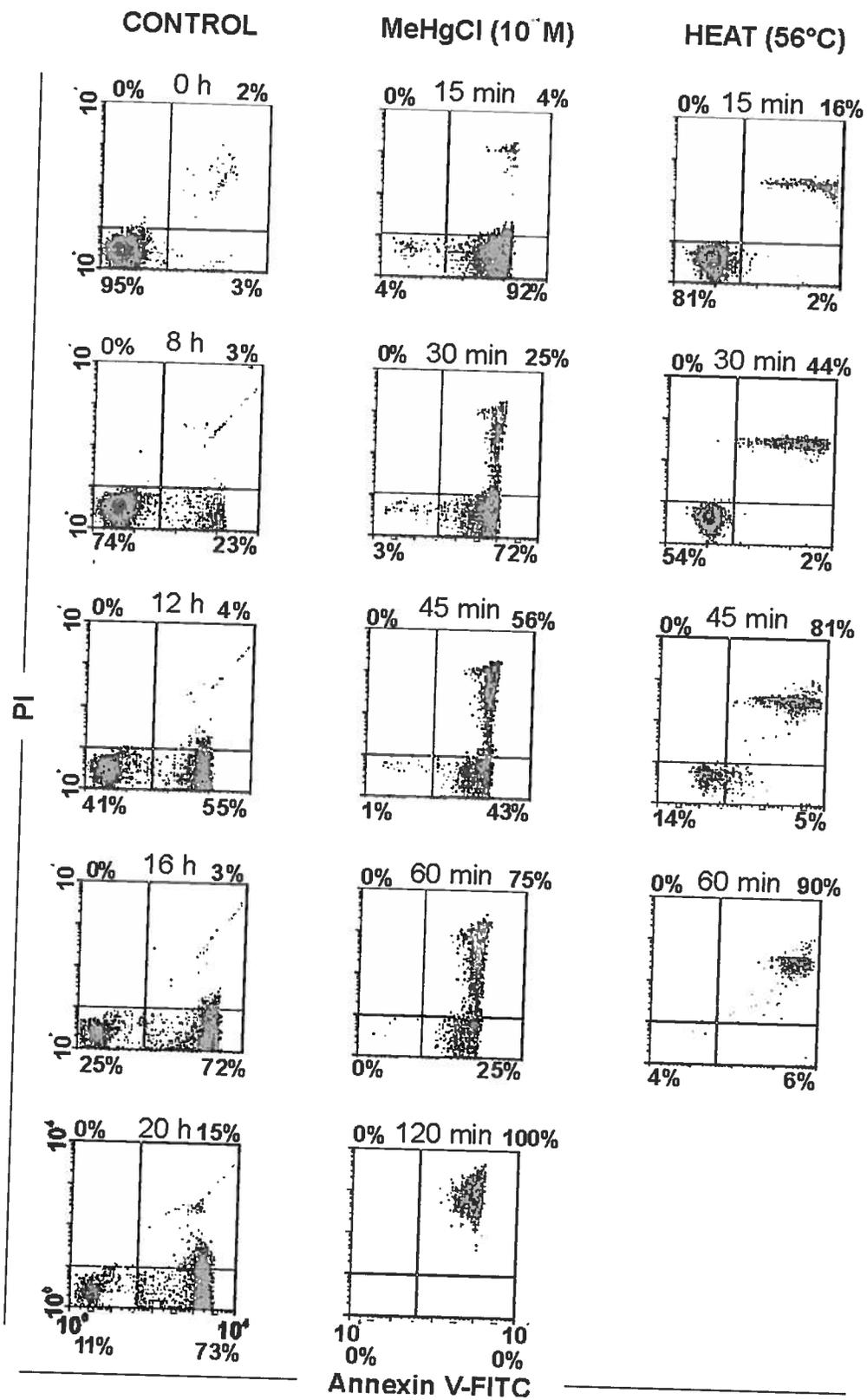
Figure 5. Progression of PMN death following exposure to PMA. PMN were treated for different periods of time with PMA (25 ng/ml), MeHgCl (10^{-4} M), or buffer (control), stained with HT and PI, and analyzed by flow cytometry to monitor induction of apoptosis and primary/secondary necrosis. The percentage of secondary necrosis during this time period was negligible (less than 5%) in all samples.

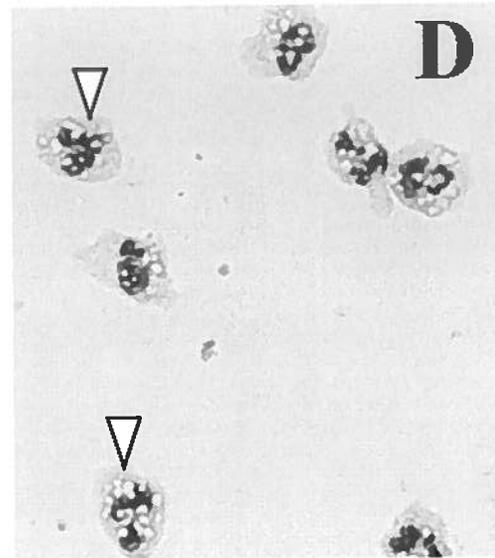
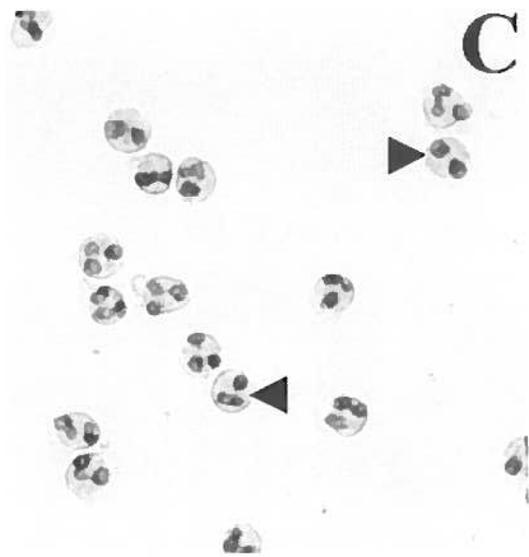
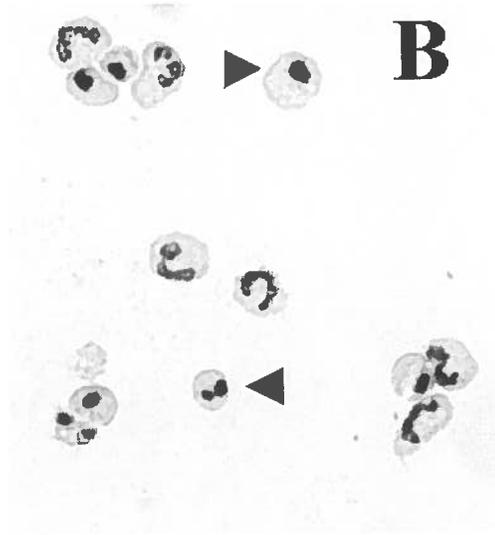
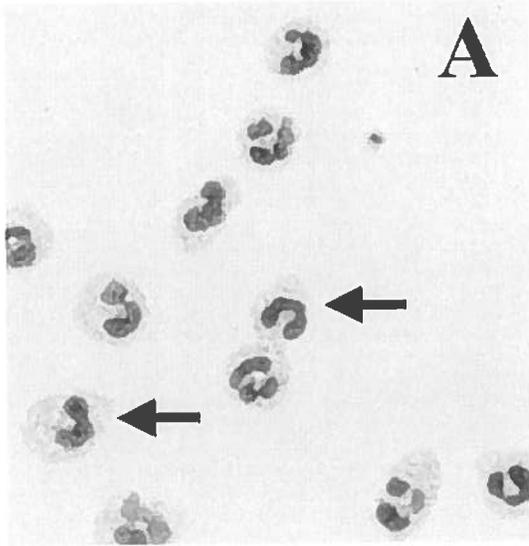
Figure 6. Representative histograms of the orange fluorescence of PMN stained with JC-1. PMN were treated for 15 min with buffer (control), MeHgCl (10^{-4} M), or valinomycin (10^{-7} M), as indicated, and stained with JC-1. Abscissa indicate FL2 orange fluorescence intensity (log scale), and ordinate the relative cell number. JC-1 incorporates into mitochondria, where it either forms monomers (FL1 green fluorescence emitting at 530 nm) or, at high membrane potential, aggregates (FL2 orange fluorescence, 575 nm). A reduction in FL2 indicates a drop in mitochondrial membrane potential, as seen here with MeHgCl or valinomycin-treated cells.

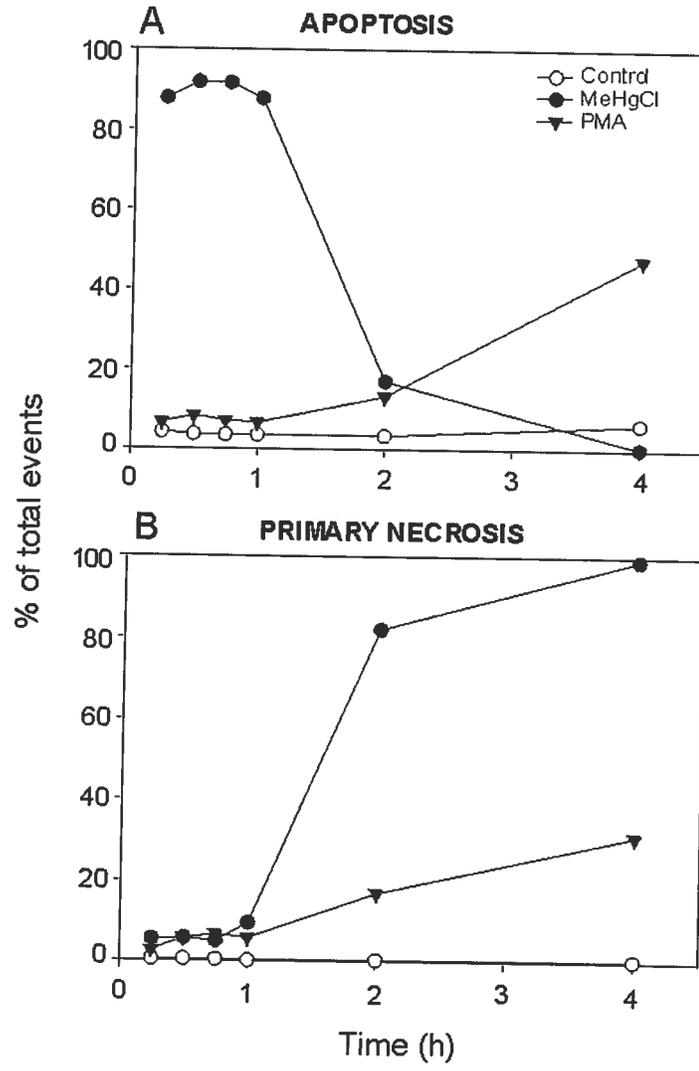
Figure 7. Assessment of the role of calcium fluxes in MeHgCl-induced cytotoxicity. (A) PMN were loaded with Fluo-3 AM and MeHgCl was added at 125 sec as indicated by the arrows to yield final concentrations of 10^{-6} - 10^{-3} M. Fluorescence was measured continuously by flow cytometry from 0 to 512 sec, and data are expressed as dot plots of fluorescence versus time. (B) PMN were preloaded with BAPTA AM (20 μ M) and pretreated with EGTA (2 mM) as indicated, and then treated with MeHgCl (10^{-4} M), and the calcium response was recorded as in (A). Abscissa indicate time of record, ordinate the mean fluorescence intensity. When present, EGTA was added at 60 sec, and MeHgCl at 125 sec of the recording period. Control cells without calcium chelators and without MeHgCl indicate the basal intracellular calcium level. (C, D, and E) Influence of calcium chelators on progression of PMN death. Cells were pretreated, or not, with combination of BAPTA AM (20 μ M) and EGTA (2 mM), and then treated with MeHgCl. The percentages of viable (C), apoptotic (D), and primary necrotic (E) cells were determined as a function of time of MeHgCl treatment by flow cytometry using the HT/PI assay.

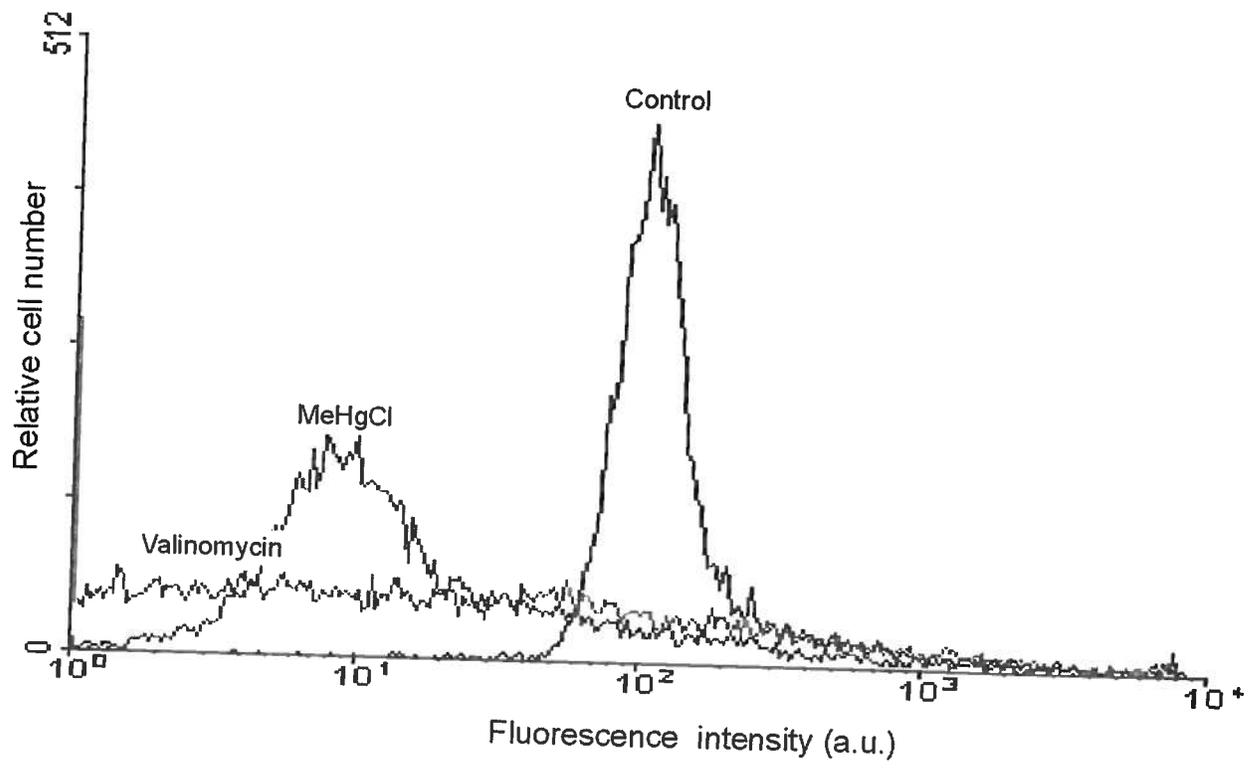


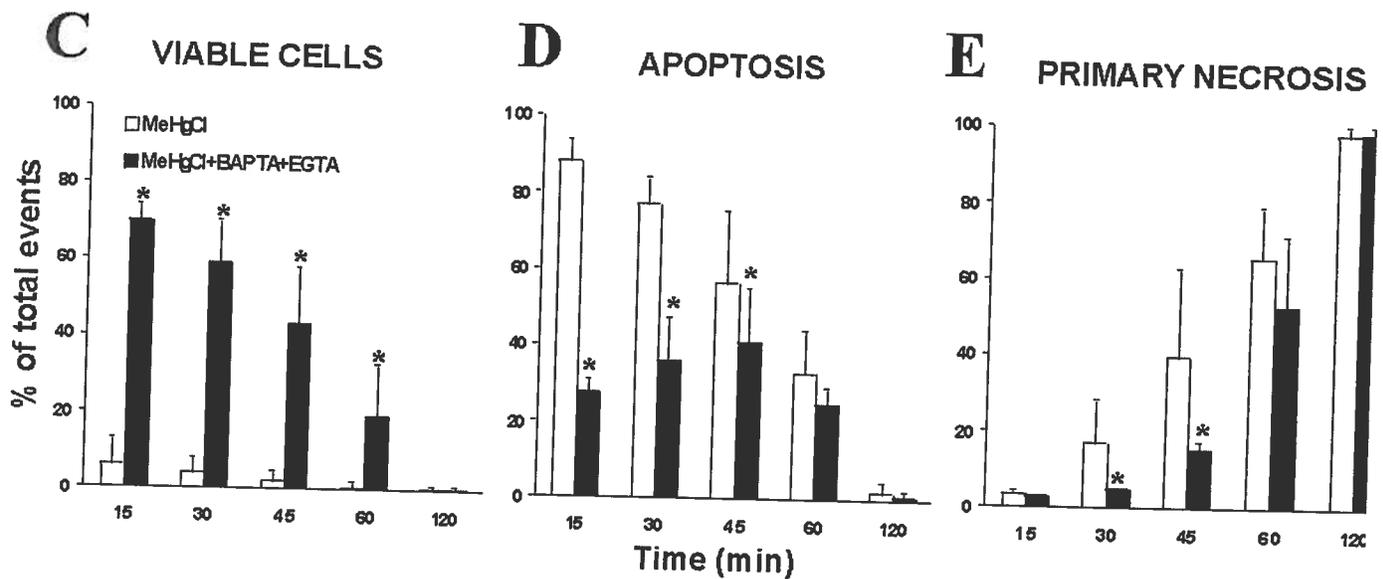
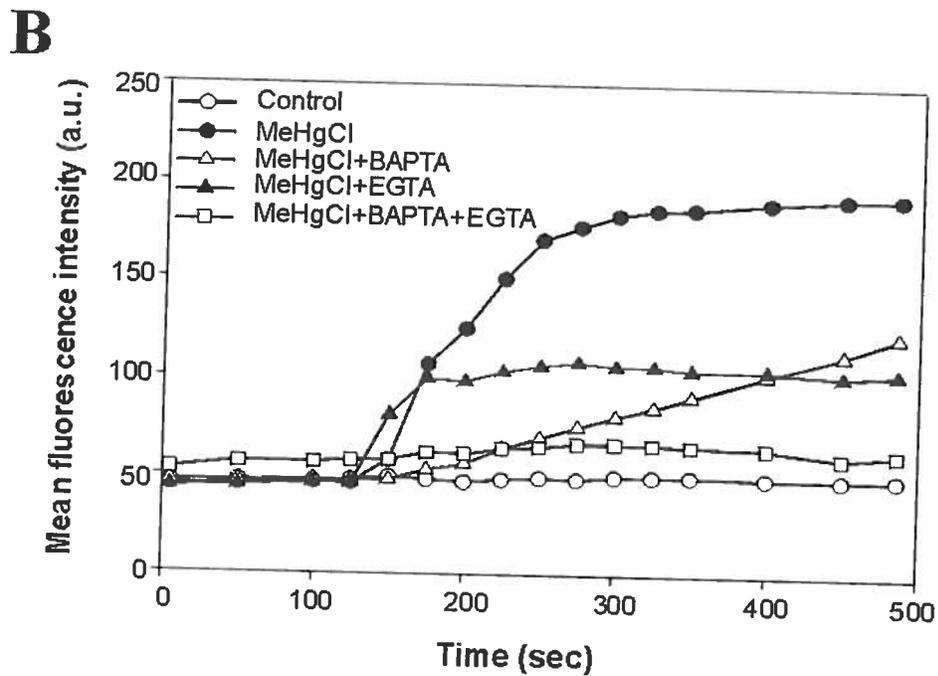
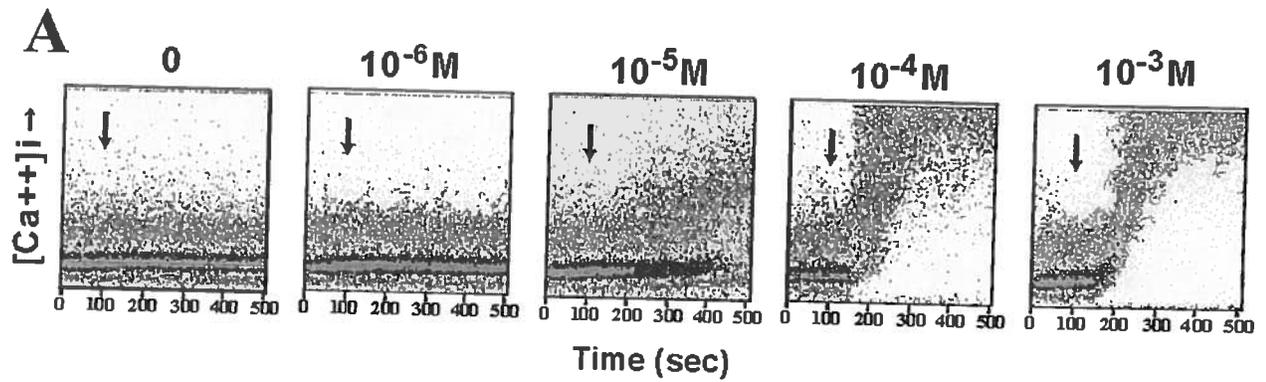












Discussion et Conclusion

Le mercure est un contaminant de l'environnement qui, à faibles concentrations, peut affecter le système immunitaire en altérant les fonctions des lymphocytes, notamment la prolifération cellulaire, la synthèse des immunoglobulines et la production de cytokines. En effet, les formes organiques et inorganiques du mercure réduisent la capacité des lymphocytes T humains à se diviser, à synthétiser et à sécréter l'IL-2 (Shenker et al., 1992b). Par contre, d'autres études toxicologiques montrent un effet contraire sur les fonctions lymphocytaires. Des études, *in vitro*, chez les lymphocytes humains (Berger et Skinner, 1974; Caron, Poutala et Provost, 1970) et murins (Reardon et Lucas, 1987) ont montré que le mercure (Hg^{2+}) et le zinc (Zn^{2+}) activaient la division des cellules. Une prolifération cellulaire induite par le mercure inorganique a été aussi observée suite à la liaison du mercure au groupement SH de la $p56^{lck}$, qui est une protéine tyrosine kinase associée aux récepteurs thy-1, CD3 et CD4 des lymphocytes T. Cette liaison du mercure amène une transduction de signaux qui prolongent la prolifération des lymphocytes (Nakashima et al., 1994). Le mercure affecte aussi les fonctions des PMN en supprimant l'adhérence, la polarisation et l'érythrophagocytose (Contrino et al., 1988).

À des concentrations élevées, le mercure est cytotoxique et il induit l'apoptose sur les lymphocytes et les monocytes humains (Shenker et al., 1992b; Shenker, Guo et Shapiro, 1998). Shenker et al., (1997) ont observé une induction d'apoptose dans les lymphocytes T humains traités avec du MeHg pendant 24 h dans une échelle de doses très restreintes (0.6 à 1 μM). De plus, en présence de mitogènes, tel que la concanavaline A, le mercure perdait sa capacité à induire l'apoptose (Shenker et al., 1997). L'apoptose est un processus naturel et nécessaire pour le maintien de l'homéostasie du système immunitaire. Il permet d'éliminer les cellules endommagées sans causer d'inflammation. Les neutrophiles jouent un rôle de premier plan au site inflammatoire et ils pourraient être une cible importante des effets cytotoxiques du mercure. De plus, ces cellules sont idéales pour étudier la cytotoxicité du mercure puisqu'elles meurent spontanément par apoptose, *in vitro*, après plusieurs heures et qu'elles vont ensuite en nécrose secondaire. À notre connaissance, il n'existe actuellement aucune étude portant sur la viabilité des neutrophiles exposés au mercure. Nous avons donc entrepris cette étude pour mieux comprendre les effets du mercure sur la survie et la mort des neutrophiles, ainsi que les mécanismes impliqués dans ces effets.

LE MERCURE INDUIT UNE SÉQUENCE ATYPIQUE DE MORT CELLULAIRE DANS LES NEUTROPHILES HUMAINS

Nous avons montré, au cours de ce travail, que le MeHgCl pouvait induire un processus d'apoptose et de nécrose primaire chez les neutrophiles humains. Un des aspects les plus originaux de ce travail a été de déterminer la séquence de la mort des PMN suite à une exposition au mercure à fortes concentrations (3×10^{-5} M- 10^{-3} M). Cette séquence se traduit par une induction rapide de l'apoptose en moins de 15 minutes, suivie de la nécrose primaire au bout de 1-2 h. Par comparaison, il est à noter que dans les conditions de notre étude les neutrophiles humains incubés *in vitro* en l'absence de mercure meurent spontanément par apoptose à partir de 8 h seulement, et ensuite par nécrose secondaire après 24-48 h.

La séquence atypique de mort cellulaire est révélée de façon concordante par trois approches méthodologiques différentes: (i) le marquage à l'annexine V et au PI par cytométrie en flux, (ii) le marquage avec Hoescht 33342 et PI par cytométrie en flux et (iii) l'analyse de la morphologie des cellules par microscopie optique. Plusieurs travaux ont utilisé le marquage à l'annexine V pour détecter l'apoptose et la nécrose, mais ce marquage possède des limites puisqu'il ne permet pas de faire convenablement la distinction entre les nécroses primaire et secondaire (Louagie et al., 1998). Quelques chercheurs dont Hébert et al. (1996) ont réussi à distinguer toutes les phases de mort cellulaire par le double marquage avec Hoescht 33342 et PI. En utilisant cette combinaison Hoescht 33342/PI, nous avons pu déterminer la séquence atypique de mort cellulaire que le mercure induit sur les neutrophiles humains, c'est-à-dire une apoptose rapide, en moins de 15 minutes à 3×10^{-5} – 10^{-3} M MeHgCl, suivie d'une progression des neutrophiles vers la nécrose primaire après 1-2 h d'incubation aux mêmes concentrations. L'importance de cette séquence atypique dans les conditions *in vivo* est encore inconnue. Compte tenu des concentrations élevées de mercure qui sont nécessaires pour induire les effets cytotoxiques *in vitro*, sur les PMN, il est peu probable que ces cellules représentent une cible importante pour le mercure *in vivo*. On ignore si le mercure induit la même séquence de mort dans d'autres types cellulaires que les PMN. Scheldle et al., (1998) ont montré que le mercure inorganique (Hg^{2+}) à une concentration de

0,33 mM ($3,3 \times 10^{-4}$ M) cause directement la nécrose dans les lignées cellulaires cancéreuses HMC-1. De plus, la nécrose se retrouve dans les tubules rénaux chez les souris exposés à des concentrations égales ou supérieures à 10^{-4} M HgCl_2/kg (Nielsen et al., 1994). Cependant, dans tous ces travaux, les auteurs n'ont pas distingué la nécrose primaire de la nécrose secondaire et on ignore si la mort par nécrose est précédée de l'apoptose. De la même façon, les travaux antérieurs décrivant l'apoptose induite par le mercure n'ont pas évalué la progression des cellules vers la nécrose primaire ou secondaire (Shenker et al., 1997).

À notre connaissance, il n'existe aucun stimulus induisant la même séquence de mort cellulaire que le mercure. Cependant, plusieurs pathologies impliquant la nécrose primaire semblent maintenant démontrer la présence de l'apoptose : l'apoplexie (Martinou et al., 1994), l'infarctus du myocarde (Itoh et al., 1995) et l'ischémie/reperfusion (Sasaki et al., 1996). Dans ces pathologies, l'importance relative des phénomènes d'apoptose et de nécrose primaire semble dépendre de l'intensité des dommages tissulaires, et de la localisation des cellules affectées. On peut aussi formuler l'hypothèse que l'apoptose précède la nécrose primaire dans ces conditions pathologiques, mais des études ultérieures devront investiguer cette possibilité. Takei et al., (1996) ont décrit une mort cellulaire atypique des PMN humains en présence de PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate), un ester de phorbol, et cela sur la base des changements morphologiques. En effet, les neutrophiles traités au PMA montrent une chromatine moins compacte, des fragments d'ADN plus petits (< 300 Kbp) et des organelles (mitochondries et granules) dégénérés, ce qui est différent de l'apoptose et de la nécrose classiques. Nos résultats démontrent que le PMA n'induit pas la même séquence de mort cellulaire que le mercure dans les PMN. D'autres métaux lourds tels que le cadmium (Achanzar et al., 2000) et le plomb (Oberto et al., 1996) qui sont connus pour leur capacité d'induire l'apoptose dans certains types cellulaires, n'induisent pas la même séquence de mort cellulaire que le mercure dans les PMN (résultats montrés en Annexe).

La séquence de mort cellulaire des neutrophiles montre que l'effet du mercure se distingue de ceux provoqués par divers autres stimuli dans divers types cellulaires. Par exemple, les thymocytes traités avec des glucocorticoïdes vont en apoptose, puis en nécrose secondaire, ce qui est similaire à la mort des neutrophiles non traités ou apoptose spontanée (Kroemer, Dallaporta et Resche-Rigon, 1998). En présence de l'inhibiteur de caspases N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluorométhylketone (Z-VAD fmk), les cellules meurent par

nécrose primaire sans passer par l'apoptose (Hirsch et al., 1997). Cho et al., (1999) constatent que le rose bengal, un agent photosensibilisant, induit en 15 minutes l'apoptose sur les cellules BCEN provenant de la cornée bovine, mais il y a présence aussi de cellules en nécrose secondaire. La roboflavine, un autre agent photosensibilisant, a aussi été testé et elle démontre une induction d'apoptose après 30 minutes d'exposition suivie de la nécrose secondaire après 2h. Récemment, un nouveau terme a été introduit par Formigli et al., (2000) : aponécrose. Ce type de mort cellulaire implique à la fois des changements morphologiques et moléculaires de l'apoptose et de la nécrose qui apparaissent simultanément dans une même cellule. L'aponécrose est observée après avoir exposé des lignées cellulaires de fibroblastes de rat à 300-400 μM d'Actimycine A, un poison métabolique qui affecte la chaîne respiratoire mitochondriale.

Outre l'apoptose, la nécrose primaire et la nécrose secondaire, Raffray et Cohen (1997) ont proposé trois autres formes de mort cellulaire induites par des agents toxiques et physiques. La première forme est l'apoptose et la nécrose concomitantes, c'est-à-dire que l'apoptose et la nécrose apparaissent simultanément dans une même cellule exposée à une lésion. Cette forme est présente lors d'une ischémie-hypoxie dans les tumeurs. La deuxième forme de mort cellulaire est l'apoptose et la nécrose séquentielles où l'apoptose précède la nécrose, ou *vice versa*. Elle peut être causée par une perturbation de l'interaction cellule-cellule dans des cellules interdépendantes. La dernière forme est la nécrose qui survient par-dessus l'apoptose. Dans cette dernière forme de mort cellulaire, l'apoptose est d'abord initiée dans des cellules individuelles, mais elle est rapidement surpassée par l'effondrement de l'intégrité cellulaire.

LE MERCURE INDUIT UNE CHUTE DU POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL

L'apoptose est un processus actif nécessitant de l'énergie, ce qui nous amène à nous pencher sur les altérations de la morphologie des mitochondries. Le potentiel membranaire mitochondrial est un reflet de la fonction des mitochondries. Il résulte de la distribution asymétrique des ions à travers la membrane interne des mitochondries (InSug et al., 1997). Nous avons utilisé le JC-1, qui est un marqueur fluorescent pour analyser le potentiel membranaire mitochondrial. Il est spécifique pour une mesure au niveau mitochondrial,

contrairement à la rhodamine 123 et au DiOC6 qui peuvent mesurer le potentiel de la membrane cellulaire ou plasmique (Zheng et al., 1999). Notre étude montre que le mercure à 10^{-4} M induit une dépolarisation du potentiel membranaire mitochondrial des neutrophiles humains, c'est-à-dire une chute du potentiel. Des résultats similaires ont été observés par Shenker, Guo et Shapiro, (1998) montrant que le MeHgCl perturbait la fonction mitochondriale des lymphocytes T humains. Par contre, cette équipe a utilisé le marqueur DiOC6 pour mesurer la chute du potentiel membranaire mitochondrial. D'autres études ont montré une chute du potentiel membranaire mitochondriale sur les neurones de rats exposés durant 4-6 h à 1 μ M MeHg (Castoldi et al., 2000). Cossarizza et al. (1994) montrent que dans le modèle de thymocytes de rat traités au dexaméthasone, reconnu pour induire l'apoptose, il y a un changement significatif dans le potentiel membranaire et dans la masse mitochondriale après 6-8 h de culture. Ils montrent aussi que la fragmentation d'ADN, détectée sur gel d'agarose, précède la perte d'ADN (détecté par cytométrie en flux par la présence de pic hypodiploïde) et la perméabilité de la membrane plasmique (par PI). Il semble alors que la diminution du potentiel membranaire et de la masse mitochondriale ne seraient pas le premier événement détecté durant l'apoptose des thymocytes. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que les cellules apoptotiques ont besoin de l'intégrité de la fonction des organelles pour commencer et/ou pour continuer la mort cellulaire (Cossarizza et al., 1994). Certains chercheurs pensent que l'apoptose induit la chute du potentiel membranaire mitochondrial et qui entraîne ensuite la libération du cytochrome c dans le cytosol (Scarlett et Murphy, 1997; Yang et Cortopassi, 1998), alors que d'autres ont des opinions contraires, c'est-à-dire que l'apoptose est reliée à la libération du cytochrome c, mais il se ferait indépendamment du changement du potentiel membranaire mitochondrial (Bossy-Wetzel, Newmeyer et Green, 1998). Les neutrophiles possèdent très peu de mitochondrie et ne relâchent pratiquement pas de cytochrome c. Une diminution du potentiel membranaire mitochondrial ne mène pas toujours à la relâche de cytochrome c. Des travaux ultérieurs pourront évaluer si la chute de potentiel membranaire mitochondrial induite par MeHgCl dans les PMN s'accompagne de relargage de cytochrome c, et si ce dernier joue un rôle dans les effets cytotoxiques observés.

MOBILISATION DU CALCIUM INTRACELLULAIRE DANS LES NEUTROPHILES HUMAINS TRAITÉS AU MERCURE

Le calcium joue un rôle dans la réponse des neutrophiles, soit durant les changements morphologiques, ou durant l'adhérence (Pettit et Hallett, 1998). De plus, le calcium est souvent impliqué dans l'apoptose où il joue divers rôles : (i) en activant des endonucléases, phospholipases, protéases, protéines kinases et phosphatases, (ii) en activant des gènes (GADD, ced-4), et (iii) en induisant des changements dans la structure de la chromatine (McConkey, 1996). Dans notre étude, nous avons utilisé la sonde Fluo-3 pour mesurer le calcium intracellulaire. Le Fluo-3 peut diffuser librement à l'intérieur des cellules, sous forme acetoxyméthyl ester (AM). Il est ensuite hydrolysé par des estérases cytoplasmiques non spécifiques et est emprisonné sous forme hydrophilique dans les cellules où il peut se lier au calcium mobilisé. L'augmentation du $(Ca^{2+})_i$ peut provenir des stocks intracellulaires (mitochondries, réticulum endoplasmique, noyau) et des influx transmembranaires (Berridge, 1993). Pettit et Hallett (1998) ont identifié 2 sites de stockage et de libération de Ca^{2+} dans les neutrophiles humains à l'aide de la chlortétracycline (CTC). Le premier site se situe au niveau périphérique, juste en dessous de la membrane plasmique et le second est dans l'espace juxtanucléaire.

Nos résultats montrent que le traitement des neutrophiles humains avec le mercure entraîne une mobilisation du calcium intracellulaire de façon dose-dépendante. Le changement du niveau de $(Ca^{2+})_i$ semble être relié au phénomène de l'apoptose. En effet, à 10^{-4} M – 10^{-3} M MeHgCl, la mobilisation du calcium cytosolique augmente drastiquement pour atteindre un plateau. Ces mêmes concentrations de MeHgCl induisent l'apoptose dans la majorité des neutrophiles en moins de 15 minutes. Oyama et al. (1994) rapportent que le MeHg à des concentrations supérieures à 3 μ M induit de façon dose-dépendante une augmentation du $(Ca^{2+})_i$ dans les neurones de rats. Le mercure est capable d'affecter l'homéostasie du $(Ca^{2+})_i$ dans les neurones cérébraux (Marty et Atchison, 1997). L'élévation du $(Ca^{2+})_i$ avec l'utilisation d'ionophores et/ou de thapsigargine peut induire l'apoptose dans les neutrophiles (Bratton et al, 1997).

Nos travaux montrent aussi que l'augmentation du niveau calcique dans les cellules peut être bloquée en ajoutant des chélateurs de calcium intracellulaire (BAPTA) et

extracellulaire (EGTA). Ces chélateurs diminuent de moitié la proportion de cellules qui vont en apoptose en présence de MeHgCl, et ils retardent légèrement l'apparition de la nécrose cellulaire sans affecter le pourcentage de cellules nécrotiques après 2 h d'incubation. Ces résultats suggèrent que la mobilisation du calcium intracellulaire joue un rôle partiel dans les effets cytotoxiques du MeHgCl, et principalement durant la phase de l'apoptose. Nos résultats sont compatibles avec ceux de Duke et al. (1994) qui montrent qu'une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire n'est pas suffisante pour induire l'apoptose dans tous les types cellulaires.

En conclusion, nous avons montré que le mercure, à des concentrations supérieures à 10^{-5} M, induit une séquence de mort cellulaire atypique incluant d'abord l'apoptose puis la nécrose primaire. De plus, l'apoptose rapide induite par le mercure est associée à des changements biochimiques typiques de l'apoptose classique : diminution du potentiel membranaire et augmentation du niveau de $[Ca^{2+}]_i$. Cependant, le blocage de l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ n'inhibe que partiellement l'induction de l'apoptose, suggérant l'implication de mécanismes moléculaires additionnels qui reste à être élucidé. Les résultats de notre travail démontrent clairement que les PMN représentent une cible potentielle pour des effets cytotoxiques du mercure. Cette recherche pourrait servir éventuellement à mieux comprendre certaines pathologies inflammatoires (apoplexie et ischémie /reperfusion) impliquant à la fois la mort cellulaire par apoptose et par nécrose primaire (Martinou et al., 1994; Sasaki et al., 1996).

Bibliographie

- ACHANZAR W.E., K. B. Achanzar, J. G. Lewis, M. M. Webber et M. P. Waalkes. «Cadmium induces c-myc, p53, and c-jun expression in normal human prostate epithelial cells as a prelude to apoptosis». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 164, no. 3, p. 291-300.
- AL-SHAHRISTANI H. et K. M. Shihab. 1974. «Variation of biological half-life of methylmercury in man». Archives of Environmental Health, vol. 28, no. 6, p. 342-344.
- AOSHIBA K., Y. Nakajima, S. Yasui, J. Tamaoki et A. Nagai. 1999. «Red blood cells inhibit apoptosis of human neutrophils». Blood, vol. 93, no. 11, p. 4006-4010.
- ASCHNER, M. 1986. «Changes in axonally transported proteins in the rat visual system following systemic methyl mercury exposure». Acta Pharmacologica et Toxicologica, vol. 59, no. 2, p. 151-157.
- ASCHNER M. et J. L. Aschner. 1990. «Mercury neurotoxicity: mechanisms of blood-brain barrier transport». Neuroscience and Behavioral Reviews, vol. 14, no. 2, p. 169-176.
- ASCHNER M., Y. L. Du, M. Gannon et H. K. Kimelberg. 1993. «Methylmercury-induced alterations in excitatory amino acid transport in rat primary astrocyte cultures». Brain Research, vol. 602, no. 2, p. 181-186.
- ATCHISON, W. D. 1988. «Effects of neurotoxicants on synaptic transmission: lessons learned from electrophysiological studies». Neurotoxicology and Teratology, vol. 10, no. 5, p. 393-416.
- BAATRUP E., M. G. Nielsen et G. Danscher. 1986. «Histochemical demonstration of two mercury pools in trout tissues: mercury in kidney and liver after mercuric chloride exposure». Ecotoxicology Environmental Safety, vol. 12, no. 3, p. 267-282.
- BAGINSKI, B. 1988. «Effect of mercuric chloride on microbicidal activities of human polymorphonuclear leukocytes». Toxicology, vol. 50, no. 3, p. 247-256.
- BAKIR F., S. F. Damluji, L. Amin-Zaki, M. Murtadha, A. Khalidi, N. Y. Al-Rawi, S. Tikriti, H. I. Dahahir, T. W. Clarkson, J. C. Smith et R. A. Doherty. 1973. «Methylmercury poisoning in Iraq». Science, vol. 181, no. 96, p. 230-241.
- BALLATORI N. 1991. «Mechanisms of metal transport across liver cell plasma membranes». Drug Metabolism Reviews, vol. 23, no. 1-2, p. 83-132.

- BEATRICE M.C., D. L. Stiers et D. R. Pfeiffer. 1984. «The role of glutathione in the retention of Ca²⁺ by liver mitochondria». Journal of Biological Chemistry, vol. 259, no. 2, p. 1279-1287.
- BERGER N. A. et A. M. Skinner. 1974. «Characterization of lymphocyte transformation induced by zinc ions». Journal of Cell Biology, vol. 61, no. 1, p. 45-55.
- BERRIDGE, M. J. 1993. «Inositol trisphosphate and calcium signalling». Nature, vol. 361, no. 6410, p. 315-325.
- BLAKLEY B. R., C. S. Sisodia et T. K. Mukkur. 1980. «The effect of methylmercury, tetraethyl lead, and sodium arsenite on the humoral immune response in mice». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 52, no. 2, p. 245-254.
- BOSSY-WETZEL E., D. D. Newmeyer et D. R. Green. 1998. «Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization». EMBO Journal, vol. 17, no. 1, p. 37-49.
- BRACH M. A., S. deVos, H. J. Gruss et F. Herrmann. 1992. «Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death». Blood, vol. 80, no. 11, p. 2920-2924.
- BRATTON D.L., V. A. Fadok, D. A. Richter, J. M. Kailey, L. A. Guthrie et P. M. Henson. 1997. «Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. Journal of Biological Chemistry, vol. 272, no. 42, p. 26159-26165.
- CARBONARI M., M. Cibati, M. Cherchi, D. Sbarigia, A. M. Pesce, L. Dell'Anna, A. Modica et M. Fiorilli. 1994. «Detection and characterization of apoptotic peripheral blood lymphocytes in human immunodeficiency virus infection and cancer chemotherapy by a novel flow immunocytometric method». Blood, vol. 83, no. 5, p. 1268-1277.
- CARON G. A., S. Poutala et T. T. Provost. 1970. «Lymphocyte transformation induced by inorganic and organic mercury». International Archives of Allergy and Applied Immunology, vol. 37, no. 1, p. 76-87.
- CASTOLDI A.F., S. Barni, I. Turin, C. Gandini et L. Manzo. 2000. «Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury». Journal of Neuroscience Research, vol. 59, no. 6, p. 775-787.
- CASTRANOVA V., L. Bowman, P. R. Miles et M. J. Reasor. 1980. «Toxicity of metal ions to alveolar macrophages». American Journal of Industrial Medicine, vol. 1, no. 3-4, p. 349-357.
- CASWELL A. H. et S. Warren. 1972. «Observation of calcium uptake by isolated sarcoplasmic reticulum employing a fluorescent chelate probe». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 46, no. 5, p. 1757-1763.

- CHANCE B., H. Sies et A. Boveris. 1979. «Hydroperoxide metabolism in mammalian organs». Physiological Reviews, vol. 59, p. 527-605.
- CHITNIS D., C. Dickerson, A. M. Munster et R. A. Winchurch. 1996. «Inhibition of apoptosis in polymorphonuclear neutrophils from burn patients». Journal of Leukocyte Biology, vol. 59, no. 6, p. 835-839.
- CHO K.S., E. H. Lee, J. S. Choi et C. K. Joo. 1999. «Reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis in bovine corneal endothelial cells». Investigative Ophthalmology and Visual Science, vol. 40, no. 5, p. 911-919.
- CHOI B.H., L. W. Lapham, L. Amin-Zaki et T. Saleem. 1978. «Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in utero». Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, vol. 37, no. 6, p. 719-733.
- CHRISTENSEN M., S. C. Mogensen et J. Rungby. 1988. «Toxicity and ultrastructural localization of mercuric chloride in cultured murine macrophages». Archives of Toxicology, vol. 62, no. 6, p. 440-446.
- CLARKSON T.W. 1972. «The biological properties and distribution of mercury». Biochemical Journal, vol. 130, no. 2, p. 61P-63P.
- CLOSE A.H., T. L. Guo et B. J. Shenker. 1999. «Activated human T lymphocytes exhibit reduced susceptibility to methylmercury chloride-induced apoptosis». Toxicological Sciences, vol. 49, no. 1, p. 68-77.
- COHEN J.J., R. C. Duke, V. A. Fadok et K. S. Sellins. 1992. «Apoptosis and programmed cell death in immunity». Annual Review of Immunology, vol. 10, p. 267-93.
- CONTRINO J., P. Marucha, R. Ribaldo, R. Ference, P. E. Bigazzi et D. L. Kreutzer. 1988. «Effects of mercury on human polymorphonuclear leukocyte function in vitro». American Journal of Pathology, vol. 132, no. 1, p. 110-118.
- CONTRINO J., L. L. Kosuda, P. Marucha, D. L. Kreutzer et P. E. Bigazzi. 1992. «The in vitro effects of mercury on peritoneal leukocytes (PMN and macrophages) from inbred brown Norway and Lewis rats». International Journal of Immunopharmacology, vol. 14, no. 6, p. 1051-1059.
- COSSARIZZA A., G. Kalashnikova, E. Grassilli, F. Chiappelli, S. Salvioli, M. Capri, D. Barbieri, L. Troiano, D. Monti et C. Franceschi. 1994. «Mitochondrial modifications during rat thymocyte apoptosis: a study at the single cell level». Experimental Cell Research, vol. 214, no. 1, p. 323-330.
- COSSARIZZA A., C. Franceschi, D. Monti, S. Salvioli, E. Bellesia, R. Rivabene, L. Biondo, G. Rainaldi, A. Tinari, W. Malorni. 1995. «Protective effect of N-acetylcysteine in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in U937 cells: the role of mitochondria». Experimental Cell Research, vol. 220, no. 1, p. 232-240.

- DANSCHER G. et H. D. Schroder. 1979. «Histochemical demonstration of mercury induced changes in rat neurons». Histochemistry, vol. 60, no. 1, p. 1-7.
- DANSCHER G. et B. Moller-Madsen. 1985. «Silver amplification of mercury sulfide and selenide: a histochemical method for light and electron microscopic localization of mercury in tissue». Journal of Histochemistry and Cytochemistry, vol. 33, no. 3, p. 219-228.
- DAUM J. R., D. M. Shepherd et R. J. Noelle. 1993. «Immunotoxicology of cadmium and mercury on B-lymphocytes--I. Effects on lymphocyte function». International Journal of Immunopharmacology, vol. 15, no. 3, p. 383-394.
- DESCOTES J. 1988. «Immunotoxicity of heavy metals». Chap. In Immunotoxicology of Drugs and Chemicals, p. 291-336. Amsterdam: Elsevier.
- DIETER M.P. 1982. «Methylmercury (II)-induced histone perturbations in nuclei isolated from calf thymus». Molecular Pharmacology, vol. 22, p. 121-126.
- DRUET P., E. Druet, F. Potdevin et C. Sapin. 1978. «Immune type glomerulonephritis induced by HgCl₂ in the Brown Norway rat». Annales D Immunologie (Paris), vol. 129 no. 6, p. 777-792.
- DUKE R.C., R. Z. Witter, P. B. Nash, J. D. Young et D. M. Ojcius. 1994. «Cytolysis mediated by ionophores and pore-forming agents: role of intracellular calcium in apoptosis». FASEB Journal, vol. 8, no. 2, p. 237-246.
- DUNICAN A. L., S. J. Leuenroth, A. Ayala et H. H. Simms. 2000. «CXC chemokine suppression of polymorphonuclear leukocytes apoptosis and preservation of function is oxidative stress independent». Shock, vol. 13, no. 3, p. 244-250.
- FADOK V.A., J. S. Savill, C. Haslett, D. L. Bratton, D. E. Doherty, P. A. Campbell et P. M. Henson. 1992. «Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells». Journal of Immunology, vol. 149, no. 12, p. 4029-4035.
- FELMANN G. 1995. «Apoptosis or programmed cell death». Annales de Pathologie, vo. 15, no. 2, p. 92-109.
- FORMIGLI L., L. Papucci, A. Tani, N. Schiavone, A. Tempestini, G. E. Orlandini, S. Capaccioli et S. Z. Orlandini. 2000. «Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis». Journal of Cellular Physiology, vol. 182, no. 1, p. 41-49.
- FORTENBERRY J.D., M. L. Owens et L. A. Brown. 1999. «S-nitrosoglutathione enhances neutrophil DNA fragmentation and cell death». American Journal of Physiology, vol. 276, no. 3, p. L435-442.

- FOWLER B.A., H. W. Brown, G. W. Lucier et M. E. Beard. 1974. «Mercury uptake by renal lysosomes of rats ingesting methyl mercury hydroxide. Ultrastructural observations and energy dispersive x-ray analysis». Archives of Pathology, vol. 98, no. 5, p. 297-301.
- FRIBERG L., E. Skog et J. E. Wahlberg. 1961. «Resorption of mercuric chloride and methylmercury dicyandiamide in guinea-pigs through normal skin and through skin pre-treated with acetone, alkylaryl-sulphonate and soap». Acta Dermatovener, vol. 41, p. 40-52.
- FRIBERG L., G. F. Nordberg et V. B. Vouk. 1979. Handbook on the toxicology of metals. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, p. 503-530.
- FRYKHLUM K.O. 1970. «Exposure of dental personnel to mercury during work. A comparative study using advanced analytical methods». Svensk Tandlakartidskrift, vol. 63, no. 11, p. 763-772.
- FUYUTA M., T. Fujimoto et S. Hirata. 1978. «Embryotoxic effects of methylmercuric chloride administered to mice and rats during orangogenesis». Teratology, vol. 18, no. 3, p. 353-366.
- GARVY B.A., W. G. Telford, L. E. King et P. J. Fraker. 1993. «Glucocorticoids and irradiation-induced apoptosis in normal murine bone marrow B-lineage lymphocytes as determined by flow cytometry». Immunology, vol. 79, no. 2, p. 270-277.
- GILES K.M., S. P. Hart, C. Haslett, A. G. Rossi et I. Dransfield. 2000. «An appetite for apoptotic cells? Controversies and challenges». British Journal of Haematology, vol. 109, no. 1, p. 1-12.
- GREENWOOD M.R., T. W. Clarkson, R. A. Doherty, A. H. Gates, L. Amin-Zaki, S. Elhassani et M. A. Majeed. 1978. «Blood clearance half-times in lactating and nonlactating members of a population exposed to methylmercury». Environmental Research, vol. 16, no. 1-3, p. 48-54.
- GRITZKA T.L. et B. F. Trump. 1968. «Renal tubular lesions caused by mercuric chloride. Electron microscopic observations: degeneration of the pars recta». American Journal of Pathology, vol. 52, no. 6, p. 1225-1277.
- GRUENWEDEL D.W. et M. K. Cruikshank. 1979. «Effect of methylmercury (II) on the synthesis of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and protein in HeLa S3 cells». Biochemical Pharmacology, vol. 28, no. 5, p. 651-655.
- HARADA M. 1995. «Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution». Critical Reviews in Toxicology, vol. 25, no. 1, p. 1-24.
- HARRINGTON J. M. 1974. «Risk of mercurial poisoning in laboratories using volumetric gas analysis». Lancet, vol. 1, no. 7847, p. 86-87.
- HEBERT M.J., T. Takano, H. Holthofer et H. R. Brady. 1996. «Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxigenase-derived eicosanoids». Journal of Immunology, vol. 157, no. 7, p. 3105-3115.

- HILBERTZ U., U. Kramer, N. De Ruiter et B. Baginski. 1986. «Effects of cadmium and lead on oxidative metabolism and phagocytosis by mouse peritoneal macrophages». Toxicology, vol. 39, no. 1, p. 47-57.
- HIROKAWA K. et Y. Hayashi. 1980. «Acute methyl mercury intoxication in mice--effect on the immune system». Acta Pathologica Japonica, vol. 30, no. 1, p. 23-32.
- HIRSCH T., P. Marchetti, S. A. Susin, B. Dallaporta, N. Zamzami, I. Marzo, M. Geuskens et G. Kroemer. 1997. «The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death». Oncogene, vol. 15, no. 13, p. 1573-1581.
- HU H., G. Moller et M. Abedi-Valugerdi. 1999. «Mechanism of mercury-induced autoimmunity: both T helper 1- and T helper 2-type responses are involved». Immunology, vol. 96, no. 3, p. 348-357.
- HULTMAN P. et S. Enestrom. 1992. «Dose-response studies in murine mercury-induced autoimmunity and immune-complex disease». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 113, no. 2, p. 199-208.
- ILBACK N.G. 1991. «Effects of methyl mercury exposure on spleen and blood natural killer (NK) cell activity in the mouse». Toxicology, vol. 67, no. 1, p. 117-124.
- INSUG O., S. Datar, C. J. Koch, I. M. Shapiro et B. J. Shenker. 1997. «Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane permeability transition and loss of reductive reserve». Toxicology, vol. 124, no. 3, p. 211-224.
- ITOH G., J. Tamura, M. Suzuki, Y. Suzuki, H. Ikeda, M. Koik, M. Nomura, T. Jie et K. Ito. 1995. «DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis». American Journal of Pathology, vol. 146, no. 6, p. 1325-1331.
- ISHIDA Y., T. Ichimura, H. Sumi, T. Horigome et S. Omata. 1997. «Methylmercury alters the tyrosination status of tubulin in the brains of acutely intoxicated rats». Toxicology, vol. 122, no. 3, p. 171-181.
- KERR J.F., A. H. Wyllie et A. R. Currie. 1972. «Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics». British Journal of Cancer, vol. 26, no. 4, p. 239-257.
- KIBUKAMUSOKE J.W., D. R. Davies et M. S. Hutt. 1974. «Membranous nephropathy due to skin-lightening cream». British Medical Journal, vol. 2, no. 920, p. 646-647.
- KOESTER S.K. et W. E. Bolton. 1999. «Differentiation and assessment of cell death». Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, vol. 37, no. 3, p. 311-317.

- KOLLER L.D., J. H. Exon et B. Arbogast. 1977. «Methylmercury: effect on serum enzymes and humoral antibody». Journal of Toxicology and Environmental Health, vol. 2, no. 5, p. 1115-1123.
- KOSOWER M.S. et T. M. Kosower. 1983. «Glutathione and cell membrane thiol status». Chap. In Functions of glutathione : Biochemical, Physiological, Toxicological, and Clinical Aspects, p. 307-315. New York: Raven Press.
- KROEMER G., P. Petit, N. Zamzami, J. L. Vayssiere et B. Mignotte. 1995. «The biochemistry of programmed cell death». FASEB Journal, vol. 9, no. 13, p. 1277-1287.
- KROEMER G., B. Dallaporta et M. Resche-Rigon. 1998. «The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis». Annual Review of Physiology, vol. 60, p. 619-642.
- LAUWERYS R. 1992. «Le mercure». Chap. In Toxicologie industrielle et intoxication professionnelle, p. 170-180. Montréal. Masson.
- LEBLEBICIOGLU B. et J. Walters. 1999. «Alkaline conditions accelerate polymorphonuclear leukocyte apoptosis in vitro». Infection and Immunity, vol. 67, no. 4, p. 2019-2021.
- LEVIN S., T. J. Bucci, S. M. Cohen, A. S. Fix, J. F. Hardisty, E. K. LeGrand, R. R. Maronpot et B. F. Trump. 1999. «The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists». Toxicologic Pathology, vol. 27, no. 4, p. 484-490.
- LOUAGIE H., M. Cornelissen, J. Philippe, A. Vral, H. Thierens et L. De Ridder. 1998. «Flow cytometric scoring of apoptosis compared to electron microscopy in gamma irradiated lymphocytes». Cell Biology International, vol. 22, no. 4, p.277-283.
- LUTHRA R. et M. S. Olson. 1976. «Studies of mitochondrial calcium movements using chlorotetracycline». Biochimica et Biophysica Acta, vol. 440, no. 3, p. 744-758.
- MADSEN K.M. et E. I. Christensen. 1978. «Effects of mercury on lysosomal protein digestion in the kidney proximal tubule». Laboratory Investigation, vol. 38, no. 2, p. 165-174.
- MAGOS L., T. W. Clarkson et J. Allen. 1978. «The interrelationship between non-protein bound thiols and the biliary excretion of methylmercury». Biochemical Pharmacology, vol. 27, no. 18, p. 2203-2208.
- MALAMUD D., S. A. Dietrich et I. M. Shapiro. 1985. «Low levels of mercury inhibit the respiratory burst in human polymorphonuclear leukocytes». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 128, no. 3, p. 1145-1151.
- MARTINO J.C., M. Dubois-Dauphin, J. K. Staple, I. Rodriguez, H. Frankowski, M. Missotten, P. Albertini, D. Talabot, S. Catsicas, C. Pietra, et al. 1994. «Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia». Neuron, vol. 13, no. 4, p. 1017-1030.

- MARTY M.S. et W. D. Atchison. 1997. «Pathways mediating Ca²⁺ entry in rat cerebellar granule cells following in vitro exposure to methyl mercury». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 147, no. 2, p. 319-330.
- MATSUMOTO H., G. Koya et T. Takeuchi. 1965. «Fetal Minamata disease». Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, vol. 24, p. 563-574.
- MCCONKEY D.J., P. Hartzell, P. Nicotera et S. Orrenius. 1989. «Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes». FASEB Journal, vol. 3, no. 7, p. 1843-1849.
- MCCONKEY D.J., M. Aguilar-Santelises, P. Hartzell, I. Eriksson, H. Mellstedt, S. Orrenius et M. Jondal. 1991. «Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells». Journal of Immunology, vol. 146, no. 3, p. 1072-1076.
- MCCONKEY D.J. 1996. «The role of calcium in the regulation of apoptosis». Scanning Microscopy, vol. 10, no. 3, p. 777-793.
- MICHAELSON J.H., J. P. Jr. McCoy, P. Hirszel et P. E. Bigazzi. 1985. «Mercury-induced autoimmune glomerulonephritis in inbred rats. I. Kinetics and species specificity of autoimmune responses». Survey and Synthesis of Pathology Research, vol. 4, no. 5-6, p. 401-411.
- MIURA K., M. Inokawa et N. Imura. 1984. «Effects of methylmercury and some metal ions on microtubule networks in mouse glioma cells and in vitro tubulin polymerization». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 73, no. 2, p. 218-231.
- MIURA K. et N. Imura. 1987. «Mechanism of methylmercury cytotoxicity». Critical Reviews in Toxicology, vol. 18, no. 3, p. 161-188.
- MOTTET K., C. M. Shaw et T. M. Burbacher. 1987. «The pathological lesions of methylmercury intoxication in monkeys». In The toxicity of methyl mercury, p. 78. Baltimore : The Johns Hopkins University Press.
- NAGATA S. 1997. «Apoptosis by death factor». Cell, vol. 88, no. 3, p. 355-365.
- NAKASHIMA I, M. Y. Pu, A. Nishizaki, I. Rosila, L. Ma, Y. Katano, K. Ohkusu, S. M. Rahman, K. Isobe, M. Hamaguchi, et al. 1994. «Redox mechanism as alternative to ligand binding for receptor activation delivering disregulated cellular signals». Journal of Immunology, vol. 152, no. 3, p. 1064-1071.
- NAKATSURU S., J. Oohashi, H. Nozaki, S. Nakada et N. Imura. 1985. «Effect of mercurials on lymphocyte functions in vitro». Toxicology, vol. 36, no. 4, p. 297-305.
- NAKAZAWA N., F. Makino et S. Okada. 1975. «Acute effects of mercury compounds on cultures mammalian cells». Biochemical Pharmacology, vol. 24, p. 489-493.
- NIELSEN J.B., H. R. Andersen, O. Andersen et H. Starklint. 1994. «Dose and time relations in Hg(++)-induced tubular necrosis and regeneration». Environmental Health Perspectives, vol. 102 Suppl. 3, p. 317-320.

- NORSETH T. et M. Brendeford. 1971. «Intracellular distribution of inorganic and organic mercury in rat liver after exposure to methylmercury salts». Biochemical Pharmacology, vol. 20, no. 6, p. 1101-1107.
- OBERTO A., N. Marks, H. L. Evans et A. Guidotti. 1996. «Lead (Pb+2) promotes apoptosis in newborn rat cerebellar neurons: pathological implications». Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 279, no. 1, p. 435-442.
- OHI G, S. Nishigaki, H. Seki, Y. Tamura et T. Maki. 1976. «Efficacy of selenium in tuna and selenite in modifying methylmercury intoxication». Environmental Research, vol. 12, no. 1, p. 49-58.
- OHYAMA H., T. Yamada et I. Watanabe. 1981. «Cell volume reduction associated with interphase death in rat thymocytes». Radiation Research, vol. 85, no. 2, p. 333-339.
- OYAMA Y., F. Tomiyoshi, S. Ueno, K. Furukawa et L. Chikahisa. 1994. «Methylmercury-induced augmentation of oxidative metabolism in cerebellar neurons dissociated from the rats: its dependence on intracellular Ca²⁺». Brain Research, vol. 660, no. 1, p. 154-157.
- PELLETIER L., R. Pasquier, J. Rossert et P. Druet. 1987. «HgCl₂ induces nonspecific immunosuppression in Lewis rats». European Journal of Immunology, vol. 17, no. 1, p. 49-54.
- PETTIT E.J. et M. B. Hallett. 1998. «Two distinct Ca²⁺ storage and release sites in human neutrophils». Journal of Leukocyte Biology, vol. 63, no. 2, p. 225-232.
- POPESCU H.I. 1978. «Poisoning with alkylmercury compounds». British Medical Journal, vol. 1, no. 6123, p. 1347.
- PRYDE J.G., A. Walker, A. G. Rossi, S. Hannah et C. Haslett. 2000. «Temperature-dependent arrest of neutrophil apoptosis: failure of bax insertion into mitochondria at 15{degrees}C prevents the release of cytochrome c». Journal of Biological Chemistry,
- RABENSTEIN D.L. et C. A. Evans. 1978. «The mobility of methylmercury in biological systems». Bioinorganic Chemistry, vol. 8, no. 2, p. 107-114.
- RAFFRAY M. et G. M. Cohen. 1997. «Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death?». Pharmacology Ther., vol. 75, no. 3, p. 153-177.
- REARDON C. L. et D. O. Lucas. 1987. «Heavy-metal mitogenesis : Zn²⁺ and Hg²⁺ induce cellular cytotoxicity and interferon production in murine T lymphocytes». Immunobiology, vol. 175, p. 455-469.
- RISCHER J. et R. DeWoskin. 1999. Toxicological profile for mercury. U. S. Department of health and human services. Public Health service and Agency for toxic substances and disease registry. Atlanta.

- ROBINSON J.B. et O. H. Tuovinen. 1984. «Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical, and genetic analyses». Microbiological Reviews, vol. 48, no. 2, p. 95-124.
- SAGER P.R., R. A. Doherty et J. B. Olmsted. 1983. «Interaction of methylmercury with microtubules in cultured cells and in vitro». Experimental Cell Research, vol. 146, no. 1, p. 127-137.
- SAPIN C., C. Mandet, E. Druet, G. Gunther et P. Druet. 1981. «Immune complex type disease induced by HgCl₂: genetic control of susceptibility». Transplantation Proceedings, vol. 13, no. 2, p. 1404-1406.
- SARAFIAN T. et M. A. Verity. 1991. «Oxidative mechanisms underlying methyl mercury neurotoxicity». International Journal of Developmental Neuroscience, vol. 9, no. 2, p. 147-153.
- SASAKI H., T. Matsuno, N. Tanaka et K. Orita. 1996. «Activation of apoptosis during the reperfusion phase after rat liver ischemia». Transplantation Proceedings, vol. 28, no. 3, p. 1908-1909.
- SAVILL J., N. Hogg, Y. Ren et C. Haslett. 1992. «Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis». Journal of Clinical Investigation, vol. 90, no. 4, p. 1513-1522.
- SCARLETT J.L. et M. P. Murphy. 1997. «Release of apoptogenic proteins from the mitochondrial intermembrane space during the mitochondrial permeability transition». FEBS Letters, vol. 418, no. 3, p. 282-286.
- SELLINS K.S. et J. J. Cohen. 1991. «Cytotoxic T lymphocytes induce different types of DNA damage in target cells of different origins». Journal of Immunology, vol. 147, no. 3, p. 795-803.
- SHENKER B.J., C. Rooney, L. Vitale et I. M. Shapiro. 1992a. «Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. I. Suppression of T-cell activation». Immunopharmacology and Immunotoxicology, vol. 14, no. 3, p. 539-553.
- SHENKER B.J., P. Berthold, S. Decker, J. Mayro, C. Rooney, L. Vitale et I. M. Shapiro. 1992b. «Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. II. Alterations in cell viability». Immunopharmacology and Immunotoxicology, vol. 14, no. 3, p. 555-577.
- SHENKER B.J., P. Berthold, C. Rooney, L. Vitale, K. DeBolt et I. M. Shapiro. 1993a. «Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. III. Alterations in B-cell function and viability». Immunopharmacology and Immunotoxicology, vol. 15, no. 1, p. 87-112.
- SHENKER B.J., J. S. Mayro, C. Rooney, L. Vitale et I. M. Shapiro. 1993b. «Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. IV. Alterations in cellular glutathione content». Immunopharmacology and Immunotoxicology, vol. 15, no. 2-3, p. 273-290.

- SHENKER B.J., S. Datar, K. Mansfield et I.M. Shapiro. 1997. «Induction of apoptosis in human T-cells by organomercuric compounds: a flow cytometric analysis». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 143, no. 2, p. 397-406.
- SHENKER B.J., T. L.Guo et I. M. Shapiro. 1998. «Low-level methylmercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: evidence of mitochondrial dysfunction». Environmental Research, vol. 77, no. 2, p. 149-159.
- SKERFVING S., K. Hansson et L. Lindsten. 1970. «Chromosome breakage in humans exposed to methyl mercury through fish consumption. Preliminary communication». Archives of Environmental Health, vol. 21, no. 2, p. 133-139.
- SOLEO L., A. Vacca, L. Vimercati, S. Bruno, M. Di Loreto, C. Zocchetti, R. Di Stefano, G. Candilio, G. Lasorsa et V. Foa. 1997. «Minimal immunological effects on workers with prolonged low exposure to inorganic mercury». Occupational and Environmental Medecine, vol. 54, no. 6, p. 437-442.
- STONARD M. D., B. V. Chater, D. P. Duffield, J. J. O'Sullivan et C. M. Lockwood. 1983. Circulating immune complexes in individuals occupationally exposed to chemistry vapour. In S. S. Brown et J. Savory, (éd.). *Chemical toxicology and clinical chemistry of metals*. New York: Academic Press, p. 135-148.
- SUDA I. et H. Takahashi. 1986. «Enhanced and inhibited biotransformation of methyl mercury in the rat spleen». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 82, no. 1, p. 45-52.
- TAKEI H., A. Araki, H. Watanabe, A. Ichinose et F. Sendo F. 1996. «Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis». Journal of Leukocyte Biology, vol. 59, no. 2, p. 229-240.
- TAKIZAWA Y. 1979. «Epidemiology of mercury poisoning». In J. Nriagu, (éd.). *The biogeochemistry of mercury in the enviromental*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland and biomedical Press, p. 325-365.
- TAN X.X., C. Tang, A. F. Castoldi, L. Manzo et L. G. Costa. 1993. «Effects of inorganic and organic mercury on intracellular calcium levels in rat T lymphocytes». Journal of Toxicology and Environmental Health, vol. 38, no. 2, p. 159-170.
- THORLACIUS-USSING O. et P. Moller Graabaek. 1986. «Simultaneous ultrastructural demonstration of heavy metals (silver, mercury) and acid phosphatase». Histochemical Journal, vol. 18, no. 11-12, p. 639-646.
- TOOL A.T., M. J. Pabst, D. Roos et A. J. Verhoeven. 1994. «Phosphatidyl-inositol-linked CD14 is involved in priming of human neutrophils by lipopolysaccharide (LPS), but not in the inactivation of LPS». Progress in Clinical and Biological Research, vol. 388, p. 137-145.
- TRUMP B.F. et I. K. Berezesky. 1995. «Calcium-mediated cell injury and cell death». FASEB Journal, vol. 9, no. 2, p. 219-228.

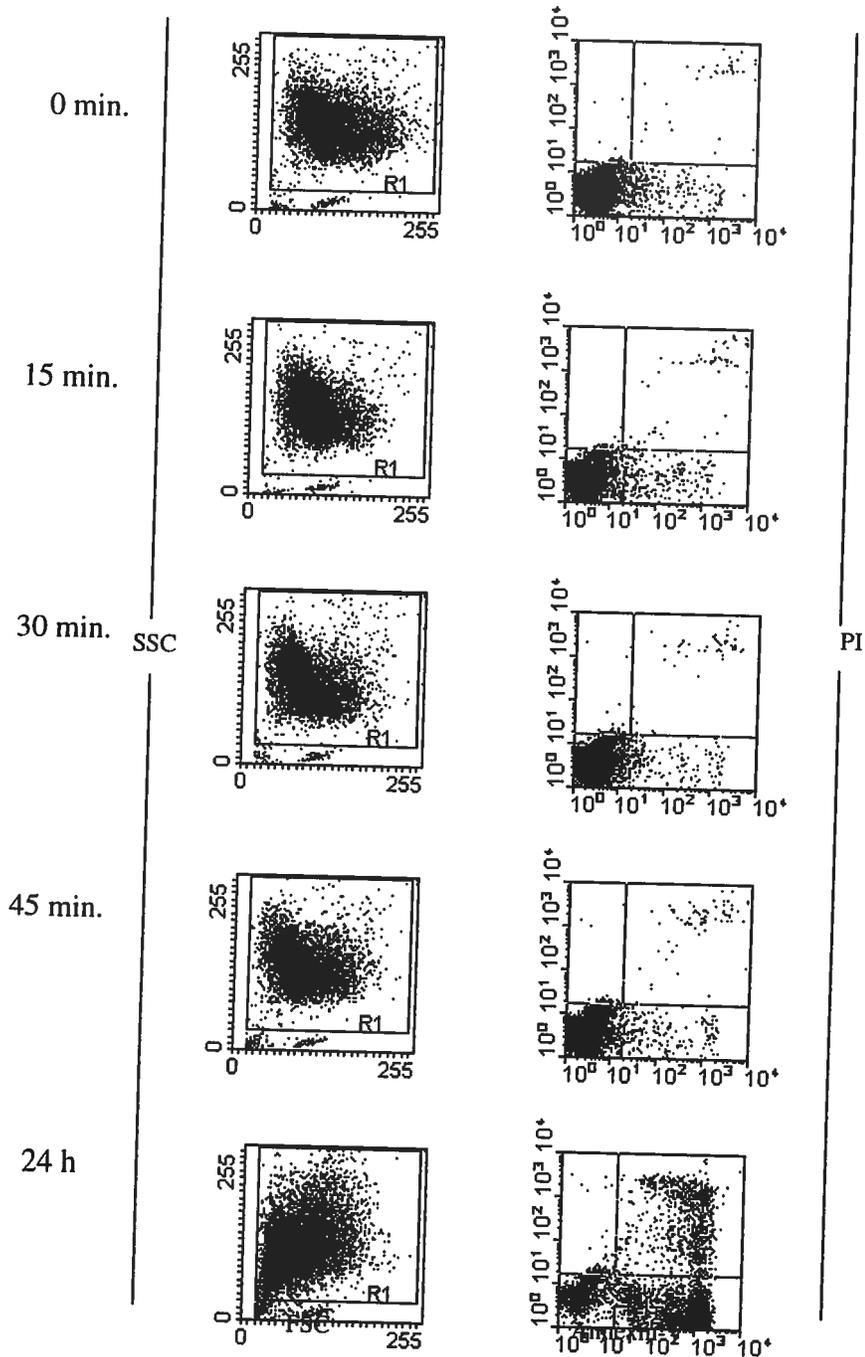
- VAHTER M., N. K. Mottet, L. Friberg, B. Lind, D. D. Shen et T. Burbacher. 1994. «Speciation of mercury in the primate blood and brain following long-term exposure to methyl mercury». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 24, no. 2, p. 221-229.
- VERMES I., C. Haanen, D. J. Richel, M. R. Schaafsma, E. Kalsbeek-Batenburg et C. P. Reutelingsperger. 1997. «Apoptosis and secondary necrosis of lymphocytes in culture». Acta Haematologica, vol. 98, no. 1, p. 8-13.
- VERSCHA EVE L., M. Kirsch-Volders, C. Susanne, C. Groetenbriel, R. Haustermans, A. Lecomte et D. Roossels. 1976. «Genetic damage induced by occupationally low mercury exposure». Environmental Research, vol. 12, no. 3, p. 306-316.
- WYLLIE A.H., J. F. Kerr et A. R. Currie. 1980. «Cell death: the significance of apoptosis». International Review of Cytology, vol. 68, p. 251-306.
- YANG J.C. et G. A. Cortopassi. 1998. «Induction of the mitochondrial permeability transition causes release of the apoptogenic factor cytochrome c». Free Radical Biology and Medecine, vol. 24, no. 4, p. 624-631.
- ZHENG A., P. Mantymaa, M. Saily, T. Siitonen, E. R. Savolainen et P. Koistinen. 1999. «An association between mitochondrial function and all-trans retinoic acid-induced apoptosis in acute myeloblastic leukaemia cells». British Journal of Haematology, vol. 105, no. 1, p. 215-224.
- ZUCKER R.M., K. H. Elstein, D. J. Thomas et J. M. Rogers. 1994. «Tributyltin and dexamethasone induce apoptosis in rat thymocytes by mutually antagonistic mechanisms». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 127, no. 1, p. 163-170.
- ZYCHLINSKY A., L. M. Zheng, C. C. Liu et J. D. Young. 1991. «Cytolytic lymphocytes induce both apoptosis and necrosis in target cells». Journal of Immunology, vol. 146, no. 1, p. 393-394.

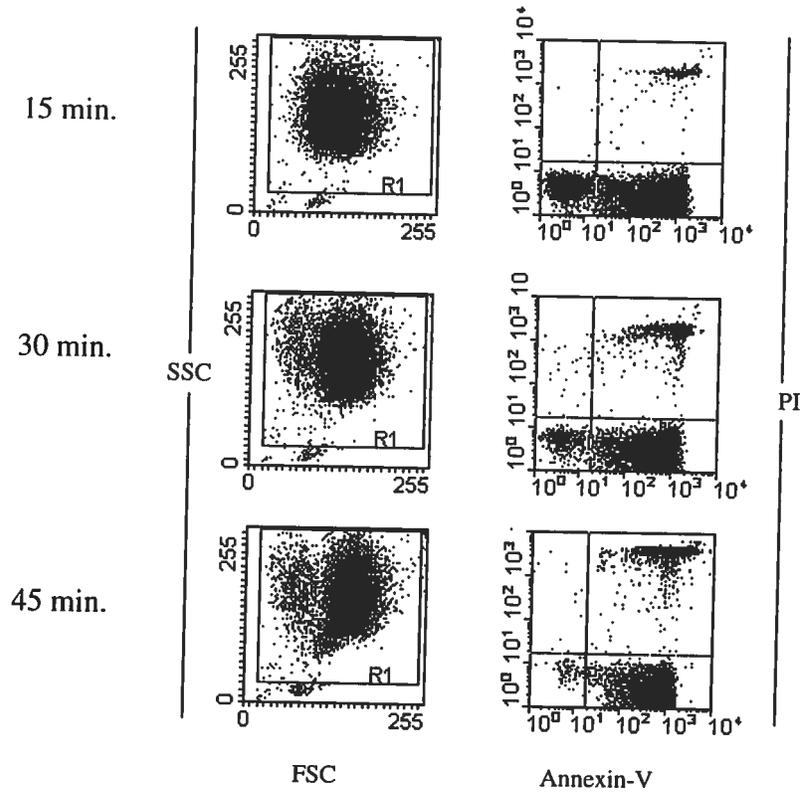
ANNEXE

Effet du cadmium et du plomb sur l'apoptose et la nécrose des PMN.

Résultats représentatifs de 2 expériences différentes.

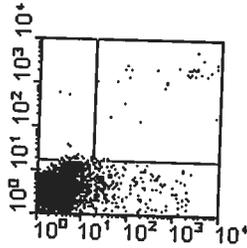
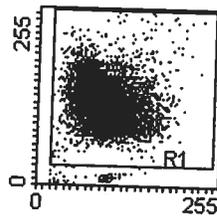
CONTRÔLE



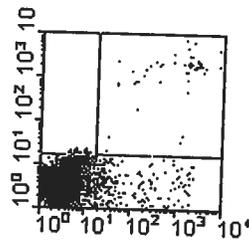
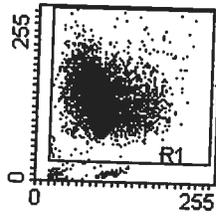
MeHgCl (10^{-4} M)

CADMIUM-Cd Cl₂
(10⁻⁸ M)

15 min.



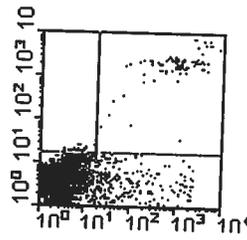
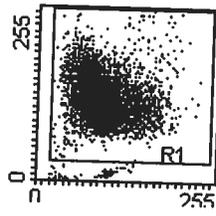
30 min.



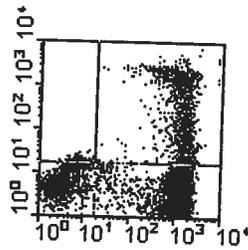
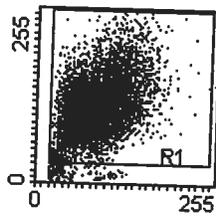
SSC

PI

45 min.

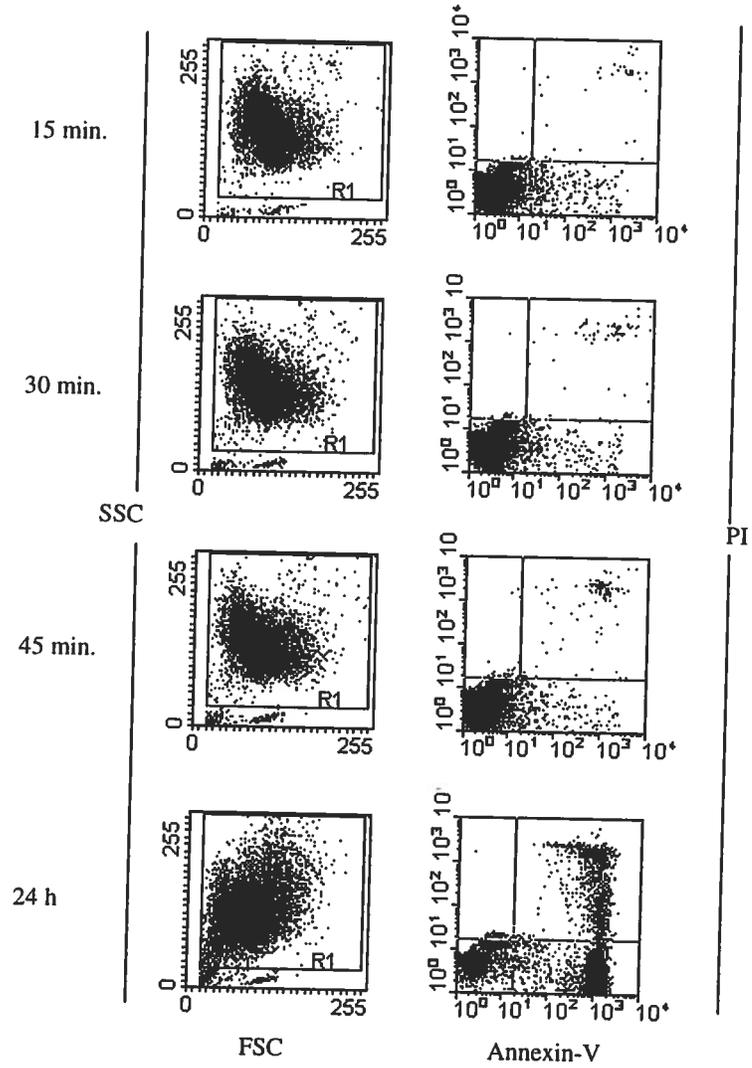


24 h

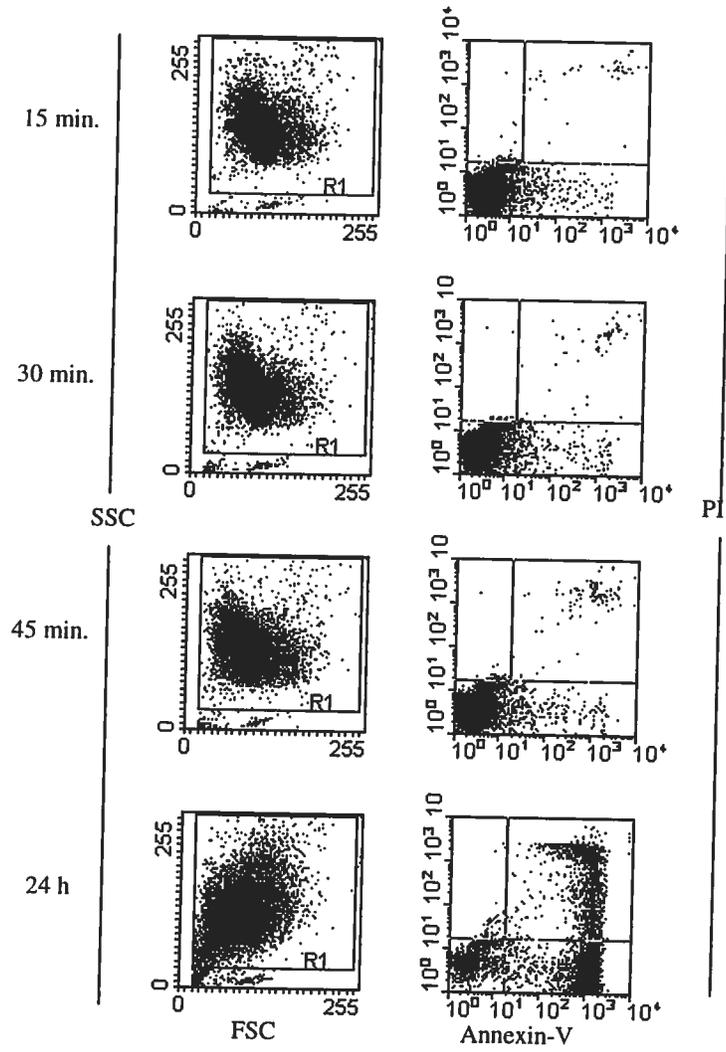


FSC

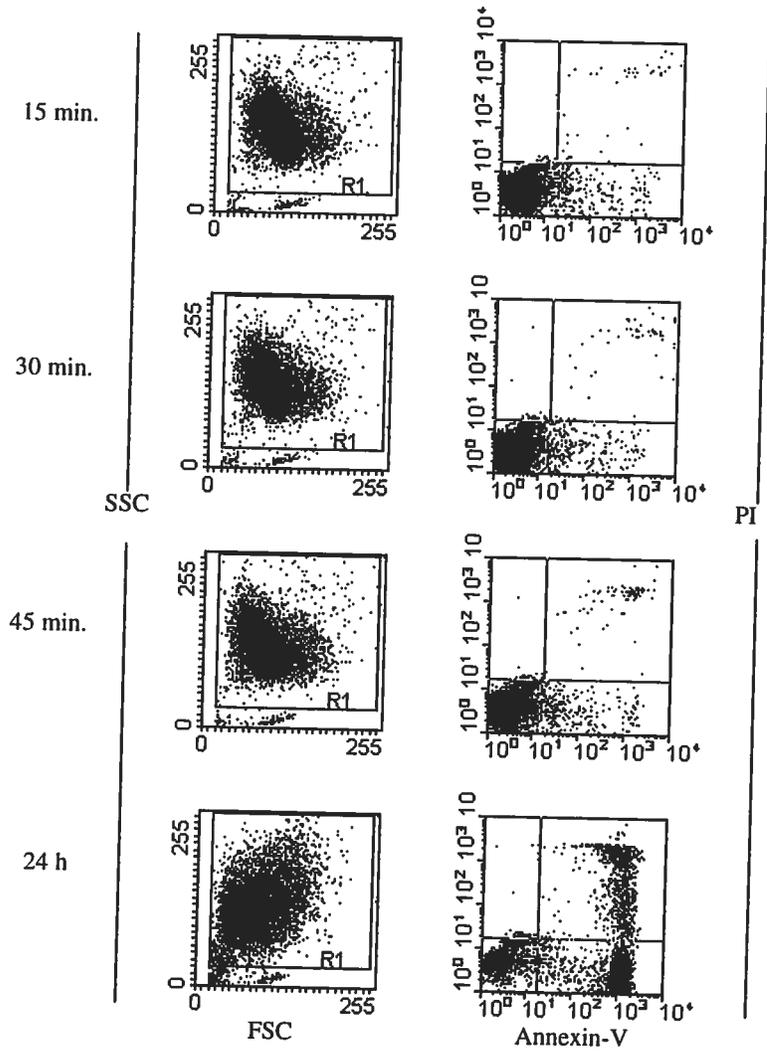
Annexin-V

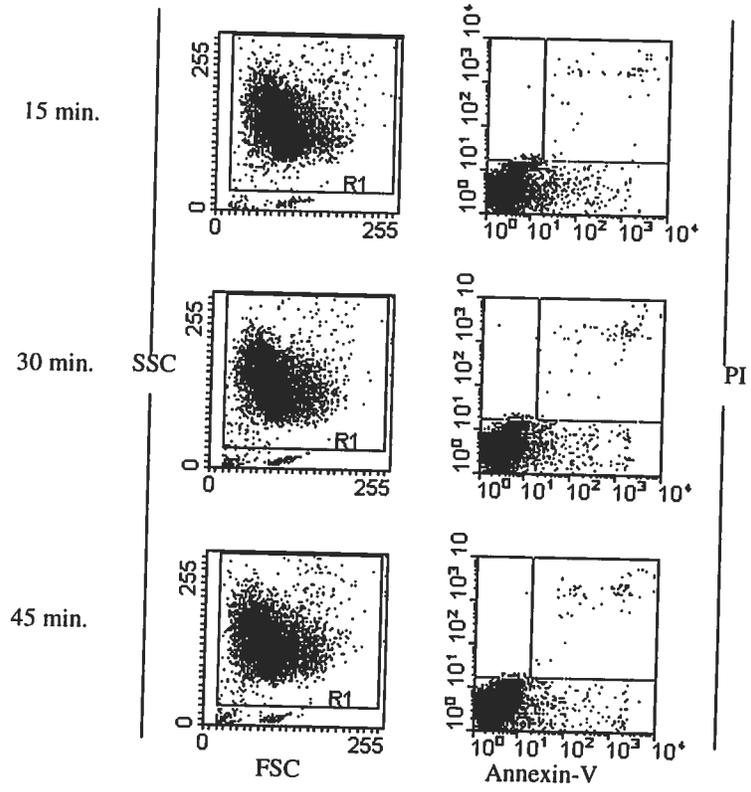
CADMIUM-Cd Cl₂
(10⁻⁷ M)

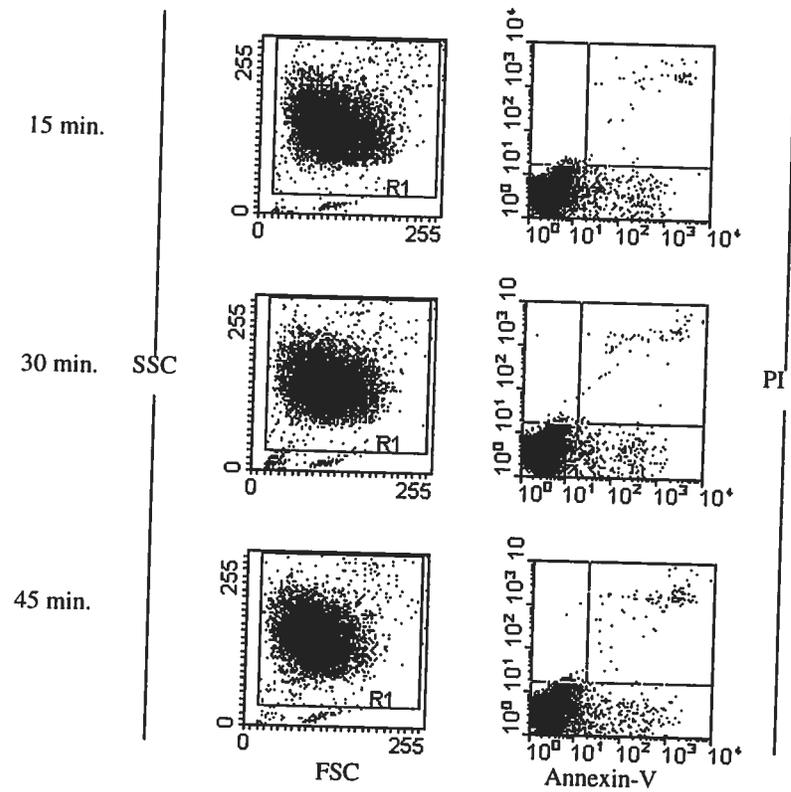
CADMIUM-Cd Cl₂
(10⁻⁶ M)

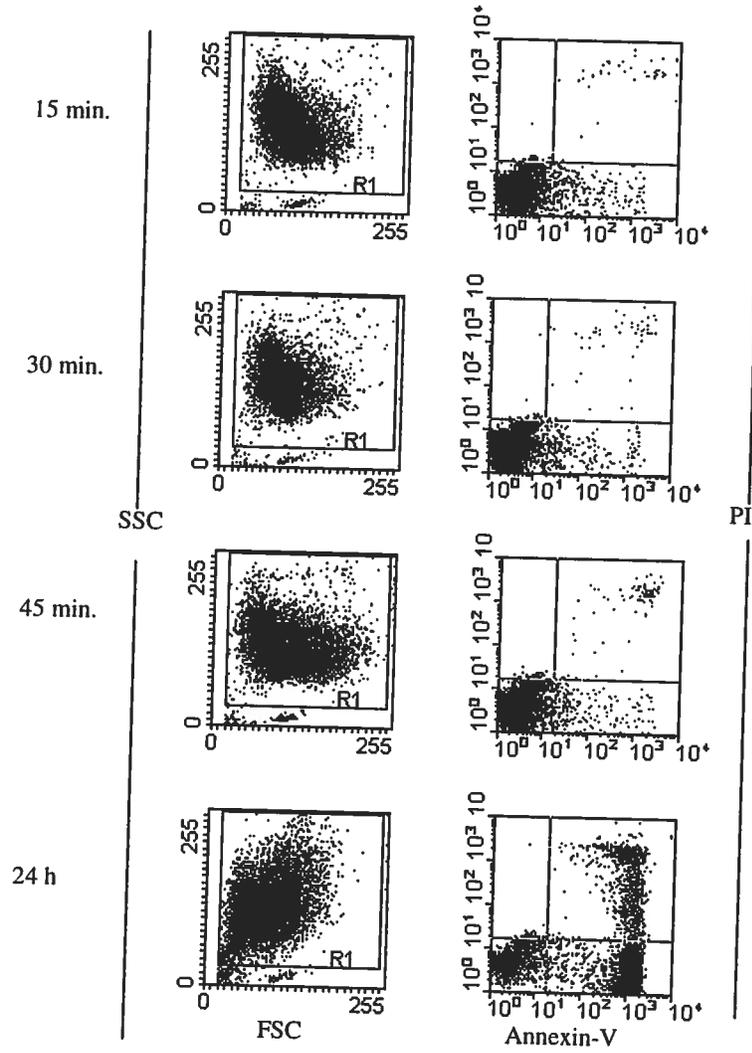


CADMIUM-Cd Cl₂
(10⁻⁵ M)

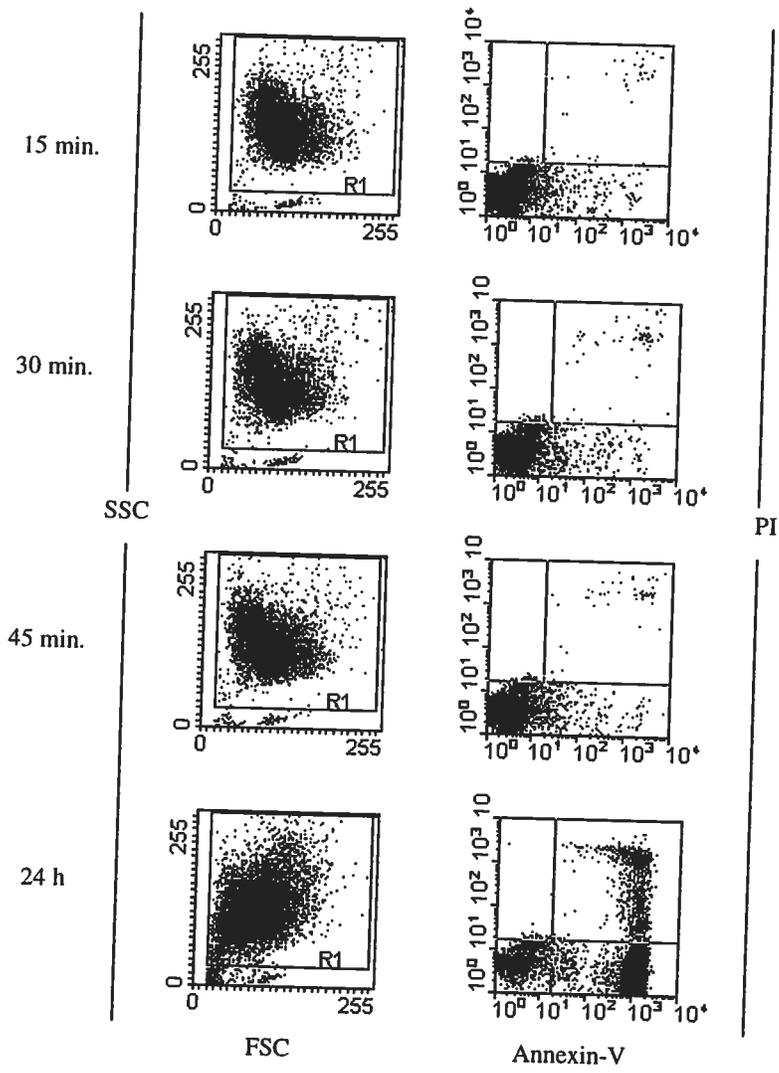


CADMIUM-Cd Cl₂
(10⁻⁴ M)

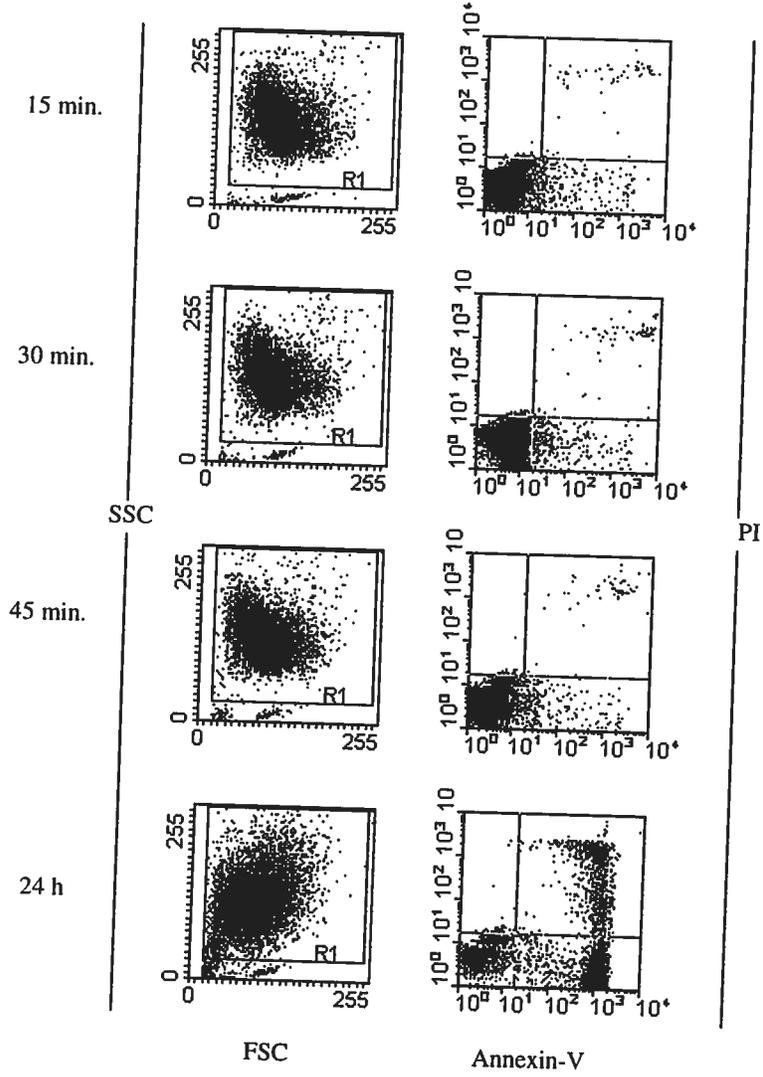
CADMIUM-Cd Cl₂
(10⁻³ M)

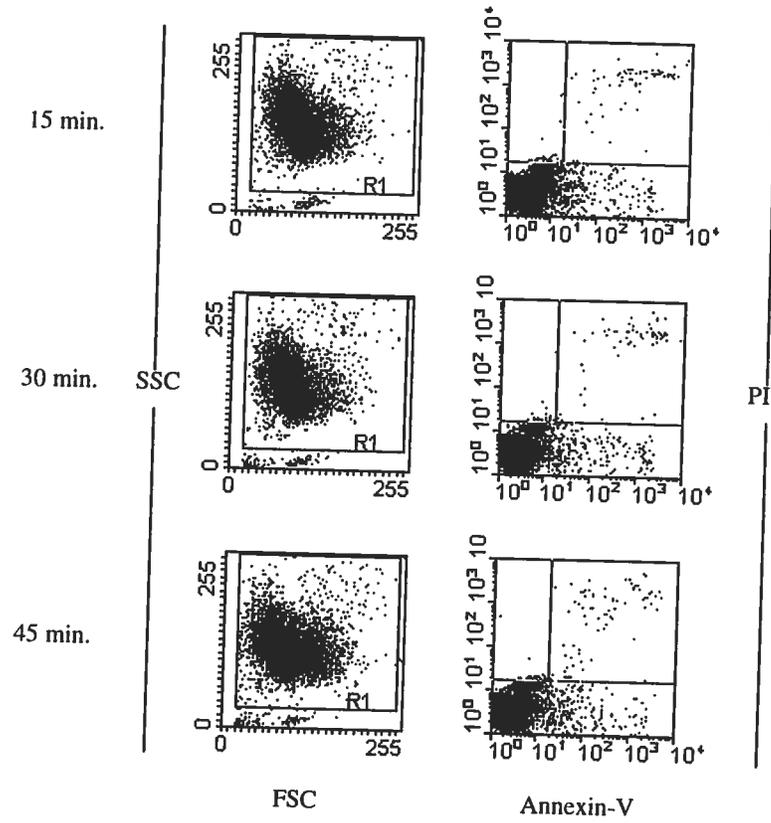
PLOMB-Pb Cl₂
(10⁻⁷ M)

PLOMB-Pb Cl₂
(10⁻⁶ M)



PLOMB-Pb Cl₂
(10⁻⁵ M)



PLOMB-Pb Cl₂
(10⁻⁴ M)

PLOMB-Pb Cl₂
(10⁻³ M)