

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ À
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE

PAR

JACKY GAGNON

EXPOSITION PROLONGÉE AUX CHAMPS MAGNÉTIQUES: EFFETS SUR LE
SYSTÈME IMMUNITAIRE DU RAT F344/N

MAI 1996

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES TABLEAUX	iv
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vi
SOMMAIRE	viii
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1. CARACTÉRISTIQUES DES CHAMPS MAGNÉTIQUES	5
1.1 Définition et propriétés physiques des champs électromagnétiques	5
1.2 Sources de champs magnétiques	6
2. EFFETS BIOLOGIQUES DES CHAMPS MAGNÉTIQUES	14
2.1 Études épidémiologiques	14
2.1.1 Exposition résidentielle près des lignes de distribution et les risques de cancer chez les enfants	14
2.1.2 Exposition résidentielle près des lignes à haute tension et les risques de cancer chez les enfants	16
2.2 Études expérimentales	17
2.2.1 Exposition in vitro	17
2.2.2 Expositions in vivo	22
2.3 Mécanismes d'action possibles	25
3. CELLULES EFFECTRICES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE	28
3.1 Cellules NK	28
3.2 Lymphocytes T	29
3.3 Lymphocytes B	30
3.4 Macrophages	31
4. OBJECTIF DE LA RECHERCHE	32
MATÉRIEL ET MÉTHODES	35
1. EXPOSITION DES ANIMAUX AUX CHAMPS MAGNÉTIQUES	36
1.1 Description de la salle d'exposition	36
1.2 Contrôle de la qualité	37
1.3 Protocole d'exposition	38
2. CULTURE CELLULAIRE	38
2.1 Origine des lignées cellulaires	38
2.2 Culture des cellules	39
2.2.1 Cellules YAC-1	39
2.2.2 Cellules CTLL-2	39
2.2.3 Cellules fibroblastiques murines (L929)	40
3. CELLULES SPLÉNIQUES	40

3.1 Préparation des cellules spléniques	40
3.2 Détermination de l'activité des cellules NK	41
3.3 Phénotypage	42
3.4 Dosage de l'interleukine-2	43
3.4.1 Production	43
3.4.2 Dosage	44
4. CELLULES PÉRITONÉALES	45
4.1 Préparation des cellules péritonéales	45
4.2 Dosage de la production intracytoplasmique de peroxyde d'hydrogène	46
4.3 Dosage du facteur de nécrose des tumeurs	47
4.3.1 Production	47
4.3.2 Dosage	48
5. POPULATIONS LEUCOCYTAIRES PÉRIPHÉRIQUES	50
5.1 Préparation des échantillons sanguins	50
5.2 Comptes leucocytaires	50
5.3 Comptes différentiels	50
6. ANALYSES STATISTIQUES	51
RÉSULTATS	52
1. CELLULES SPLÉNIQUES: EFFETS D'UNE EXPOSITION DE 3, 6, 9 MOIS	53
1.1 Activité des cellules NK	53
1.2 Phénotypage	54
1.3 Production de l'interleukine 2	67
2. CELLULES PÉRITONÉALES: EFFETS D'UNE EXPOSITION DE 3, 6, 9 MOIS	71
2.1 Production de peroxyde d'hydrogène	71
2.2 Production du facteur de nécrose des tumeurs (TNF- α)	72
3. CELLULES DU SANG PÉRIPHÉRIQUE: EFFETS D'UNE EXPOSITION DE 3, 6, 9 MOIS	80
3.1 Compte leucocytaire	80
3.2 Compte différentiel	80
DISCUSSION	84
1. LES CELLULES SPLÉNIQUES	85
1.1 Activité des cellules NK	85
1.2 Phénotypage	86
1.3 Dosage de l'interleukine 2	88
2. LES CELLULES PÉRITONÉALES	89
3. LES SOUS POPULATIONS DANS LE SANG PÉRIPHÉRIQUE	91
4. SYSTÈME IMMUNITAIRE: EFFETS D'UNE EXPOSITION DE 3, 6 ET 9 MOIS	93
CONCLUSION	96
REMERCIEMENTS	98
BIBLIOGRAPHIE	100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I:	Résultats de trois études Scandinaves (1993) sur les effets d'une exposition résidentielle aux champs magnétiques.....	18
Tableau II A:	Effets d'une exposition aux champs magnétiques sur différents paramètres immunitaires chez des rats F344/N mâles: résultats calculés avec le groupe "sham".	56
Tableau II B:	Effets d'une exposition aux champs magnétiques sur différents paramètres immunitaires chez des rats F344/N mâles: résultats calculés avec le groupe CC	57
Tableau III:	Activité des cellules NK spléniques de rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.....	58
Tableau IV:	Pourcentages des différentes populations de lymphocytes T spléniques chez des rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.	65
Tableau V:	Pourcentages de lymphocytes B (Igs ⁺) spléniques chez des rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.	66
Tableau VI:	Production d'IL-2 par des cellules spléniques chez des rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.	70
Tableau VII:	Index de stimulation de la production d'H ₂ O ₂ par les cellules péritonéales chez des rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.	76
Tableau VIII:	Production du facteur de nécrose des tumeurs par des cellules péritonéales chez des rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.	77
Tableau IX:	Nombre de leucocytes/mm ³ de sang chez des rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.....	81
Tableau X A:	Pourcentages de leucocytes mononucléaires périphériques de rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.....	82
Tableau X B:	Pourcentages de leucocytes polynucléaires périphériques chez des rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.....	83
Tableau XI:	Variations dose-dépendante des réponses immunitaires, suite à une exposition de rats F344/N aux champs magnétiques de 60 Hz.....	92

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Différence entre le champ électrique et le champ magnétique.....	7
Figure 2: Spectre de fréquences des ondes électromagnétiques.	9
Figure 3: Niveaux d'intensité des champs magnétiques rencontrés en Amérique du Nord. ..	12
Figure 4: Effets d'une exposition aux champs magnétiques sur l'activité des cellules NK spléniques chez le rat F344/N.....	59
Figure 5: Effets d'une exposition aux champs magnétiques sur différentes populations de lymphocytes T spléniques chez le rats F344/N (en comparaison avec le groupe "sham").....	61
Figure 6: Effets d'une exposition aux champs magnétiques sur différentes populations de lymphocytes T spléniques chez le rat F344/N (en comparaison avec le groupe "CC").....	63
Figure 7: Effets d'une exposition aux champs magnétiques sur la production d'interleukine-2 par les cellules spléniques chez le rat F344/N.....	68
Figure 8: Distribution des cellules péritonéales de rats F344N.....	74
Figure 9: Effets d'une exposition aux champs magnétiques sur la production de TNF- α par les cellules péritonéales chez le rat F344/N.....	78

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac:	Anticorps	DMBA:	7,12-dimethyl- benz[a]anthracene
ADCC:	"Antibody dependant cellular cytotoxicity"	ELF:	"Extremely Low Frequency"
ADN:	Acide Désoxyribonucléique	EDTA:	Acide éthylènediaminetétraacétate
Ag:	Antigène	ELISA:	"Enzyme-Linked Immunsorbent Assay"
ARN:	Acide Ribonucléique	FITC:	Isothiocyanate de fluorescéine
ATCC:	"American Type Culture Collection"	g:	gramme
b:	Pente	HBSS:	"Hank's Buffered Saline Solution"
BF:	Basse Fréquence	HF:	"High Frequency"
C:	Coulomb	Hz:	Hertz
CC:	Contrôle de colonie	IFN:	Interféron
CD3:	Lymphocytes T totaux	IL-x:	Interleukine (1,2,4,5,6,10)
CD4:	Lymphocytes T auxiliaires	kV:	kilovolt
CD5:	Lymphocytes T totaux	LAK:	"Lymphokine Activated Killer"
CD8:	Lymphocytes T cytotoxiques	LPS:	Lipopolysaccharide
CD:	"Cluster Differentiation"	m:	mètre
CE:	Champ Électrique	M:	molaire
CEM	Champ Électromagnétique	MF:	"Medium Frequency"
CM:	Champ Magnétique	mg:	milligramme
CMH:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	ml:	millilitre
CMP	Champ Magnétique Pulsé	mM:	millimolaire
ConA:	Concavoline A	mT:	millitesla
cpm:	coup par minute	nd:	non déterminé
CTL:	Lymphocyte T cytotoxique	ng:	nanogramme
D.O.:	Densité Optique	NK:	"Natural Killer"
DCFH-DA:	2', 7' dichlorofluorescéine- diacétate		

nm:	nanomètre
p:	valeur de probabilité
PBS:	Tampon phosphate salin
PE:	Phycoérythrine
PFC:	"Plaque Forming Cell"
PHA:	Phytohémagglutinine A
PMA:	Phorbo Myristate Acetate
r:	coefficient de corrélation
rIL-2:	récepteur d'IL-2
SDS:	"Sodium Dodecyl Sulfate"
SFB:	Sérum Foetal Bovin
T:	Tesla
TBF:	Très Basse Fréquence
TGF:	"Transforming growth factor"
VHF:	"Very High Frequency"
TNF:	"Tumor Necrosis Factor"
TPA:	"12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate"
U:	Unité
UHF:	"Ultra High Frequency"
UL:	Unité Lytique
V:	Volt
μCi:	microcurie
μg:	microgramme
μl:	microlitre
μT:	μTesla

SOMMAIRE

Les champs électromagnétiques de 50-60 Hz sont omniprésents dans les pays industrialisés. Jusqu'à présent, les études n'ont montré aucun risque de la composante électrique pour la santé humaine et animale. Depuis l'étude de Wertheimer et Leeper en 1979, plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à la composante magnétique des champs électromagnétiques.

Dans ce travail nous avons étudié l'effet d'une exposition prolongée aux champs magnétiques sinusoïdaux de 60 Hz sur différentes populations de cellules immunitaires. Dès le vingtième jour de gestation, des rats F344/N ont été exposés à différentes intensités de champs magnétiques (2, 20, 200 et 2000 μ T) pendant 3, 6 et 9 mois.

Selon les résultats obtenus dans cette étude, les champs magnétiques semblent moduler de manière dose-dépendante certaines réponses des cellules spléniques, plus particulièrement après 3 mois d'exposition. Des augmentations de l'activité des cellules NK ont été observées avec des intensités croissantes de champs magnétiques et après 3, 6 et 9 mois d'exposition. Les pourcentages de lymphocytes T CD5⁺, CD4⁺, et CD8⁺ diminuaient après 3 mois d'exposition, pour revenir à un niveau normal après 6 et 9 mois d'exposition. Les lymphocytes B Igs⁺ ne semblent pas avoir été affectés par les champs magnétiques. Après 3 mois d'exposition, l'activité IL-2 a diminué avec l'augmentation de l'intensité des champs magnétiques; cette variation n'était plus présente après 6 et 9 mois.

L'index de stimulation de la production d'H₂O₂ par les cellules péritonéales était peu affecté par une exposition aux champs magnétiques. Seule une légère diminution de ce rapport a été observée dans la population cellulaire majeure (A) après 3 et 9 mois d'exposition et seulement par rapport au "sham". De plus les champs magnétiques ont entraîné une augmentation de l'activité TNF- α après 3 mois d'exposition, mais ce résultat demande à être

confirmé à l'aide d'un plus grand nombre d'échantillons. Finalement, les champs magnétiques n'ont eu que peu d'effets sur les comptes leucocytaires et différentiels.

Nous avons démontré que les champs magnétiques peuvent moduler, de manière dose-dépendante, différentes réponses immunitaires et plus particulièrement après 3 mois d'exposition. Il sera donc intéressant d'étudier d'autres paramètres immunitaires et d'évaluer l'effet d'une exposition aux champs magnétiques sur la résistance des animaux aux infections et aux tumeurs.

INTRODUCTION

L'effet des champs magnétiques 50-60 Hz sur la santé suscite beaucoup de controverse. En effet, des études épidémiologiques ont mis en évidence une relation cause-effet entre une exposition prolongée aux champs magnétiques et le développement de certains type de cancers particulièrement chez les enfants. Cependant ces études présentent plusieurs points faibles, dont la difficulté de différencier de façon précise le niveau d'exposition et l'impossibilité de contrôler certains facteurs environnementaux (pollution, statut économique etc.). Pour mieux comprendre l'effet d'une exposition aux champs magnétiques sur le fonctionnement de certains systèmes biologiques, il est important d'effectuer des études en laboratoire sous des conditions contrôlées.

Comme le système immunitaire est directement associé à la lutte contre les maladies infectieuses et les cellules tumorales, dans ce travail nous avons étudié les effets d'une exposition prolongée aux champs magnétiques sur différentes populations de cellules immunitaires chez le rat F344/N. Dans le but de déterminer la présence d'une relation dose-réponse, les animaux ont été soumis à différentes intensités de champs magnétiques (2, 20, 200, et 2000 μ T) retrouvées dans notre environnement. De plus, les champs magnétiques utilisés correspondent à ceux produits par le courant alternatif en Amérique du Nord; ils ont une forme sinusoïdale et une fréquence de 60 Hz. Pour évaluer l'influence des champs magnétiques en fonction du temps d'exposition, les animaux ont été exposés pendant 3, 6 et 9 mois à partir de la période prénatale.

Les paramètres de la réponse immunitaire qui ont été étudiés, impliquent différentes populations du système réticulo-endothélial et correspondent aux paramètres les plus couramment considérés en immunotoxicologie. Parmi les tests effectués sur les cellules spléniques, mentionnons la détermination de l'activité lytique non-spécifique des cellules NK, les pourcentages de lymphocytes T (auxiliaires et cytotoxiques) et B, ainsi que la

production d'IL-2 en présence d'un mitogène. La fonction des macrophages péritonéaux a également été évaluée en mesurant la production d'H₂O₂ intracytoplasmique ainsi que la production de TNF- α . De plus, le profil hématologique (comptes leucocytaires et différentiels) a été examiné au niveau du sang périphérique.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. CARACTÉRISTIQUES DES CHAMPS MAGNÉTIQUES

1.1 Définition et propriétés physiques des champs électromagnétiques

Les champs électromagnétiques (CEM) sont formés de deux composantes vectorielles: un champ électrique (CE) et un champ magnétique (CM). Le champ électrique est produit par les charges et dépend du voltage. Le champ magnétique est créé par le mouvement des charges et dépend de l'intensité du courant électrique circulant à l'intérieur des fils conducteurs (Figure 1). La quantité vectorielle représentant le champ électrique est symbolisée par **E** et correspond à l'intensité du CE en volts par mètre (V/m). Le champ magnétique est spécifié par **B**, quantité vectorielle correspondant à l'intensité des champs magnétiques, dont l'unité de mesure internationale est le Tesla (T) (Tenforde et Kaune, 1987). Le vecteur **B** est perpendiculaire à **E** et les intensités du CE et du CM diminuent avec la distance de la source. La force du CE peut-être facilement atténuée par des obstacles physiques, tels que des arbres ou des matériaux de construction, tandis que le CM traverse presque toutes les matières, sans perte d'intensité.

Les champs électriques et magnétiques produits par le courant alternatif ont la propriété de transmettre de l'énergie sous une forme ondulatoire. Toutes les ondes électromagnétiques se propagent à la même vitesse, soit celle de la lumière ($c = 3 \times 10^8$ km/s). La quantité d'énergie transportée par les radiations électromagnétiques est directement proportionnelle à la fréquence d'oscillation de l'onde dont l'unité de mesure est le Hertz (Hz=nombre de cycle par seconde). Le spectre des ondes électromagnétiques comporte des ondes de fréquence variant de 0 Hz à 3×10^{22} Hz (Figure 2). Les ondes les plus énergétiques

sont les radiations ionisantes (rayons X et les radiations gamma); elles transportent suffisamment d'énergie pour briser des liens chimiques à l'intérieur des molécules biologiques. Au bas du spectre, on retrouve le champ statique (0 Hz) n'émettant aucune énergie; c'est le cas du champ géomagnétique terrestre. La lumière visible, les micro-ondes et les ondes radio font également partie de la grande famille des ondes électromagnétiques. Les fréquences associées à l'électricité se situent dans la région de moins de 300 Hz (ELF; pour Extremely Low Frequency; Figure 2), avec des fréquences de 50 Hz en Europe et de 60 Hz en Amérique du Nord. L'énergie transmise par ces ondes est extrêmement faible et ne pourrait théoriquement briser des liens covalents comme le feraient les radiations ionisantes. De plus, il est suggéré que l'énergie thermique véhiculée par ces ondes n'est pas assez élevée pour affecter l'activité cellulaire d'une manière significative (Bennett, 1994, 1995).

1.2 Sources de champs magnétiques

Les champs électromagnétiques ELF sont omniprésents dans les milieux industrialisés. Jusqu'à présent, les études suggèrent que la composante électrique ne comporte aucun risque pour la santé humaine et animale (Savitz, 1993). Depuis l'étude de Wertheimer et Leeper en 1979, plusieurs groupes de chercheurs se sont intéressés à la composante magnétique des CEM.

Figure 1: Différence entre le champ électrique et le champ magnétique.

Le champ électrique est produit par les charges et dépend du voltage. Une lampe branchée, en absence ou en présence d'un courant électrique, produit un champ électrique. Le champ magnétique est créé par le mouvement des charges et dépend de l'intensité du courant électrique circulant à l'intérieur du fil conducteur: il ne sera donc produit que lorsque la lumière est allumée.

(champs électriques:  ; champs magnétiques:  ; courant électrique: )

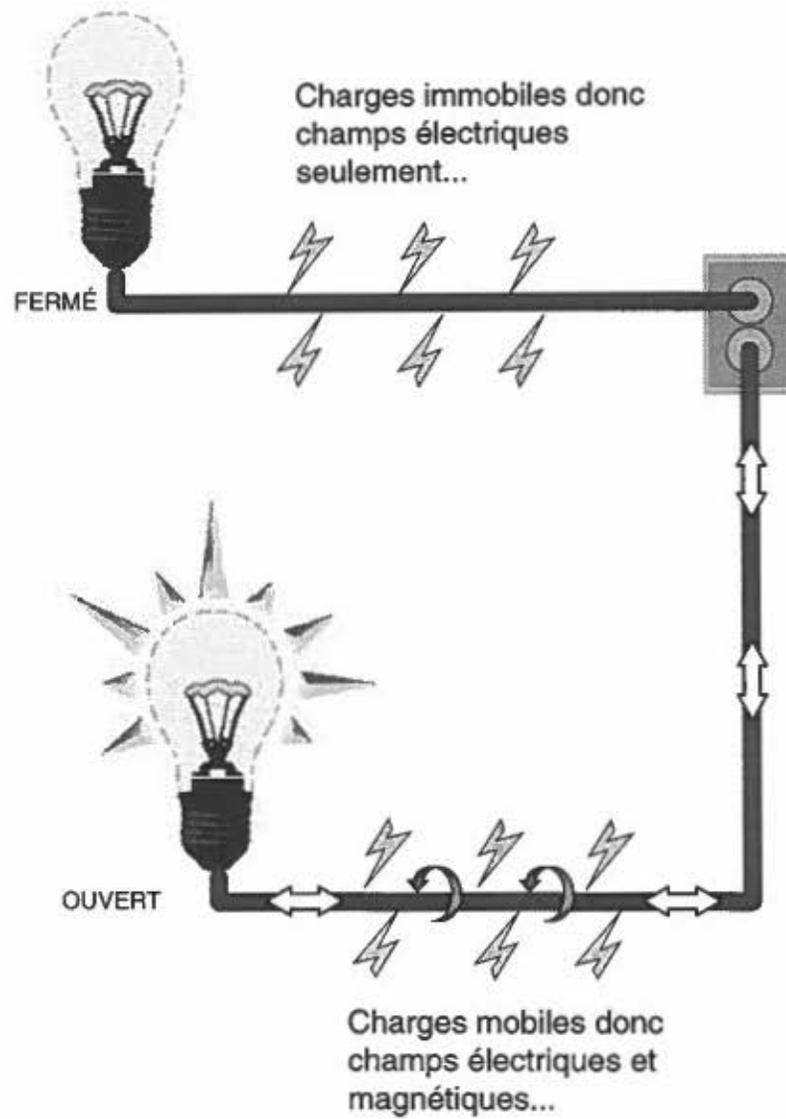
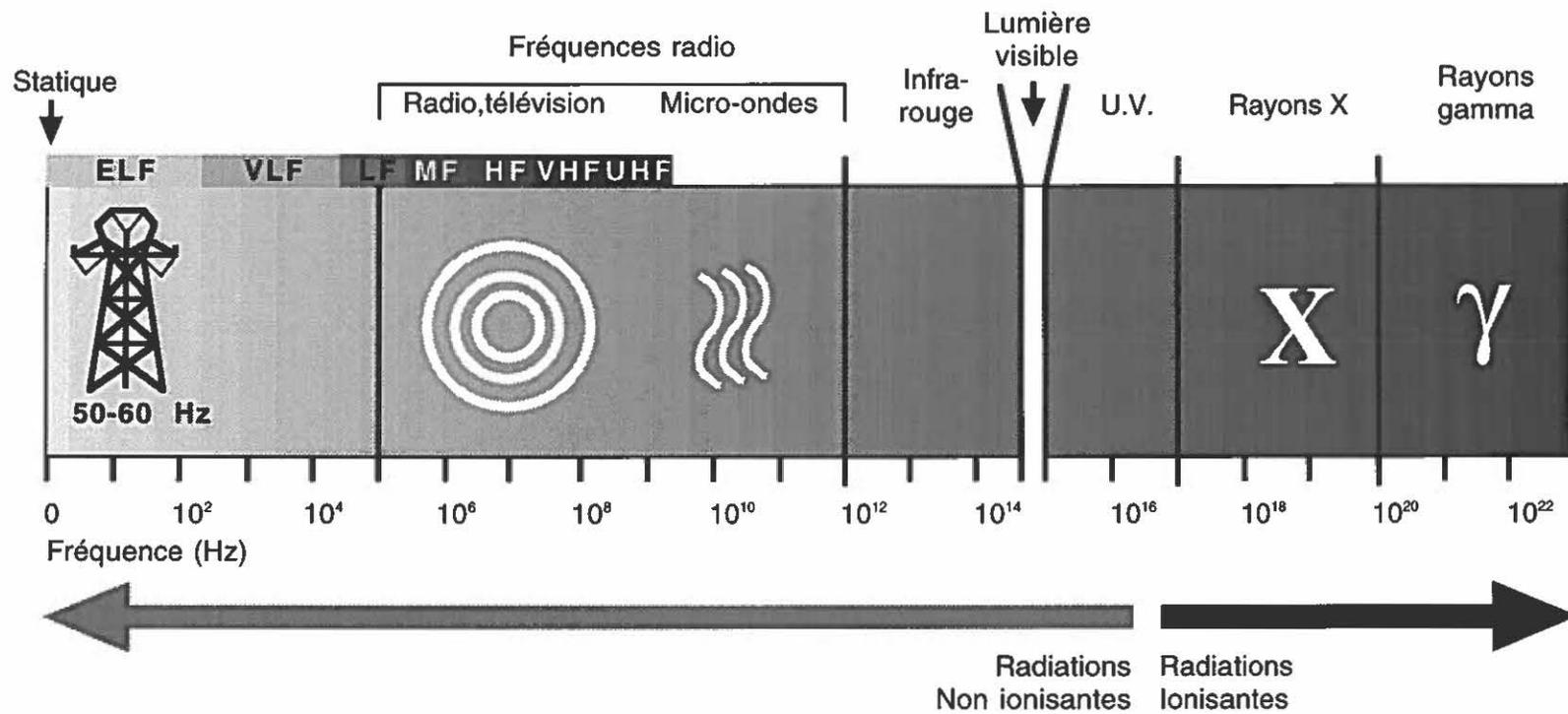


Figure 2: Spectre de fréquences des ondes électromagnétiques.

Ce schéma illustre les fréquences d'oscillation correspondant aux différentes radiations électromagnétiques. L'énergie transportée par ces ondes est directement proportionnelle à la fréquence d'oscillation de l'onde. Ce spectre est divisé en deux sections: les radiations ionisantes, et les radiations non ionisantes. Les champs magnétiques de 50-60 Hz se situent dans la zone ELF ("Extremely Low Frequency"; échelle adaptée de Bennett, 1995).

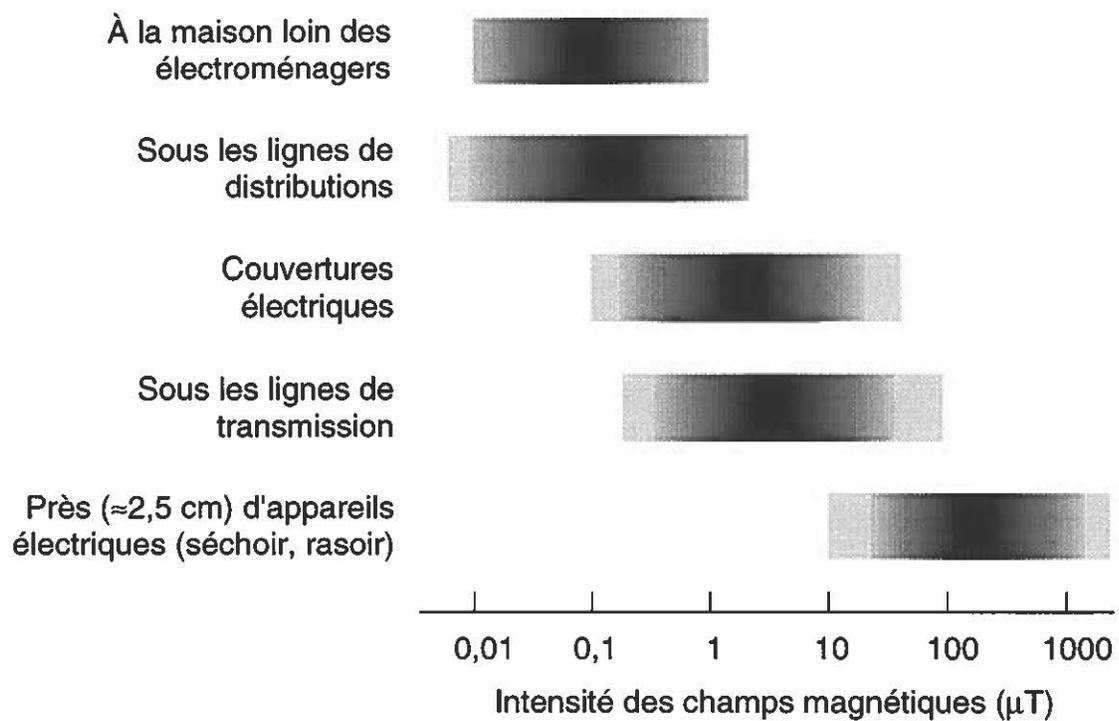


Les CM présents dans notre environnement proviennent de diverses sources, d'origine naturelle ou humaine. Parmi les CM d'origine naturelle, il y a le champ magnétique terrestre dont l'intensité moyenne est de $50 \mu\text{T}$ et qui varie selon notre position géographique: $30 \mu\text{T}$ à l'équateur et $70 \mu\text{T}$ près des pôles géographiques (Bennett, 1995). De plus, comme ce champ est statique ($\approx 0 \text{ Hz}$), il ne peut donc induire aucun courant électrique dans les organismes vivants (courants "Eddy") comme le ferait un champ magnétique ondulatoire. Les phénomènes naturels comme les orages électriques ou l'activité solaire peuvent aussi produire des CM d'ELF. Cependant leur intensité est habituellement très faible, de l'ordre de $0,01 \mu\text{T}$ (Kaune, 1993)

Les CM d'ELF d'origine humaine proviennent de différentes sources et leur intensité varie en fonction du carré distance de la source. De plus, ils peuvent produire différentes formes d'ondes électromagnétiques. Ainsi, les CM produits par les lignes électriques ont une forme sinusoïdale, alors que les champs magnétiques utilisés en médecine pour la réparation de fractures osseuses ont une forme pulsée. L'intensité moyenne des CM retrouvés à l'intérieur des résidences est d'environ $0,3 \mu\text{T}$. Sous des lignes de distribution, le niveau d'intensité approche les $15 \mu\text{T}$. Les CM produits par un rasoir électrique ou un séchoir à cheveux peuvent atteindre des intensités très importantes, lorsqu'ils sont utilisés à proximité ($1000 \mu\text{T}$ à $2,5 \text{ cm}$). Dans l'industrie de l'acier, les intensités retrouvées sont parmi les plus élevées et peuvent varier de 8000 à $70\,000 \mu\text{T}$ (Tenforde et Kaune, 1987; Grandolfo, 1993) (Figure 3).

Figure 3: Niveaux d'intensité des champs magnétiques rencontrés en Amérique du Nord.

Ce schéma illustre les niveaux d'intensité (μT) des champs magnétiques de 60 Hz mesurés en Amérique du Nord. (Adapté de Tenforde et Kaune, 1987).



2. EFFETS BIOLOGIQUES DES CHAMPS MAGNÉTIQUES

2.1 Études épidémiologiques

On peut regrouper les études épidémiologiques sous trois catégories principales: (1) les expositions résidentielles, déterminées par le type de lignes électriques situées à proximité des demeures; (2) les expositions près d'appareils électriques comme les couvertures électriques et les lits d'eau chauffants; (3) les expositions occupationnelles, où les travailleurs sont exposés près d'équipements produisant de fortes intensités comme les générateurs électriques, les appareils de transmission, un moteur électrique ou des photocopieurs (Savitz, 1993).

Dans la première catégorie d'études, la relation entre les expositions résidentielles et le cancer chez les enfants a sonné l'alarme et a déclenché la controverse à propos de l'effet des champs magnétiques de 50-60 Hz sur la santé humaine. Nous soulignerons les principales études de cette catégorie.

2.1.1 Exposition résidentielle près des lignes de distribution et les risques de cancer chez les enfants

Wertheimer et Leeper (1979) ont été les premiers à rapporter une relation possible entre une exposition résidentielle aux champs magnétiques et le développement de cancers. Cette première étude a été conduite à Denver au Colorado et a montré que les enfants vivant dans des demeures à "haute intensité" avaient de 1,5 à 3 fois plus de risques (risque relatif) de mourir d'un cancer, comparativement aux enfants habitant dans un environnement à "faible intensité".

La validité du "code de Wertheimer et Leeper" comme indicateur de l'intensité des champs magnétiques, a été critiquée par plusieurs auteurs. En effet, pour estimer l'exposition aux CM, Wertheimer et Leeper considéraient les lignes de distribution adjacentes à la maison comme source majeure d'exposition résidentielle. L'exposition des individus a été évaluée selon la configuration des lignes électriques (type, grosseur, nombre de câbles, etc.) et la proximité de la résidence. Les études utilisant le code de Wertheimer et Leeper concernent uniquement les champs magnétiques et non les champs électriques (Savitz, 1993).

L'étude de Savitz et *al.* (1988) fut aussi menée à Denver. En plus d'utiliser le "code de Weitheimer-Leeper", les chercheurs ont mesuré l'intensité des CM à l'intérieur et sur le palier de la maison. Dans cette étude, les risques de cancer chez les enfants vivant dans une maison à "haute intensité" (estimé par la configuration des câbles) étaient 1,5 fois plus élevés que chez ceux vivants dans des demeures à "faible intensité" de CM. Par contre, les facteurs de risque n'étaient plus significatifs lorsque les mesures directes de l'intensité des CM étaient comparées.

Les résultats rapportés par London et *al.* (1991) confirment sensiblement ceux de Savitz et *al.* (1988). Cette étude avait de grands avantages par rapport aux études précédentes; elle fut conduite dans une autre ville que Denver (Los Angeles) et l'intensité des CM était mesurée sur une période de 24 heures, donnant ainsi beaucoup plus d'informations sur l'exposition des individus. Cependant, malgré l'utilisation de méthodes de mesures plus complexes, aucune relation statistiquement significative entre une exposition aux CM et le risque de cancer chez les enfants n'a été décelée. Par contre les résultats obtenus avec le "code de Weitheimer-Leeper", montraient une relation significative entre les risques de leucémie chez les enfants et la proximité des configurations à "haute intensité" (risque relatif 2.15).

2.1.2 Exposition résidentielle près des lignes à haute tension et les risques de cancer chez les enfants

Cette série d'études a été menée dans trois pays scandinaves: la Suède, le Danemark et la Finlande. Elles furent publiées en 1993 et traitaient de la relation entre les expositions résidentielles près des lignes à haute tension de 50 Hz (lignes de transport), et le cancer chez les enfants (Tableau 1).

La première étude, menée en Suède par l'équipe de Feychting et Ahlbom (1993), porte sur des individus habitant à moins de 300 m des lignes de transmission de 220 et 400 kV. L'exposition aux CM a été estimée en mesurant directement l'intensité puis en calculant l'intensité des CM à l'aide d'un modèle informatique qui tient compte de différents paramètres (la distance de l'installation électrique, le type de lignes électriques, le type de pylône, la date de construction et de l'intensité du courant). Les risques de leucémie étaient de 2,7 (0,2 μ T et plus) et de 3,8 (0,3 μ T et plus) fois plus élevés chez les enfants vivant près des lignes de 220 et 440 kV. Ces effets étaient présents lorsque les intensités de champs magnétiques étaient estimées par le logiciel informatique, et non avec les intensités mesurées à l'intérieur des résidences. Aucune association n'a été retrouvée avec d'autres cancers: tumeur du système nerveux central, lymphôme, et tous les cancers infantiles combinés.

D'autre part, l'équipe de Olsen et *al.* (1993) a déterminé les risques de cancer chez les enfants habitant près de lignes à haute tension de 50-400 kV au Danemark. Les risques de tous les types de cancers combinés étaient 5,6 fois plus élevés près des installations produisant des intensités de CM plus grandes ou égales à 0,4 μ T. Lorsque l'intensité calculée était supérieure ou égale à 0,25 μ T, l'association n'était plus significative.

Une autre étude (Verkasalo *et al.*, 1993) avait pour but de déterminer le risque de cancer chez des enfants vivants à l'intérieur de 500 m des lignes électriques de 110-400 kV d'intensités supérieures ou égales à 0,01 μ T (Finlande). Aucune augmentation significative de cancer n'a été notée, excepté l'apparition de cancers du système nerveux central chez des garçons exposés à des intensités calculées plus grandes ou égales à 0,2 μ T.

2.2 Études expérimentales

Les études épidémiologiques furent les premières à mettre en évidence les effets d'une exposition aux champs magnétiques sur la santé. Ces études présentent deux grandes faiblesses: (1) la difficulté d'estimer l'exposition réelle aux champs magnétiques; (2) la présence de certains facteurs pouvant fausser les résultats de l'étude, comme: le statut économique, la densité du trafic, la mobilité de la famille, le facteur urbain/rural, la densité de la population, le type d'habitation, les expositions aux herbicides, pesticides ou autres substances (Jauchem, 1993). Les études *in vitro* et *in vivo* deviennent donc importantes, car tous les facteurs d'exposition peuvent être contrôlés.

2.2.1 Exposition *in vitro*

Différents chercheurs ont exposé *in vitro* différentes cellules du système immunitaire à des CM de formes pulsées ou sinusoïdales.

Tableau 1: Résultats de trois études Scandinaves (1993) sur les effets d'une exposition résidentielle aux champs magnétiques.

	Risque de leucémie	Risque de cancer du cerveau	Risque de lymphôme	Risque de tous les cancers
Fechting & Ahlbom ($\geq 0,2 \mu\text{T}$)	2,7 (1,0-6,3) ^a	0,7 (0,1-2,7)	1,3 (0,2-5,1)	1,1 (0,5-2,1)
Olsen et al. ($\geq 0,25 \mu\text{T}$)	1,5 (0,3-6,7)	1,0 (0,2-5,0)	5,0 (0,3-4,2)	1,5 (0,6-4,1)
Verkasalo et al. ($\geq 0,2 \mu\text{T}$)	1,6 (0,3-4,5)	2,3 (0,8-5,4)	0,0 (0,0-4,2)	1,5 (0,7-2,7)
Résultats regroupés	2,1 (1,1-4,1)	1,5 (0,7-3,2)	1,0 (0,3-3,7)	1,3 (0,9-2,1)

a Risque relatif (intervalle de confiance) i.e. la chance de retrouver des cas de cancer dans une population (enfants) exposée à de hautes intensités de champs magnétiques, divisée par la chance de retrouver des cas de cancer dans la population servant de témoin.

(Adapté de Carpenter, 1994)

Comme il fut mentionné précédemment, les champs magnétiques de 50-60 Hz ne transportent pas suffisamment d'énergie pour briser les liens chimiques des molécules biologiques comme l'ADN. Plusieurs études *in vitro* confirment cette hypothèse par l'absence de mutations, d'aberrations chromosomiques, d'échanges de chromatides soeurs ou de perturbations du cycle cellulaire (Cohen et *al.*, 1986; Nafziger et *al.*, 1993; Paile et *al.*, 1995). Cette absence de pouvoir mutagène peut suggérer que les champs magnétiques ne peuvent initier le développement d'un cancer.

La membrane cellulaire semble être une cible majeure des champs magnétiques d'ELF. Dans une étude on a évalué si les CM sinusoïdaux de 2500 μ T pouvaient induire des changements dans les propriétés électriques de la membrane de cellules leucémiques. Les résultats indiquent que les CM diminuent la conductivité et la permittivité (constante diélectrique) de la membrane plasmique. Une diminution de la conductivité suggère une altération dans le transport de certains ions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ , Mg^{2+} et Cl^-). La permittivité est indirectement dépendante des changements de conductivité, car elle indique un changement à la surface membranaire au niveau des protéines (comme les canaux ioniques), des lipides ou les deux (Santini et *al.*, 1995).

Le transport des ions comme le calcium semble en effet être altéré par les champs magnétiques d'ELF. Walleczek et Liburdy (1990) ont rapporté une augmentation de 170% de l'influx de calcium chez des thymocytes de rats stimulés avec de la Con A et exposés aux CM de 22 000 μ T. Dans le même sens, l'étude de Lyle et *al.* (1991) rapporte une hausse de 37% de l'influx de calcium chez des lymphocytes spléniques murins exposés à des CM de 20 μ T. D'autres augmentations ont également été observées chez des lignées leucémiques (Lindström et *al.*, 1993, 1995; Carson et *al.*, 1990). Par contre, Coulton et Barker (1993) n'ont rapporté aucun changement de la concentration intracellulaire de calcium sur des

lymphocytes T isolés du thymus de souris et exposés aux CM de 65,3 μ T en présence de Con A.

Différents travaux de recherche ont également démontré certains changements au niveau des structures à la surface de la membrane plasmique des cellules. Les champs magnétiques de 60 Hz et 100 μ T, semblent diminuer la susceptibilité des Colo 205 (cellules cancéreuses du colon) à la cytolyse par les cellules NK grâce à une augmentation des récepteurs de transferrine à leur surface (Phillips, 1986). D'autres données suggèrent que les CMP de 2,5 mT peuvent moduler la prolifération des lymphocytes en agissant sur l'expression des récepteurs d'IL-2 à la surface membranaire. Ces résultats furent obtenus avec des lymphocytes humains provenant de donneurs âgés (Cossarizza et al., 1989). D'autre part, les CM de 22 mT semblent modifier la structure et la fonction de la membrane plasmique des cellules T et B, en induisant le largage de protéines extracellulaires responsables de la transduction de signaux; cependant les lymphocytes B semblent moins affectés par les CM que les lymphocytes T (Liburdy et al., 1993).

Une modulation par les champs magnétiques au niveau de la membrane pourrait conduire à différents changements au niveau de l'activité des cellules immunitaires. Des modifications au niveau de la prolifération cellulaire, de la transcription d'ARN et de la production de cytokines ont déjà été observés *in vitro* par différentes équipes de chercheurs.

La prolifération cellulaire induite par des mitogènes semble être affectée par les CM. Des lectines de plantes comme la phytohémagglutinine A (PHA) et la concanavaleine A (Con A) sont utilisées comme mitogènes pour étudier le niveau d'activation des lymphocytes. Certains travaux suggèrent que les champs magnétiques pulsés (CMP) de 50 Hz diminuent la prolifération des lymphocytes périphériques humains, stimulés par PHA ou ConA (Conti et al., 1983; Petrini et al., 1990). L'équipe de Mooney et al. (1986) a aussi observé cet effet

d'inhibition des CMP sur des cellules mononucléées humaines du sang périphérique. Le groupe de Cadossi et *al.* (1985) contredit ces résultats; ils ont rapporté une augmentation de la réponse induite par la PHA chez des lymphocytes humains exposés à des CMPs de 75 Hz. Cet effet a également été noté avec la fréquence de 50 Hz et semble plus prononcé chez des lymphocytes provenant de donneurs âgés (Cossarizza et *al.* 1989).

Les champs magnétiques sinusoïdaux semblent agir sur la transcription. Des variations ont été détectées le plus souvent dans des expériences d'incorporation d'uridine ou par hybridation de type "Northern". Différents travaux suggèrent que les CM de 60 Hz augmentent la transcription d'ARN des cellules HL-60 (Human Leukemia Cell Line); en effet, des augmentations de 50-100% de la transcription de *c-myc*, histone H2B et β -actin ont été observées par Goodman et *al.* (1989), ainsi qu'une augmentation de 30-50% de l'incorporation d'uridine (Green et *al.*, 1991). Par contre, Azadniv et Miller (1992) n'ont noté aucun effet significatif des CM de 1 μ T sur la transcription.

La production de certaines cytokines semble également être affecter par une exposition aux CM. Cossarizza et *al.* (1993) ont montré une augmentation significative de la production *in vitro* de l'IL-1 β et IL-6 chez des monocytes humains exposés aux CMP de 2,5 mT en présence de PHA ou TPA. Cependant, l'exposition *in vitro* de cellules péritonéales de souris à des CM de 300 μ T ne semble pas affecter la production d'IL-1 et d'IL-6 (Morandi et *al.*, 1994).

L'activité cytotoxique de certaines cellules immunitaires peut-être également modulée par les CM. En effet, après exposition aux CM d'ELF une diminution de 25% de la cytotoxicité d'une lignée de lymphocytes T (CTLL-1) a été observée par Lyle et *al.* (1988). D'autre part, Bellosi et Dazord (1994) ont observé une augmentation de la cytotoxicité de macrophages péritonéaux de souris exposés *in vitro* à des CMP de 12 Hz ou 460 Hz.

2.2.2 Expositions *in vivo*

Peu d'études ont tenté de déterminer les effets d'une exposition *in vivo* aux CM d'ELF sur le système immunitaire. Elles reflètent davantage la complexité du système immunitaire comparativement aux études *in vitro*.

Dans le but de vérifier si les champs magnétiques sont capables d'altérer le chromosome dans un système *in vivo*, une équipe de chercheurs a évalué l'effet des champs magnétiques de 50 Hz et de 30 mT sur la prolifération cellulaire et la fréquence des échanges de chromatides soeurs chez les lymphocytes périphériques de rats (Zwingelberg et *al.*, 1993). Des rats femelles Wistar adultes ont été exposés durant 7 ou 28 jours. Contrairement aux rats traités à la cyclophosphamide (témoin positif), l'exposition aux champs magnétiques ne semble influencer ni les échanges de chromatides soeurs, ni la prolifération des cultures de lymphocytes périphériques. Les champs magnétiques ne semblent pas avoir la capacité d'entraîner des dommages cytogéniques. Ces résultats suggèrent que les champs magnétiques ne pourraient initier un cancer, mais agiraient plutôt comme promoteur ou co-promoteur d'un cancer déjà initié.

Des études *in vivo* traitent d'ailleurs des effets sur la promotion ou la co-promotion de cancers par les CM. Baum et *al.* (1995) ont exposé des rats femelles Sprague-Dawley adultes à des champs magnétiques de 50 Hz, d'une intensité de 100 μ T et d'une durée continue de 3 mois. Les animaux étaient préalablement traités avec un initiateur de cancer des glandes mammaires (DMBA; 7,12-diméthyl-benz[a]anthracène). Dans cette étude, les champs magnétiques ne semblaient pas modifier l'incidence des lésions mammaires; ils ont

seulement accéléré la croissance des tumeurs, appuyant l'hypothèse d'un rôle de co-promoteur des champs magnétiques. De plus, les rats exposés aux CM présentaient plus de tumeurs malignes; le nombre de métastases et de lésions primaires dans les autres organes ne semblaient pas être affecté. L'étude de Mevissen *et al.* (1995) montre une augmentation de l'activité de l'ornithine décarboxylase (ODC) au niveau des glandes mammaires et de la rate, chez des rats exposés aux CM de 50 μ T pendant six semaines. L'ODC est impliquée dans la biosynthèse des polyamines, qui jouent un rôle dans le contrôle de l'expression des gènes et de la prolifération cellulaire. Lösher *et al.* (1993) ont confirmé également l'effet de promotion/co-promotion des CM. Les rats exposés pour une période de 3 mois aux CM de 100 μ T présentaient 50 % plus de tumeurs induites au DMBA par rapport au groupe témoin. D'autre part, l'équipe de McLean *et al.* (1991) avaient exposé des souris adultes à des champs magnétiques de 2000 μ T pendant 21 semaines (6 h/jours). Les animaux étaient traités au DMBA et à un promoteur de la carcinogénèse (TPA:12-O-tétradécanoylphorbol-13-acetate). Les résultats obtenus suggèrent que les champs magnétiques pourraient affecter la croissance des tumeurs par une dépression de l'activité des cellules NK.

D'autres laboratoires se sont intéressés à l'interaction des CM sur les cellules NK. Les résultats obtenus par Malter *et al.* (1987) ne montrent aucune variation significative de l'activité cytotoxique des cellules NK spléniques chez des rats adultes exposés à des CMP de 50 Hz (26 mT) pendant 8 jours. Par contre, une augmentation de l'activité des cellules NK spléniques a été observée après exposition de souris Balb/c adultes (âgées de 6 à 12 semaines) à des CMP de 0,8 Hz (30 mT) pendant 5 jours. Chez des souris de 24 semaines, aucune variation significative de l'activité NK n'a été rapportée (Seze *et al.*, 1993). Un autre groupe de chercheurs (House *et al.*, 1995) n'a observé aucune variation significative de l'activité des cellules NK chez des rats F344/N (mâle ou femelle) exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz durant 6 et 13 semaines.

Le profil hématologique pourrait être modulé par les CM. L'étude de Picazo *et al.* (1994) montre, chez des souris exposées pendant 3 mois à des CM de 100 μ T, une diminution des comptes leucocytaires et des pourcentages de lymphocytes et monocytes provenant du sang périphérique. Par contre, les CM de 20 mT ne semblent pas affecter les leucocytes du sang périphérique murins après une semaine d'exposition (Lorimore *et al.*, 1990).

La production d'IL-1 et celle d'anticorps spécifiques ont été évaluées chez des agneaux Ewe soumis aux champs électromagnétiques de 3,76 μ T produits par des lignes de transmission de 500 kV. Les données suggèrent une diminution de l'activité IL-1 après 10 mois d'exposition mais la production d'anticorps spécifiques n'est pas modifiée de manière significative (McCoy et Hefeneider, 1993).

Jankovic *et al.* (1991) ont utilisé comme modèle *in vivo* des rats Wistar adultes pour évaluer l'effet des CM sur l'immunité humorale et cellulaire. Un champ magnétique statique de 60 mT a été appliqué localement au niveau du système nerveux central à l'aide de micro-aimants. Ils ont noté un effet immunomodulateur des CM après 24 et 34 jours d'exposition sur les cellules formant des plages (PFC), des réactions d'hypersensibilité et le développement de l'encéphalomyélite allergique expérimentale. De plus, après 14, 24 ou 34 jours d'exposition, ils ont observé une augmentation des lymphocytes T auxiliaires (CD4⁺) et une diminution des lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺), entraînant ainsi une augmentation du rapport CD4/CD8. Cependant, la modulation du système immunitaire par des CM statiques semble moins prononcée chez les animaux qui ont subi une ablation de la glande pinéale (Jankovic *et al.*, 1994).

Dans notre laboratoire (Tremblay *et al.*, 1996), l'influence des CM de 60 Hz a été évaluée sur les réponses des cellules du système immunitaire. Des rats Fisher 344/N ont été exposés à différentes intensités de CM (2, 20, 200 et 2000 μ T) de la période prénatale

jusqu'à l'âge de 6 semaines. Différents paramètres ont été étudiés: l'activité des cellules NK spléniques, le phénotypage des populations de lymphocytes T et B, ainsi que les productions de TNF et de H_2O_2 par les cellules péritonéales. Les CM augmentent de manière dose-dépendante les niveaux d'activité des cellules NK spléniques; par contre, les pourcentages de lymphocytes T $CD5^+$, $CD4^+$ et $CD8^+$ semblent être modulés négativement par les CM. Les lymphocytes B (Ig^+) et les cellules péritonéales semblent peu affectés par les CM.

2.3 Mécanismes d'action possibles

Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer l'interaction entre les champs magnétiques d'ELF et les systèmes biologiques. Toutefois, le mécanisme d'action des CM de 60 Hz avec les systèmes biologiques reste méconnu. Il est cependant admis que l'énergie thermique véhiculée par ces ondes n'est pas suffisante pour ioniser des molécules biologiques et ainsi agir comme initiateur de la carcinogénèse.

Une première hypothèse propose que les champs magnétiques agirait directement sur des magnétorécepteurs. En effet, certaines formes de vie animale peuvent interagir avec le champ magnétique terrestre par le biais de particules ferromagnétiques (Fe_3O_4); c'est le cas par exemple des abeilles et des pigeons voyageurs. Ces particules sont également retrouvées au niveau du système nerveux central des mammifères. Les CM de 50-60Hz pourraient ainsi induire un mouvement d'oscillation de ces particules et produire un volume de courant intense qui pourrait agir sur le tissu environnant (Kirschvink *et al.* 1992; Adair, 1993, 1994).

Une seconde théorie suggère que les CM agirait au niveau de la glande pinéale (Wilson *et al.*, 1990; Reiter, 1990, 1993; Lerchl *et al.*, 1991; Kato *et al.*, 1994; Yellon *et al.*, 1994). La glande pinéale produit une hormone, la mélatonine, impliquée dans différents

processus physiologiques et diminuerait l'incidence de certains cancers. La glande pinéale est un organe magnétosensible; la production de mélatonine est inhibée par le spectre visible des ondes électromagnétiques (lumière visible). Des études chez les rongeurs ont montré que les champs magnétiques de 50-60 Hz peuvent inhiber la sécrétion de mélatonine. Lerchl *et al.* (1991) suggèrent que les courants induits par les CM (courant "Eddy") seraient responsables de l'altération de la production de mélatonine.

Adey (1990) a formulé l'hypothèse que la membrane cellulaire est un site primaire des réponses cellulaires induites par les CM. Les courants induits par les CM de 60 Hz seraient détectés à la surface de la membrane cellulaire par des glycoprotéines transmembranaires participant à la transduction de signaux. Ces signaux seraient ensuite acheminés à l'intérieur de la cellule via des solitons (ondes solitaires), se propageant le long des protéines transmembranaires et transférés aux systèmes enzymatiques intracellulaires, perturbant ainsi l'activité de la cellule.

D'autres chercheurs ont proposés un effet de résonance pouvant affecter la cinétique des ions comme le calcium (Blackman *et al.* 1985; Liboff *al.* 1987; McLEod et Liboff 1988; Lednev, 1991). Un effet de résonance perturberait le transport des ions et leur attachement sur un site actif au niveau de la membrane cellulaire. Cette hypothèse expliquerait la présence "d'effets fenêtre" à certaines fréquences de CM. Les mécanismes de résonance, comme la résonance cyclotron, se basent sur les fréquences naturelles de vibration des ions. Les ions se déplacent suivant une orbite circulaire dans le champ magnétique terrestre à une fréquence donnée (fréquence cyclotron); cette fréquence dépend de la charge et de la masse de l'ion, ainsi que de l'intensité du CM terrestre. Lorsque la fréquence des CM se rapproche de la fréquence cyclotron d'un ion, un phénomène de résonance se produit, entraînant ainsi un changement dans la cinétique de la particule. Ce mécanisme implique toutefois un environnement à faible risque de collision avec les molécules voisines. Chiaberra et Bianco

(1987) suggèrent l'existence d'une zone hydrophobique à la surface des cellules, où les ligands chargés ont un faible risque de collision.

Steiner & Ulrich (1989), de même que McLaughlan (1992), ont émis l'hypothèse que les CM produits par le courant alternatif d'une fréquence appropriée pourraient augmenter la réactivité des radicaux libres. Les radicaux libres sont des molécules hautement réactives qui peuvent endommager les molécules biologiques. Ils se forment après rupture d'un lien covalent et possèdent un électron supplémentaire. La réactivité des radicaux libres est connue pour jouer un rôle dans le processus de la carcinogénèse.

3. CELLULES EFFECTRICES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

L'introduction d'une substance étrangère dans l'organisme, entraîne une cascade de réactions impliquant différents types de cellules du système réticulo-endothélial.

3.1 Cellules NK

Les cellules NK sont des cellules lymphoïdes retrouvées principalement dans la rate, les nodules lymphatiques, la moelle osseuse et dans le sang périphérique. Les cellules NK agissent comme des effecteurs de l'immunité naturelle et peuvent lyser différents types de cellules cibles, comme des cellules infectées par un virus, certaines cellules tumorales et des cellules recouvertes d'anticorps (ADCC: "Antibody dependant cellular cytotoxicity"). L'activation des cellules NK n'implique pas une mémoire immunologique et n'est pas restreinte par le complexe majeur d'histocompatibilité. L'activité des cellules NK peut-être activé par différentes cytokines, tel que l'IL-2 et l'IFN- γ (Howard et *al.* 1993). Une baisse de l'activité NK reflète une altération de l'immunité naturelle et peut entraîner une plus grande sensibilité aux maladies (Whiteside et Herberman, 1989). Des études suggèrent qu'une dépression de l'activité NK peut être un facteur de risque important dans le développement de certains cancers (Hersey et *al.*, 1979; Saemundsen et *al.*, 1981; Strayer et *al.*, 1984, 1986; Hanto et *al.*, 1985). De plus, des recherches sur des patients atteints de cancer montrent une corrélation négative entre l'activité NK et le développement de métastases (Takasugi et *al.*, 1977; Pross et Baines, 1976; Steinhauer et *al.*, 1982; Introna et Mantovani, 1983; Trinchieri et Perussia, 1984). D'autre part, les cellules NK semblent représenter une première ligne de

défense contre certains virus avant le développement de lymphocytes T cytotoxiques et d'anticorps spécifiques au virus (Santoli *et al.* 1978; Biron et Welsh, 1982; Welsh, 1986).

3.2 Lymphocytes T

Il existe plusieurs sous-populations de lymphocytes T, qui exercent différentes fonctions. Les cellules T jouent un rôle important dans le rejet de certaines tumeurs: les tumeurs allogéniques ainsi que les tumeurs induites par les rayons U.V., un agent chimique ou un virus (Shreiber, 1993).

Les cellules T auxiliaires expriment le marqueur CD4 à leur surface et produisent différentes cytokines requises principalement pour la synthèse d'anticorps, ou l'activation des cellules T cytotoxiques. La réponse des cellules T auxiliaires est induite par la présence d'antigènes associés au CMH de classe II et à l'IL-1 sécrété par les macrophages. Cette activation engendre l'expression du récepteur de l'IL-2 (rIL-2), la production de cytokines, la prolifération des cellules T et l'activation des cellules T cytotoxiques (Weiss, 1993). Les lymphocytes T auxiliaires se divisent en deux sous-populations caractérisées en fonction de leurs cytokines sécrétées: les lymphocytes Th1 produisent principalement de l'IL-2 et de l'IFN- γ , tandis que les lymphocytes Th2 sécrètent de l'IL4, IL-5, IL-6 et IL-10 (Burstein & Abbas, 1991; Mosmann *et al.*, 1986; Mosmann et Coffman, 1989; Swain *et al.*, 1991). L'IL-2 entraîne la prolifération des cellules T, des lymphocytes B, ainsi que l'activation des cellules NK et des cellules "LAK" (lymphokine activated killer). L'IFN- γ active les cellules T cytotoxiques, les cellules NK, et les macrophages, chez lesquels il induit la production de TNF- α (facteur nécrosant des tumeurs). L'IL-4 et l'IL-5 stimulent la croissance des lymphocytes B et la sécrétion d'immunoglobulines. L'IL-6 induit également la production d'immunoglobulines. L'IL-10 inhibe la synthèse de certaines cytokines, notamment l'IFN- γ ,

et stimule la production d'IgM et d'IgG (Fitch et *al.*, 1993; Howard et *al.* 1993; Koszinowski et *al.*, 1991).

Les cellules T cytotoxiques expriment le marqueur CD8 à leur surface. Elles jouent un rôle dans l'immunité dirigée contre les cellules infectées par des virus et contre les cellules tumorales (Koszinowski et *al.*, 1991; Levy, 1978; North, 1984). L'activation des cellules T cytotoxiques requiert la reconnaissance d'antigènes associés aux CMH de classe I (Carbone et *al.*, 1990; Cassell et *al.*, 1988; Keene et Forman 1982; Townsend et Bodmer, 1989), et l'attachement aux récepteurs (rIL-2) de l'IL-2, cytokine sécrétée par les cellules T auxiliaires activées.

3.3 Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont les précurseurs des plasmocytes, les cellules productrices d'anticorps (Kincade et Gimble, 1993). Les cellules B ont à leur surface des immunoglobulines (Ig) et des molécules du CMH de classe II. L'activation des cellules B implique la liaison de l'antigène via les récepteurs d'immunoglobulines ainsi que d'autres facteurs comme la production d'IL-4 et d'IL-5 lors de l'activation des lymphocytes T auxiliaires par le même antigène (DeFranco, 1993). Les cellules T auxiliaires en présence d'antigènes associés aux CMH II à la surface des cellules B peut aussi induire la réponse de ces dernières (Noelle et Snow, 1991; Burstein et Abbas, 1991; Clark et Lane, 1991). Les lymphocytes B activés peuvent proliférer et se différencier en plasmocytes, qui jouent un rôle important dans la synthèse et la sécrétion d'anticorps de même spécificité que les récepteurs membranaires des lymphocytes B. L'activation et la prolifération des cellules B permet également de fournir des cellules B matures, capables de répondre plus rapidement à une immunisation subséquente.

Le rôle des cellules B dans la régulation de l'immunité contre les tumeurs n'est pas encore élucidé. Il ne semble pas y avoir de corrélation entre une forte réponse humorale contre les antigènes tumoraux et la résistance de l'hôte aux tumeurs (Shreiber, 1993).

3.4 Macrophages

Les macrophages sont des cellules phagocytiques jouant un rôle important dans l'inflammation. Leur fonction dans l'initiation d'une réponse immunologique implique l'ingestion de l'antigène, sa transformation, et sa présentation aux cellules T auxiliaires (Unanue, 1993). De plus les macrophages sont aussi impliqués dans les phénomènes de phagocytose et peuvent agir comme cellules effectrices contre les microorganismes et les cellules tumorales en synthétisant différents produits toxiques comme le TNF- α , les métabolites de l'oxygène, l'oxyde nitrique, les lysozymes, les protéases et les dérivés de l'acide arachidonique (Nathan, 1987; Unanue, 1993).

Le TNF- α est l'un des facteurs impliqués dans l'activité cytotoxique des macrophages, il est principalement produit par les macrophages activés (Carswell *et al.*, 1975; Fish et Gifford, 1983). Cette cytokine a été décrite comme étant une protéine présente dans le sérum d'animaux traités au BCG (Bacille de Calmette et Guérin) et au LPS (lipopolysaccharide), capable de produire la nécrose hémorragique ainsi que la régression de certaines tumeurs (Carswell *et al.*, 1975). Le TNF- α peut distinguer certaines cellules tumorales des cellules normales et n'a pas de spécificité d'espèce (Ruddle, 1987). L'expression des récepteurs du TNF- α sur les cellules-cibles est nécessaire, mais leur présence ne détermine pas leur sensibilité aux effets cytotoxiques du TNF- α (Ortaldo *et al.*,

1986; Spriggs *et al.*, 1987). Le TNF- α peut également augmenter l'expression des récepteurs de l'IL-2 et la sécrétion d'IFN- γ (Scheurich *et al.*, 1987).

Les produits dérivant du métabolisme d'oxydation, comme l'anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) constituent également un mécanisme de cytotoxicité des macrophages (Meltzer et Nacy, 1989). Ces deux composés sont produits lors de la "flambée oxydative" (oxidative respiratory burst) suite à la réduction de l' O_2 en O_2^- par un complexe oxidase associé à la membrane. C'est l'enzyme superoxyde dismutase qui catalyse cette réaction, produisant ainsi deux composés très toxiques impliqués dans la destruction intracellulaire des microorganismes pathogènes (Unanue, 1993). Ce processus est initié par la phagocytose ou la liaison avec un récepteur approprié.

4. OBJECTIF DE LA RECHERCHE

Les champs magnétiques semblent avoir des effets importants sur le système immunitaire et la santé des individus. Dans cette étude nous avons voulu étudier les effets d'une exposition prolongée aux champs magnétiques de 60 Hz sur différentes réponses immunitaires chez le rat. Nous avons opté pour un modèle *in vivo* ; contrairement aux modèles *in vitro*, les études de ce genre sont peu nombreuses et tiennent compte des interactions entre les différentes populations de cellules. De plus, comme il s'agit d'une étude en laboratoire, les conditions expérimentales peuvent être mieux contrôlées.

Cette étude fait suite à celle de Tremblay *et al.* (1996) où les réponses des cellules du système immunitaire chez le rat F344/N ont été évaluées après 6 semaines d'exposition aux CM de 60 Hz. Afin de déterminer la présence d'une relation dose-réponse, nos animaux ont été soumis à différentes intensités de champs magnétiques (2, 20, 200, et 2000 μ T)

retrouvées dans notre environnement. Les champs magnétiques utilisés correspondent à ceux produits par le courant alternatif en Amérique du Nord: ils ont une forme sinusoïdale et une fréquence de 60 Hz. Pour déterminer l'influence des champs magnétiques en fonction du temps de l'exposition, les animaux ont été exposés pendant 3, 6 et 9 mois à partir de la période prénatale.

L'immunotoxicité d'agents environnementaux a été évaluée par différents tests immunitaires (Dean *et al.* 1982; Trizio *et al.* 1988; Sjoblad, 1988; Vos *et al.* 1989; Hoyle et Cooper, 1990; Luster *et al.* 1988, 1992, 1993). L'étude d'un seul paramètre immunitaire n'est pas suffisant pour révéler une perturbation au niveau d'un système aussi complexe que le système immunitaire. Luster *et al.* (1992,1993) suggèrent que l'évaluation de 2 ou 3 réponses immunitaires est suffisante pour prédire l'immunotoxicité d'agents environnementaux chez les rongeurs. Ces études montrent une relation entre une perturbation du système immunitaire et l'altération de la résistance de l'hôte face aux agents pathogènes ou aux cellules tumorales. Parmi les tests immunologiques montrant une grande association avec un effet immunotoxique, notons le phénotypage des populations lymphocytaires (CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺ et Ig⁺), la détermination de l'activité des cellules NK, les PFC, et la réponse des cellules T à un mitogène (Luster *et al.*, 1992). D'autres analyses concernant la réponse des macrophages ou l'hématologie, peuvent aussi aider à confirmer la présence ou l'absence d'une altération du système immunitaire, même s'ils sont de moins bon indicateurs.

Afin d'évaluer l'effet des CM sur les cellules du système immunitaire, nous avons analysé différentes réponses immunitaires. Les paramètres étudiés sont sensiblement les mêmes que ceux utilisés par Tremblay *et al.* (1996). Ils ont été sélectionnés en se basant sur les tests utilisés dans les études d'immunotoxicologie et regroupent différentes populations de cellules immunitaires. Parmi les tests effectués sur les cellules spléniques, il y a la détermination de l'activité lytique non-spécifique des cellules NK, l'énumération des

lymphocytes T (auxiliaires et cytotoxiques) et B, ainsi que la production d'IL-2 en présence d'un mitogène. La fonction et l'activation des macrophages péritonéaux a également été étudiée en mesurant la production d'H₂O₂ intracytoplasmique ainsi que la production de TNF- α . De plus le profil hématologique (compte leucocytaire et différentiel) a été examiné au niveau du sang périphérique.

L'originalité de ce travail tient au modèle expérimental utilisé, ainsi qu'aux différentes réponses immunitaires étudiés. En effet, notre étude *in vivo* se distingue par: (1) les intensités, la forme et la fréquence de champs magnétiques utilisés; (2) une exposition des animaux débutant dès le vingtième jour de gestation; (3) des périodes d'exposition prolongées; (4) un contrôle informatisé de la salle d'exposition; (5) les paramètres immunitaires sélectionnés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. EXPOSITION DES ANIMAUX AUX CHAMPS MAGNÉTIQUES

1.1 Description de la salle d'exposition

Dans l'animalerie de l'édifice # 25 (IAF, Laval, Québec, Canada), il y a deux chambres où logent les animaux: la salle d'exposition et la salle de contrôle. La salle d'exposition a été conçue afin d'exposer les animaux aux champs magnétiques dans un environnement bien contrôlé (Mandeville et *al.*, 1993).

La salle d'exposition contient 20 modules d'exposition identiques divisés en 5 groupes de 4 unités. Chaque module permet d'exposer 16 rats aux champs magnétiques de 60 Hz dont l'intensité varie de 2 à 2000 μT . Ces modules d'exposition ont été conçus par le Dr S. Harvey (Hydro Ontario) et fabriqués par Westinghouse Canada (Pointe-Claire, Québec, Canada).

La fréquence des champs magnétiques est de 60 Hz, de forme sinusoïdale sans aucun contrôle spécial des harmoniques. Ces champs sont linéaires sur un plan horizontal avec une orientation Sud-Est. Les intensités de courant produites ont un rapport de 1:10:100:1000, donnant des intensités de champs magnétiques de 2, 20, 200 et 2000 μT . Un autre groupe constitue un témoin ("sham"), car le courant passant dans les solénoïdes est de zéro et l'intensité est $<0,025 \mu\text{T}$ (bruit de fond). La distance entre les modules est telle, que les champs magnétiques produits par une unité d'exposition ne peuvent influencer les modules de la rangée voisine. La configuration en forme de "8" des bobines permet d'annuler les champs électriques et de donner aux champs magnétiques une plus grande uniformité (9%) à l'intérieur du volume délimité par les bobines et une diminution rapide des champs à l'extérieur du module d'exposition. De plus, quatre appareils de chauffage ont été installés sur les modules de faible intensité ("sham", 2, 20, 200 μT), afin d'ajuster la température à

celle retrouvée dans le groupe de 2000 μ T. La mise en marche et l'arrêt de l'exposition se fait graduellement.

Dans la salle d'exposition, les cages sont en polycarbonate, d'une dimension non standard (28,5 x 28,5 x 18cm) avec un couvercle en acier inoxydable. Elles sont placées sur des plateaux de polycarbonate par groupe de quatre (soit 8 cages/module). Les mangeoires sont en céramique et les bouteilles d'eau en verre afin d'éviter les électrochocs.

1.2 Contrôle de la qualité

Les conditions d'exposition ont été présélectionnées afin de simuler les expositions humaines. Le système est opéré et entretenu par le personnel de l'IREQ (Institut de recherches d'Électricité d'Hydro Québec) sous la direction du Dr. S. Maruvada. L'exposition est réalisée en double aveugle; le personnel impliqué dans les opérations de contrôle du système électrique ne peut, en aucun cas, être associé aux soins des animaux et vice versa, le personnel technique ne peut connaître l'intensité des champs à laquelle sont exposés les animaux.

Afin d'assurer une exposition égale au champ magnétique terrestre, un système a été conçu permettant la rotation des cages à l'intérieur de chaque module et des modules à l'intérieur de la salle d'exposition.

Les salles, d'exposition et de contrôle sont soumises à un environnement contrôlé. Chaque paramètre est mesuré à l'aide de sondes spécifiques: la température ambiante, l'humidité, la lumière, et le bruit. De plus, l'accès à la salle d'exposition est interdit lorsque le courant est activé dans les bobines. Le système intégré et informatisé SEMS 600 (Stand Alone Energy Management System; Landis & Gyr Powers Ltd) contrôle ces différents

paramètres, une alarme étant déclenchée quand l'un des paramètres mesurés dépasse les valeurs acceptables préalablement sélectionnées.

1.3 Protocole d'exposition

Des rats Fisher 344/N mâles et femelles ont débuté leur exposition aux champs magnétiques in utero (vingtième jour de gestation; environ 3 jours avant la naissance). L'exposition était de 20 heures par jour, 10 heures pendant la nuit et 10 heures pendant le jour.

Trois groupes de rats (8 animaux/intensité) ont été exposés pendant 3 (15 semaines), 6 et 9 mois aux différentes intensités de champs magnétiques (2, 20, 200 et 2000 μ T). Deux groupes témoins ont été utilisés: un groupe témoin à l'intérieur de la salle d'exposition, le "sham", et un second (contrôle de colonie) localisé dans la salle de contrôle. Chaque temps d'exposition a été effectué en double, donc un total de 16 rats par groupe.

2. CULTURE CELLULAIRE

2.1 Origine des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires continues YAC-1, CTLL-2 et L929 ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA). La lignée YAC-1 dérive d'un lymphôme murin induit par le virus leucémique de Moloney. Elle est utilisée pour la détermination de l'activité des cellules NK de rat et de souris. La lignée CTLL-2 est un clone de cellules T cytotoxiques dérivé de souris C57B1/6, employées pour le dosage de l'interleukine-2 (IL-2). Les cellules L929 sont des cellules fibroblastiques murines sensibles

à l'activité cytolytique du facteur nécrosant des tumeurs (TNF- α) et sont utilisées pour le dosage de cette cytokine.

2.2 Culture des cellules

2.2.1 Cellules YAC-1

Les cellules YAC-1 étaient cultivées dans du milieu RPMI-1640 (Gibco BRL, Life Technologie inc., Grand Island, NY, USA) supplémenté de 10% de sérum foetal bovin (SFB; Gibco BRL), 10 mM d'acide N-2-hydroxyéthyl-piperazine-N2-éthanesulfonique (HEPES; Gibco BRL) et 100 U/ml de pénicilline G, 100 μ g/ml de sulfate de streptomycine, 0,25 μ g/ml d'amphotéricine (Antibiotiques-antimycotique 100X; Gibco BRL). Le compte cellulaire était effectué à l'aide d'un hématimètre (Scientific Instrument Division, Ny, USA), en excluant les cellules mortes au bleu trypan 0,1% (ICN Biomedicals inc., OH, USA). Les cellules étaient mises en culture à une concentration de 1×10^4 cellules/ml, et le milieu était renouvelé à tous les quatre jours.

2.2.2 Cellules CTLL-2

Les cellules CTLL-2 étaient cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Gibco BRL) enrichi de 10% de SFB, 10% de supplément de culture contenant de l'IL-2 ("T-STIM Culture Supplement Rat, with ConA", Collaborative Biomedical Products, MA, USA), 10 mM HEPES, 1% antibiotiques-antimycotique 100X, 1 mM de sodium pyruvate (Gibco BRL), 0,1 mM d'acides aminés non essentiels (Gibco BRL) et 5×10^{-5} M de 2-mercaptoéthanol (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Tous les 4 jours, elles étaient comptées et ajustées à une concentration de 4×10^3 cellules/ml.

2.2.3 Cellules fibroblastiques murines (L929)

Les cellules L929 étaient cultivées dans du milieu RPMI-1640, contenant 5% de SFB, 10 mM HEPES et 1% antibiotiques-antimycotique 100X. Tous les 3-4 jours, les cellules adhérentes étaient lavées avec 10 ml de tampon phosphate salin de Dulbecco's sans Ca^{++} , Mg^{++} (D-PBS; Gibco BRL) puis décollées avec une solution de trypsine 0,05% et d'acide diamine tétraacétique•4Na 0,53 mM (Trypsine-EDTA•4Na 1X;Gibco BRL). Elles étaient ensuite remises en culture à une concentration de 10^5 cellules/ml.

3. CELLULES SPLÉNIQUES

3.1 Préparation des cellules spléniques

Après l'euthanasie des rats par asphyxie au CO_2 , la rate de chaque animal était prélevée stérilement et triturée dans un pétri de plastique (100 x 15 mm; Fisher Brand Scientific, Canada) contenant 5 ml de solution saline équilibrée de Hank's (HBSS; Gibco BRL). Les cellules étaient récupérées dans des tubes coniques de 50 ml (Sarstedt, NC, USA) et centrifugées à 500 x g pendant 5 minutes à 4°C (IEC Centra-8R, International Equipment Company, Division of Damon, Needham, MA, USA). Les culots étaient soumis à deux chocs osmotiques. Le premier avec 10 ml d'eau distillée stérile pendant 15 secondes; l'osmolarité était rétablie avec 40 ml de HBSS. Le deuxième était réalisé avec 5 ml d'eau durant 10 secondes; l'osmolarité était rétablie avec 20 ml de HBSS. Les échantillons étaient filtrés à l'aide d'un coton stérile, puis resuspendus dans 5 ml de milieu complet (RPMI-1640, 10% SFB, 10 mM HEPES, 1% antibiotiques et antimycotique 100X). Les cellules étaient

énumérées à l'aide d'un hématimètre avec exclusion des cellules mortes au bleu trypan. Les concentrations cellulaires étaient ajustées selon le protocole utilisé.

3.2 Détermination de l'activité des cellules NK

La mesure de l'activité cytotoxique des cellules NK de rat a été effectuée par co-culture de cellules spléniques de rat (cellules effectrices) et de cellules YAC-1 (cellules cibles) marquées au ^{51}Cr . La lyse des cellules cibles était mesurée par largage du ^{51}Cr dans le surnageant.

Les cellules YAC-1 étaient lavées deux fois avec du milieu HBSS et mises en présence de 100 μCi de ^{51}Cr (ICN Radio Chemicals, CA, USA)/ 5×10^6 cellules/0,5 ml d'HBSS, puis incubées 60-75 minutes à 37°C , dans une atmosphère contenant 5% CO_2 . Les cellules étaient ensuite centrifugées à 500 x g pendant 5 minutes et lavées 3 fois avec du HBSS. Le culot était resuspendu dans 3 ml de milieu complet et la concentration cellulaire était ajustée à 10^5 cellules/ml.

Les cellules spléniques de chaque échantillon étaient distribuées en quadruplicata à raison de 100 μl /puit dans des plateaux de 96 puits à fond rond (Corning Glass Works, NY, USA). Pour chaque animal, l'activité des cellules NK spléniques était déterminée grâce à quatre rapports cellules effectrices/cellules cibles (200:1, 100:1, 50:1 et 25:1). Un volume de 100 μl de cellules cibles (YAC-1) était ensuite ajouté (10^4 cellules/puits). Pour évaluer le relargage spontané et maximal des YAC-1, les cellules effectrices étaient remplacées par 100 μl de milieu et 100 μl d'une solution de sodium dodécyl sulfate (SDS) à 1 % (ICN) respectivement. Les plateaux étaient centrifugés 4 minutes à 400 x g et incubés durant 4 heures à 37°C en atmosphère enrichie de 5% CO_2 . Les surnageants étaient récoltés à l'aide d'un système de collection de surnageants (Skatron Harvesting System, Skatron, Norvège).

La radioactivité du ^{51}Cr libéré dans les surnageants était mesurée en c.p.m. (coups par minute), à l'aide d'un compteur à radiation gamma (Beckman Gamma 7000).

L'activité NK fut exprimée en unités lytiques (UL) par 10^7 cellules, qui est définie comme le nombre de cellules effectrices par 10^7 cellules spléniques nécessaire pour lyser 20% de cellules cibles. Le pourcentage de cytotoxicité (ou % de lyse des cellules cibles) fut déterminé à l'aide de la formule suivante:

$$\% \text{ Cytotoxicité} = \frac{\text{c.p.m. de l'échantillon} - \text{c.p.m. spontané}}{\text{c.p.m. maximum}} \times 100$$

3.3 Phénotypage

Les pourcentages des différentes populations de lymphocytes ont été déterminés par cytofluorométrie à l'aide d'anticorps monoclonaux couplés à un fluorochrome. Le marquage a été effectué sur les lymphocytes B (Igs^+), lymphocytes T totaux (CD5^+), lymphocytes T auxiliaires (CD4^+), et lymphocytes T cytotoxiques (CD8^+).

Pour chaque échantillon, 20×10^6 cellules spléniques étaient transférées dans des boîtes de pétri pour culture de tissus (100 mm; Fisher) contenant 8 ml de RPMI-1640 complet. Les cellules étaient incubées à 37°C en présence de 5 % CO_2 durant 90 minutes permettant ainsi l'adhérence des macrophages au plastique. Les cellules non adhérentes étaient remises en suspension par rotation des boîtes de pétri, transférées dans des tubes de 15 ml (Sarstedt), puis centrifugées à $500 \times g$ pendant 5 minutes (IEC Centra-8R, International Equipment Company). Les culots étaient resuspendus dans 2 ml d'une solution de PBS-azoture de sodium 0,1% (p/v) enrichi de 1% de SFB (à 4°C). Dans des plateaux de 96 puits à fond conique est ajouté 150 μl de cellules ($\approx 10^6$ cellules) par puits. Après avoir centrifugé les plateaux à $500 \times g$ durant 5 minutes, les surnageants étaient retirés et 10 μl d'anticorps

appropriés étaient ajoutés aux culots. Les cellules T totales furent marquées à l'aide d'immunoglobulines anti-CD5 (clone MRC OX-19; Pharmingen, CA, USA) de rat couplé à la phycoérythrine (PE). Les sous populations de lymphocytes T, T auxiliaires et T cytotoxiques, furent marquées respectivement à l'aide d'immunoglobulines anti-CD4 (clone W3/25; Cedarlane, Ontario, Canada) et anti-CD8 (clone MRC OX-8 ; Cedarlane), tous les deux couplés au FITC. Un anticorps anti-chaîne kappa (κ) d'immunoglobuline (Igs) de rat (clone MRC OX-12; Pharmingen), couplé à la FITC, a été utilisé pour marquer les cellules B. Afin de déterminer les liaisons non spécifiques des anticorps aux cellules, un contrôle isotypique anti-IgG1 de souris couplé à la FITC et à la PE a été employé. Les plateaux étaient incubés à 4 °C, dans l'obscurité, pendant 30 minutes. Les cellules étaient ensuite lavées 3 fois avec 180 μ l de PBS-azoture de sodium, resuspendues dans 180 μ l d'une solution de paraformaldéhyde 1%, puis transférées dans des tubes Eppendorf de 1 ml contenant 800 μ l de paraformaldéhyde 1%. Les cellules fluorescentes furent énumérées à l'aide du cytofluoromètre "XL" (Coulter Electronics, Division of Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA) à une longueur d'onde de 520 nm et 560 nm pour la détection respective de la FITC et de la PE. Les pourcentages des différentes populations de lymphocytes spléniques furent déterminés à partir de la population totale. Au pourcentage de cellules fluorescentes, était soustrait le pourcentage de liaisons non spécifiques correspondant (contrôle isotypique).

3.4 Dosage de l'interleukine-2

3.4.1 Production

Chaque échantillon de cellules spléniques était ajusté à $2,2 \times 10^6$ cellules/ml dans 5 ml de milieu complet contenant 5×10^{-5} M de 2-mercaptoéthanol (BioRad Laboratories, CA,

USA). Dans un plateau de 24 puits (Sartstedt), 900 μ l de cellules/puit étaient distribués en quadruplicata pour chacun des rats. Différentes concentrations de Conavaline A (ConA; Sigma) ont été utilisées pour stimuler la production d'IL-2: 0,625, 1,25 et 2,5 μ g/ml. Pour le témoin, on remplaçait la Con A par du milieu. Les plateaux étaient incubés pendant 24 heures à 37°C. Des aliquots de 400 μ l étaient récupérés et congelés jusqu'à la détermination de l'activité IL-2. Seuls les échantillons stimulés par une concentration suboptimale de Con A (1,25 μ g/ml), ainsi que les non stimulés, ont été utilisés pour le dosage de l'IL-2.

3.4.2 Dosage

L'activité de l'IL-2 dans les surnageants de culture fut déterminée selon les niveaux de prolifération des cellules CTLL-2 qui nécessitent essentiellement cette cytokine pour leur croissance. Des cellules CTLL-2 en phase exponentielle de croissance furent utilisées (10^6 par plateau). La quantité de cellules nécessaire fut prélevée; elles furent centrifugées à 500 x g durant 5 minutes et lavées 3 fois avec du HBSS. Le culot était resuspendu dans du RPMI 1640 complet additionné de 1 mM de sodium pyruvate, 0,1 mM d'acides aminés non-essentiels et 5×10^{-5} M de 2-mercaptoéthanol. Les cellules étaient par la suite incubées durant 2 heures à 37°C en présence de 5% CO_2 . Les cellules étaient lavées deux fois avec du HBSS et récupérées dans du milieu complet. Dans des plateaux de 96 puits à fond plat, contenant 50 μ l de milieu par puit, les surnageants à doser (50 μ l) étaient distribués en triplicata, puis 8 dilutions par un facteur de 2 étaient effectuées. Une solution standard d'IL-2, produite par des splénocytes de rat stimulés avec de la Con A (Rat T-STIM™ with Con A; Collaborative Biomedical Products), était diluée 15 fois en triplicat. Les CTLL-2, ajustées à 2×10^5 cellules/ml, étaient ensuite réparties dans les puits, soit un volume de 50 μ l/puits. Les plateaux étaient incubés pendant 20 heures à 37°C en présence de 5% de CO_2 . Après

l'incubation, la thymidine tritiée (ICN Radiochemicals) était ajoutée à raison de 50 µl/puit d'une solution de 20 µCi/ml. Les plateaux étaient réincubés durant 5 heures. Les débris cellulaires, dont l'ADN, étaient recueillis sur des filtres en fibre de verre (Skatron, Norvège) à l'aide d'un récupérateur de cellules (Micro Cell Harvester, Skatron instrument). Les filtres étaient séchés dans un incubateur à 37°C pendant une heure, puis déposés dans des fioles à scintillation (Fisher Brand Scientific, Canada) dans lesquelles étaient ajoutés 7 ml de toluène à scintillation liquide (Fisher) contenant 167 ml de liquifluor (Biotechnology Systems, New Research Products, MA, USA) par 4 L. La radioactivité était mesurée dans un compteur à scintillation Bêta (Beckman LS 1701). Les résultats obtenus en coups par minute (c.p.m.) furent transformés en unité d'IL-2, soit l'inverse de la dilution d'IL-2 requise pour obtenir 50% de la stimulation maximale des CTLL. Le pourcentage de prolifération fut obtenu par la formule suivante:

$$\% \text{ Prolifération} = \frac{\text{c.p.m. de l'échantillon} - \text{c.p.m. minimum}}{\text{c.p.m. maximum}} \times 100$$

Les pourcentages de prolifération furent ensuite reportés sur papier d'analyse probit et le nombre d'unités IL-2 fut déterminé.

4. CELLULES PÉRITONÉALES

4.1 Préparation des cellules péritonéales

Après avoir euthanasié les rats par asphyxie au CO₂, l'abdomen était stérilisé et dépecé. La cavité péritonéale de chaque animal était lavée avec 25 ml de HBSS (Gibco BRL) refroidi à 4 °C, en utilisant une seringue hypodermique de 60 cc (Becton Dickinson & CO., NJ, USA) et une aiguille #16G 1 1/2 (Becton Dickinson & CO.). Le milieu était réparti dans

la cavité en secouant légèrement l'abdomen du rat. Les cellules étaient décollées de la paroi à l'aide d'un mouvement d'aspiration et d'expulsion du milieu; cette étape était exécutée à l'aide d'une seringue hypodermique de 30 cc (Becton Dickinson & CO.) et d'une aiguille #18G 1 1/2 (Becton Dickinson & CO.). Les cellules étaient ensuite recueillies et transférées dans un tube conique de 50 ml (Sarstedt), et étaient gardées sur la glace. Les cellules étaient centrifugées à 500 x g durant 5 minutes à 4 °C (IEC Centra-8R, International Equipment Company), puis le culot était resuspendu dans 2 ml d'HBSS. Le dénombrement des cellules fut exécuté à l'aide d'un hématimètre par exclusion des cellules mortes au bleu trypan. Les concentrations cellulaires étaient ajustées selon le protocole utilisé.

4.2 Dosage de la production intracytoplasmique de peroxyde d'hydrogène

La sonde 2',7' dichlorofluorescéine-diacétate (DCFH-DA) a été utilisée pour évaluer par cytométrie de flux la production d' H_2O_2 intracytoplasmique. Cette technique consiste à mettre les cellules péritonéales en présence de la sonde liposoluble. Lors de son passage au travers de la membrane cytoplasmique, la sonde est déacétylée en dichlorofluorocéine (DCFH; molécule polaire) et émet une fluorescence verte (525 nm) en présence d' H_2O_2 . L'intensité de fluorescence produite est mesurée au cytofluoromètre pour évaluer le niveau de production d' H_2O_2 .

La suspension de cellules péritonéales était ajustée à une concentration de 10^6 cellules/ml. Les cellules étaient centrifugées à raison de 3×10^6 cellules pour chacun des échantillons dans des tubes de 10 ml (Sarstedt). Les culots étaient resuspendus dans 3 ml de D-PBS sans Ca^{++} et Mg^{++} (Gibco) contenant 1 mg/ml de gélatine (Difco Laboratories inc., Michigan, USA) et 1 mg/ml de α -D-glucose (Fisher Scientific Company, Chemical

Manufacturing Division, USA). Les échantillons étaient réchauffés dans un bain à 37°C. La sonde DCFH-DA était ajoutée à raison d'une concentration de 1 µl/ml (solution de 5 mM dans ETOH 100%; Eastman-Kodak, Rochester, NY, USA). Les tubes étaient incubés durant 5 minutes à 37°C et puis refroidis à 4 °C. Les échantillons étaient divisés en 2 aliquots de 1 ml et réchauffés à 37°C. Pour chaque rat le premier aliquot était composé de cellules stimulées avec 10 ng/ml de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA; Sigma chemical CO, MO, USA) et le deuxième contenait des cellules non stimulées. Les tubes étaient incubés pendant 15 min à 37°C. L'intensité de fluorescence émise par les différentes populations de cellules péritonéales fut mesurée au cytofluoromètre "XL" (Coulter Electronics, Division of Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA) à une longueur d'onde de 525 nm. Deux populations de cellules péritonéales furent analysées: une population majeure représentant environ 67% de la population totale, et une population mineure représentant 15%. Les résultats furent exprimés en index de stimulation de la production d'H₂O₂ intracytoplasmique définie par le rapport de l'intensité de fluorescence des cellules stimulées au PMA sur l'intensité des cellules non-stimulées.

4.3 Dosage du facteur de nécrose des tumeurs

4.3.1 Production

La préparation de cellules péritonéales était ajustée à 10⁶ cellules/ml; un volume de 3 ml/échantillon était centrifugé dans des tubes de 10 ml (Sarstedt). Les culots étaient resuspendus dans 3ml de RPMI 1640 contenant 10% de SFB, 10 mM HEPES, 1% antibiotique-antimycotique 100X et 5 X 10⁻⁵ M de 2-mercaptoéthanol. Les cellules péritonéales étaient mises en culture dans des plateaux de 24 puits (Sarstedt) à raison de 10⁶ cellules par puits (2 puits par échantillons), puis incubées 2 heures à 37 °C en présence

d'atmosphère contenant 5% de CO₂ pour l'adhérence des macrophages. Pour éliminer les cellules non adhérentes, les puits étaient lavés 2 fois avec du D-PBS. Un volume de 900 µl de RPMI 1640 complet contenant du 2-Me était ensuite distribué dans tous les puits. Pour chaque échantillon, on ajoutait 100 µl d'une solution de 1 µg/ml de lipopolysaccharide (LPS provenant de *Esherishia coli* sérotype 0127:88; Sigma chemical Co., MO, USA) dans l'un des deux puits; dans l'autre, la solution de LPS était substituée par 100 µl de milieu complet (échantillon non-stimulé). Les plateaux étaient incubés durant 24 heures à 37°C en atmosphère contenant 5% de CO₂. Les surnageants étaient ensuite récupérés dans des tubes Eppendorf en aliquots de 250 µl et congelés à -20°C.

4.3.2 Dosage

L'activité du facteur de nécrose des tumeurs (TNF) a été évaluée en fonction de son pouvoir cytotoxique sur des cellules fibroblastiques. La lignée cellulaire L929 a été utilisée comme cellules cibles.

Les cellules L929 étaient trypsinées et leur concentration était ajustée à 3 X10⁵ cellules/ml avec du RPMI 1640 enrichi de 10 % de SFB, HEPES, antibiotiques et antimycotique (milieu complet). Les cellules étaientensemencées dans des plaques de 96 puits à fond plat, à raison de 75 µl/puits, en laissant pour chaque plateau une rangée de huit puits qui servait de blanc pour le lecteur ELISA. Pour permettre l'adhérence des cellules au plastique, les plateaux étaient incubés durant 18 heures à 37°C en présence de 5% CO₂. La prolifération cellulaire était bloquée par l'addition de 75 µl d'actinomycine D à 2 µg/ml (Boehringer Mannheim, Qué, Canada); cet inhibiteur de la transcription augmente la sensibilité du test. Les surnageants à doser, ainsi que la solution de référence (TNF-α murin recombinant, 10³ U/ml; Genzyme, Cambridge, MA,USA) étaient ajoutés en triplicata dans un

volume de 50 µl. Des dilutions successives en série de 1:4 étaient ensuite effectuées directement dans les puits contenant les cellules L929 adhérentes. Une rangée de huit puits/plateau, contenant des cellules L929 et du milieu avec actinomycine D, était utilisée pour déterminer la densité cellulaire maximale (témoin négatif). Après 18 heures d'incubation à 37 °C en présence de 5% CO₂, le milieu était vidangé en inversant les plateaux. Les cellules viables étaient fixées avec de la formaldéhyde 5% (100 µl/puits) pendant 5 minutes. Les puits étaient rincés 2 à 3 fois à l'eau du robinet et les cellules étaient colorées avec 50 µl/puits d'une solution de violet cristal 1%(Sigma) pendant 5 minutes. Les plateaux étaient ensuite lavés et asséchés. Le violet cristal était alors solubilisé avec 100 µl/puits d'acide acétique 33% (Fisher Scientific Company). La densité optique (D.O.) de chacun des puits était lue à l'aide d'un lecteur ELISA à une longueur d'onde de 540 nm.

Les résultats furent exprimés en unités de TNF. Les pourcentages de cytotoxicité pour chacune des dilutions furent calculés à l'aide de la formule suivante:

$$\% \text{ de cytotoxicité} = 1 - \frac{\text{D.O. échantillon}}{\text{D.O. maximale}} \times 100$$

Ces pourcentages furent ensuite reportés sur papier d'analyse probit. Le nombre d'unités de TNF correspond à l'inverse de la dilution de TNF requise pour obtenir 50% de cytotoxicité.

5. POPULATIONS LEUCOCYTAIRES PÉRIPHÉRIQUES

5.1 Préparation des échantillons sanguins

Après avoir anesthésié les animaux au CO₂, le sang était prélevé au niveau du coeur à l'aide de tubes à prélèvement de sang (Vacutainer, 13 X 7 mm, EDTA K₃ 15%; Becton Dickinson).

5.2 Comptes leucocytaires

À l'aide de pipettes pour hématocrites (Scientific Instrument Division), le sang de chacun des échantillons était prélevé et dilué par un facteur de 20 avec une solution d'acide acétique 5% et 0,01% p/v de cristal violet; le capillaire était rempli jusqu'à la marque "0.5" avec le sang et jusqu'à la marque "11" avec le diluant. Les pipettes étaient ensuite agitées 30 secondes et les leucocytes étaient par la suite dénombrés au microscope à l'aide d'un hématièmètre. Les résultats furent présentés en nombre de leucocytes par millimètre cube de sang:

$$\text{Nombre de leucocytes/mm}^3 \text{ de sang} = \frac{\text{Nb de leukocytes} \times 20 \text{ (dilution)} \times 10}{\text{Nb de surfaces de 1 mm carrée utilisées}}$$

5.3 Comptes différentiels

Un frottis sanguin de chaque échantillon était effectué puis séché. Les cellules étaient colorées à l'aide du "Leukostat Stain Kit" (Fisher Scientific Diagnostics, PA, USA). Sur chaque lame, les leucocytes étaient énumérés et identifiés au microscope: les lymphocytes,

neutrophiles, monocytes, éosinophiles et basophiles. Les résultats furent présentés en pourcentage de cellules.

6. ANALYSES STATISTIQUES

Huit animaux ont été utilisés pour chaque intensité d'exposition, et chaque temps d'exposition a été répété deux fois. Les valeurs obtenues pour un temps d'exposition identique ont été regroupées en normalisant chaque valeur par rapport à la moyenne du premier groupe. De plus, seuls des animaux de même sexe ont été regroupés et utilisés pour les analyses statistiques: des rats mâles à 3, 6 et 9 mois d'exposition. Les résultats provenant de rats mâles et femelles n'ont pu être regroupés. Une différence statistiquement significative était présente entre les deux sexes pour tous les paramètres étudiés (présence d'un "gender effect"; effet des genres).

Pour déterminer une éventuelle relation dose-réponse significative ($p \leq 0,05$) entre l'intensité des champs magnétiques et les résultats obtenus, des analyses de régression linéaire ont été réalisées; la pente (b), le coefficient de corrélation (r), et la valeur de probabilité (p) ont été calculés pour chacun des paramètres mesurés. De plus, la régression multiple a été utilisée pour évaluer l'interaction des champs magnétiques avec le temps d'exposition. Par ce test, une valeur de probabilité (p) est calculée pour vérifier si les droites de régression linéaire, pour les temps d'exposition 3, 6 et 9 mois, sont statistiquement parallèle ($p > 0,05$) ou non.

Ces analyses statistiques ont toutes été calculées en tenant compte de l'un ou l'autre des témoins (le groupe CC et le groupe "sham"), même si aucune différence significative n'est observée entre ces 2 groupes. Tout les résultats statistiques ont été compilés à l'aide du logiciel SPSS 5.0 pour UNIX.

RÉSULTATS

1. CELLULES SPLÉNIQUES: EFFETS D'UNE EXPOSITION DE 3, 6, 9 MOIS

1.1 Activité des cellules NK

Les niveaux d'activité des cellules NK spléniques ont été évalués chez des rats exposés aux champs magnétiques pendant 3, 6 et 9 mois (Tableau II et III). À 3 mois, l'analyse de régression linéaire calculée avec le groupe "sham" (Tableau II A, Figure 4 A) est significative ($p < 0,0001$) et de pente positive ($b = 4,46$), indiquant ainsi une augmentation de l'activité des cellules NK directement proportionnelle avec l'augmentation de l'intensité. L'activité des cellules NK mesurée à l'intensité la plus élevée (2000 μT) augmente d'environ 124%.

Un effet dose-réponse positif ($b = 0,86$; $p = 0,04$) fut aussi observé à 9 mois (augmentation de 43% à 2000 μT) alors qu'à 6 mois, l'activité des cellules NK ne montra aucune variation significative ($p = 0,25$).

En comparant les effets obtenus pour les trois temps d'exposition, le test de régression multiple indique une absence de parallélisme entre les droites de régression linéaire ($p = 0,0003$). Les réponses des cellules NK aux champs magnétiques diffèrent donc de manière significative selon la durée de l'exposition. En effet, la pente positive obtenue à 3 mois ($b = 4,46$) est beaucoup plus prononcée que celles obtenues aux autres temps d'exposition.

Les mêmes tendances se confirment avec les analyses statistiques calculées avec le contrôle de colonie (CC) comme intensité minimale (Tableau II B, Figure 4 B). De plus, une légère augmentation dose-dépendante de l'activité des cellules NK était présente à 6 mois ($p < 0,02$), tendance qui n'était pas significative avec le groupe "sham". Toutefois cette

augmentation ($b=0,51$) était plus faible que celle obtenue à 3 mois ($b=4,01$) et à 9 mois ($b=1,04$).

D'autre part, une réduction de l'activité des cellules NK fut observée chez les animaux plus âgés (Tableau III). Chez les animaux servant de témoins, cette activité était 2 fois plus faible à 6 et 9 mois d'exposition qu'à celle obtenue à 3 mois.

1.2 Phénotypage

Le pourcentage des différentes populations de cellules spléniques a été identifié par cytofluorométrie en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques. Les pourcentages de lymphocytes B (Ig^+), de lymphocytes T totaux ($CD5^+$) et des sous-populations T auxiliaires ($CD4^+$) et T cytotoxiques ($CD8^+$) ont ainsi été évalués.

Après 3 mois d'exposition, le test de régression linéaire obtenu avec le "sham" montre une relation dose-réponse négative entre les pourcentages de lymphocytes T et l'intensité des champs magnétiques (Tableau II A; Figure 5). La diminution observée chez les $CD5^+$ était de 30% à 2000 μT ($b=-1,17$; $p<0,0001$) (Tableau IV), de 28 % chez la sous-population $CD8^+$ ($b=-0,77$, $p<0,0001$) et aucune variation significative ne fut notée ($b=-0,21$; $p=0,11$) pour les lymphocytes T $CD4^+$. De plus le rapport $CD4:CD8$ augmenta avec l'intensité des champs magnétiques soulignant ainsi que les deux sous-populations, $CD4^+$ et $CD8^+$, ont varié selon des proportions différentes ($b=0,10$; $p<0,02$); l'augmentation de ce rapport à 2000 μT était de 29% par rapport au "sham". L'exposition aux champs magnétiques n'a pas entraîné de changements significatifs du pourcentage de lymphocytes B ($p>0,05$; Tableau V).

Après 6 et 9 mois d'exposition, aucun changement significatif ($p > 0,05$) ne fut observé dans les pourcentages de lymphocytes T ($CD5^+$, $CD8^+$ et $CD4^+$), et de lymphocytes B (Igs^+).

La comparaison par régressions multiples des réponses obtenues à 3, 6 et 9 mois d'exposition, montre des différences significatives pour les lymphocytes T $CD5^+$ ($p=0,02$) et $CD8^+$ ($p=0,04$). L'effet des champs magnétiques sur ces deux populations diffèrent selon le temps d'exposition.

Les résultats obtenus avec le CC confirment ceux calculés avec le groupe "sham" (Tableau II B; Figure 6). Mais contrairement aux résultats obtenus avec le groupe "sham", une diminution significative a été observée au niveau des cellules $CD4^+$. Cette baisse est dose-dépendante mais moins prononcée ($b=-0,44$) que celle des $CD8^+$ ($b=-0,95$). Elle entraîne ainsi un accroissement du rapport $CD4:CD8$ ($p=0,02$) en fonction de l'intensité.

Tableau II A: Effets d'une exposition aux champs magnétiques sur différents paramètres immunitaires chez des rats F344/N mâles: résultats calculés avec le groupe "sham".

Temps d'exposition Paramètres	3 mois			6 mois			9 mois			Interaction
	Pente	r ^a	p ^b	Pente	r	p	Pente	r	p	p ^c
Activité NK	4,46	0,71	<0,0001	0,24	0,13	0,25	0,86	0,43	0,04	0,0003
CD5	-1,17	-0,58	<0,0001	0,20	0,13	0,24	-0,24	-0,14	0,28	0,02
CD4	-0,21	-0,24	0,11	0,13	0,08	0,47	0,08	0,06	0,62	0,3
CD8	-0,77	-0,59	<0,0001	-0,02	-0,01	0,92	-0,08	-0,07	0,59	0,04
CD4/CD8	0,10	0,29	0,02	0,05	0,20	0,08	0,01	0,02	0,89	0,29
Igs	-0,69	-0,16	0,29	-0,33	-0,10	0,38	-0,42	-0,09	0,49	0,88
IL-2	-5,40	-0,37	0,003	2,03	0,27	0,10	3,77	0,12	0,33	0,02
I. S. d'H ₂ O ₂ (A)	-0,33	-0,24	0,05	-0,45	-0,21	0,10	-0,48	-0,39	0,01	0,7
I. S. d'H ₂ O ₂ (B)	-0,03	-0,05	0,71	-0,03	-0,02	0,85	-0,16	-0,26	0,09	0,65
TNF	17,13	0,42	0,05	6,17	0,09	0,70	8,33	0,10	0,68	0,67
Compte leucocytaire	36,80	0,03	0,90	-452,90	-0,29	0,07	-41,60	-0,04	0,85	0,85
Lymphocytes	0,22	0,08	0,70	0,09	0,02	0,91	1,16	0,24	0,24	0,44
Neutrophiles	-0,26	-0,10	0,62	0,19	0,05	0,78	-0,86	-0,19	0,36	0,59
Monocytes	0,06	0,06	0,77	-0,13	-0,14	-0,39	-0,22	-0,28	-0,17	-0,28
Basophiles	-0,04	-0,29	0,16	-0,01	-0,11	-0,49	0,00	0,00	1,00	0,27
Eosinophiles	0,06	0,16	0,45	-0,09	-0,28	0,09	-0,02	-0,14	0,49	0,35

a Coefficient de corrélation

b Valeur de probabilité obtenue par analyse de régression linéaire

c Valeur de probabilité obtenue par régression multiple.

Tableau II B: Effets d'une exposition aux champs magnétiques sur différents paramètres immunitaires chez des rats F344/N mâles: résultats calculés avec le groupe CC.

Temps d'exposition Paramètres	3 mois			6 mois			9 mois			Interaction
	Pente	r ^a	p ^b	Pente	r	p	Pente	r	p	p ^c
Activité NK	4,01	0,68	<0,0001	0,51	0,27	0,02	1,04	0,51	0,01	0,004
CD5	-1,32	-0,59	<0,0001	0,15	0,09	0,43	-0,34	-0,20	0,11	0,02
CD4	-0,44	-0,41	0,004	0,02	0,01	0,93	0,05	0,04	0,78	0,10
CD8	-0,95	-0,66	<0,0001	-0,08	-0,05	0,66	-0,21	-0,16	0,22	0,03
CD4/CD8	0,11	0,30	0,02	0,05	0,24	0,04	0,05	0,08	0,54	0,48
Igs	-0,62	-0,14	0,36	-0,69	-0,21	0,08	-0,41	-0,10	0,46	0,83
IL-2	-7,29	-0,50	<0,0001	0,47	0,06	0,72	1,00	0,03	0,78	0,03
I. S. d'H ₂ O ₂ (A)	-0,10	-0,08	0,54	-0,37	-0,18	0,17	-0,25	-0,17	0,31	0,54
I. S. d'H ₂ O ₂ (B)	0,03	0,04	0,73	0,007	0,01	0,96	-0,02	-0,03	0,86	0,82
TNF	18,88	0,46	0,04	23,54	0,33	0,19	-49,20	-0,32	0,16	0,03
Compte leucocytaire	-434,80	-0,29	0,17	-93,60	-0,07	0,70	-384,00	-0,32	0,12	0,98
Lymphocytes	-0,03	-0,01	0,96	-0,23	-0,05	0,78	1,40	0,27	0,19	0,25
Neutrophiles	0,06	0,02	0,91	0,44	0,10	0,55	-1,22	-0,27	0,20	0,25
Monocytes	-0,04	-0,04	0,86	-0,20	-0,21	0,23	-0,02	-0,03	0,90	0,92
Basophiles	-0,05	-0,31	0,13	-0,02	-0,14	0,40	-0,04	-0,21	0,32	0,93
Eosinophiles	0,10	0,26	0,22	-0,03	-0,10	0,55	-0,10	-0,44	0,03	0,02

a Coefficient de corrélation

b Valeur de probabilité obtenue par analyse de régression linéaire

c Valeur de probabilité obtenue par régression multiple pour l'interaction.

Tableau III: Activité des cellules NK spléniques de rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.

Intensités (μT)	Temps d'exposition		
	3 mois	6 mois	9 mois
CC	15,9 \pm 1,7 ^a (n=6)	7,9 \pm 2,5 (n=10)	6,8 \pm 0,6 (n=4)
Sham	13,8 \pm 3,5 (n=6)	9,2 \pm 2,2 (n=13)	7,7 \pm 2,5 (n=5)
2	15,6 \pm 5,4 (n=6)	7,9 \pm 2,1 (n=16)	8,5 \pm 1,2 (n=5)
20	22,7 \pm 6,2 (n=6)	8,1 \pm 2,6 (n=15)	8,8 \pm 2,4 (n=5)
200	26,1 \pm 8,7 (n=6)	9,0 \pm 2,8 (n=16)	10,5 \pm 3,7 (n=5)
2000	30,9 \pm 8,3 (n=5)	9,7 \pm 2,7 (n=16)	11,0 \pm 3,6 (n=4)

a Moyenne de n observations \pm écart type; moyenne exprimée en unités lytiques par 10^7 cellules.

Figure 4: Effets d'une exposition aux champs magnétiques sur l'activité des cellules NK spléniques chez le rat F344/N.

Des droites ont été tracées par régression linéaire avec les moyennes de l'activité des cellules NK spléniques obtenues pour chaque rat mâle. L'exposition aux champs magnétiques est de 60 Hz durant une période de 3 mois (—), 6 mois (— — —) et 9 mois (.....). Le graphique représente les droites de régression linéaire calculées avec le "sham" (A) ou le CC (B).

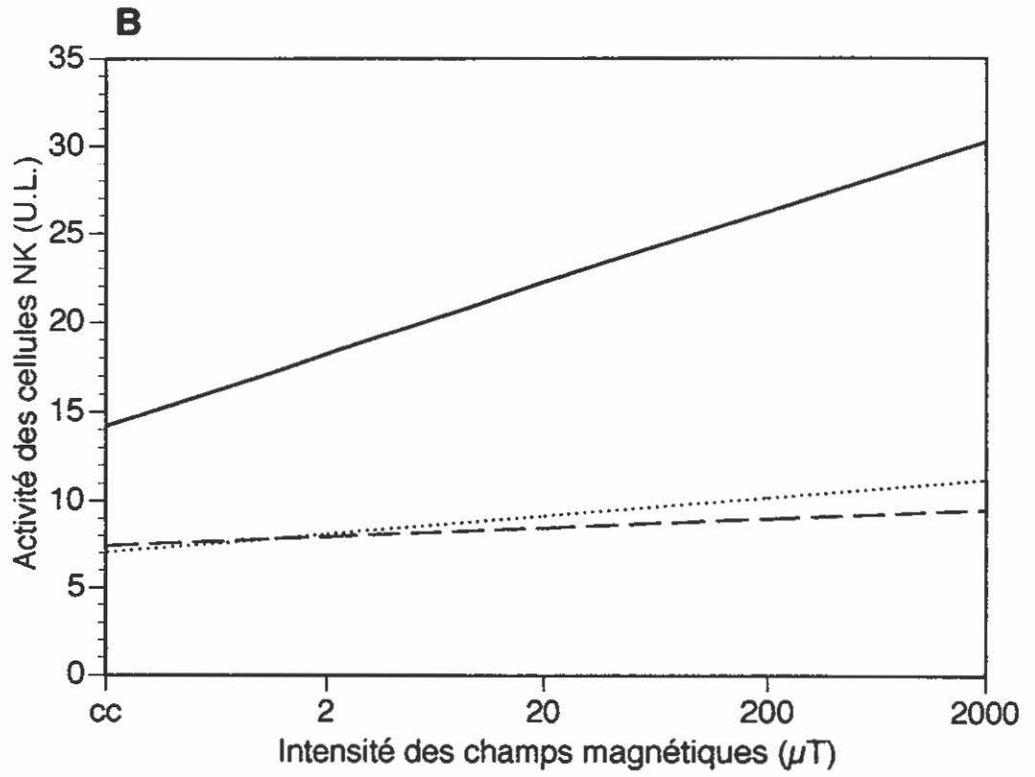
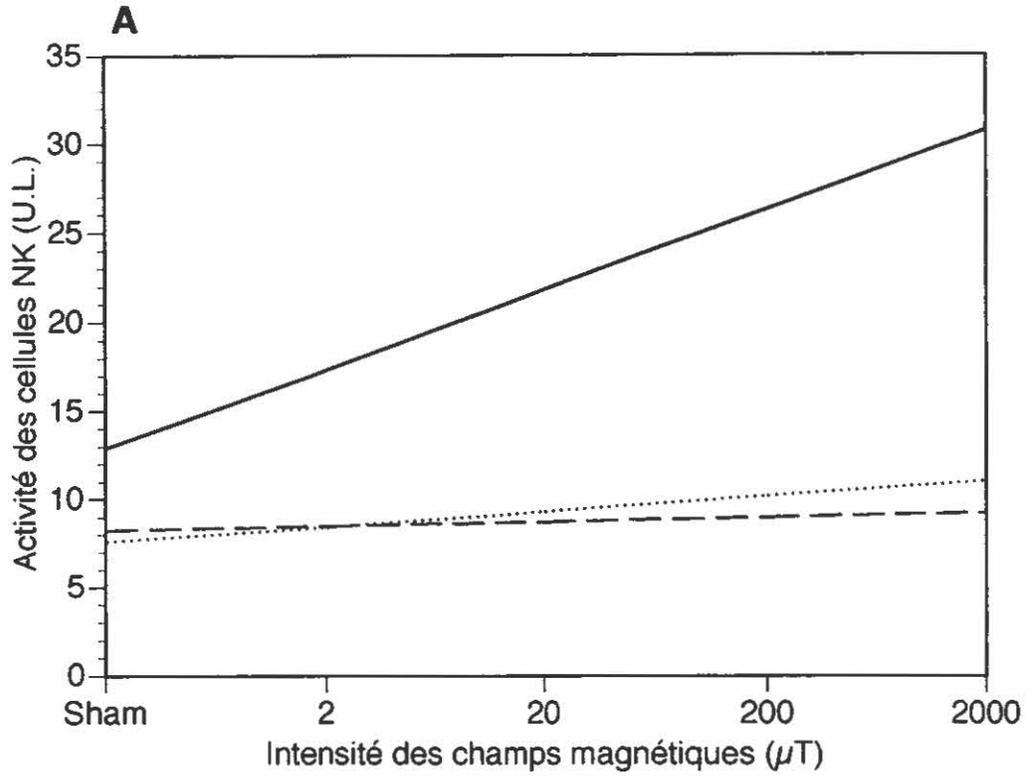
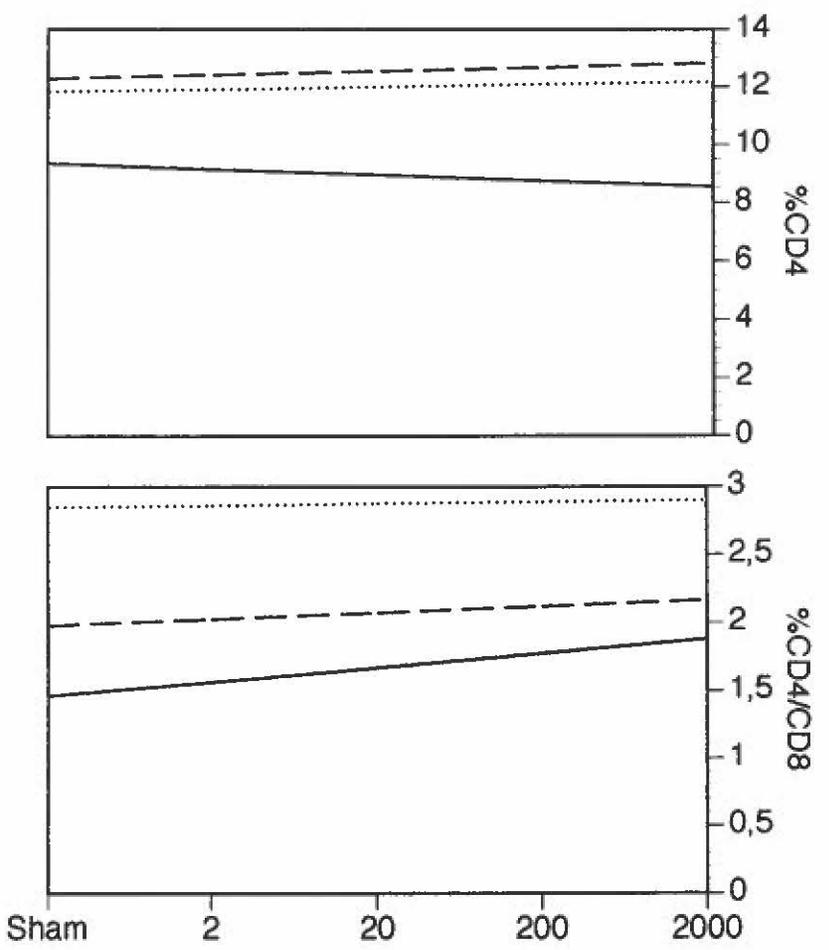
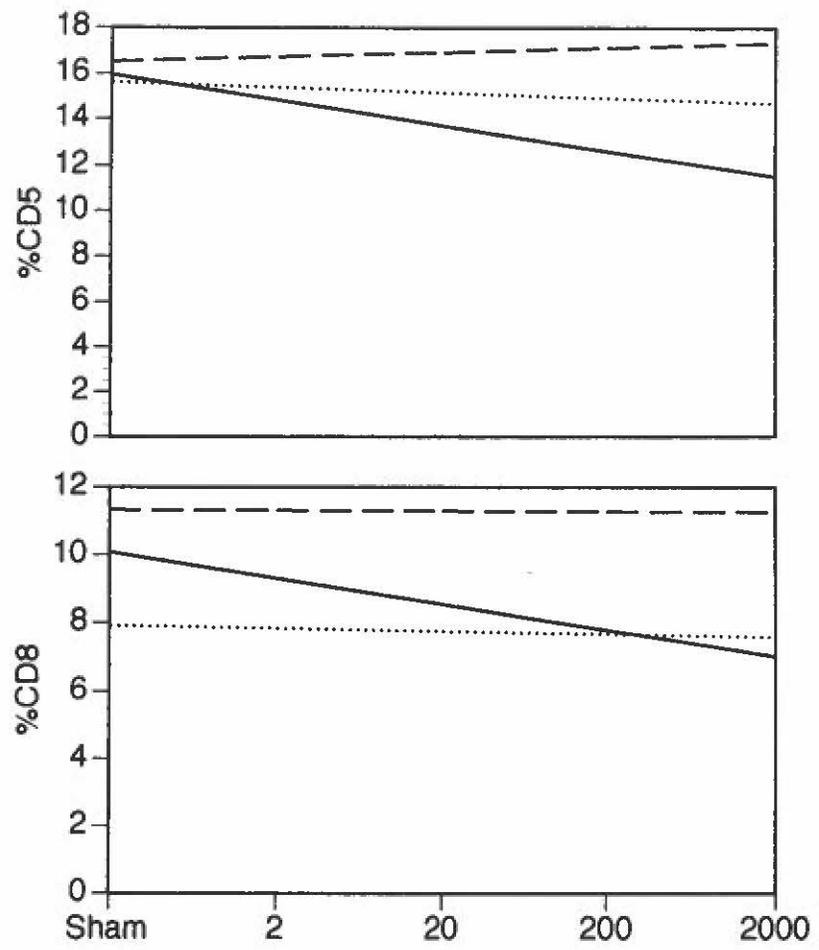


Figure 5: Effets d'une exposition aux champs magnétiques sur différentes populations de lymphocytes T spléniques chez le rats F344/N.

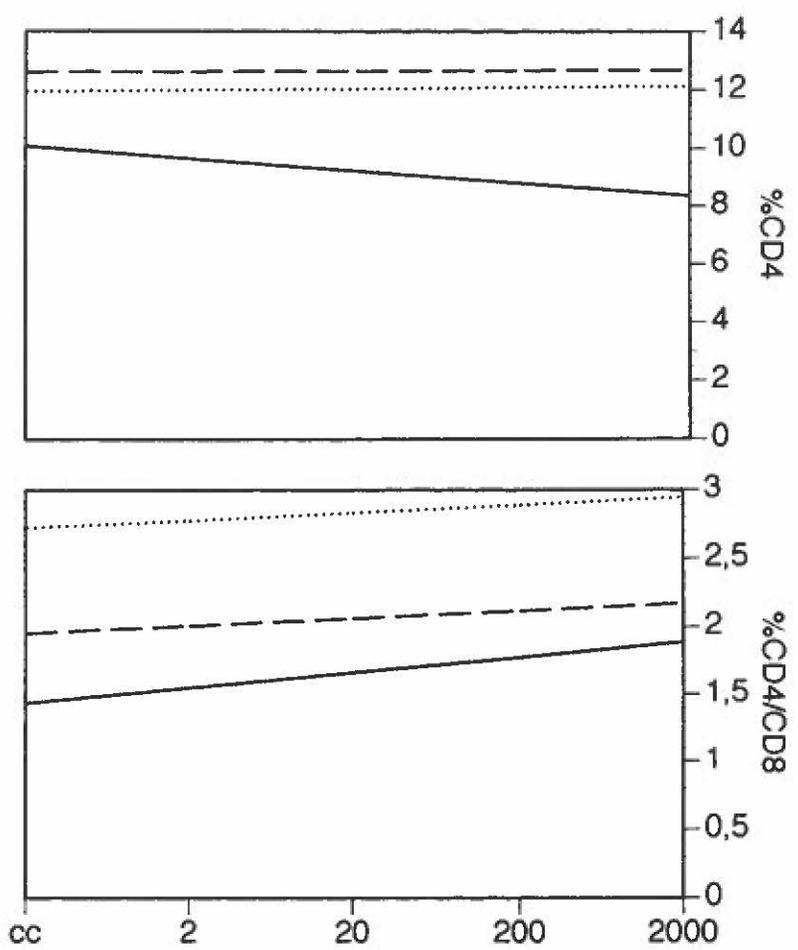
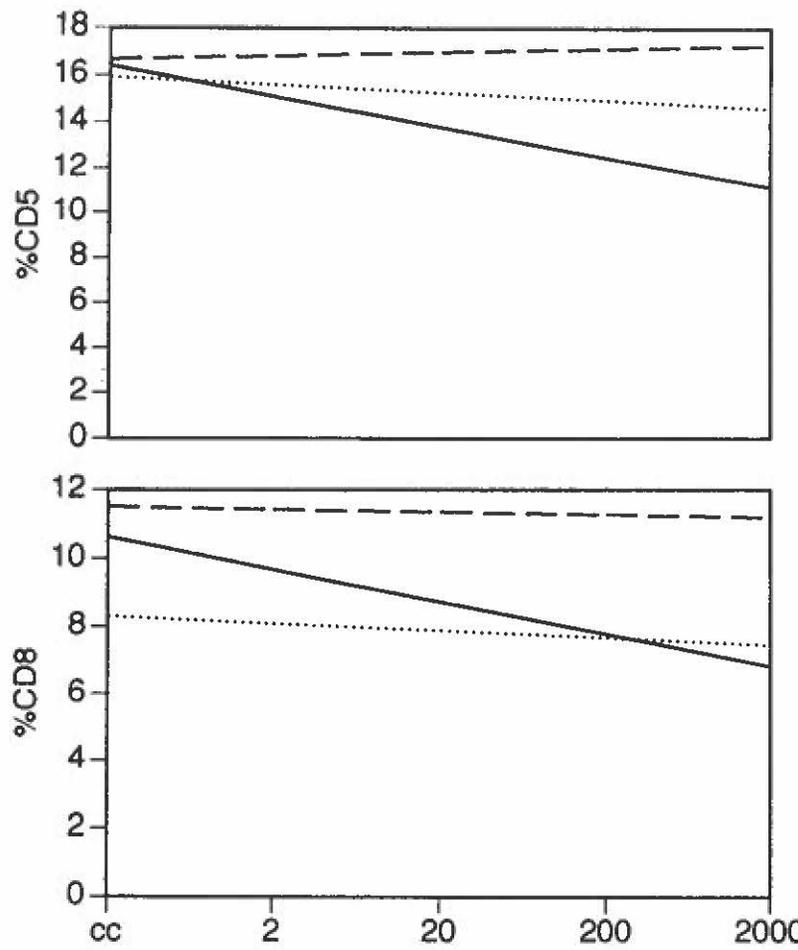
Des droites ont été tracées par régression linéaire avec les moyennes des pourcentages de lymphocytes T obtenues pour chaque rat mâle. L'exposition aux champs magnétiques était de 60 Hz durant une période de 3 mois (—), 6 mois (— — —) et 9 mois (.....). Les graphiques représentent les droites de régression linéaire obtenues pour les cellules CD5⁺ (A), CD4⁺ (B), CD8⁺ (C) et les rapports CD4/CD8 (D). Ces régressions linéaires ont été calculées par rapport au "sham".



Intensité des champs magnétiques (μT)

Figure 6: Effets d'une exposition aux champs magnétiques sur différentes populations de lymphocytes T spléniques chez le rat F344/N.

Des droites ont été tracées par régression linéaire avec les moyennes des pourcentages de lymphocytes T obtenues pour chaque rat mâle. L'exposition aux champs magnétiques était de 60 Hz durant une période de 3 mois (—), 6 mois (— — —) et 9 mois (.....). Les graphiques représentent les droites de régression linéaire obtenues pour les cellules CD5⁺ (A), CD4⁺ (B), CD8⁺ (C) et les rapports CD4/CD8 (D). Ces régressions linéaires ont été calculées par rapport au "CC".



Intensité des champs magnétiques (μT)

Tableau IV: Pourcentages des différentes populations de lymphocytes T spléniques chez des rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.

	Intensités (μ T)	Temps d'exposition		
		3 mois	6 mois	9 mois
CD5 (%)	CC	16,7 \pm 4,0 ^a (n=8)	16,9 \pm 2,1 (n=13)	16,4 \pm 2,3 (n=12)
	Sham	15,8 \pm 2,8 (n=8)	16,6 \pm 1,7 (n=16)	15,9 \pm 2,8 (n=13)
	2	14,8 \pm 2,4 (n=9)	16,5 \pm 1,8 (n=16)	15,2 \pm 2,6 (n=12)
	20	13,6 \pm 2,2 (n=10)	16,7 \pm 2,6 (n=15)	15,0 \pm 2,2 (n=13)
	200	12,6 \pm 3,0 (n=10)	17,8 \pm 2,7 (n=16)	14,6 \pm 2,8 (n=13)
	2000	11,1 \pm 1,4 (n=10)	16,9 \pm 1,8 (n=16)	15,0 \pm 2,1 (n=13)
CD4 (%)	CC	10,7 \pm 1,5 (n=8)	12,8 \pm 2,6 (n=13)	12,2 \pm 1,5 (n=13)
	Sham	9,5 \pm 0,8 (n=8)	12,2 \pm 2,0 (n=16)	12,0 \pm 2,0 (n=13)
	2	9,3 \pm 0,8 (n=9)	12,6 \pm 2,3 (n=16)	11,2 \pm 1,6 (n=12)
	20	8,8 \pm 1,1 (n=10)	12,3 \pm 2,4 (n=15)	12,7 \pm 2,2 (n=13)
	200	8,5 \pm 0,9 (n=10)	12,8 \pm 2,4 (n=16)	12,2 \pm 1,6 (n=13)
	2000	8,9 \pm 2,1 (n=10)	12,8 \pm 2,5 (n=15)	11,9 \pm 2,0 (n=13)
CD8 (%)	CC	11,1 \pm 1,3 (n=8)	11,5 \pm 1,4 (n=13)	8,8 \pm 2,3 (n=13)
	Sham	10,1 \pm 1,0 (n=8)	11,2 \pm 1,7 (n=16)	8,1 \pm 1,5 (n=13)
	2	9,6 \pm 1,4 (n=9)	11,4 \pm 1,9 (n=16)	7,4 \pm 2,1 (n=12)
	20	8,2 \pm 0,9 (n=10)	11,2 \pm 2,3 (n=15)	7,7 \pm 1,7 (n=13)
	200	7,6 \pm 1,4 (n=10)	11,6 \pm 2,8 (n=16)	7,9 \pm 1,6 (n=13)
	2000	7,3 \pm 2,3 (n=10)	11,0 \pm 2,3 (n=15)	7,5 \pm 2,0 (n=13)
rapport	CC	1,44 \pm 0,48 ^b	1,95 \pm 0,28	2,55 \pm 0,55
CD4:CD8	Sham	1,48 \pm 0,46	1,99 \pm 0,38	2,75 \pm 0,98
	2	1,55 \pm 0,46	2,01 \pm 0,18	3,02 \pm 1,57
	20	1,69 \pm 0,48	2,07 \pm 0,27	2,94 \pm 0,79
	200	1,73 \pm 0,50	2,10 \pm 0,33	2,68 \pm 0,39
	2000	1,91 \pm 0,64	2,18 \pm 0,44	2,98 \pm 1,27

a Moyenne de n observations \pm écart type; moyenne exprimée en pourcentage de cellules marqués dans la population lymphocytaires splénique.

b Moyenne de n observations \pm écart type; moyenne des rapports des pourcentages de cellules CD4⁺:CD8⁺.

Tableau V: Pourcentages de lymphocytes B (Igs⁺) spléniques chez des rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.

Intensités (μ T)	Temps d'exposition		
	3 mois	6 mois	9 mois
CC	58,8 \pm 6,9 ^a (n=8)	59,5 \pm 1,9 (n=12)	64,2 \pm 5,2 (n=12)
Sham	59,2 \pm 4,8 (n=8)	57,3 \pm 4,0 (n=16)	64,3 \pm 8,8 (n=13)
2	57,7 \pm 6,4 (n=9)	56,3 \pm 4,0 (n=16)	66,4 \pm 6,0 (n=12)
20	57,9 \pm 3,7 (n=9)	54,3 \pm 4,0 (n=15)	63,7 \pm 7,3 (n=13)
200	56,8 \pm 6,6 (n=10)	57,3 \pm 4,1 (n=16)	64,7 \pm 5,5 (n=13)
2000	56,1 \pm 8,5 (n=10)	55,1 \pm 6,4 (n=16)	63,0 \pm 6,7 (n=13)

a Moyenne \pm écart type; moyenne exprimée en pourcentage de cellules marquées dans la population lymphocytaire splénique.

1.3 Production de l'interleukine 2

La production d'IL-2 par les cellules spléniques, en présence de Con A, a été déterminée suite à des expositions de 3, 6 et 9 mois aux champs magnétiques (Tableau VI).

Après 3 mois d'exposition, la régression linéaire calculée avec le "sham" démontre une diminution significative ($b=-5,40$; $p=0,003$) des niveaux de production d'IL-2 avec l'augmentation d'intensité des champs magnétiques (Tableau II A, Figure 7 A). La différence mesurée entre le groupe "sham" et le groupe de rats exposés à 2000 μT était de 38%.

Après 6 et 9 mois d'exposition, aucune variation dose-réponse de l'activité IL-2 n'a été observée ($p>0,05$). En comparant ces trois temps d'exposition, l'analyse de régression multiple révèle que les droites de régression linéaire ne sont pas parallèles ($p=0,02$), étant donné la disparition des effets des champs magnétiques sur la production d'IL-2 après 6 et 9 mois d'exposition.

Les analyses de régression linéaire et multiple montrent des résultats similaires, lorsque calculées avec le CC comme intensité minimale (Tableau II B, Figure 7 B).

Figure 7: Effets d'une exposition aux champs magnétiques sur la production d'interleukine-2 par les cellules spléniques chez le rat F344/N.

Des droites ont été tracées par régression linéaire avec les moyennes de production d'IL-2, en présence de ConA, obtenues pour chaque rat mâle. L'exposition aux champs magnétiques était de 60 Hz durant une période de 3 mois (—), 6 mois (— — —) et 9 mois (.....). Le graphique représente les droites de régression linéaire calculées avec le "sham" (A) ou le CC (B).

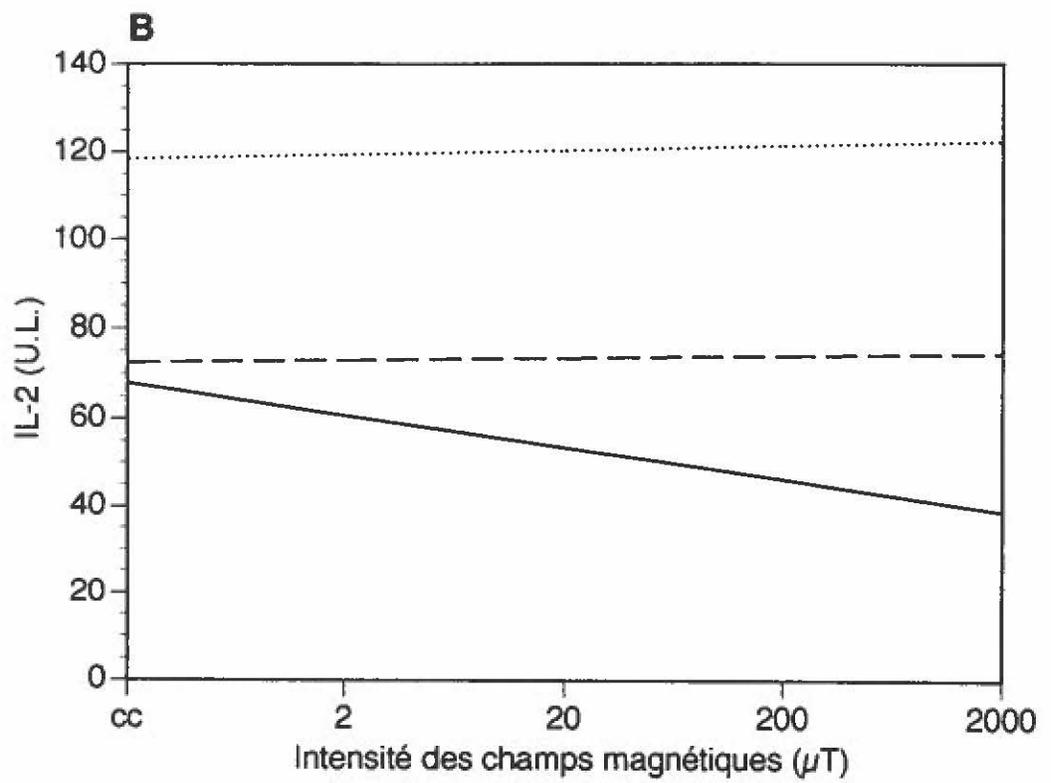
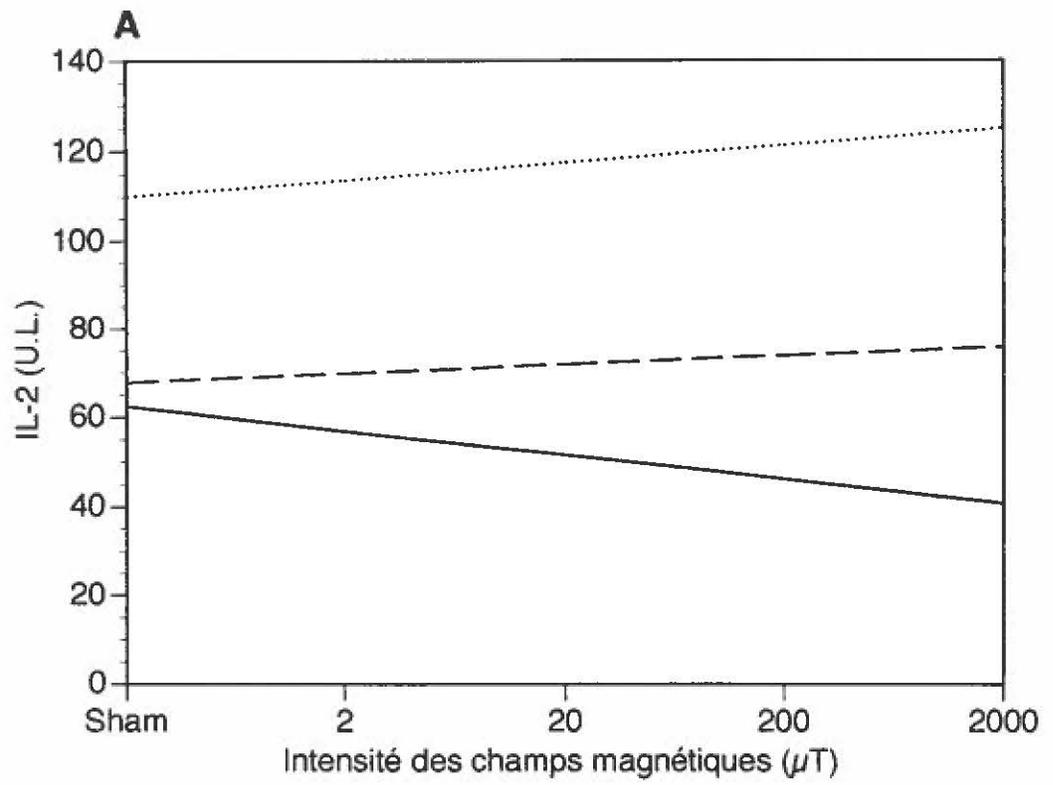


Tableau VI: Production d'IL-2 par des cellules spléniques chez des rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.

Intensités (μT)	Temps d'exposition		
	3 mois	6 mois	9 mois
CC	70,8 \pm 25,3 ^a (n=12)	78,4 \pm 8,3 (n=5)	125,6 \pm 38,6 (n=13)
Sham	61,3 \pm 29,1 (n=13)	68,4 \pm 11,8 (n=8)	111,8 \pm 48,9 (n=13)
2	59,1 \pm 17,7 (n=13)	68,9 \pm 6,7 (n=8)	107,5 \pm 37,1 (n=13)
20	47,7 \pm 17,8 (n=12)	68,7 \pm 10,8 (n=8)	120,4 \pm 62,4 (n=13)
200	51,1 \pm 14,3 (n=12)	79,9 \pm 12,3 (n=8)	127,1 \pm 33,7 (n=12)
2000	38,3 \pm 25,3 (n=12)	73,0 \pm 10,0 (n=8)	121,1 \pm 29,3 (n=13)

a Moyenne de n observations \pm écart type; moyenne exprimée en unités d'IL-2 produites par des cellules spléniques stimulées avec 1,25 $\mu\text{g/ml}$ de ConA.

2. CELLULES PÉRITONÉALES: EFFETS D'UNE EXPOSITION DE 3, 6, 9 MOIS

2.1 Production de peroxyde d'hydrogène

La production de H_2O_2 intracytoplasmique a été mesurée par cytofluorométrie sur la population totale de cellules péritonéales, en présence ou en absence de PMA. Le rapport, production de H_2O_2 en présence de PMA / production de H_2O_2 en absence de PMA a ensuite été calculé pour déterminer l'index de stimulation.

Deux sous-populations de cellules péritonéales ont pu être délimitées en fonction de leur taille et de leur granulosité (Figure 8): soit une population majeure (A) représentant 67% ($\pm 5\%$) des cellules de la population totale et une population mineure (B) représentant 15% ($\pm 3\%$). Des analyses subséquentes de ces deux populations, par adhérence et par liaison d'Ac monoclonaux anti-granulocyte et anti-macrophage de rat, n'ont pas révélé de différences entre les deux populations (Tremblay et *al.* 1996). L'index de stimulation de production d' H_2O_2 était en moyenne deux fois plus élevé chez la population majeure, quelque soit le temps de l'exposition (Tableau VII).

Avec le "sham" (Tableau II A), les analyses de régression linéaire montrent la présence d'une légère diminution dose-réponse de l'index de stimulation de la production de H_2O_2 pour la population majeure (A) après 3 mois ($b=-0,33$; $p=0,05$) et 9 mois ($b=-0,48$; $p=0,01$) d'exposition. Ces diminutions à 2000 μT étaient respectivement de 17% et 34%. À 6 mois d'exposition, la pente négative obtenue ($b=-0,45$) n'est pas significative ($p=0,10$). Pour la population mineure (B), aucune relation dose-dépendante n'a été observée ($p>0,05$).

En comparant les réponses des deux sous-populations obtenues à 3, 6 et 9 mois par régression multiple, aucune variation avec le temps d'exposition ($p>0,05$) n'est observée. La

durée d'exposition ne semble pas avoir affecté, de manière significative, les réponses aux champs magnétiques.

Avec le CC comme témoin, les résultats statistiques diffèrent sensiblement (Tableau II B). Les diminutions de l'index de stimulation observées à 3 et 9 mois pour la population majeure (A) avec le "sham", ne sont pas significatives par rapport à celles calculées avec le CC ($p > 0,05$).

2.2 Production du facteur de nécrose des tumeurs (TNF- α)

La production de TNF- α par des cellules péritonéales de rats, en présence de LPS, a été déterminée après des expositions aux champs magnétiques de 3, 6 et 9 mois (Tableau VIII). Les résultats obtenus montrent qu'il y avait une variation importante à l'intérieur des groupes, les écarts-types étant très élevés. Le nombre d'observations y est aussi très limité.

Après 3 mois, le test de régression linéaire calculé avec le "sham" montre une augmentation de la production de TNF- α ($b=17,13$; $p=0,05$) proportionnelle à l'intensité des champs magnétiques (Tableau II A, Figure 9 A). En effet, la production de TNF- α était environ 3 fois plus élevée à 2000 μ T par rapport au groupe témoin.

Après 6 et 9 mois d'exposition, aucune variation significative de la production de TNF- α n'a pu être observée ($p > 0,05$). La comparaison des temps d'expositions par régression multiple montre que les réponses sont analogues ($p=0,67$).

Les résultats statistiques obtenus avec le CC comme groupe témoin, corroborent ceux obtenus avec le "sham" (Tableau II B, Figure 9 B). Par contre, la production de TNF- α a varié de manière significative en fonction du temps d'exposition ($p < 0,05$) avec ce témoin.

Figure 8: Distribution des cellules péritonéales de rats F344N.

Ce graphique montre la distribution des cellules péritonéales obtenue par cytofluorométrie. En abscisse on retrouve la granulosité des cellules (side scatter [SS]) et en ordonnée, la taille des cellules (forward scatter [FS]). Cette figure met en évidence deux populations de cellules péritonéales: une population majeure (A), représentant environ 67% de la population totale, et une population mineure (B) représentant 15%. La distribution des cellules péritonéales est représentative de tous les groupes.

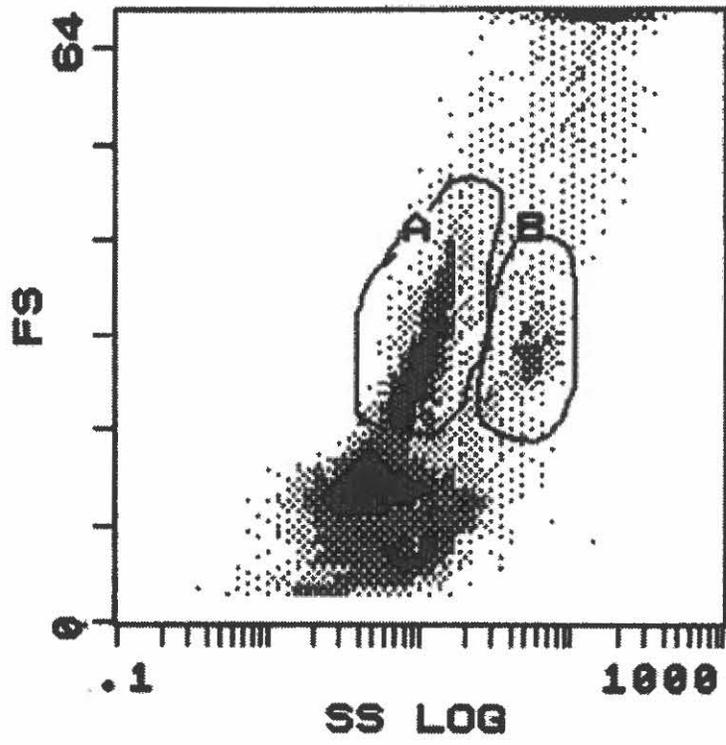


Tableau VII: Index de stimulation de la production d'H₂O₂ par les cellules péritonéales chez des rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.

		Temps d'exposition		
Intensités (μT)		3 mois	6 mois	9 mois
Population majeure (A)	CC	4,9 ± 1,8 ^a (n=12)	5,4 ± 2,3 (n=11)	4,0 ± 2,6 (n=4)
	Sham	6,0 ± 2,1 (n=13)	5,9 ± 3,2 (n=14)	5,3 ± 0,4 (n=10)
	2	6,2 ± 2,1 (n=13)	6,6 ± 4,1 (n=12)	4,8 ± 2,5 (n=10)
	20	4,2 ± 1,2 (n=13)	5,8 ± 3,5 (n=12)	3,5 ± 1,6 (n=9)
	200	5,0 ± 1,9 (n=13)	5,2 ± 2,1 (n=13)	4,0 ± 1,2 (n=8)
	2000	5,0 ± 1,7 (n=12)	4,3 ± 0,7 (n=11)	3,5 ± 1,3 (n=6)
Population mineure (B)	CC	2,4 ± 0,7 (n=12)	2,8 ± 1,0 (n=11)	2,1 ± 1,1 (n=4)
	Sham	2,7 ± 0,7 (n=13)	3,1 ± 1,2 (n=14)	2,8 ± 0,4 (n=10)
	2	3,1 ± 1,1 (n=13)	3,6 ± 2,2 (n=12)	2,5 ± 1,1 (n=10)
	20	2,7 ± 0,8 (n=13)	3,1 ± 1,2 (n=12)	2,0 ± 0,8 (n=9)
	200	2,7 ± 0,8 (n=13)	3,2 ± 1,5 (n=14)	2,2 ± 0,7 (n=8)
	2000	2,4 ± 0,7 (n=12)	3,1 ± 1,6 (n=14)	2,3 ± 0,8 (n=5)

a Moyenne de n observations ± écart type; moyenne exprimée par l'index de stimulation (IS) de la production H₂O₂ i.e. le rapport de l'intensité de fluorescence obtenue en présence de PMA sur celle obtenue en absence de PMA.

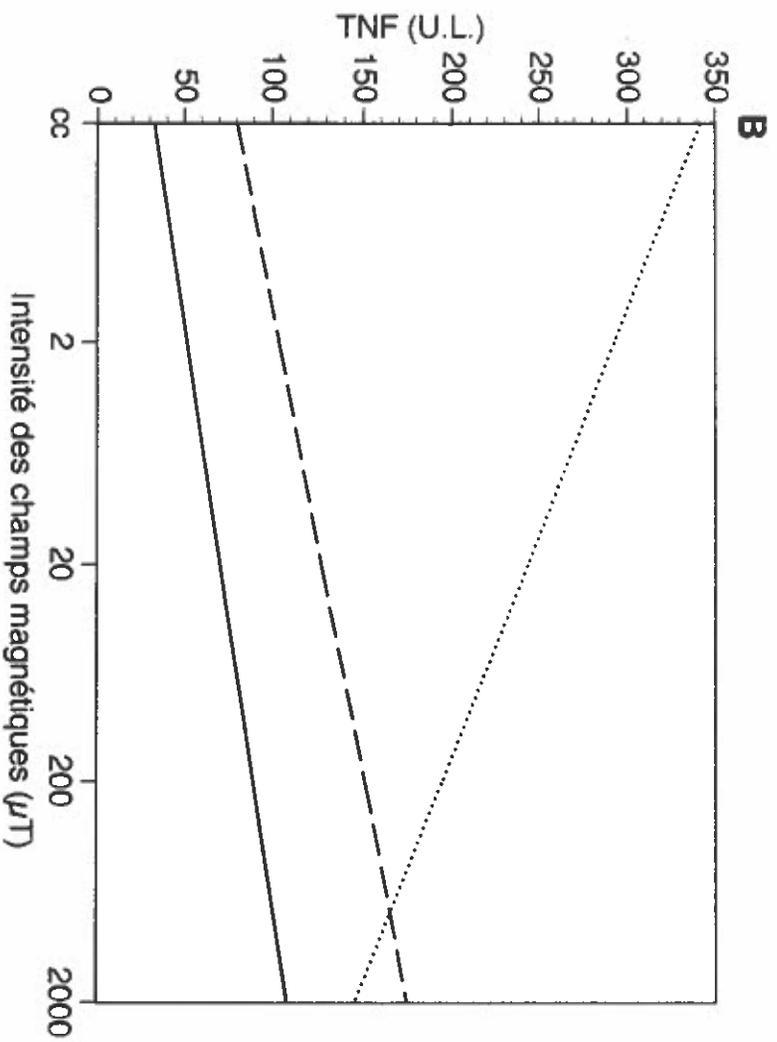
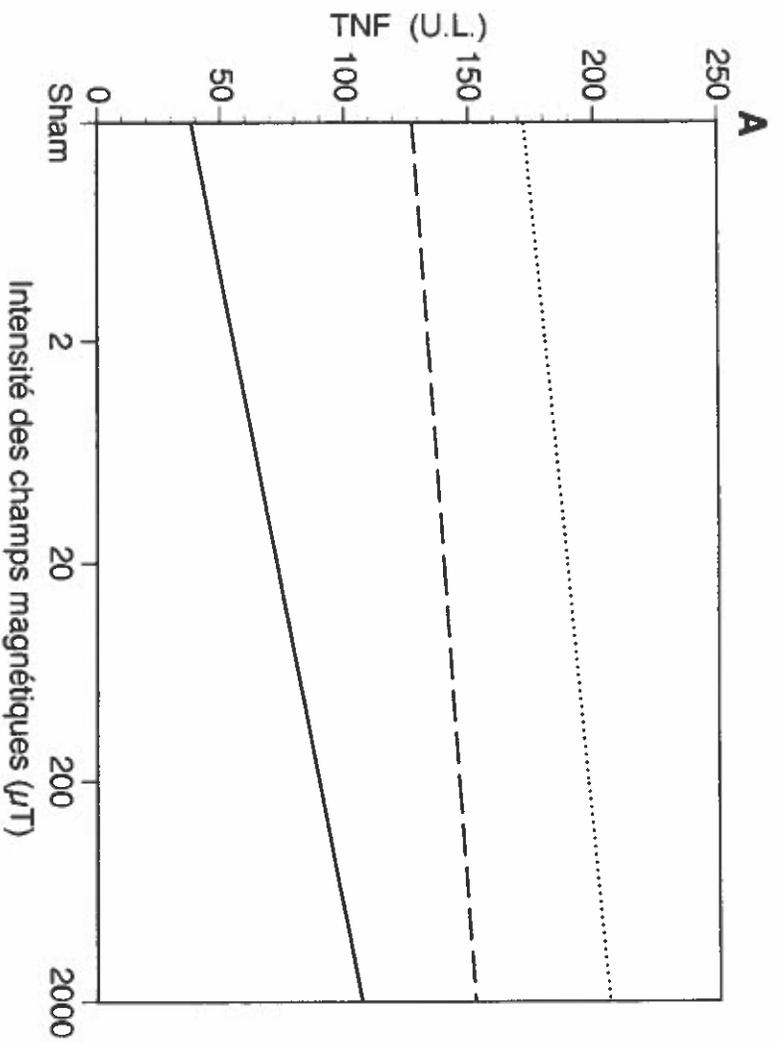
Tableau VIII: Production du facteur de nécrose des tumeurs par des cellules péritonéales chez des rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.

Intensités (μ T)	Temps d'exposition		
	3 mois	6 mois	9 mois
CC	37,0 \pm 22,7 ^a (n=3)	43,3 \pm 40,6 (n=3)	441,5 \pm 398,6 (n=4)
Sham	43,8 \pm 56,7 (n=5)	128,3 \pm 76,1 (n=4)	146,6 \pm 124,3 (n=5)
2	72,0 \pm 38,7 (n=5)	98,5 \pm 108,1 (n=4)	155,8 \pm 103,9 (n=5)
20	32,7 \pm 17,2 (n=3)	173,2 \pm 88,0 (n=5)	240,5 \pm 133,4 (n=4)
200	65,0 \pm 38,6 (n=5)	165,0 \pm 90,9 (n=4)	354,7 \pm 94,9 (n=3)
2000	139,5 \pm 88,0 (n=4)	99,5 \pm 89,8 (n=2)	99,0 \pm 63,6 (n=4)

a Moyenne de n observations \pm écart type; moyenne exprimée en unités de TNF- α produit par des macrophages péritonéaux stimulés avec 0,1 μ g/ml de LPS.

Figure 9: Effets d'une exposition aux champs magnétiques sur la production de TNF- α par les cellules péritonéales chez le rat F344/N.

Des droites ont été tracées par régression linéaire avec les moyennes de productions de TNF- α obtenues pour chacun des rats mâles. L'exposition aux champs magnétiques était de 60 Hz, durant une période de 3 mois (—), 6 mois (— — —) et 9 mois (.....). Le graphique représente les droites de régression linéaire calculées avec le "sham" (A) ou le CC (B).



3. CELLULES DU SANG PÉRIPHÉRIQUE: EFFETS D'UNE EXPOSITION DE 3, 6, 9 MOIS

3.1 Compte leucocytaire

Le dénombrement des leucocytes du sang périphérique a été effectué, après des expositions de 3, 6, et 9 mois aux champs magnétiques (Tableau IX). Les analyses de régression linéaire calculées par rapport au "sham" ou au CC (Tableau II A et B), ne montrent aucune relation dose-dépendante entre l'intensité des champs magnétiques et le nombre de leucocytes par mm^3 de sang ($p > 0,05$), quelque soit la période d'exposition.

3.2 Compte différentiel

Le pourcentage des différentes populations de leucocytes périphériques a été déterminé par coloration différentielle (Tableaux X A et B). Après des expositions de 3, 6 et 9 mois, les analyses de régression linéaire ne montrent aucune variation dose-réponse significative ($p > 0,05$) des pourcentages de populations leucocytaires du sang périphérique (lymphocytes, monocytes, neutrophiles, éosinophiles et basophiles). Seule une légère diminution du pourcentage d'éosinophiles a été observé après 9 mois d'exposition ($b = -0,10$; $p = 0,03$), par rapport au groupe "sham" seulement. Toutefois, cette observation semble être due à la taille de l'échantillonnage: les éosinophiles représentent moins de 1 % de la population leucocytaire totale.

Tableau IX: Nombre de leukocytes/mm³ de sang chez des rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.

Intensités (μ T)	Temps d'exposition		
	3 mois	6 mois	9 mois
CC	10300 \pm 1238 ^a (n=4)	6632 \pm 1578 (n=5)	9456 \pm 1367 (n=5)
Sham	7832 \pm 1398 (n=5)	8485 \pm 2442 (n=8)	7744 \pm 1057 (n=5)
2	9744 \pm 2872 (n=5)	6145 \pm 2257 (n=8)	7424 \pm 1631 (n=5)
20	6960 \pm 2158 (n=5)	6970 \pm 1838 (n=8)	7312 \pm 1362 (n=5)
200	9248 \pm 1959 (n=5)	7756 \pm 2059 (n=8)	8672 \pm 2028 (n=5)
2000	8264 \pm 382 (n=5)	5415 \pm 1315 (n=8)	6912 \pm 1290 (n=5)

a Moyenne de n observations \pm écart type; moyenne exprimée en nombre de leukocytes par mm³ de sang.

Tableau X A: Pourcentages de leucocytes mononucléaires périphériques de rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.

		Temps d'exposition		
		3 mois	6 mois	9 mois
	Intensités (μ T)			
Lymphocytes (%)	CC	87,5 \pm 1,7 ^a (n=4)	90,0 \pm 4,3 (n=5)	85,0 \pm 6,0 (n=5)
	Sham	86,6 \pm 3,5 (n=5)	87,5 \pm 6,8 (n=8)	86,0 \pm 3,4 (n=5)
	2	91,4 \pm 1,7 (n=5)	86,6 \pm 7,2 (n=8)	82,6 \pm 11,6 (n=5)
	20	88,2 \pm 4,8 (n=5)	88,0 \pm 4,4 (n=8)	84,4 \pm 7,7 (n=5)
	200	89,6 \pm 5,6 (n=5)	84,9 \pm 10,1 (n=7)	87,0 \pm 4,3 (n=5)
	2000	88,6 \pm 3,0 (n=5)	89,1 \pm 4,0 (n=8)	89,6 \pm 5,1 (n=5)
Monocytes (%)	CC	3,5 \pm 2,6 (n=4)	2,2 \pm 0,4 (n=5)	1,2 \pm 0,4 (n=5)
	Sham	2,8 \pm 1,5 (n=5)	1,9 \pm 1,0 (n=8)	2,2 \pm 0,4 (n=5)
	2	1,6 \pm 0,9 (n=5)	2,6 \pm 1,7 (n=8)	1,4 \pm 1,5 (n=5)
	20	3,0 \pm 1,6 (n=5)	0,8 \pm 1,2 (n=8)	1,8 \pm 1,8 (n=5)
	200	1,4 \pm 1,1 (n=5)	2,4 \pm 1,3 (n=7)	1,2 \pm 0,8 (n=5)
	2000	3,2 \pm 1,1 (n=5)	1,4 \pm 0,5 (n=8)	1,2 \pm 0,4 (n=5)

^a Moyenne de n observations \pm écart type; moyenne exprimée en pourcentage de cellules identifiées dans la population leucocytaire périphérique.

Tableau X B: Pourcentages de leucocytes polynucléaires périphériques chez des rats F344/N mâles exposés à différentes intensités de champs magnétiques de 60 Hz.

		Temps d'exposition			
		Intensités (μ T)	3 mois	6 mois	9 mois
Neutrophiles (%)	CC		8,5 \pm 2,4 ^a (n=4)	8,2 \pm 4,5 (n=5)	13,2 \pm 5,3 (n=5)
	Sham		10,0 \pm 2,7 (n=5)	10,0 \pm 5,8 (n=8)	11,4 \pm 3,8 (n=5)
	2		7,0 \pm 2,0 (n=5)	10,3 \pm 6,4 (n=8)	16,0 \pm 10,8 (n=5)
	20		8,8 \pm 4,4 (n=5)	10,9 \pm 3,8 (n=8)	13,8 \pm 6,7 (n=5)
	200		8,4 \pm 5,5 (n=5)	14,0 \pm 9,3 (n=7)	11,8 \pm 4,02 (n=5)
	2000		8,0 \pm 3,2 (n=5)	9,3 \pm 3,7 (n=8)	9,2 \pm 5,1 (n=5)
Eosinophiles (%)	CC		0,25 \pm 0,50 (n=4)	0,00 \pm 0,00 (n=5)	0,40 \pm 0,55 (n=5)
	Sham		0,40 \pm 0,55 (n=5)	0,38 \pm 0,52 (n=8)	0,00 \pm 0,00 (n=5)
	2		non-délectable	0,38 \pm 0,52 (n=8)	0,20 \pm 0,45 (n=5)
	20		non-délectable	0,38 \pm 0,52 (n=8)	non-délectable
	200		0,60 \pm 0,89 (n=5)	non-délectable	non-délectable
	2000		0,40 \pm 0,55 (n=5)	0,13 \pm 0,35 (n=8)	non-délectable
Basophiles (%)	CC		0,25 \pm 0,50 (n=4)	non-délectable	0,20 \pm 0,45 (n=5)
	Sham		0,20 \pm 0,45 (n=5)	non-délectable	non-délectable
	2		non-délectable	0,13 \pm 0,35 (n=8)	non-délectable
	20		non-délectable	non-délectable	0,20 \pm 0,45 (n=5)
	200		non-délectable	non-délectable	non-délectable
	2000		3,20 \pm 1,10 (n=5)	non-délectable	non-délectable

^a Moyenne de n observations \pm écart type; moyenne exprimée en pourcentage de cellules identifiées dans la population leucocytaire périphérique.

DISCUSSION

1. LES CELLULES SPLÉNIQUES

1.1 Activité des cellules NK

Cette étude a démontré des augmentations significatives de l'activité des cellules NK après une exposition de 3, 6, et 9 mois aux champs magnétiques de différentes intensités. Cette augmentation variait selon le temps d'exposition; les réponses aux champs magnétiques étaient beaucoup moins prononcées après 6 et 9 mois d'exposition.

Le niveau d'activité des cellules NK obtenu avec les deux témoins étaient comparables à ceux observés dans notre laboratoire (Tremblay *et al.*, 1996) et par d'autres chercheurs (Reynolds et Holden, 1982). De plus, dans une étude récente menée dans notre laboratoire, une relation dose-réponse entre l'activité des cellules NK spléniques de rat F344/N et l'intensité des champs magnétiques après 6 semaines d'exposition a été observée (Tremblay *et al.* 1996). Nos résultats confirment aussi ceux rapportés par De Seze *et al.* (1993); ces chercheurs ont aussi noté une augmentation de l'activité des cellules NK spléniques chez des souris Balb/C exposées à des champs magnétiques pulsés de 0,8 Hz pendant 5 semaines. Ces effets dépendaient de l'âge des souris (effets observés à 12 et 24 semaines) et de l'intensité des champs magnétiques (effets observés à 30 et 60 mT). D'autre part, l'équipe de McLean *et al.* (1991) a démontré une augmentation non significative de 21% (par rapport au témoin) de l'activité des cellules NK spléniques chez les souris traitées au DMBA et exposées à des champs magnétiques de 2000 μ T. L'étude de Malter *et al.* (1987) n'a montré aucune variation significative de l'activité des cellules NK spléniques après exposition de rats à des champs magnétiques pulsés de 50Hz et de 26 mT. Le groupe de House *et al.* (1995) n'a montré aucune variation significative de l'activité des cellules NK chez des rats F344/N (mâle ou femelle) exposés à des champs magnétiques de 60 Hz (1000 μ T) durant 6 et 13 semaines.

Les différences observées entre nos résultats et ceux d'autres études peuvent être attribuées à différents facteurs: temps d'exposition, type de champ magnétique utilisé (fréquence, intensité et forme), le modèle animal employé et le fait que nos animaux étaient exposés dès la naissance (et non à la fin du sevrage).

L'augmentation de l'activité NK observée dans notre étude pourrait être due à (1) une augmentation du nombre de cellules NK; (2) une augmentation de l'activité des cellules NK après une stimulation de la production de certains immunomodulateurs et/ou (3) des changements à la surface de la membrane cellulaire induisant une reconnaissance ou une cytotoxicité accrue. Selon certaines hypothèses, les champs magnétiques pourraient agir comme un facteur de stress biologique; en effet, il a été démontré que l'activité cytotoxique des cellules NK pouvait être altérée chez le rat F344/N suite à l'exposition à un stress aigu (Ben-Eliyahu et *al.*, 1991). Une augmentation de l'activité des cellules NK peut représenter une plus grande efficacité de l'immunité naturelle contre la présence d'agents pathogènes ou de cellules tumorales (Whiteside et Herberman, 1989). Toutefois, une activité excessivement élevée des cellules NK pourrait avoir des effets néfastes pour la défense de l'organisme en provoquant une réaction inflammatoire ou maladie autoimmune (Arai et *al.*, 1989; Gergely, 1992).

1.2 Phénotypage

Dans notre étude, l'exposition aux champs magnétiques a induit des diminutions significatives au niveau des différentes populations de cellules spléniques chez le rat. Après une exposition de 3 mois, des effets dose-réponses négatifs ont été observés au niveau des sous-populations de lymphocytes T CD5⁺ et CD8⁺, ainsi qu'une légère diminution des CD4⁺. La diminution des cellules CD4⁺ n'était toutefois pas proportionnelle à celle des CD8⁺, ce qui

a résulté en une augmentation du rapport CD4/CD8. Effectivement, la diminution des cellules CD8⁺ était beaucoup plus prononcée que celle des lymphocytes CD4⁺. Aucun effet des expositions aux champs magnétiques n'a été observé au niveau du pourcentage de lymphocytes B (Igs⁺).

Les réponses obtenues variaient en fonction du temps d'exposition; aucune relation dose-dépendante, entre les différentes populations de lymphocytes spléniques et l'intensité des champs magnétiques, n'a été observée après 6 et 9 mois d'exposition.

Les réponses des groupes témoins (CC et "sham"), pour les différents marqueurs de surface, ont différé sensiblement de celles obtenues par d'autres chercheurs (Brideau et al., 1980; Dallman et al., 1984). Les pourcentages de lymphocytes T, CD5⁺, CD8⁺ et CD4⁺ étaient inférieurs à ceux des travaux antérieurs, alors que le pourcentage de lymphocytes B (Igs⁺) était comparable. Il faut toutefois noter que ces chercheurs ont employé des techniques de marquage indirect, amplifiant ainsi la réponse, et le bruit de fond.

Nos résultats obtenus après 3 mois d'exposition sont en accord avec ceux obtenus antérieurement dans notre laboratoire, après une exposition de 6 semaines (Tremblay et al. 1996). Des variations inversement proportionnelles avec l'intensité des champs magnétiques avaient été observées pour les lymphocytes T CD5⁺ et les sous-populations CD4⁺ et CD8⁺. Par contre, aucune différence significative n'a été observée dans le rapport CD4:CD8, et dans les pourcentages de lymphocytes B. Nos résultats corroborent en partie ceux observés par Jankovic et al. (1991) chez le rat Wistar adulte. Ces auteurs ont rapporté une diminution des lymphocytes CD8⁺ et une augmentation des CD4⁺, donnant ainsi des rapports CD4:CD8 plus élevés dans le cas des rats exposés aux champs magnétiques. Dans cette étude les champs magnétiques utilisés étaient statiques et produits par des micro-aimants appliqués au niveau du cerveau. De plus, l'intensité utilisée (60 mT) était 30 fois plus élevée que l'intensité

maximale utilisée dans notre protocole d'exposition, alors que les périodes d'exposition étaient beaucoup plus courtes que les nôtres (14, 24 ou 34 jours).

L'ensemble des résultats obtenus semblent indiquer que les champs magnétiques pourraient agir directement en modifiant l'expression de certains antigènes de surface. Une étude dirigée par Santini *et al.* (1995) a montré des diminutions de la permittivité membranaire de cellules leucémiques, exposées *in vitro* aux champs magnétiques de 2500 μ T. Ces changements observés indiquent des modifications à la surface de la membrane plasmique, au niveau des protéines, des lipides ou des deux. Des altérations ont également été observées au niveau de l'expression des récepteurs IL-2, après une exposition *in vitro* de lymphocytes humains à des champs magnétiques pulsés (Cossarizza *et al.*, 1989). De plus, les champs magnétiques pourraient agir de différentes manières sur la structure et la fonction de la membrane cellulaire des lymphocytes T et B (Liburdy *et al.*, 1993). Les champs magnétiques pourraient affecter indirectement les pourcentages de lymphocytes, en agissant au niveau de la glande pinéale, responsable de la production de mélatonine. Une inhibition de la synthèse de la mélatonine peut conduire à une dépression significative de l'immunité (Maestroni *et al.* 1986). Des études ont montré une réduction de la sécrétion de mélatonine après exposition à des champs magnétiques de 50-60 Hz (Wilson *et al.*, 1990; Reiter, 1990; Kato *et al.*, 1993; Yellon *et al.*, 1994).

1.3 Dosage de l'interleukine 2

La production d'IL-2 par des cellules spléniques, stimulées par Con A, semble être influencée par les champs magnétiques. En effet, après une exposition de 3 mois, la variation de l'activité IL-2 était inversement proportionnelle à l'augmentation de l'intensité.

Cette modulation négative dépend du temps d'exposition, ainsi la production d'IL-2 n'était pas altérée par les champs magnétiques après 6 et 9 mois.

D'autres auteurs ont rapporté que les champs magnétiques pouvaient moduler le niveau d'activation des lymphocytes en présence de Con A. Nos résultats après 3 mois d'exposition sont en accord avec ceux obtenus par Conti et *al.* (1983). Ces derniers ont observé une diminution de la prolifération de lymphocytes humains, suite à une exposition *in vitro* aux champs magnétiques pulsés de 50 Hz. Par contre, Walleczek et Liburdy (1990) ont observé une augmentation de l'influx de calcium chez des thymocytes de rats, après une exposition aux champs magnétiques de 22 mT. Coulton et Barker (1993) n'ont noté aucun changement de la concentration de calcium intracellulaire chez des lymphocytes T murins, exposé à des champs magnétiques de 65,3 μ T. Plusieurs facteurs peuvent expliquer la divergence des résultats obtenus: le type de champ magnétique (fréquence, forme et intensité) utilisé, la méthode d'exposition (*in vivo*, *in vitro*), le test utilisé, la concentration de Con A, ainsi que le temps de stimulation.

La diminution de la production d'IL-2 observée dans notre étude pourrait être individuelle, la baisse du pourcentage des cellules CD4⁺ étant très faible à 3 mois. Les champs magnétiques pourraient agir indirectement sur la production d'IL-2, en affectant la production de certains immunomodulateurs comme la mélatonine. La mélatonine peut affecter les niveaux de production d'IL-2 (Caroleo et *al.*, 1992).

2. LES CELLULES PÉRITONÉALES

Selon les résultats obtenus, l'index de stimulation de la production d'H₂O₂ a semblé peu affecté par une exposition aux champs magnétiques. Il était légèrement diminué chez la population cellulaire majeure (A) après 3 et 9 mois d'exposition, et seulement lorsqu'il était

calculé par rapport au "sham". Nos résultats diffèrent de ceux précédemment obtenus par Tremblay et *al.*, (1996). Aucun effet significatif n'avait été observé dans la population majeure (A); seul un effet dose-réponse positif avait été noté sur la production nette d' H_2O_2 dans la population mineure (B). Une autre étude montre que l'activation de monocytes par le TPA (un analogue du PMA) peut-être modulée par les champs magnétiques. Des augmentations de la production d'IL-1 β et d'IL-6 (en absence ou en présence de TPA) ont déjà été observées après une exposition de monocytes humains à des champs magnétiques pulsés d'une intensité de 2500 μ T (Cossarizza et *al.*, 1993).

D'autre part, le taux de production de TNF- α en présence de LPS était modifié par les champs magnétiques. Après une exposition de 3 mois, une augmentation significative de l'activité TNF- α fut observée et sembla disparaître après 6 et 9 mois. Toutefois, il faut souligner que le nombre d'observations était limité pour l'étude de ce paramètre; ces résultats demanderaient à être vérifiés à l'aide d'un plus grand nombre d'animaux. Aucun effet significatif n'avait été observé après 6 semaines d'exposition (Tremblay et *al.*, 1996). La hausse de la production de TNF- α après 3 mois était similaire à celle rapportée par Bellosi et L.Dazord (1994); ces chercheurs ont observé une augmentation de l'activité cytotoxique de macrophages de souris exposés *in vitro* à des champs magnétiques pulsés d'une intensité de 6 mT. Par contre, McCoy et Heifeneider (1993), ont observé des diminutions de la production d'IL-1 par des leucocytes stimulés par LPS et provenant d'agneaux exposés à des champs magnétiques de 60 HZ de 3,77 μ T.

La stimulation de la production de TNF- α en présence de LPS après 3 mois, mais non celle de la production d' H_2O_2 en présence de PMA, pourrait être expliquée par un effet sélectif des champs magnétiques sur les voies impliquées dans ces réponses. La production

de TNF- α peut être induite par le LPS via un mécanisme dépendant de la protéine kinase A (Muroi et Suzuki, 1993), alors que l'activation d'une voie dépendante de la protéine kinase C par le PMA peut induire la production d' H₂O₂ (Ghosh et Baltimore, 1990).

3. LES SOUS POPULATIONS DANS LE SANG PÉRIPHÉRIQUE

Les comptes leucocytaires et différentiels n'ont présenté aucune variation après des expositions de 3, 6 et 9 mois aux champs magnétiques. Seule une légère diminution du pourcentage d'éosinophiles est observée après 9 mois d'exposition (résultats obtenus par comparaison au CC). Cet effet pourrait être dû au faible échantillonnage de cette population dans le sang. L'absence de variations des comptes leucocytaires et différentiels, a aussi été rapportée par Lorimore *et al.* (1990). L'équipe de Picazo *et al.* (1994) a par contre observé une diminution des comptes leucocytaires et des pourcentages de lymphocytes et monocytes de souris exposées à des champs magnétiques de 100 μ T. D'autre part, nos résultats de comptes totaux et différentiels des deux groupes témoins sont comparables à ceux retrouvés dans la littérature chez le rat (Vondruska et Greco, 1973; Weisse *et al.*, 1974).

Tableau XI: Variations dose-dépendante des réponses immunitaires, suite à une exposition de rats F344/N aux champs magnétiques de 60 Hz.

Paramètres	Temps d'exposition			
	6 semaines (Tremblay <i>et al.</i> , 1996)	3 mois (15 sem.)	6 mois	9 mois
Activité NK	↑	↑	↑ ^c	↑
CD5	↓	↓	→	→
CD4	↓	↓ ^c	→	→
CD8	↓	↓	→	→
CD4:CD8	→	↑	→	→
Igs	→	→	→	→
IL-2	nd	↓	→	→
H ₂ O ₂ (pop. A)	→	↓ ^s	→	↓ ^s
H ₂ O ₂ (pop. B)	↑	→	→	→
TNF	→	↑	→	→
Compte leucocytaire	nd	→	→	→
Lymphocytes	nd	→	→	→
Neutrophiles	nd	→	→	→
Monocytes	nd	→	→	→
Basophiles	nd	→	→	→
Eosinophiles	nd	→	→	↓ ^c

- ↓ Diminution dose-dépendante significative par régression linéaire.
 ↑ Augmentation dose-dépendante significative par régression linéaire.
 → Analyse de régression linéaire non significative ($p > 0,05$).
 nd Non-déterminé
 s Variation significative par rapport au groupe "sham" seulement.
 c Variation significative par rapport au groupe CC seulement.

4. SYSTÈME IMMUNITAIRE: EFFETS D'UNE EXPOSITION DE 3, 6 ET 9 MOIS.

D'après nos résultats (Tableau XI), les réponses du système immunitaire aux champs magnétiques dépendent (1) de l'intensité utilisée et (2) de la période d'exposition. Les modifications les plus importantes du système immunitaire ont été observées après 3 mois d'exposition et se sont avérées dose-dépendantes. Cependant, le système immunitaire semble moins sensible chez des rats plus âgés, car la plupart des effets rapportés après 3 mois d'exposition se dissipent après 6 et 9 mois, ce qui suggère une adaptation de l'organisme au stress infligé par les champs magnétiques

Les variations significatives ont été observées en grande partie au niveau des populations de cellules spléniques et de cellules péritonéales; les leucocytes périphériques ne seraient pas modifiés par une exposition aux champs magnétiques. D'après Luster et *al.* (1992,1993), il existe une relation directe entre une perturbation de la réponse immunitaire et la résistance de l'hôte aux infections et au développement de tumeurs. Selon cette équipe, des tests comme l'activité des cellules NK, le phénotypage des populations lymphocytaires, ou la réponse des cellules T à un mitogène, sont très efficaces pour détecter une perturbation du système immunitaire. En effet les pourcentages de concordance (somme de la spécificité et de la sensibilité du test) obtenus pour ces techniques sont significatifs (respectivement 69%, 83% et 67%). Par contre, les techniques employées pour évaluer la réponse des macrophages au LPS, ou pour déterminer les comptes leucocytaires et différentiels seraient moins efficaces.

Les effets observés après une exposition aux champs magnétiques, dépendent du paramètre immunitaire étudié. Une modulation positive fut observée au niveau de l'activité des cellules NK et de la production de TNF- α . Elle représentait probablement une plus

grande efficacité du système immunitaire. Par contre, une augmentation anormalement élevée entraînerait des effets néfastes sur le système immunitaire et des réactions d'hypersensibilité ou auto-immune. D'autre part, une modulation négative est observée au niveau des pourcentages de lymphocytes T et de la production d'Il-2 et de H_2O_2 . Un effet immunosuppresseur pourrait signifier une moins grande efficacité du système immunitaire: l'affaiblissement des résistances antimicrobiennes et l'accroissement de l'incidence de certains cancers (Descotes J., 1991). L'augmentation de certaines réponses immunitaires pourraient représenter une adaptation du système immunitaire, face à l'effet dépressif des champs magnétiques sur les lymphocytes T et la production d'Il-2.

Différents mécanismes peuvent être impliqués après une exposition aux champs magnétiques: un effet direct au niveau de la membrane cellulaire avec des modifications au niveau de la composition protéique ou lipidique de la membrane, ou des variations dans le transport de certains ions comme le calcium (Santini et *al.*, 1995; Walleczek, 1992). Les champs magnétiques pourraient influencer la production de certains facteurs immunomodulateurs. Des études ont montré que les champs magnétiques peuvent altérer la production de mélatonine (Wilson et *al.*, 1990; Reiter, 1990; Kato et *al.*, 1993; Yellon et *al.*, 1994), hormone qui pourrait agir comme immunomodulateur (Maestroni et *al.* 1986; Caroleo et *al.*, 1992). Une ablation de la glande pinéale chez le rat (Jankovik et *al.*, 1994) peut altérer l'effet d'une exposition aux champs magnétiques sur certaines réponses immunitaires.

Les résultats obtenus démontrent que certaines réponses immunitaires peuvent être affectées par les champs magnétiques et soulèvent différentes questions. Quelle serait l'impact réelle de ces perturbations observées sur la résistance aux infections et aux tumeurs? Les effets observés seraient-ils les mêmes si nos rats auraient été exposés dès l'âge adulte? Est-ce que d'autres paramètres immunitaires pourraient être modulés par une exposition aux champs magnétiques? Des travaux sont actuellement effectués dans notre laboratoire pour

mieux comprendre les interactions entre les champs magnétiques et le système immunitaire. Les mêmes paramètres immunitaires sont évalués chez des rats adultes exposés pendant 6 et 15 semaines (3 mois). De plus d'autres techniques ont été ajoutées pour évaluer l'effet d'une exposition aux champs magnétiques sur les cellules formant des plages (PFC), l'activité cytotoxique des lymphocytes T, et le phénotypage des thymocytes. Les effets sur la résistance de l'hôte aux infections (*Listeria monocytogenes*) et aux tumeurs (tumeur mammaire:MADB106) sont également étudiés pour évaluer l'impact réel sur la santé.

CONCLUSION

Cette étude avait pour but de déterminer l'effet d'une exposition à long terme aux champs magnétiques sinusoïdaux de 60 Hz sur différentes populations de cellules immunitaires. Dès le vingtième jour de gestation, des rats F344/N ont été exposés à différentes intensités de champs magnétiques (2, 20, 200 et 2000 μ T) pendant 3, 6 et 9 mois.

Les résultats obtenus démontrent que les champs magnétiques semblent moduler de manière dose-dépendante certaines réponses des cellules spléniques et confirment dans l'ensemble les variations observés par Tremblay et *al.* (1996). Une augmentation de l'activité des cellules NK fut observée avec l'intensité croissante des champs magnétiques et après 3 et 9 mois d'exposition. Une hausse significative fut également observée à 6 mois, mais seulement par rapport au groupe CC. Les pourcentages de lymphocytes T CD5⁺, CD4⁺, et CD8⁺ ont diminué après 3 mois d'exposition, et sont revenus à un niveau normal après 6 et 9 mois d'exposition. Les lymphocytes B Igs⁺ n'ont pas été affectés par les champs magnétiques. Après 3 mois d'exposition, une diminution de l'activité IL-2 en parallèle à une augmentation de l'intensité des champs magnétiques fut observée; cette variation disparaissait après 6 et 9 mois.

L'index de stimulation de la production d'H₂O₂ par les cellules péritonéales fut peu affecté par une exposition aux champs magnétiques. Seule une légère dépression de ce rapport est observée dans la population cellulaire majeure (A) après 3 et 9 mois d'exposition, par rapport au "sham" seulement. De plus les champs magnétiques semble causer une augmentation de la production de TNF- α après 3 mois d'exposition; toutefois, ce résultat demande à être confirmé à l'aide d'un plus grand échantillonnage. Finalement, les comptes leucocytaires et différentiels furent peu influencés par une exposition aux champs magnétiques.

Nous avons démontré que les champs magnétiques peuvent moduler, de manière dose-dépendante, différents paramètres immunitaires et plus particulièrement après 3 mois d'exposition. Il sera donc intéressant d'évaluer d'autres réponses immunitaires et d'étudier les effets directs d'une exposition aux champs magnétiques sur la résistance des individus à différentes infections et cellules tumorales.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier d'une façon toute particulière le Dr. Rosemonde Mandeville pour avoir accepté la direction de ce projet de recherche. Elle a su me transmettre son intérêt pour la recherche et a démontré beaucoup de support et de compréhension.

Je tiens également à remercier Ginette Mercier pour son aide considérable tout au long de ma maîtrise. Son aide technique, ses précieux conseils, et ses encouragements m'ont été indispensables.

Un grand merci au Dr. Michel Houde, Normand Rocheleau, Fawsia Ben-Amor, El-Khansa Kaicer, Salwa Sidrac-Ghali et Michel Labrèche qui ont tous contribué à ce travail, chacun à leur manière. Je remercie également Marcel Desrosiers pour la cytofluorométrie, ainsi que Marie Désy pour les analyses statistiques.

J'aimerais exprimer mes sincères remerciements au FCAR et à la fondation Armand-Frappier pour leur aide financière, ainsi qu'à B.C. Hydro (représenté par Kelly Gibney) et Hydro-Québec (représenté par Daniel Goulet) qui ont subventionné ce projet.

Merci aussi aux étudiants pour leur support morale et leur amitié grandement apprécié: Anna Karine Bélizaire, France Filiatrault, Isabelle Lussier, Mikhaïl Popkov et tous les autres.

En terminant, je tiens à remercier mes parents, Jacques et Jocelyne, qui m'ont appuyé dès le début, tout au long de mes études. Mes remerciements également à Francis et Julie, qui m'ont apporté une aide des plus précieuse, ainsi qu'à Sylvie et Michel.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAIR, R. K. 1993. Effects of ELF Magnetic Fields on Biological Magnetite. *Bioelectromagnetics*, 14: 1-4.
- ADAIR, R. K. 1994. Constraints of thermal noise on the effects of weak 60-Hz magnetic fields acting on biological magnetite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2925-2929.
- ADEY, W. R. 1990. Joint actions of environmental nonionizing electromagnetic fields and chemical pollution in cancer promotion. *Environ. Health Persp.* 86:297-305.
- ARAI, S., T. KASHO, Y. TOMITA, T. MUNAKATA, H. INOUE & T. MIYAZAKI. 1989. Suppressive effect of interferon- β -activated natural killer cells in lipopolysaccharide-induced B cell differentiation of MRL/Mp-1pr/1pr mice. *Microbiol. Immunol.* 33: 957-967.
- AZADNIV, M. & M.W. MILLER 1992. ^3H -Uridine uptake in human leukemia HL-60 cells exposed to extremely low frequency electromagnetic fields. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 189: 437-444.
- BAUM, A., M. MEVISSSEN, K. KAMINO, U. MOHR, & W. LOSCHER. (1995). A histopathological study on alterations in DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats with 50 Hz, 100 μT magnetic field exposure. *Carcinogenesis*, 16: 119-125.
- BELLOSSI, A. & L. DAZORD. 1994. Effect of pulsed magnetic fields on the cytotoxicity of mice peritoneal macrophages. *Electro- and Magnetobiology*, 13: 183-189.
- BENNET, W. R., Jr. 1994. Cancer and Power Lines. *Physics Today*. April: 23-29.
- BENNET, W. R., Jr. 1995. Electromagnetic Fields and Power Lines. *Scientific American, Science & Medicine*. July/August: 68-77.
- BIRON, C. A. & R.M. WELSH. 1982. Activation and role of natural killer cells in virus infections. *Med. Microbiol. Immunol.* 170: 155-172.
- BLACKMAN, C. F., S. G. BENANE, & W. T. JOINES. 1985. Effects of ELF (1-120 Hz) and modulated (50 Hz) RF fields on the efflux of calcium ions from brain tissue in vitro. *Bioelectromagnetics*. 6: 1-11.
- BRIDEAU, R. J., P. B. CARTER, W. R. MCMASTER, D. W. MASON & A. F. WILLIAMS. 1980. Two subset of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 10: 609-615.

- BURSTEIN, H. J. & A. K. ABBAS. 1991. T-cell-mediated activation of B cells. *Current Opinion in Immunology*. 3: 345-349.
- CADOSSI, R., G. EMILIA G. TORELLI, G. CECCHERELLI, S. FERRARI & P. RUGGIER. 1985. The effect of low-frequency pulsing electromagnetic fields on the response of human normal lymphocytes to phytohaemagglutinin (PHA). *Bioelectrochem. Bioenerg.* 14: 115-119.
- CARBONE, F. R. & M. J. BEVAN. 1990. Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J. Exp. Med.* 171: 377-387.
- CAROLEO, M. C., M. L. FRASCA, D. NISTICO & G. DORIA. 1992. Melatonin as immunoregulator in immunodeficient mice. *Immunopharmacology*. 23: 81-87.
- CARPENTER, D.O. 1994. "Epidemiological evidence for an association between exposure to 50 and 60 Hz magnetic fields and cancer" dans *Hydro-Electric Development: Environmental Impacts*-paper no. 6. Montréal. North Information Services, Inc. 1-31.
- CARSON, J. J. L., F.S. PRATO, D.J. DROST, L.D. DIESBOURG, & S. J. DIXON. 1990. Time-varying magnetic fields increase cytosolic free Ca²⁺ in HL-60 cells. *Am. J. Physiol.* 259:C687-692.
- CARSWELL, E. A., L. J. OLD, R. L. KASSEL, S. GREEN, N. FIORE & B. WILLIAMSON. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumours. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 3666-3670.
- CASSEL, D. J. & J. FORMAN. 1988. Linked recognition of helper and cytotoxic antigenic determinants for the generation of cytotoxic T lymphocytes. *Ann. NY Acad. Sci.* 532: 51-60.
- CHIABRERA, A., B BIANCO. 1987. "The role of the magnetic field in the EM interaction with ligand binding." Dans Blank (ed): *Mechanistic Approaches to interactions of Electric and Electromagnetic Fields with Living Systems*. New York. Plenum. 79-95.
- CLARK, E. A & P. J. L. LANE. 1991. Regulation of human B-cell activation and adhesion. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 97-127.
- COHEN, M., A. KUNSKA, J. A. ASTEMBORSKI & D. MCCULLOCH. 1986. The effect of low-level 60-Hz electromagnetic fields on human lymphoid cells. II. Sister-chromatid exchanges in peripheral lymphocytes and lymphoblastoid cell lines. *Mutation Res.* 172: 177-184.
- COHEN, M., A. KUNSKA, J. A. ASTEMBORSKI, D. MCCULLOCH & D. A. PASKEWITZ. 1986. Effect of low-level 60-Hz electromagnetic fields on human

- lymphoid cells: I. mitotic rate and chromosome breakage in human peripheral lymphocytes. *Bioelectromagnetics*. 7: 415-423.
- CONTI, P., G.E. GIGANTE, M.G. CIFONE, E. ALESSE, G. IANNI, M. REALE & P. U. ANGELETTI. 1983. Reduced mitogenic stimulation of human lymphocytes by extremely low frequency electromagnetic fields. *FEBS Lett.* 162: 156-160.
- COSSARIZZA, A., D. MONTI, F. BERSANI, M. CANTINI, R. CADOSSO, A. SACCHI & C. FRANCESCHI. 1989. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase cell proliferation in lymphocytes from young and aged subjects. *Biochemical and biophysical research communications*. 160: 692-698.
- COSSARIZZA, A., D. MONTI, F. BERSANI, R. PAGANELLI, G. MONTAGNANI, R. CADOSSO, M. CANTINI, & C. FRANCESCHI. 1989. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase interleukin-2 (IL-2) utilization and IL-2 receptor expression in mitogen-stimulated human lymphocytes from old subjects. *FEBS Lett.* 248: 141-144.
- COSSARIZZA, A., S. ANGIONI, F. PETREGLIA, A. R. GENAZZANI, D. MONTI, M. CAPRI, F. BERSANI, R. CADOSSO, & C. FRANCESCHI. 1993. Exposure to low frequency pulsed electromagnetic fields increase interleukin-1 and interleukin-6 production by human peripheral blood mononuclear cells. *Experimental Cell Research*. 204: 385-387.
- COULTON, L.A. & A.T. BARKER. 1993. Magnetic fields and intracellular calcium: effects on lymphocytes exposed to condition for cyclotron resonance. *Phys. Med. Biol.* 38: 347-360.
- DALLMAN, M. J., M.L. THOMAS & J. R. GREEN. 1984. MRC OX-19: A monoclonal antibody that labels rat T lymphocytes and augments *in vitro* proliferative responses. *Eur. J. Immunol.* 14: 260-267.
- DE FRANCO, A. L. 1993. "B lymphocyte activation" dans Paul, W. E. (Ed.): *Fundamental Immunology*. New York. Raven Press Ltd. 505-525.
- DE SEZE, R., C. BOUTHET, S. TUFFET, P. DESCHAUX, A. CARISTAN, J. M. MOREAU & B. VEYRET. 1993. Effects of Time-Varying Uniform Magnetic Fields on Natural Killer Cell Activity and Antibody Response in Mice. *Bioelectromagnetics*, 14: 405-412.
- DEAN, J. H., LUSTER, M.I., BOORMAN, G. A. & L. D. LAUER. 1982. Procedure available to examine the immunotoxicity of chemicals and drugs. *Pharmacological Reviews*. 34: 137-148.
- DESCOTES, J.. 1991. Évaluation précoce de l'immunotoxicité. *Médecine/Science*. 7: 719-722.

- FEYCHTING, M. & A. AHLBOM. 1993. Magnetic Fields and Cancer in Children Residing Near Swedish High-Voltage Power Lines. *American Journal of Epidemiology*. 138: 467-481.
- FISH, H. & G. E. GIFFORD. 1983. *In vitro* production of rabbit macrophage tumour cell cytotoxin. *Int. J. Cancer*. 32: 105-112.
- FITCH, F. W., D. W. LANCKI & T. F. GAJEWSKI. 1993. "T-cell-mediated immune regulation" dans Paul, W. E. (Ed.): *Fundamental Immunology*. New york. Raven Press Ltd. 733-755.
- GERGELY, P. 1992. The pathogenesis of autoimmune disease. *Immunol. Today*. 13: A21-23.
- GHOSH, S. & D. BALTIMORE. 1990. Activation *in vitro* of NF-k by phosphorylation of its inhibitor I κ B. *Nature*. 344: 678-682.
- GOODMAN, R., L.-X. WEI, J.-C. XU & A. HENDERSON. 1989. Exposure of human cells to low-frequency electromagnetic fields results in quantitative changes in transcripts. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1009: 651-653.
- GRANDOLFO, M. 1993. Extremely low frequency electromagnetic fields: environmental exposure levels, epidemiological studies and risk assesment. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 30: 239-252.
- GREENE, J. J., W. J. SKOWRONSKI, J.M. MULLINS & R. M. NARDONE. 1991. Delineation of electric and magnetic field effects of extremely low frequency electromagnetic radiation on transcription. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 174: 742-749.
- HANTO, D., G. FRIZZERA, K. GAJIL-PECZALSKI & R. SIMMONS. 1985. Epstein-Barr virus, immunodeficiency, and B cell lymphoproliferation. *Transplantation*. 39: 461-472.
- HERSEY, P., A. EDWARDS, M. HONEYMAN & W. H. MCCARTHY. 1979. Low natural killer-cell activity in familial melanoma patients and their relatives. *Brit. J. Cancer*. 40: 113-122.
- HOUSE, R. V., J. KOVAC, A. S. GUY, P. T. THOMAS & D. L. McCORMICK. 1995. Natural killer (NK) cell function in F344 rats receiving subchronic exposure to 60 Hz magnetic fields. *BEMS. Abst.* 18-1.
- HOWARD, M. C., A. MIYAJIMA & R. COFFMAN. 1993. "T-cell-derived cytokines and their receptors" dans Paul, W. E. (Ed.): *Fundamental Immunology*. New york. Raven Press Ltd. 763-800.

- HOYLE, L.D. & E. C. COOPER. 1990. Nonclinical toxicity studies of antiviral drugs indicated for the treatment of non-life threatening diseases: Evaluation of drug toxicity prior to phase I clinical studies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 11: 81-89.
- INTRONA, M. & A. MANTOVANI. 1983. Natural killer cells in human solid tumors. *Cancer Metastasis Rev.* 2: 337.
- JANKOVIC, B. D., D. MARIC, J. RANIN & J. VELJIC. (1991). Magnetic fields, brain and immunity: effect on humoral and cell-mediated immune responses. *Int. J. Neurosc.*, 59: 25-43.
- JANKOVIC, B. D., P. NIKOLIC, V. CUPIC & K. HLADNI. (1994). Potentiation of immune responsiveness in aging by static magnetic fields applied to the brain-role of the pineal gland. *Annals New York Academy of sciences*, 719: 410-418.
- JAUCHEM, J. R. 1993. Potential Confounders in Epidemiologic Studies of Electric and Magnetic Fields and Childhood Leukemia. *Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews - Part C of Journal of Environmental Science and Health.* 11: 163-183.
- KATO, M., K. HONMA, T. SHIGEMITSU & Y. SHIGA. 1994. Recovery of nocturnal melatonin concentration takes place within one week following cessation of 50 Hz circularly polarized magnetic field exposure for six weeks. *Bioelectromagnetics.* 15: 489-492.
- KAUNE, W. T. 1993. Introduction to Power-Frequency Electric and Magnetic Fields. *Environmental Health Perspectives* 101: 73-81.
- KEENE J-A & J. FORMAN. 1982. Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 155: 768-782.
- KINCADE P. W. & J. M. GIMBLE. 1993. "B Lymphocytes" dans Paul, W. E. (Ed.): *Fundamental Immunology*. New york. Raven Press Ltd. 43-74.
- KIRSCHVINK, J. L., A. KOBAYASHI-KIRSCHVINK, & B. J. WOODFORD. 1992. Magnetite biomineralization in the human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7683-7687.
- KIRSCHVINK, J. L., A. KOBAYASHI-KIRSCHVINK, J. C. DIAZRICCI, & S. J. KIRSCHVINK. 1992. Magnetite in Human Tissues - A Mechanism for the Biological Effects of Weak ELF Magnetic Fields. *Bioelectromagnetics*, Suppl. 1: 101-113.
- KOSZINOWSKI, U. H., M.J. REDDEHASE & S. JONJIC. 1991. The role of CD4 and CD8 T cells in viral infections. *Current Opinion in Immunology.* 3: 471-475.

- LEDNEV, V. V. 1991. Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems. *Bioelectromagnetics*. 12: 71-75.
- LERCHL, A., K.O. HONAKA, R. J. REITER. 1991. Pineal gland "magnetosensitivity" to static magnetic fields is a consequence of induced electric currents (eddy currents). *J. Pineal Res.* 10: 109-116.
- LEVY, N. L. . 1978. Specificity of lymphocyte-mediated cytotoxicity in patient with primary intracranial tumors. *J. Immunol.* 121: 903-915.
- LIBOFF, A. R., & B. R. MCLEOD. 1988. Kinetics of channelized membrane ions in magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 9: 39-51.
- LIBOFF, A. R., R. J. ROZEK, M. L. SHERMAN. B. R. MCLEOD, & S. D. SMITH, 1987. Ca²⁺-45 cyclotron resonance in human lymphocytes. *Journal of Bioelectricity*. 6: 13-22.
- LIBURDY, R. P., D. E. CALLAHAN & J. D. HARLAND. 1993. "Protein shedding and ELF magnetic fields: antibody binding at the CD3 and CD20 receptor sites of human lymphocytes." *Electricity and magnetism in Biology and Medicine*. CA. San Francisco Press. 651-653.
- LINDSTROM, E., P. LINDSTROM, A. BERGLUND, E. LUNDGREN, & K. H. MILD. 1995. Intracellular calcium oscillations in a T-cell line after exposure to extremely-low-frequency magnetic fields with variable frequencies and flux densities. *Bioelectromagnetics*. 16: 41-47.
- LINDSTROM, E., P. LINDSTROM, A. BERGLUND, K. H. MILD, E. & LUNDGREN. 1993. Intracellular Calcium Oscillations Induced in a T-Cell Line by a Weak 50-Hz Magnetic Field. *Journal of Cellular Physiology*. 156: 395-398.
- LONDON, S. J., D. C. THOMAS, J. D. BOWMAN. E. SOBEL, T.-C. CHENG, & J. M. PETERS. 1991. Exposure to residential electric and magnetic fields and risk of childhood leukemia. *Am. J. Epidemiol.* 134: 923-927.
- LORIMORE, S.A., C.I. KOWALCZUK, R.D. SAUNDERS & E.G. WRIGHT. 1990. Lack of acute effects of 20 mT, 50 Hz magnetic fields on murine haemopoiesis. *Int. J. Radiat. Biol.* 58: 713-723.
- LOSCHER, W., M. MEVISSSEN, W. LEHMACHER & A. STAMM. 1993. Tumor promotion in a breast cancer model by exposure to a weak alternating magnetic field. *Cancer Letters*. 71: 75-81.
- LUSTER, M. I., A.E. MUNSON, P.T. THOMAS, M.P. HOLSAPPLE, J. D. FENTERS, K. L. WHITE JR., L. D. LAUER, D. R. GERMOLEC, G. J. ROSENTHAL & J. H. FEAN. 1988. Development of a testing battery to assess chemical-induced

- immunotoxicity: Maternal toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. *Fund. App. Toxicol.* 10: 2-19.
- LUSTER, M. I., C. PORTIER, D. G. PAIT, G. J. ROSENTHAL, D.R. GERMOLEC, E. CORSINI, B. L. BLAYLOCK, P. POLLOCK, Y. KOUCHI, W. CRAIG, K. L. WHITE, A. E. MUNSON & C. E. COMMENT. 1993. Risk assessment in Immunotoxicology. II. Relationships between immune and host resistance Tests. *Fund. App. Toxicol.* 21: 71-82.
- LUSTER, M. I., C. PORTIER, D. G. PAIT, K.L. WHITE, JR., C. GENNINGS, A.E. MUNSON & G. J. ROSENTHAL. 1992. Risk assessment in Immunotoxicology. I. Sensitivity and predictability of immune tests. *Fund. App. Toxicol.* 18: 200-210.
- LYLE, D. B., R. D. AYOTTE, A. R. SHEPPARD & W. R. ADEY. 1988. Suppression of T-lymphocyte cytotoxicity following exposure to 60-Hz sinusoidal electric fields. *Bioelectromagnetics*, 9: 303-313.
- LYLE, D. B., X. WANG, R. D. AYOTTE, A. R. SHEPPARD, & W. R. ADEY. 1991. Calcium uptake by leukemic and normal T-lymphocytes exposed to low frequency magnetic fields. *Bioelectromagnetics*. 12: 145-156.
- MAESTRONI, G. J. M., A. CONTI & W. PIERPAOLI. 1986. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J. Neuroimmunology*. 13: 19-30.
- MALTER, M., G. SCHRIEVER, R. KUHNLEIN, R. SUSS. 1987. Tumoricidal cells increased by pulsating magnetic field. *Anticancer Res.* 14: 405-412.
- MANDEVILLE, R., G. MERCIER, D. OTH, J.-P. DESCOTEAUX, M. LIS, E. FRANCO, M. HOUDE & L. TREMBLAY. 1993. "IAF chronic carcinogenicity evaluation of 60 Hz linear sinusoidal continuous-wave magnetic fields in rats: protocol outline and quality assurance program development." Dans Blank (ed): *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine*. San Francisco. CA. San Francisco Press Inc. 419-422.
- MCCOY, S. L., S. H. HEFENEIDER, B.E. OGDEN & A. S. HALL. 1993. "Effect of 60 Hz electric and magnetic fields from 500 kV LORIMORE, S.A., C.I. KOWALCZUK, R.D. SAUNDERS & E.G. WRIGHT. 1990. Lack of acute effects of 20 mT, 50 Hz magnetic fields on murine haemopoiesis. *Int. J. Radiat. Biol.* 58: 713-723. Transmission line on interleukine-1 production and antibody response by Ewe lambs" dans Blank M.(ed.): *Electricity and magnetism in biology and medicine*. CA. San Francisco Press. 633-636.
- MCLAUCHLAN, K. A. 1992. Are environmental magnetic fields dangerous? *Physics World*. New York. Plenum. January: 41-45.

- MCLEAN, J. R. N., M. A. STUCHLY, R. E. J. MITCHEL, D. WILKINSON, H. YANG, M. GODDARD, D. W. LECUYER, M. SCHUNK, E. CALLARY & D. MORRISON. 1991. Cancer promotion in a mouse-skin model by a 60-Hz magnetic field: II. tumor development and immune response. *Bioelectromagnetics*, 12: 273-287.
- MELTZER, M. S. & C. A. NACY. 1989. "Delayed-type hypersensitivity and the induction of activated, cytotoxic macrophages" dans Paul, W. E. (Ed.): *Fundamental Immunology*. New York. Raven Press Ltd. 765-777.
- MEVISSSEN, M., M. KIETZMANN & W. LOSCHER. 1995. In vivo exposure of rats to a weak alternating magnetic field increase ornithine decarboxylase activity in the mammary gland by a similar extent as the carcinogen DMBA. *Cancer Letters*. 90: 207-214.
- MOONEY, N. A., R. E. SMITH & B. W. WATSON. 1986. Effect of extremely-low-frequency pulsed magnetic fields on the mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells. *Bioelectromagnetics*. 7: 387-394.
- MORANDI, M. A., J. A. DELRIO, R. P. CAREN & L. D. CAREN. 1994. Effects of Short Term Exposure to 60 Hz Electromagnetic Fields on Interleukin 1 and Interleukin 6 Production by Peritoneal Exudate Cells. *Life Sciences*. 54: 731-738.
- MOSMANN, T. R. & R. L. COFFMAN. 1989. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 7: 145-174.
- MOSMANN, T. R., H.F. CHERWINSKI, M. W. BOND, M. A. GIEDLIN & R. L. COFFMAN. 1986. Two types of murine helper cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348.
- MUROI, M. & T. SUSUKI. 1993. Role of protein kinase A in LPS-induced activation of NF-kB proteins of a mouse macrophage-like cell line, J774. *Cell Signaling*. 5: 289-298.
- NAFZIGER, J., H. DESJOBERT, B. BENAMAR & J. J. GUILLOSON. 1993. DNA mutations and 50 Hz electromagnetic fields. 30: 133-141.
- NATHAN, C.F. 1987. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79: 319-326.
- NOELLE, R. J., & C. SNOW. 1991. T helper cell-dependent B cell activation. *FASEB J.* 5: 2770-2776.
- NORTH, R. J. 1984. The murine antitumor immune response and its therapeutic manipulation. *Adv. Immunol.* 35: 89-155.

- OLSEN, J. H., A. NIELSEN & G. SCHULGEN. 1993. Residence Near High Voltage Facilities and Risk of Cancer in Children. *British Medical Journal*. 307: 891-895.
- ORTALDO, J. R., L. H. MASON, B. J. MATHIESON, S. M. LIANG, D. A. FLICK & R. B. HERBERMAN. 1986. Mediation of mouse natural cytotoxic activity by tumour necrosis factor. *Nature*. 321: 700-702.
- PAILE, W., K. JOKELA, A. KOIVISTOINEN & S. SALOMAA. 1995. Effects of 50 Hz sinusoidal magnetic fields and spark discharges on human lymphocytes in vitro. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 36: 15-22.
- PETRINI, M., R. POLIDORI, F. AMBROGI, F. VAGLINI, P. ZANIOL, G. RONCA & A. CONTE. 1980. Effects of different low-frequency electromagnetic fields on lymphocyte activation: at which cellular level. *J. Bioelectr.* 9: 159-166.
- PHILLIPS, J. L. 1986. Transferrin receptors and natural killer cell lysis, a study using Colo 205 cells exposed to 60 Hz electromagnetic fields. *Immunol. Lett.* 13: 295-299.
- PICAZO, M. L., D. VALLEJO & J. L. BARDASANO. 1994. An Introduction to the Study of ELF Magnetic Field Effects on White Blood Cells in Mice. *Electro- and Magnetobiology*, 13: 77-84.
- PROSS, H. F. & M. G. BAINES. 1976. Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. I The effect of malignant disease. *Int. J. Cancer*. 18: 593-604.
- REITER, R. J. 1990. "Effects of light and stress on pineal function." Dans Wilson, Stevens, anderson (ed): *Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields: the Question of Cancer*. Columbus OH. Battelle Press. 87-107.
- REITER, R. J. 1993. Electromagnetic Fields and Melatonin Production. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 47: 439-444.
- REYNOLDS, C.W. & H. T. HOLDEN. 1982. "Genetic variation in natural killer (NK) activity in the rat" dans Herberman. R. B. (Ed.): *NK Cells and Other Natural Effector Cells*. New York. Academic press. Inc. 319-324.
- RUDDLE, N. H. 1987. Tumor necrosis factor and related cytokines. *Imm. Today*. 8: 129-130.
- SAEMUNDSEN, A.K., A. I. BERKEL. W. HENLE. 1981. Epstein-Barr virus carrying lymphoma in a patient with ataxia telangiectasia. *Brit. Med. J.* 282: 425-427.
- SANTINI, M. T., C. CAMETTI, S. PARADISI, E. STRAFACE, G. DONELLI, P. L. INDOVINA & W. MALORNI. 1995. A 50 Hz sinusoidal magnetic field induces

- changes in the membrane electrical properties of K562 leukaemic cells. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 36: 39-45.
- SANTOLI, D., G. TRINCHIERI,, & F. LEIF. 1978. Cell-mediated cytotoxicity against virus-infected target cells in humans. I Characterization of the effector lymphocytes. *J. immunol.* 121: 526-531.
- SAVITZ, D. A. 1993. Overview of epidemiologic research on electric and magnetic fields and cancer. *Amer. Ind. Hyg. Assoc.* 54: 197-204.
- SAVITZ, D. A., H. WACHTEL, F.A. BARNES, E.M. JOHN & J.G. TVRDIK. 1988. Case-control study of childhood cancer and exposure to 60-Hz magnetic fields. *Am. J. Epidemiol.* 128: 21-38.
- SCHEURICH, P., B. THOMA, U. UCER & K. PFIZENMAIER. 1987. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)-alpha: Induction of TNF TNF receptors on human T cells and TNF-alpha mediated enhancement of T cell responses. *J. Immunol.* 138: 1786-1790.
- SHREIBER, H. L. 1993. "Tumor immunology" dans Paul, W. E. (Ed.): *Fundamental Immunology*. New york. Raven Press Ltd. 1143-1170.
- SJOLAD, R.D. 1988. Potential future requirements for immunotoxicology testing of pesticides. *Toxicol. Ind. Health.* 4:391-395.
- SPRIGGS, D., K. IMAMURA, C. RODRIGEZ, J. HORIGUCHI, D. W. KUFE. 1987. Induction of tumor necrosis factor expression and resistance in a human breast tumor cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 6563-6566.
- STEINHAUER, E.H., A.T. DOYLE, J. REED & A. S. KADISH. 1982. Effective natural cytotoxicity in patients with cancer: normal number effector cells but decreased recycling capacity in patients with advanced disease. *J. immunol.* 129: 2255-2259.
- STRAYER, D. R., W. A. CARTER & I. BRODSKY. 1986. Familial occurrence of breast cancer is associated with reduced natural killer cytotoxicity. *Breast Cancer Res. Treat.* 7: 187-192.
- STRAYER, D. R., W. A. CARTER, S. D. MAYBERRY, E. PEQUIGNOT & I. BRODSKY. 1984. Low natural cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells in individuals with high familial incidences of cancer. *Cancer Res.* 44: 370-374.
- SWAIN, S. L., L. M. BRADLEY, M. CROFT, S. TONKONOGY, G. ATKINS, A. D. WEINBERG, D.D. DUNCAN, S. M. HEDRICK, R. W. DUTTON & G. HUSTON. 1991. Helper T-cell subsets: Phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. *Immunol. Rev.* 123: 115-144.

- TAKASUGI, M., A. RAMSEYER & J. TAKASUGI. 1977. Decline of natural nonselective cell-mediated cytotoxicity in patients with tumor progression. *Cancer Res.* 37: 413-418.
- TENFORDE, T. S., & W. T. KAUNE. 1987. Interaction of extremely low frequency electric and magnetic fields with humans. *Health Physics* 53: 585-606.
- TOWNSEND, A. & H. BODMER. 1989. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 601-624.
- TREMBLAY, L., M. HOUDE, G. MERCIER, J. GAGNON & R. MANDEVILLE. 1996. Differential modulation of natural and adaptive immunity in Fisher rats exposed for 6 weeks to 60 Hz linear sinusoidal continuous-wave magnetic fields. *Bioelectromagnetics*(sous-presse).
- TRINCHIERI, G. & B. PERUSSIA. 1984. Human natural killer cells: Biologic and pathologic aspects. *Lab. Invest.* 50: 489-513.
- TRIZIO, D., D. A. BASKETTER, P. A. BOTHAM, P. H. GRAEPEL, G. LAMBRE, S. J. MAGDA, T. M. PAL, A. J. RILEY, H. RONNENBERG, N. J. VAN SITTER & W. J. BONTINCK. 1988. Identification of immunotoxic effects of chemicals and assesment of their relevance to man. *Food Chem. Toxicol.* 26: 527-539.
- UNANUE, E. R. 1993. "Macrophages, antigen-presenting cells, and the phenomena of antigen handling and presentation" dans Paul, W. E. (Ed.): *Fundamental Immunology*. New york. Raven Press Ltd. 111-144.
- VERKASALO, P. K., E. PUKKALA, M. Y. HONGISTO, J. E. VALJUS, P. JARVINEN, K. V. HEIKKILA & M. KOSKENVUO. 1993. Risk of Cancer in Finnish Children Living Close to Power Lines. *British Medical Journal.* 307: 895-899.
- VONDRUSKA, J.F. & R. A. GRECO. 1973. Certain hematologic and blood chemical values in Charles River CD albino rats. *Bull. Am. Soc. Vet. Clin. Pathol.* 2: 3-17.
- VOS, J., H. VAN LOVEREN, P. WESTER & D. VETHAAK. 1989. Toxic effects of environmental chemicals on the immune system. *Trends Pharmacol. Sci.* 10: 289-292.
- WALLECZEK, J. 1992. Electromagnetic field effects on cells of the immune system: the role of calcium signaling. *The FASEB Journal.* 6: 3177-3185.
- WALLECZEK, J., & R. P. LIBURDY. 1990. Nonthermal 60 Hz sinusoidal magnetic-field exposure enhances $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in rat thymocytes: dependence on mitogen activation. *FEBS Letters.* 271: 157-160.

- WEISS, A. 1993. "T lymphocyte activation" dans Paul, W. E. (Ed.): *Fundamental Immunology*. New York. Raven Press Ltd. 467-504.
- WEISSE, V. I., F. KNAPEN, W. FROLKE, J. GUENARD, H. KOLLMER & H. STOTZER. 1974. Blutwerte der ratte in abhängigigkeit van alter und geschlecht. *Arzneim.-Forsh.* 24: 1221-1225.
- WELSH, R.M. 1986. Regulation of virus infections by natural killer cells. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* 5: 169-199.
- WERTHEIMER, N. & E. LEEPER. 1979. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am. J. Epidemiol.* 109: 273-284.
- WHITESIDE, T. L. & R. B. HERBERMAN. 1989. The role of natural killer cells in human disease. *Clinical immunology and immunopathology.* 53: 1-23.
- WILSON, B. W., C. W. WRIGHT, J. E. MORRIS, R. I. BUSCHBOM, D. P. BROWN, D. L. MILLER, R. SOMMERS-FLANNIGAN & L. E. ANDERSON. 1990. Evidence for an effect of ELF electromagnetic fields on human pineal gland function. *J. Pin. Res.* 9: 259-269.
- YELLON, S. M. 1994. Acute 60 Hz magnetic field exposure effects on the melatonin rhythm in the pineal gland and circulation of the adult Djungarian hamster. *J. Pineal Res.* 16: 136-144.
- ZWINGELBERG, R., G. OBE, M. ROSENTHAL, M. MEVISSSEN, S. BUNTENKOTTER & W. LOSCHER. 1993. Exposure of Rats to a 50-Hz, 30-mT Magnetic Field Influences Neither the Frequencies of Sister-Chromatid Exchanges Nor Proliferation Characteristics of Cultured Peripheral Lymphocytes. *Mutation Research.* 302: 39-44.

