

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

PAR

LYNA TREMBLAY

MODULATION DES PARAMÈTRES DE L'IMMUNITÉ CELLULAIRE ET
NATURELLE CHEZ DES JEUNES RATS EXPOSÉS À DES CHAMPS
MAGNÉTIQUES (60-HZ) DE DIFFÉRENTES INTENSITÉS

OCTOBRE 1993

À Daniel,
qui fût présent
tout au long de cette aventure

À Renée, Marcel et Marco

"Success is...
...to laugh often and love much;
to win the respect of intelligent persons and the affection of children;
to earn the approbation of honest critics and endure the betrayal of
false friends;
to appreciate beauty;
to find the best in others;
to give to one's self;
to leave the world a bit better, whether by a healthy child, a garden
patch, or a redeemed social condition;
to have played and laughed with enthusiasm and sung with
exultation;
to know that even one life has breathed easier because you have
lived;
this is to have succeeded.

-Author Unknown"

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
SOMMAIRE.....	xiv
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. EFFETS DES CHAMPS MAGNÉTIQUES	3
1.1 Description des champs magnétiques.....	3
1.1.1 Propriétés physiques des champs magnétiques.....	3
1.1.2 Quantités physiques et unités de l'intensité des champs magnétiques.....	7
1.1.3 Sources de champs magnétiques	7
1.2 Études épidémiologiques.....	8
1.2.1 Expositions résidentielles et le cancer chez les enfants.....	11
1.2.2 Expositions résidentielles chez les adultes	11
1.2.3 Expositions occupationnelles chez les adultes.....	12
1.3 Études <i>in vitro</i>	13
1.4 Études <i>in vivo</i>	16
1.5 Mécanismes d'action proposés des champs magnétiques sur les organismes vivants.....	19
2. CELLULES EFFECTRICES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	22
2.1 Cellules NK.....	22
2.2 Macrophages.....	23
2.3 Lymphocytes T.....	26
2.4 Lymphocytes B.....	28

3. MODÈLE EXPÉRIMENTAL	30
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	33
1. CHAMPS MAGNÉTIQUES.....	33
1.1 Salle d'exposition.....	33
1.2 Unités d'exposition.....	34
1.3 Caractéristiques des champs magnétiques.....	34
1.4 Surveillance continue.....	36
1.5 Protocole d'exposition.....	36
2. CULTURES CELLULAIRES.....	37
2.1 Origine des lignées cellulaires.....	37
2.2 Culture des cellules.....	39
2.2.1 Cellules YAC-1.....	39
2.2.2 Cellules fibroblastiques murines (L929).....	39
3. PRÉPARATION DES SUSPENSIONS CELLULAIRES.....	40
3.1 Suspension de cellules péritonéales	40
3.2 Suspension de splénocytes.....	40
4. DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DES CELLULES NK.....	41
5. DOSAGE DE LA PRODUCTION DE PEROXYDE D'HYDROGÈNE.....	42
6. PRODUCTION D'OXYDE NITRIQUE ET DU FACTEUR NÉCROSANT DES TUMEURS.....	44
7. DOSAGE DU FACTEUR DE NÉCROSE DES TUMEURS.....	44
7.1 Dosage de l'activité du facteur nécrosant des tumeurs.....	44
7.2 Calcul de l'activité du facteur nécrosant des tumeurs.....	45
8. MESURE DE LA PRODUCTION D'OXYDE NITRIQUE.....	47
9. ANALYSE DES DIFFÉRENTES POPULATIONS MACROPHAGIQUES	47

10. ANALYSE DES DIFFÉRENTES POPULATIONS	
LYMPHOCYTAIRES.....	48
11. DÉTERMINATION DES CELLULES SÉCRÉTRICES	
D'ANTICORPS	50
11.1 Immunisation.....	50
11.2 Détermination des cellules sécrétrices d'anticorps.....	50
12. TESTS STATISTIQUES.....	52
12.1 Test de Student	52
12.2 Régression linéaire	52
RÉSULTATS.....	53
1. ACTIVITÉ DES CELLULES NK.....	53
2. PRODUCTION DE PEROXYDE D'HYDROGÈNE	57
3. SÉCRÉTION DU FACTEUR DE NÉCROSE DES TUMEURS.....	69
4. PRODUCTION D'OXYDE NITRIQUE.....	73
5. MARQUEURS PHÉNOTYPIQUES.....	75
6. CELLULES SÉCRÉTRICES D'ANTICORPS.....	81
DISCUSSION.....	83
1. EFFETS DES CHAMPS MAGNÉTIQUES SUR LES	
LYMPHOCYTES	83
1.1 Activité des cellules NK.....	83
1.2 Marqueurs phénotypiques	85
1.3 Hypothèses sur l'effet des champs magnétiques sur les	
lymphocytes T et cellules NK.....	87
1.4 Cellules sécrétrices d'anticorps.....	88
2. EFFETS DES CHAMPS MAGNÉTIQUES SUR LES CELLULES	
PÉRITONÉALES.....	89

3. EFFETS SUR L'ONTOGÉNIE.....	91
4. EFFETS DES CHAMPS MAGNÉTIQUES SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	92
CONCLUSION.....	96
REMERCIEMENTS.....	98
BIBLIOGRAPHIE	99
ANNEXE I.....	117

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. :	Le spectre électromagnétique.....	5
FIGURE 2. :	Échelle d'intensités des champs magnétiques (60 Hz) rencontrés en Amérique du Nord.....	9
FIGURE 3. :	Protocole d'exposition.....	38
FIGURE 4. :	Corrélation entre l'activité des cellules NK spléniques et l'intensité de CM suivant six semaines d'exposition.....	55
FIGURE 5. :	Activité des cellules NK spléniques provenant de rats Fischer 344/N soumis à différentes intensités de CM pendant 9, 13 et 17 semaines	58
FIGURE 6. :	Analyse cytofluorométrique de la distribution cellulaire des cellules péritonéales provenant de rats Fischer 344/N exposés aux différentes intensités de CM.....	60
FIGURE 7A:	Expression des antigènes spécifiques aux macrophages et aux granulocytes à la surface des cellules péritonéales.....	63

FIGURE 7B:	Cytofluorogramme de la production de peroxyde d'hydrogène sur les cellules péritonéales.....	65
FIGURE 8. :	Corrélation entre la production de peroxyde d'hydrogène par la population mineure des cellules péritonéales et l'intensité de CM après six semaines d'exposition.....	70
FIGURE 9. :	Corrélation entre les pourcentages de lymphocytes T spléniques CD4 ⁺ ou CD8 ⁺ et l'intensité de CM après six semaines d'exposition.....	78
FIGURE 10.:	Courbe standard de dosage d'unités d'activité TNF- α	120
FIGURE 11.:	Courbe standard utilisée pour la détermination de la concentration de NO ₂ ⁻	122
FIGURE 12.:	Analyse cytofluorométrique de la distribution cellulaire des cellules spléniques non-adhérentes provenant de rats Fisher 344/N exposés aux différentes intensités de CM.....	124
FIGURE 13.:	Expression des antigènes spécifiques aux lymphocytes T à la surface des cellules spléniques non-adhérentes.....	126

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU	I:	Effets de la variation de l'intensité du champ magnétique sur l'activité des cellules NK spléniques de rats Fischer 344/N.....	54
TABLEAU	II:	Effets de la variation de l'intensité du champ magnétique sur la production de H ₂ O ₂ par la population majeure des cellules péritonéales provenant de rats Fischer 344/N.....	67
TABLEAU	III:	Effets de la variation de l'intensité du champ magnétique sur la production de H ₂ O ₂ par la population mineure des cellules péritonéales provenant de rats Fischer 344/N.....	68
TABLEAU	IV :	Effets de la variation de l'intensité du champ magnétique sur la production de TNF par les cellules péritonéales de rats Fischer 344/N.....	72
TABLEAU	V :	Effets de la variation de l'intensité des champs magnétiques sur la production de NO ₂ ⁻ par les cellules péritonéales de rats Fischer 344/N.....	74

TABLEAU VI :	Évaluation par immunofluorescence de divers marqueurs phénotypique des cellules spléniques de rats Fischer 344/N exposés à différentes intensités de champs magnétiques pendant six semaines.....	76
TABLEAU VII :	Évaluation par immunofluorescence de divers marqueurs phénotypiques des cellules spléniques de rats Fischer 344/N exposés à différentes intensités de champs magnétiques pendant 12 semaines.....	80
TABLEAU VIII :	Effets d'un champ magnétique de 2000 μ T sur la capacité des cellules B spléniques de rats Fischer 344/N à sécréter des anticorps	82
TABLEAU IX :	Variations significatives ($p < 0,05$) des champs magnétiques sur les réponses immunitaires.....	93
TABLEAU X :	Calcul des unités ASC pour la courbe standard d'activité TNF- α	118

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac	:	Anticorps
AC	:	Courant Alternatif
ADCC	:	"Antibody dependant cellular cytotoxicity"
ADN	:	Acide Désoxyribonucléique
Ag	:	Antigène
ARN	:	Acide Ribonucléique
ASC	:	Aire Sous la Courbe
BSA	:	"Bovine Serum Albumin"
C	:	Coulomb
CD	:	"Cluster Differentiation antigen"
CD4	:	lymphocyte T auxiliaire
CD5	:	lymphocyte T
CD8	:	lymphocyte T cytotoxique/suppresseur
CE	:	Champ Électrique
CEM	:	Champ Électromagnétique
CM	:	Champ Magnétique
cm	:	centimètre
CMH	:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
Con A	:	Concanavaline A
cpm	:	coup par minute
CTL	:	"Cytotoxic T lymphocyte"
DMBA	:	7, 12-diméthylbenz(a)anthracène
D. O.	:	Densité Optique

EDTA	:	acide éthylènediaminetétraacétate
ELISA	:	"Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"
FITC	:	isothiocyanate de fluorescéine
g	:	gramme
GM-CSF	:	"Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor"
GRM	:	Globules Rouges de Mouton
HBSS	:	"Hank's Buffered Saline Solution"
Hz	:	Hertz
IFN	:	Interferon gamma
Ig	:	Immunoglobuline
i. p.	:	intrapéritonéale
kA	:	kiloampère
kV	:	kilovolt
IL-(1,2,3,4,5,6,10)	:	Interleukine (1,2,3,4,5,6,10)
LAK	:	"Lymphokine Activated Killer"
LPS	:	Lipopolysaccharide
m	:	mètre
mg	:	milligramme
ml	:	millilitre
mM	:	millimole
mT	:	millitesla
N	:	Newton
ng	:	nanogramme
NK	:	"Natural Killer"
nm	:	nanomètre

NS	:	Non-Significatif
PBS	:	"Phosphate Buffered Saline"
PE	:	Phycoérythrine
PFC	:	"Plaque Forming Cell"
PHA	:	Phytohémagglutinine
PMA	:	"Phorbol Myristate Acetate"
p/v	:	poids/volume
rIL-2	:	récepteur d'IL-2
rTf	:	récepteur de transferrine
s	:	seconde
SDS	:	"Sodium Dodecyl Sulfate"
SFB	:	Sérum Foetal Bovin
SNC	:	Système Nerveux Central
T	:	Tesla
TBF	:	Très Basse Fréquence
TGF	:	"Transforming growth factor"
TNF α	:	"Tumor Necrosis Factor-alpha"
TPA	:	"12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate"
U	:	Unité
UL	:	Unité Lytique
μ Ci	:	microcurie
μ g	:	microgramme
μ l	:	microlitre
μ M	:	micromole
μ T	:	microtesla
v/v	:	volume/volume

SOMMAIRE

Les champs magnétiques, omniprésents dans nos vies, sont produits par la circulation des charges électriques à l'intérieur de fils conducteurs. Des études épidémiologiques ont associé les expositions résidentielles et occupationnelles aux champs magnétiques à différents types de cancer. Par ce travail, nous avons voulu évaluer l'influence des champs magnétiques de 60 Hz de quatre intensités allant de 2 à 2000 μT , sur les réponses des cellules du système immunitaire. Pour tenter de mieux cerner les effets des champs magnétiques, des rats Fischer 344/N ont été exposés aux différentes intensités en période prénatale jusqu'à l'âge de six ou douze semaines. Plusieurs paramètres ont été étudiés: l'activité des cellules NK spléniques, le nombre de lymphocytes T et B, la sécrétion d'anticorps par les cellules B spléniques ainsi que les productions de TNF, NO_2^- et de H_2O_2 par les cellules péritonéales.

Les champs magnétiques d'intensité élevée ont potentialisé les réponses de l'activité des cellules NK spléniques, mais semblent par contre moduler négativement les pourcentages de lymphocytes T CD4^+ , CD8^+ et CD5^+ ainsi que les lymphocytes B (Ig^+) suivant six semaines d'exposition. À l'exception de la population CD5^+ , le niveau des paramètres testés sont tous revenus à un niveau normal, après douze semaines d'exposition. Les champs magnétiques ont eu peu d'effet sur les productions de TNF- α , de NO_2^- et de H_2O_2 par les cellules péritonéales.

Les résultats obtenus suggèrent que le système immunitaire pourrait

être affecté de façon significative par les CM d'intensité élevée, intensités rencontrées en milieu industriel ou en grande proximité d'appareillage électrique. Quelques paramètres sont modulés positivement par les CM et d'autres négativement, ce qui peut améliorer l'efficacité de la réponse immunitaire ou bien être néfaste pour le système immunitaire dans sa lutte contre les agents infectieux et les cellules néoplasiques.

INTRODUCTION

Dans ce travail, nous avons voulu évaluer l'influence des champs magnétiques (60 Hz) de différentes intensités sur les réponses des cellules du système immunitaire. Jusqu'à présent, une relation cause-effet entre les champs magnétiques et un risque de cancer n'a pu être établie qu'à partir des études épidémiologiques et les travaux sur le sujet ont surtout été effectués *in vitro*, en exposant des cultures cellulaires aux champs magnétiques. À cause de la complexité et de la multiplicité des interactions cellulaires, les résultats obtenus après expositions aux champs magnétiques *in vitro* ne reflètent pas nécessairement la situation qui prévaut *in vivo*. Les études *in vivo* sur les effets des champs magnétiques sont très peu nombreuses et souvent contradictoires.

À la lumière de ces considérations, nous avons opté pour l'exposition d'animaux vivants à des champs magnétiques de fréquence utilisée en Amérique du Nord, 60 Hz, à des intensités semblables à celles rencontrées dans notre environnement quotidien. Plusieurs intensités, 2, 20, 200 et 2000 μT , ont été utilisées dans le but d'évaluer l'existence d'une relation dose-réponse. Pour tenter de mieux cerner les effets des champs magnétiques, les rats ont été exposés aux différentes intensités en période prénatale jusqu'au sacrifice.

Les paramètres de la réponse immunitaire étudiés représentent les paramètres les plus étudiés en immunotoxicologie et regroupent différents types de cellules immunitaires: les cellules NK spléniques ont été évaluées pour leur activité lytique non-spécifique chez les cellules tumorales; les cellules péritonéales

ont été examinées dans leurs capacités de sécrétion de H_2O_2 , de $TNF-\alpha$ et de NO_2^- , trois facteurs impliqués dans les mécanismes de cytotoxicité et d'immunorégulation des macrophages; l'expression des marqueurs phénotypiques a été évalué chez les lymphocytes T spléniques (CD4, CD5 et CD8) ainsi que chez les lymphocytes B (Igs de surface) spléniques; enfin, les lymphocytes B ont aussi été étudiés pour leur capacité de sécréter des anticorps en réponse à un antigène spécifique.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. EFFETS DES CHAMPS MAGNÉTIQUES

Depuis quelques décennies, l'énergie électrique joue un rôle de plus en plus vital dans nos vies sociales et économiques. L'industrialisation et l'électrification de la société exposent tous les organismes vivants à un assortiment complexe de champs électromagnétiques (CEM) de toutes les fréquences. Ainsi, les niveaux de CEM retrouvés dans l'environnement ont augmenté de façon considérable.

1.1 Description des champs magnétiques

1.1.1 Propriétés physiques des champs magnétiques

Comme le terme "électromagnétique" le suggère, les CEM comportent deux constituantes, un champ électrique (CE) et un champ magnétique (CM). Les résultats d'un nombre considérable d'études entreprises depuis une vingtaine d'années suggèrent que les CE ne comportent pas de risques biologiques pour la santé humaine et animale. Depuis 1979, l'intérêt s'est déplacé de la composante électrique à la composante magnétique suite à l'étude historique de Wertheimer et Leeper (1979). Nous allons dorénavant nous concentrer sur les CM.

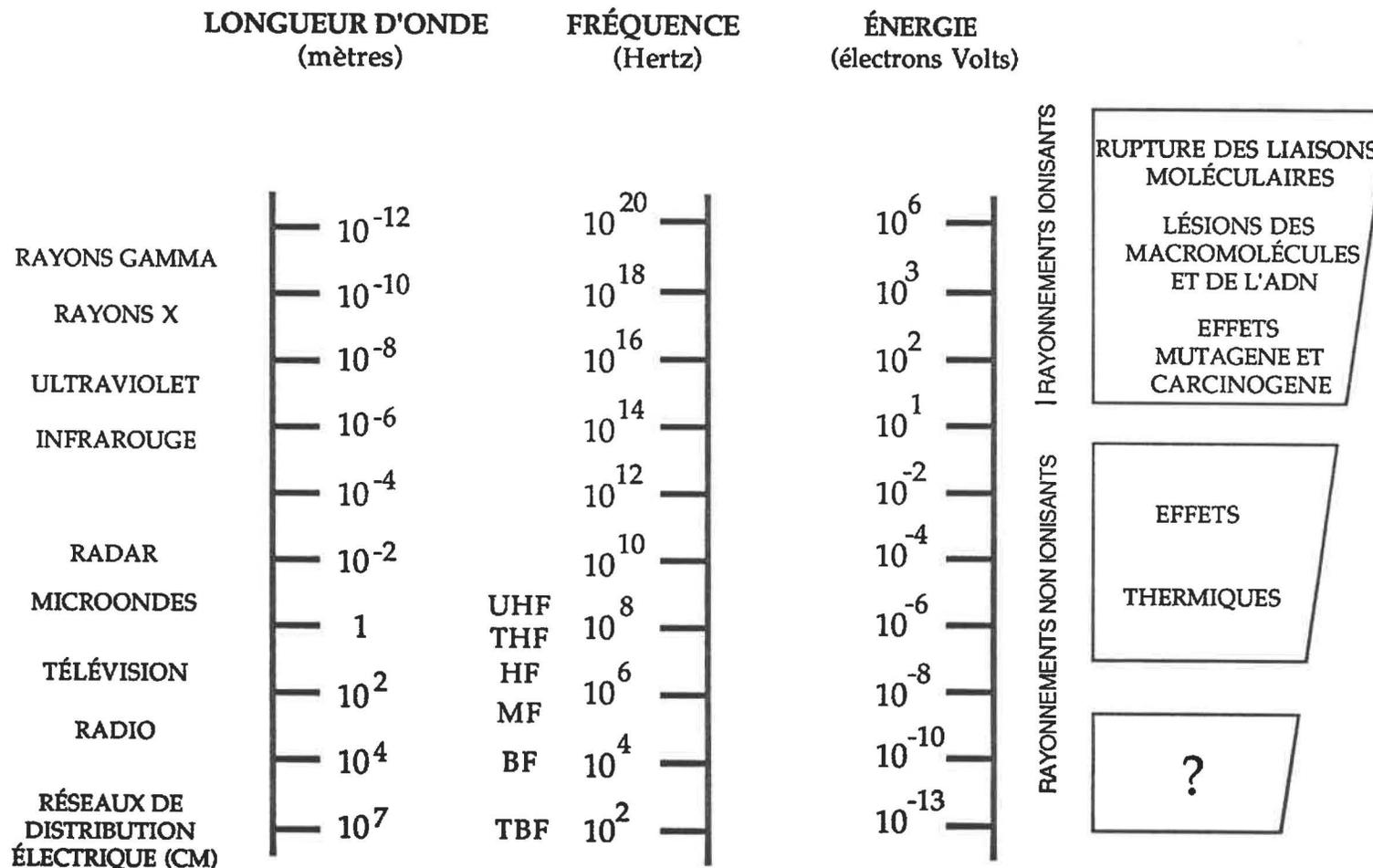
La circulation de charges électriques à l'intérieur des fils conducteurs engendre la production de CM qui émanent de ces fils. Les CM ne sont présents que lorsque le courant électrique circule puisqu'ils sont créés par le mouvement des charges électriques. Selon la densité de charge circulante, les CM peuvent

s'étendre assez loin de leur source. Par conséquent, l'intensité du CM est proportionnelle à l'intensité du courant. Ainsi, plus la densité de charge est élevée, plus le CM produit sera grand. Par ailleurs, l'intensité du CM est inversement proportionnelle à la distance par rapport à la source. Une autre caractéristique importante des CM se rapporte à la protection. Contrairement aux champs électriques qui sont atténués de façon importante par tout matériel conducteur, les CM pénètrent presque tous les matériaux sans perte d'intensité, à l'exception de substances ferromagnétiques. Les CM oscillent à la fréquence (nombre d'oscillations par seconde; mesurée en Hertz; Hz) avec laquelle le courant alterne.

Du point de vue énergétique, au bas du spectre électromagnétique (Figure 1) se trouve le champ statique (0 Hz) n'émettant aucune énergie; les radiations ionisantes, les rayons X et gamma de 10^{18} à 10^{21} Hz, se trouvant dans le haut du spectre, émettent des quantités d'énergie extrêmement élevées ayant la capacité de briser les liens chimiques à l'intérieur de la molécule d'ADN. Les CM générés par le courant électrique utilisé en milieux industriel et résidentiel possèdent une fréquence d'oscillation de 60 Hz et se trouvent ainsi dans la région de "très basse fréquence" ou TBF (moins de 300 Hz) du spectre électromagnétique. Les CM de TBF ne peuvent transmettre que des énergies très faibles. Plusieurs études confirment les modèles théoriques physiques qui prédisent que les CM de TBF n'affectent pas les liens chimiques de l'ADN, des protéines ou d'autres molécules biologiques. Cette affirmation est soutenue par l'incapacité de démontrer des perturbations chromosomiques ou des mutations (Cohen *et al.*, 1986a, 1986b; Nafziger *et al.*, 1993), des changements dans les systèmes de réparation de l'ADN (Cossarizza *et al.*, 1989c; Frazier *et al.*, 1990), ou des échanges

FIGURE 1. Spectre électromagnétique

Ce schéma illustre les longueurs d'onde, les fréquences d'oscillation et les énergies correspondantes aux différentes radiations électromagnétiques. De plus, l'énergie que possèdent ces radiations est inversement proportionnelle à la longueur d'onde. Les champs magnétiques (CM) produits par le courant électrique de 60 Hz se situent dans la zone de TBF (BF: Basse Fréquence; TBF: Très Basse Fréquence; MF: Moyenne Fréquence; HF: Haute Fréquence; THF: Très Haute Fréquence; UHF: Ultra Haute Fréquence; adapté du National Radiological Protection Board, 1992).



de chromatides soeurs (Cohen *et al.*, 1986b; Khalil *et al.*, 1993; Rosenthal et Obe, 1989; Zwingelberg *et al.*, 1993) dans des cellules exposées *in vitro* à des CM de 60 Hz. Une autre particularité importante des CM de TBF ambiants appliqués aux organismes vivants constitue la nature non-thermique de leurs interactions (Brown et Chattopadhyay, 1988). Les effets engendrés par les CM de TBF ne sont donc pas produits par l'intermédiaire d'un changement dans l'énergie thermique.

1.1.2 Quantités physiques et unités de l'intensité des champs magnétiques

On appelle induction magnétique ou intensité de CM, la grandeur vectorielle fondamentale qui décrit le CM. Cette grandeur est symbolisée par **B**. En un point où une charge électrique Q est animée d'une vitesse v avec une force F s'exerçant sur cette charge en mouvement, un CM existe dont la grandeur vectorielle satisfait la relation: $F = Q (v \times B)$ (Loi de Lorentz). Le terme entre parenthèses correspond au produit vectoriel égal en grandeur à $|v| \cdot |B| \cdot \sin \alpha$ où α est l'angle entre v et B . En exprimant F en newtons (N), Q en coulombs (C), et v en m/s, l'unité métrique pour l'intensité du CM, **B**, est le N·s/C·m ou tesla (T) (Boridy, 1992).

1.1.3 Sources de champs magnétiques

Dans l'environnement, les CM de TBF sont omniprésents et d'origine naturelle et anthropogénique (Grandolfo et Vecchia, 1985; Polk, 1974). Parmi les CM produits naturellement, le champ géomagnétique terrestre est statique et son intensité varie selon notre position géographique. Il peut atteindre un maximum de 50 μ T à l'équateur. Contrairement aux CM produits par le courant alternatif (AC), les CM statiques n'induisent pas de courant électrique (courants "Eddy") dans les organismes vivants.

Les CM de TBF d'origine humaine possèdent en général des intensités beaucoup plus élevées que les CM naturels, atteignant parfois 0,1 T en milieu de travail (Mader et Peralta, 1992). Deux sources de CM soulèvent l'intérêt public, soient les lignes de haute tension et les systèmes de communication (Tenforde, 1992). Sous une ligne 60 Hz de 765 kV portant 1 kA par phase, un CM de 15 μ T est détecté au niveau du sol (Figure 2) (Scott-Walton *et al.*, 1979). Le CM d'une antenne de TBF utilisée lors des communications maritimes atteint un maximum de 14 μ T au niveau du sol (Am. Inst. Biol. Sci., 1985).

Les appareils électriques retrouvés dans les résidences utilisant les courants émis par des lignes de 60 Hz produisent des CM dont les intensités peuvent atteindre jusqu'à 2500 μ T (Grandolfo, 1985) (Figure 2). Les CM ambiants résidentiels ont en moyenne une intensité de moins de 0,3 μ T (Caola *et al.*, 1983). Lorsque l'on considère la proximité des sources de CM, même les CM émis par des petits appareils électriques peuvent être importants; bien que le CM d'un four électrique peut atteindre 0,5 μ T à 30 cm, celui produit par un séchoir à cheveux est de 2000 μ T à 3 cm (Harvey, 1988).

1.2 Études épidémiologiques

Depuis 1979, plusieurs études épidémiologiques de grande envergure ont associé les CM produits par les lignes de transmission et de distribution de l'électricité à différents types de cancer. Les études effectuées se regroupent selon trois catégories:

FIGURE 2. Échelle d'intensités des champs magnétiques (60 Hz) rencontrés en Amérique du Nord

Ce schéma démontre les intensités de CM en μT telles que mesurées sous différentes conditions d'exposition (d'après Tenforde et Kaune, 1987).

À la maison loin des électroménagers



Sous les lignes de distribution



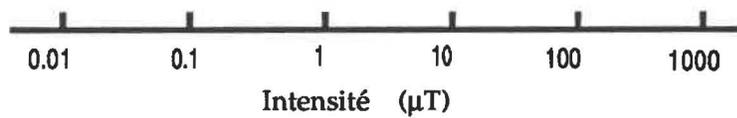
Couvertures électriques



Sous les pylônes de transmission



À proximité (≈ 2.5 cm) d'appareils électriques tels que: séchoir, rasoir



1.2.1 Expositions résidentielles et cancer chez les enfants

La première indication d'une association entre les CM et le cancer relève d'une étude sur les cancers chez les enfants menée à Denver au Colorado par Wertheimer et Leeper, en 1979. Dans cette étude, un facteur de risque (risque relatif) de 2,0 à 2,9 a été trouvé pour les enfants vivant dans des maisons à "haute intensité" de CM par rapport aux enfants demeurant dans des environnements à "faible intensité". Cette conclusion fut reçue avec assez de scepticisme dû à l'absence d'explication plausible quant aux mécanismes d'action. Une étude semblable entreprise en Suède par Tomenius, en 1986, présentait des résultats contradictoires: les facteurs de risque étaient élevés pour les tumeurs cérébrales chez les enfants exposés, mais réduits pour les leucémies infantiles. En 1988, l'équipe de Savitz a repris l'étude de Wertheimer et Leeper, à Denver, en mesurant toutefois les CM à l'intérieur des résidences, et a relevé un facteur de risque de 1,5. Myers *et al.* ont entrepris, en 1990, de mettre en relation la proximité des résidences aux lignes surélevées, les CM mesurés et les leucémies infantiles; un facteur de risque de 1,4 a été calculé pour des expositions à moins de 100 m des lignes surélevées. Finalement, une étude suédoise (Feychting et Ahlbom, 1992) s'étendant sur 26 ans et incluant près de 500 000 personnes a rapporté une corrélation positive entre une exposition aux CM et les leucémies infantiles (facteur de risque entre 2,7 et 3,8).

1.2.2 Expositions résidentielles chez les adultes

La première étude sur les cancers chez les adultes exposés aux CM d'origine résidentielle rapportait l'existence d'une faible association avec un facteur de risque de 1,3 à 1,4 (Wertheimer et Leeper, 1982). Cependant, trois études

subséquentes ont rapporté le contraire (Coleman *et al.*, 1989; Severson *et al.*, 1988; Youngson *et al.*, 1991).

1.2.3 Expositions occupationnelles chez les adultes

Certains emplois dits "électriques" exposent les adultes aux CM d'intensités beaucoup plus élevées que la normale (Stuchly et Hansson-Mild, 1987). Ces expositions sont associées à des hauts facteurs de risque (jusqu'à 6,5) pour le développement de leucémies (Floderus *et al.*, 1992; Flodin *et al.*, 1986; Gilman *et al.*, 1985; Stern *et al.*, 1986), de tumeurs cérébrales (Floderus *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1985; Thomas *et al.*, 1987) ainsi que de cancers du sein chez les personnes de sexe masculin (Demers *et al.*, 1990; Matanoski *et al.*, 1991; Tynes et Andersen, 1990). Ce dernier type de tumeur, quoique rare chez les hommes, soulève un intérêt particulier pour un mécanisme d'interaction entre les expositions aux CM et les hormones. Les CM pourraient supprimer la production de mélatonine nocturne produite par la glande pinéale, importante dans la sécrétion de certaines hormones (Matanoski *et al.*, 1991).

Jusqu'à présent, ce sont les études épidémiologiques qui suggèrent une relation statistique entre les CM et un risque élevé de cancer. Par conséquent, dans le but de confirmer la pertinence des résultats épidémiologiques, il est important de comprendre la façon par laquelle les CM interagissent avec les fonctions biologiques dans un environnement contrôlé. En tenant compte des résultats épidémiologiques, les connaissances actuelles quant aux effets des CM de TBF sur le système immunitaire deviennent dignes d'intérêt, puisque le système immunitaire sert de mécanisme principal dans la défense contre les infections virales et bactériennes ainsi que le développement et la croissance de tumeurs. Par

exemple, l'augmentation dans l'incidence de certaines tumeurs associée à une immunosuppression souligne l'importance du système immunitaire dans la défense de l'hôte contre les néoplasmes. Notre hypothèse de travail relève directement de ces propos: une immunosuppression due à une baisse dans les fonctions immunitaires causée par les CM, pourrait amener un risque plus grand de développer un cancer (notre modèle pour vérifier cette hypothèse est présenté à la section 3).

1.3 Études *in vitro*

Cette revue ne tient compte que d'expositions *in vitro* de cellules du système immunitaire aux CM de TBF de différentes sortes d'onde (de type pulsé ou sinusoïdal).

La phytohémagglutinine (PHA) et la concanavaline A (Con A) sont des lectines de plantes, qui agissent comme mitogènes en induisant la transformation blastique et la prolifération des lymphocytes provenant principalement du thymus (Davies *et al.*, 1968; Johnston et Wilson, 1970). La réponse proliférative à ces mitogènes sert de modèle pour étudier la fonction de même que le niveau d'activation des lymphocytes T.

Plusieurs équipes ont étudié l'influence d'expositions *in vitro* aux CM sur la prolifération des lymphocytes en présence de mitogène (les CM seuls n'affectant pas la prolifération des lymphocytes). Certains groupes ont rapporté que les CM pouvaient augmenter la réponse induite par des lectines sur les lymphocytes normaux (Cadossi *et al.*, 1985; Cantini *et al.*, 1986; Rosenthal et Obe, 1989) et chez les cellules leucémiques (Emilia *et al.*, 1985). En 1988, Cadossi *et al.* ont suggéré une relation dose-dépendante entre l'intensité des CM et le taux de prolifération des

lymphocytes normaux en présence de mitogène: la prolifération augmente à faible intensité de CM, puis diminue à forte intensité de CM. Les résultats obtenus par Conti *et al.* (1983; 1986), soit une inhibition allant jusqu'à 50% de la stimulation mitogénique des lymphocytes normaux suivant l'exposition à des CM de 2,3-6,5 mT, corrobore cette hypothèse. Dans le même sens, l'étude menée par Mooney *et al.* (1986) dans laquelle l'intensité d'exposition aux CM était de 4,5 mT, rapporte une inhibition de 60% de la prolifération des lymphocytes en présence de mitogène. L'équipe de Grattarola *et al.* (1985) démontre, elle aussi, un effet antagoniste produit par des CM de 0 à 2 mT d'intensité sur la mitogénèse des lymphocytes. Par contre, des expositions de cultures lymphocytaires à un mitogène et un CM d'intensité de 2,5 mT (intensité élevée selon Cadossi *et al.*, 1988) effectuées par Bersani *et al.* (1988) et Cossarizza *et al.* (1989a) donnent lieu à une augmentation du taux de prolifération cellulaire. Cette augmentation, obtenue pour des lymphocytes provenant de jeunes adultes, est comparable à celle obtenue pour des personnes âgées. De plus, une diminution de la concentration en interleukine-2 (IL-2) des surnageants de culture et un pourcentage plus élevé de lymphocytes T activés ont été rapportés: l'expression accrue de récepteurs d'IL-2 (rIL-2) à la surface des lymphocytes pourrait contribuer à l'utilisation optimale de cette cytokine (Bersani *et al.*, 1988; Cossarizza *et al.*, 1989b).

Plusieurs équipes suggèrent l'implication du calcium intracellulaire dans les effets produits au niveau de la prolifération des lymphocytes T par les CM de TBF (Conti *et al.*, 1985a, 1985b; Lyle *et al.*, 1991; Walleczek et Budinger, 1992; Walleczek et Liburdy, 1990; Yost et Liburdy, 1992).

Les CM ne semblent pas affecter directement l'ADN des lymphocytes tel que mentionné à la section 1.1.1. Par contre, les expositions aux CM de TBF

semblent augmenter la synthèse d'ARN et par le fait même, la synthèse protéique chez les lignées cellulaires CCRF-CEM (Phillips et McChesney, 1991) et HL-60 (Goodman *et al.*, 1989).

La structure et la fonction de la membrane plasmique des lymphocytes T semblent être modifiées par une exposition *in vitro* de ces cellules à des CM de 22 mT (Liburdy *et al.*, 1993). Les CM semblent induire le largage de protéines extracellulaires impliquées dans la reconnaissance des signaux extracellulaires importants dans la fonction cellulaire et, contrairement aux lymphocytes T, sous les mêmes conditions d'exposition, ce largage de protéines extracellulaires ne se produit que peu ou pas du tout chez les lymphocytes B. Il se pourrait donc que les CM agissent de façon différente sur les lymphocytes T et B.

L'effet des CM sur la fonction des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) a été examiné par l'équipe de Lyle *et al.* (1988). Après une pré-exposition de 48 heures de la lignée cytotoxique murine, CTLL-1, aux CM de TBF, une inhibition de 25% de la cytotoxicité allogénique envers les cellules cibles MPC-11 a été observée.

Dans un autre système, Phillips (1986) a étudié l'effet des CM sur le rôle des récepteurs de transferrine (rTf) des cellules cibles lors de la cytolysse par les cellules cytotoxiques naturelles (NK). Les rTf s'avèrent associés avec la structure cible à la surface cellulaire que reconnaissent les cellules NK. Des cellules cibles d'adénocarcinome humain, Colo 205, ont été exposées à une intensité de CM de 0,1 mT donnant lieu à l'expression constitutive d'un nombre maximal de rTf. L'activité des cellules NK était diminuée de façon importante lorsque les cellules exprimaient des niveaux élevés de rTf.

Les résultats rapportés par Cossarizza *et al.* (1993) suggèrent que les monocytes peuvent aussi être des cibles importantes pour les CM de TBF. Cette étude démontre un effet synergique des CM de 2,5 mT et de la PHA/TPA dans la production *in vitro* des cytokines IL-1 β et IL-6 par des monocytes humains.

Selon ces études *in vitro*, les CM de TBF semblent exercer un effet important sur la structure et la fonction de divers types de cellules du système immunitaire. On remarque cependant que ces effets ne sont pas consistants d'une étude à l'autre, les systèmes d'exposition ainsi que les conditions d'exposition variant d'une étude à l'autre. De plus, ces systèmes d'exposition *in vitro* possèdent des limites importantes quant à la nature des interactions complexes qui existent dans les systèmes physiologiques d'un organisme vivant. Les modifications de la réponse immunitaire après des expositions *in vitro* ne reflètent donc pas nécessairement les modifications observées *in vivo*.

1.4 Études *in vivo*

Très peu d'études mettant en relation les effets des CM de TBF appliqués *in vivo* sur la fonction immunitaire ont été entreprises jusqu'à maintenant.

La première étude rapportant des modifications au niveau des cellules du système immunitaire, suivant une exposition à des CM, fut celle de Barnothy *et al.* (1956). L'exposition de souris C3H à une intensité de 420 mT a donné lieu à une augmentation dans le nombre de lymphocytes du sang périphérique.

Gorczyńska (1987) a suggéré que les CM affectaient la myélopoïèse, puisqu'une diminution du nombre de globules rouges et de mégacaryocytes ainsi qu'une augmentation du nombre de granulocytes et de lymphocytes

périphériques, ont été observées lors d'exposition de cobayes à des CM de 5 et 300 mT. Cette étude démontrait également que les CM n'affectaient pas le nombre de plasmocytes ni le nombre de monocytes chez ces mêmes animaux.

En exposant des personnes volontaires à des CE et des CM de TBF de façon simultanée, Fotopoulos *et al.* (1987) ont observé une augmentation du nombre total de lymphocytes, une diminution dans le nombre de lymphocytes T auxiliaires puis aucun changement au niveau des leucocytes ni de la réponse humorale.

D'autres études ont été réalisées mettant en relation des CM de 20 mT et de 110 mT et diverses cellules lymphocytaires provenant du sang périphérique murin: aucune différence dans les comptes totaux et différentiels n'a été détectée après une exposition d'une semaine (Fam, 1981; Lorimore *et al.*, 1990).

Dans le même sens, les échanges de chromatides soeurs et les caractéristiques prolifératives des lymphocytes périphériques sanguins de rats n'ont pas été influencés par des expositions de 7 ou 28 jours à un CM de 50 Hz et 30 mT (Zwingelberg *et al.*, 1993). Une étude examinant des personnes ayant été exposées chroniquement à des CM en milieu occupationnel montre un nombre élevé (presque doublé) de cellules aberrantes, des index prolifératifs et mitotiques plus faibles, mais aucune différence au niveau des échanges de chromatides soeurs n'a été observée (Khalil *et al.*, 1993).

En 1991, Jankovic *et al.* ont démontré que des CM de 60 mT appliqués aux cerveaux de rats pour des périodes de 14, 24 ou 34 jours, pouvaient influencer l'immunité cellulaire et humorale. Les réponses des cellules sécrétrices d'anticorps (Ac; PFC), les réactions d'hypersensibilité et le développement de

l'encéphalomyélite allergique expérimentale ont été potentialisés en présence de CM. De plus, cette équipe a noté une augmentation dans la population des lymphocytes T auxiliaires et une diminution de la population des lymphocytes T cytotoxiques, donnant ainsi des rapports CD4⁺/CD8⁺ plus élevés dans le cas des animaux exposés aux CM.

Selon l'étude de McLean *et al.* (1991), les CM de 2 mT n'induisent pas de tumeurs et ne modifient pas l'activité des cellules NK chez des souris SENCAR traitées avec un carcinogène chimique, le 7, 12-diméthylbenz(a)anthracène (DMBA). Par contre, lorsque les animaux sont traités avec le DMBA et un agent promoteur de carcinogénèse, le 12-0-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA), en présence de CM de 2 mT (6 heures par jour pendant 21 semaines), les résultats indiquent que les CM contribuent à la croissance de tumeurs en supprimant la surveillance immunitaire que fournissent les cellules NK.

L'effet des CE et des CM (3,77 μ T) provenant de lignes de transmission d'électricité (500 kV) sur la production d'une cytokine immunorégulatrice produite par les leucocytes, l'IL-1, a été examiné chez des moutons Ewe (McCoy et Hefeneider, 1993). Des niveaux diminués de l'activité IL-1 chez les animaux exposés pendant dix mois ont été observés, cependant la capacité fonctionnelle de produire des Ac spécifiques à des antigènes (Ag) définis n'a pas été affectée.

Les études analysant la réponse immunitaire suivant une exposition *in vivo* à long terme aux CM de TBF sont peu nombreuses, contradictoires et n'examinent que quelques paramètres de la fonction immune. De plus, les études réalisées n'utilisent que des CM d'intensités élevées, soit de 2 mT et plus. Notre étude est donc dans ce domaine innovatrice et importante.

1.5 Mécanismes d'action proposés des CM sur les organismes vivants

Plusieurs questions ont été soulevées quant au mécanisme d'action plausible des CM de très faible énergie sur le développement d'un cancer. Les mécanismes proposés impliquent un phénomène de promotion néoplasique ou de stimulation de la croissance tumorale plutôt que de l'initiation du processus néoplasique. En fait, aucune preuve ne supporte l'hypothèse que les CM pourraient agir comme initiateurs du processus néoplasique (voir section 1.1.1). De façon simple, l'énergie générée par ces champs et ces courants induits est infiniment plus faible (inférieure par quatorze ordres de grandeur à l'énergie nécessaire pour briser un lien chimique de l'ADN) que celles émises par les rayons X ou gamma. Par conséquent, elle ne peut, comme le font les rayons X et gamma, briser les liaisons chimiques de la molécule d'ADN.

Les CM pourraient toutefois agir comme promoteurs de la carcinogénèse (Adey, 1988). Quelques expériences ont démontré qu'une exposition aux CM peut accélérer l'apparition des tumeurs ou augmenter le nombre chez des animaux exposés à des carcinogènes (Cadossi *et al.*, 1991; Leung *et al.*, 1988, Mevissen *et al.*, 1993). Des études épidémiologiques suggèrent également que de tels champs servent de promoteurs: en 1989, Wertheimer a rapporté qu'une association épidémiologique entre les lignes résidentielles de haute tension et le cancer se développe sur une période de sept années, puis disparaît pour ceux qui cessent de vivre dans ces habitations pour une durée au-delà de trois ans. On considère une telle réversibilité caractéristique d'un promoteur.

La promotion du cancer peut s'expliquer par plusieurs mécanismes et un nombre croissant d'études pointe vers différentes hypothèses: Adey (1990) propose

que les courants électriques (courants "Eddy") produits dans l'organisme par les CM de 60 Hz sont perçus par des protéines transmembranaires (récepteurs) participant à la transduction de signaux, qui sont ensuite amplifiés et transférés aux systèmes enzymatiques intracellulaires ainsi qu'au noyau. Cette hypothèse suppose que la membrane cellulaire est le site primaire des réponses cellulaires induites par les CM, alors que le liquide entourant les cellules constitue la route de choix pour la dispersion du courant électrique à travers les tissus.

Une seconde théorie a été formulée par McLeod et Liboff (1986) ainsi que Chiaberra et Bianco (1987) et suggère, comme la première, que les signaux engendrés par les CM agissent au niveau de récepteurs spécifiques sur la membrane cellulaire. Par contre, le mouvement des ligands chargés perturbe l'énergie de liaison du complexe ligand-récepteur. Ces mécanismes, induits initialement par les CM de 60 Hz, pourraient ensuite perturber les interactions intracellulaires à différents niveaux: par exemple, interruption de la communication intercellulaire (Blackman et Benane, 1989), modulation de la croissance cellulaire via des modifications dans le flux des ions calciques (Conti *et al.*, 1985a, 1985b), altérations dans l'expression de séquences géniques spécifiques (Goodman *et al.*, 1989; Litovitz *et al.*, 1990; Ning *et al.*, 1992; Phillips *et al.*, 1992), diminution de la production de mélatonine par la glande pinéale (Lerchl *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1990; Yaga *et al.*, 1993), modulation de l'activité de l'ornithine décarboxylase (Byus *et al.*, 1987) ou perturbation des systèmes hormonal et immunitaire impliqués dans les mécanismes de contrôle anti-tumoral en déclenchant une réponse de stress (Gorczyńska et Wegrzynowicz, 1991; Luben *et al.*, 1982).

Kirschvink *et al.* (1992) suggèrent un autre mécanisme dans lequel des particules de magnétite (Fe_3O_4) retrouvées dans le cerveau humain pourraient être induites à osciller par les champs alternatifs externes. Ces mouvements d'oscillation pourraient produire des effets tel que l'ouverture d'un canal ionique transmembranaire.

McLauchlan (1992) propose un rôle pour les radicaux libres hautement réactifs (molécules possédant un électron de plus, suivant une rupture de covalence) soumis aux fréquences de 50 et 60 Hz. Dans son modèle, les CM de très faible intensité dissocient les paires de triplet (état fondamental de la structure électronique de la molécule) donnant des singulets (état excité de la structure électronique de la molécule). Les paires de radicaux ne réagissent pas comme elles le feraient sans la présence d'un champ. L'addition d'un champ oscillant dans ce système introduit des "fenêtres" d'intensités amenant les triplets à retourner à des états de singulet qui réagissent les uns avec les autres.

Depuis la parution des premières études épidémiologiques, la question des risques pour la santé associés aux CM des lignes à haute tension est devenue un sujet d'intérêt brûlant: les implications au niveau de la santé humaine et animale ne sont pas encore bien définies et le mécanisme d'interaction avec les cellules des CM de fréquence aussi faible (60 Hz) nous échappe toujours. Il est donc raisonnable et opportun d'évaluer les interactions entre l'environnement électromagnétique et les organismes vivants, et d'étudier si de telles interactions ont des effets bénéfiques ou nuisibles, éphémères ou permanents sur leur santé.

2. CELLULES EFFECTRICES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

Le système immunitaire joue un rôle fondamental au niveau de la reconnaissance du soi et du non-soi. Les éléments du non-soi représentent tout ce qui est étranger et différent des constituantes propres à l'individu. Lorsqu'une substance antigénique étrangère s'infiltré dans l'organisme, la réponse du système immunitaire se compose de l'activation d'un système d'amplification englobant divers types de cellules.

2.1 Cellules NK

Les cellules NK représentent jusqu'à 15% de la population lymphocytaire et se distinguent des lymphocytes T et B par leur morphologie et leur phénotype. De plus, les cellules NK ont la capacité de reconnaître, de lier et de lyser des cellules tumorales ou infectées avec un virus, sans immunisation préalable (Jondal, 1987; Ortaldo et Herberman, 1984).

Ces cellules agissent comme effecteurs de l'immunité naturelle et jouent un rôle essentiel dans la surveillance immunitaire contre les tumeurs et les agents infectieux. Les cellules NK ne sont pas restreintes par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) dans leur fonction. Elles sont capables de tuer un vaste éventail de tumeurs solides ainsi que des cellules cibles leucémiques ou infectées par un virus incluant même des cellules n'exprimant pas de CMH (Whiteside et Herberman, 1989). On retrouve les cellules NK dans la plupart des organes (poumons, rate) et dans les liquides biologiques (lymphe, sang) (Herberman, 1986). Les cellules NK semblent représenter la première ligne de défense contre la propagation métastatique des cellules tumorales, et contre l'infection virale avant

le développement d'Ac spécifiques et de cellules cytotoxiques. Une réduction dans le nombre de cellules NK, ou dans leur activité, pourrait donc augmenter le risque d'évasion de cellules malignes à ce système de surveillance et conséquemment, augmenter le risque de formation de tumeur.

Plusieurs études de patients cancéreux appuient l'hypothèse d'une relation inversement proportionnelle entre l'activité des cellules NK et la maladie métastatique (Introna et Mantovani, 1983; Pross et Baines, 1976; Steinhauer *et al.*, 1982; Takasugi *et al.*, 1977; Trinchieri et Perussia, 1984). De plus, il est bien établi dans les modèles animaux, que l'abrogation sélective de la population des cellules NK permet un taux de survie plus élevé des cellules malignes injectées par voie intraveineuse, le développement subséquent de métastases pulmonaires et que la reconstitution de l'activité des cellules NK rétablit la résistance à de telles cellules métastatiques (Barlozzari *et al.*, 1983; Gorelik *et al.*, 1982; Hanna, 1982; Pollack et Hollenbeck, 1982).

2.2 Macrophages

Les macrophages représentent un type cellulaire retrouvé dans la majorité des tissus. Ces cellules jouent un rôle important dans l'inflammation, la défense de l'hôte et les réponses contre une multitude de substances étrangères. Lors de réponses immunologiques, leurs fonctions impliquent l'interception de l'Ag, sa transformation et sa présentation aux lymphocytes T auxiliaires (Unanue, 1981); la sécrétion de molécules immunomodulatrices telles que l'IL-1 et le facteur nécrosant des tumeurs (TNF); et leur participation comme cellules effectrices contre les tumeurs et les agents pathogènes, caractéristique de l'immunité cellulaire (Unanue,

1993). De plus, les macrophages possèdent des capacités de phagocytose et de pinocytose.

En état d'activation, les macrophages font preuve d'une cytotoxicité puissante contre plusieurs types de cellule tumorale, une cytotoxicité qui requiert un contact entre les cellules cibles et effectrices. Cette toxicité est sélective; les macrophages tuent les cellules néoplasiques sans tuer les cellules normales même lorsque ces cibles potentielles sont en co-culture (Meltzer, 1981). La majorité des produits sécrétés par les macrophages sont toxiques: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF, IFN- α , TGF- β ; produits du complément; lysozyme, protéases, autres enzymes hydrolytiques; prostaglandines et autres lipides bioactifs; oxyde nitrique (NO); métabolites oxygénés réactifs et autres (Nathan, 1987).

Un des mécanismes cytotoxiques majeurs des macrophages activés dérive de la sécrétion d'intermédiaires oxygénés réactifs, l'anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Meltzer et Nacy, 1989). Le déséquilibre de la membrane plasmique lors de la phagocytose ou de la liaison avec un récepteur approprié initie la "flambée oxydative" (oxidative respiratory burst) dans laquelle un complexe oxydase associé à la membrane, et qui dépend du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) et de la flavoprotéine, réduit l' O_2 ambiant en O_2^- au niveau de la membrane plasmique. L'enzyme superoxyde dismutase catalyse spontanément la conversion de O_2^- en H_2O_2 . Ces deux composés sont toxiques, de même que les produits secondaires de la réaction: radicaux hydroxydes, singulets d'oxygène et ions hypohaleux générés par la myéloperoxydase.

Les macrophages utilisent plusieurs autres facteurs qui agissent de concert pour compromettre les cellules cibles dont le TNF- α . Son nom dérive de sa propriété d'induire une nécrose hémorragique ainsi que la régression de certaines tumeurs (Carswell *et al.*, 1975). La stimulation préalable des cellules macrophagiques *in vivo* avec des agents tels que le bacille de Calmette-Guérin (Beutler et Cerami, 1986; Old, 1985) ou *in vitro* avec de l'IFN- γ (Gifford et Lohmann-Matters, 1987) augmentent la capacité du lipopolysaccharide (LPS) à induire le TNF- α *in vitro*. Cette cytokine est produite principalement par les macrophages activés (Carswell *et al.*, 1975; Fisch et Gifford, 1983). Ce facteur est impliqué dans la réponse immunitaire soit directement par son activité cytotoxique endogène (Beutler et Cerami, 1986; Palladino *et al.*, 1987; Powell *et al.*, 1985; Ruggiero *et al.*, 1987; Sugarman *et al.*, 1985) ou indirectement par sa capacité de promouvoir les activités anti-tumorale et anti-microbienne des macrophages et des cellules NK (Esparza *et al.*, 1987; Ostensen *et al.*, 1987; Schmid et Ruddle, 1988). Son action n'affecte pas les cellules normales (Sugarman *et al.*, 1985) et n'a pas de spécificité d'espèce (Helson *et al.*, 1975). Le mécanisme d'action du TNF- α requiert la présence de récepteurs pour le TNF sur les cellules cibles, cependant leur présence ne détermine pas la sensibilité des cellules ciblées aux effets du TNF (Ortaldo *et al.*, 1986). Le TNF stimule également les lymphocytes T de plusieurs façons: (1) en augmentant la réponse proliférative en présence d'Ag; (2) en augmentant l'expression des rIL-2, augmentant ainsi la prolifération induite par l'IL-2; (3) en induisant la sécrétion d'IFN- γ (Scheurich *et al.*, 1987; Yokota *et al.*, 1988).

Hibbs *et al.* décrivaient, en 1987, une voie cytotoxique dépendante de l'oxydation de l'acide aminé L-arginine. Un produit intermédiaire de cette réaction,

l'oxyde nitrique (NO), est un agent cytostatique pour les cellules tumorales. Les molécules de NO inactivent les systèmes enzymatiques qui dépendent du fer telles que les oxydoréductases de la chaîne respiratoire mitochondriale, l'enzyme aconitase du cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs) et plusieurs autres enzymes nécessaires à la synthèse de l'ADN (Hibbs *et al.*, 1988; Stuehr et Nathan, 1989). Chacune de ces enzymes comporte une molécule active de fer liée à un atome de soufre qui est dégradée par le NO et qui donne un complexe fer-nitrosyl (Lancaster et Hibbs, 1990; Pellat *et al.*, 1990).

2.3 Lymphocytes T

L'induction des lymphocytes T auxiliaires et la panoplie de lymphokines qu'ils sécrètent constituent le mécanisme principal de la régulation du système immunitaire. En effet, l'activation des lymphocytes T induit la sécrétion de lymphokines, l'expression du rIL-2, la prolifération des lymphocytes T, et l'activation du mécanisme cytolytique des CTL (Weiss, 1993).

Les lymphocytes T, activés par la présence d'Ag et d'IL-1 sécrété par les macrophages, expriment alors des rIL-2, puis se différencient en lymphocytes T auxiliaires, exprimant le marqueur de surface CD4 et produisant de l'IL-2, ainsi qu'en lymphocytes T cytotoxiques ou T suppresseurs dotés du marqueur CD8 et ne produisant que peu, ou pas d'IL-2.

Lorsque les lymphocytes T auxiliaires sont stimulés et produisent de l'IL-2, cette cytokine agit de deux façons, soient de façon autocrine, ainsi que sur les cellules portant le rIL-2 (Weiss, 1993). Cette lymphokine déclenche l'expansion clonale des lymphocytes T spécifiquement dirigés contre l'Ag et maintient leur état d'activation.

Par son action autocrine, l'IL-2 stimule les lymphocytes T auxiliaires activés à sécréter d'autres cytokines, qui servent à amplifier la fonction des autres cellules immunitaires. Les clones de lymphocytes T auxiliaires se divisent en deux groupes relevant des cytokines sécrétées soient (1) les lymphocytes TH1 qui sécrètent de l'IFN- γ , du GM-CSF ("granulocyte-macrophage colony-stimulating factor"), de la lymphotoxine (TNF β), de l'IL-2 et de l'IL-3 et (2) les cellules TH2 qui produisent du GM-CSF, de l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-10 (Mosmann et Coffman, 1987). L'IL-4 et l'IL-5 induisent la division des lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'Ac. L'IL-4, le GM-CSF et surtout l'IFN- γ induisent la cytotoxicité chez les macrophages qui sécrètent à leur tour du TNF- α (Buchmeier et Schreiber, 1985; Crawford *et al.*, 1987; Grabstein *et al.*, 1986). L'IL-2 engendre la prolifération des lymphocytes B ainsi que l'activation des monocytes, des cellules NK et des cellules LAK (lymphokine-activated killer). L'IFN- γ active également les cellules NK, les CTL et initie la différenciation des lymphocytes B (Howard *et al.*, 1993).

L'immunité induite par les lymphocytes T joue un rôle important dans le rejet de tumeurs induites par un virus (Leclerc *et al.*, 1973; Tevethia *et al.*, 1974) ou un carcinogène chimique (Klein *et al.*, 1960; Old *et al.*, 1962; Rouse *et al.*, 1972) ou bien encore dans les cas de rejet de tumeurs induites par des rayons ultraviolets (Kripke, 1974; Spellman et Tomasi, 1983; Ward *et al.*, 1990) ou des tumeurs allogéniques (Algire *et al.*, 1954).

Les CTL reconnaissent les déterminants antigéniques lorsqu'ils sont présentés conjointement avec des molécules du CMH de classe I à la surface cellulaire. Suivant la reconnaissance et la liaison de l'Ag, les CTL démontrent une activité lytique dans l'immunité anti-tumorale au même titre que les cellules NK

(Anichini *et al.*, 1987; North, 1984). Il a été démontré que les CTL provenant du sang périphérique ou de tumeurs de patients, réagissent *in vitro* avec des cellules malignes autologues (Anichini *et al.*, 1987).

2.4 Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont les précurseurs des PFC. L'activation des lymphocytes B se fait en deux étapes: la prolifération et la différenciation (Kincade et Gimble, 1993). La prolifération sert à accroître le nombre de cellules capables de réagir contre les substances antigéniques présentes dans l'organisme. De toute évidence, le nombre de lymphocytes B spécifiques à un antigène quelconque dans un organisme non-immunisé est très faible. Ainsi, la prolifération permet d'accroître d'une part le nombre de cellules pouvant se différencier immédiatement en PFC et, d'autre part de fournir un nombre élevé de lymphocytes B, similaires à bien des égards au précurseur original, pour mieux répondre à une immunisation subséquente.

La réponse immunitaire la plus efficace et la plus spécifique implique une coopération directe entre les lymphocytes B spécifiques et les lymphocytes T auxiliaires (Kincade et Gimble, 1993). Dans ce type de réponse, les deux types cellulaires reconnaissent des composantes de la même molécule antigénique. Les récepteurs de haute affinité à la surface des immunoglobulines permettent la prise d'Ag par les lymphocytes B spécifiques. Ceci n'est pas toujours suffisant pour les activer. L'Ag est plutôt transformé après endocytose, avant de réapparaître à la surface en association avec des molécules du CMH de classe II. Des lymphocytes T spécifiques reconnaissent ce complexe, s'activent et produisent des facteurs

solubles. La nature de ces médiateurs détermine en grande partie l'intensité et la durée de la réponse ainsi que la nature isotypique des Ac produits.

Étant donné la diversité antigénique des tumeurs, il n'est pas surprenant de retrouver une implication des effecteurs de l'immunité humorale et cellulaire dans la destruction de cellules malignes. Cependant, il faut noter qu'une forte réponse humorale aux Ag tumoraux n'est pas souvent associée à une résistance adéquate de l'hôte (Brown *et al.*, 1978). Par contre, ces effecteurs de l'immunité peuvent attaquer les cellules leucémiques et les lysér efficacement en présence d'Ac spécifiques et de complément (Schreiber, 1993). De plus, les cellules effectrices de l'immunité peuvent détruire des cellules provenant de tumeurs solides selon un procédé impliquant l'enrobage avec des Ac, l'opsonisation, et la phagocytose subséquente par les macrophages (Schreiber, 1993). Ce procédé peut être amplifié par la présence de complément. Les cellules tumorales enrobées d'anticorps peuvent également être lysées par cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC) en présence de macrophages, cellules NK ou neutrophiles (Schreiber, 1993). Des effets thérapeutiques dramatiques ont même été observés lorsque des patients cancéreux ont été traités avec des Ac monoclonaux murins (Goodman *et al.*, 1990; Houghton *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1982).

3. MODÈLE EXPÉRIMENTAL

Jusqu'à présent, une relation cause-effet entre les champs magnétiques et un risque de cancer n'a pu être établie qu'à partir des études épidémiologiques et les travaux sur le sujet ont surtout été effectués *in vitro*, en exposant des cultures cellulaires aux champs magnétiques. À cause de la complexité et de la multiplicité des interactions cellulaires, les résultats obtenus après expositions aux champs magnétiques *in vitro* ne reflètent pas nécessairement la situation qui prévaut *in vivo*. Les études *in vivo* sur les effets des champs magnétiques sont très peu nombreuses et souvent contradictoires.

À la lumière de ces considérations, nous avons opté pour l'exposition d'animaux vivants à des champs magnétiques de fréquence utilisée en Amérique du Nord, 60 Hz, à des intensités semblables à celles rencontrées dans notre environnement quotidien. Plusieurs intensités, 2, 20, 200 et 2000 μT , ont été utilisées dans le but d'évaluer l'existence d'une relation dose-réponse. Pour tenter de mieux cerner les effets des champs magnétiques, les rats ont été exposés aux différentes intensités en période prénatale jusqu'au sacrifice.

Étant donné la nature complexe et multicomposante du système immunitaire, des altérations induites dans une partie de ce système sont souvent accompagnées de changements dans d'autres parties. Ainsi, l'évaluation d'un seul paramètre immunitaire fonctionnel ne peut représenter adéquatement les effets d'un agresseur environnemental sur le système immunitaire (Luster *et al.*, 1992, 1993). Une panoplie de tests immunitaires est proposée pour évaluer l'immunotoxicité d'agents environnementaux (Hoyle et Cooper, 1990; Luster *et al.*, 1988; Sjoblad, 1988; Trizio *et al.*, 1988; Vos *et al.*, 1989). Selon les études de Luster *et*

al. (1992, 1993), qui évaluent les paramètres utilisés dans les études importantes d'immunotoxicité effectuées jusqu'à maintenant, ce sont les analyses combinées de cellules sécrétrices d'Ac et d'énumération des populations lymphocytaires ($CD5^+$, $CD4^+$ et $CD8^+$) qui prédisent, avec les meilleurs intervalles de confiance, la possibilité d'un agent d'être immunotoxique. La combinaison de ces analyses à l'évaluation de l'activité des cellules NK ainsi qu'à la détermination d'un paramètre macrophagique, augmente les possibilités de confirmation d'immunotoxicité. Cette équipe soutient aussi qu'une bonne corrélation existe entre les modifications observées dans les paramètres immunitaires et l'altération de la résistance de l'hôte: celle-ci était toujours accompagnée de modifications dans les réponses immunitaires. De plus, leurs analyses suggèrent que plusieurs agents immunotoxiques sont vraisemblablement des agents carcinogènes lors d'études effectuées chez les rongeurs.

Se basant sur ces études, nous avons choisi les paramètres les plus probables de prédire l'effet des CM, s'il y a, sur la réponse immunitaire. Ces paramètres regroupent différents types de cellules immunitaires et représentent le criblage le plus souvent utilisé dans les études immunotoxicologiques (Luster *et al.*, 1992, 1993; Wong *et al.*, 1992): d'une part, l'immunité humorale est déterminée par les cellules NK spléniques dans leur activité lytique non-spécifique chez les cellules tumorales, ainsi que par les macrophages dans leurs capacités de sécrétion de H_2O_2 , de $TNF-\alpha$ et de NO_2^- , trois facteurs impliqués dans les mécanismes de cytotoxicité et d'immunorégulation des macrophages; d'autre part, l'immunité cellulaire qui peut être déterminée par l'expression des marqueurs phénotypiques chez les lymphocytes T spléniques ($CD4$, $CD5$ et $CD8$) ainsi que chez les

lymphocytes B (Igs de surface) spléniques, et enfin, la capacité des lymphocytes B de sécréter des Ac en réponse à un Ag spécifique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. CHAMPS MAGNÉTIQUES

1.1 Salle d'exposition

Pour répondre au besoin de deux études de grande envergure portant sur l'effet carcinogène des CM, une salle d'exposition (154 m²) fut conçue à l'édifice 25 sur le campus de l'Institut Armand-Frappier. La salle d'exposition comprend 20 modules d'exposition identiques répartis en cinq rangées, chacune correspondant à une intensité de CM différente. La distance entre les rangées a été calculée afin que les CM produits dans un module ne puissent influencer les modules de la rangée voisine. Conçu par Ontario-Hydro (Harvey, 1988) et mis en place par Westinghouse Canada (Pointe-Claire, Québec, Canada), chaque module permet l'exposition de 16 rats (huit cages contenant chacune deux rats) à un CM d'onde sinusoïdale d'intensité spécifiée. Chaque rangée d'unités d'exposition est munie de prises d'alimentation pour le courant 60 Hz nécessaire aux bobines génératrices de CM et au bobinage distinct de chauffage. L'alimentation des bobines est conçue de façon à fournir des intensités de courant dans le ratio de 1:10:100:1000, produisant respectivement des CM d'intensités 2, 20, 200 et 2000 μ T en plus d'un témoin interne ("sham") de 0,2 μ T. Des appareils de chauffage ont été intégrés aux modules et permettent d'ajuster le niveau de chaleur généré par les groupes de CM d'intensités plus faibles ("sham", 2, 20, 200 μ T) à celui généré par le groupe de CM d'intensité la plus élevée (2000 μ T).

1.2 Unités d'exposition

Chacun des 20 modules d'exposition est composé de deux unités superposées, chacune capable de recevoir quatre cages sur des plateaux (59 x 59 cm) en polycarbonate. Les cages ont été fabriquées sur mesure: en polycarbonate avec des couvercles plats en acier inoxydable contenant une bouteille en verre de 500 ml avec un bouchon en caoutchouc et un siphon en verre, ainsi qu'une mangeoire en céramique. Chaque cage est équipée d'un portoir en polycarbonate servant à l'identification par carte de couleur. Chaque couleur correspond à une intensité de CM. La distribution des groupes d'intensité de CM à l'intérieur de la salle d'exposition est ainsi rendue aveugle aux investigateurs.

1.3 Caractéristiques des champs magnétiques

Les caractéristiques principales des CM produits par l'appareillage d'exposition sont les suivantes: 1) la configuration en huit des bobines donne aux CM une grande uniformité à l'intérieur du volume limité par les bobines ainsi qu'une diminution rapide de l'intensité du CM à l'extérieur de celui-ci; le CM à l'intérieur de l'espace occupé par les animaux est homogène à $\pm 9\%$; 2) le CM oscille à une fréquence de 60 Hz et possède une onde sinusoïdale sans contrôle harmonique (multiples de la fréquence principale) spécifique, qui est linéaire dans un plan horizontal orienté sud-est; 3) le voltage est "rampé" pour obtenir une mise en marche et un arrêt graduels; 4) les effets des paramètres suivants ont été minimisés, soient: le champ électrique (annulé par la configuration en huit des bobines autour des unités d'exposition), le bruit, les vibrations des cages, la température et l'humidité, l'intensité lumineuse à l'intérieur des cages, et les concentrations d'ammoniac (NH_3) et de dioxyde de carbone (CO_2).

Les conditions d'exposition (intensités de CM variant de 2 à 2000 μT) ont été choisies de façon à simuler des expositions humaines résidentielles et occupationnelles. Le système d'exposition est opéré et entretenu par des techniciens de l'IREQ (Institut de Recherches d'Electricité d'Hydro-Québec, Varennes, Québec, Canada) sous la surveillance du Dr. S. Maruvada. Pour éviter les effets potentialisateurs de différents paramètres environnementaux, les cages sont périodiquement déplacées. Elles sont déplacées à l'intérieur de l'unité d'exposition à chaque semaine puis changées de module à chaque mois, afin de contrôler la variabilité due à la position à l'intérieur de la salle d'exposition. Les rotations sont effectuées selon un programme statistique bien défini. Dans ces rotations, nous nous assurons que les niveaux d'exposition des groupes "sham" et 2 μT ne se trouvent jamais adjacents au groupe 2000 μT .

1.4 Surveillance continue

Pendant les expositions expérimentales, les paramètres suivants sont mesurés et contrôlés:

Salle d'exposition

Température

Humidité

Bruit

Radiations ionisantes

Ventilation

Photopériode

Accès à la salle d'exposition

Courant AC

Appareillage d'exposition

Animalerie

Température

Humidité

Bruit

Radiations ionisantes

Ventilation

Photopériode

1.5 Protocole d'exposition

Ce programme d'étude implique des rats mâles et femelles Fischer F344/N de type Virgin reçus à l'âge de 4-5 semaines du National Institute of Health (Taconic Breeding Laboratories, Germantown, NY, USA). Suite à une période d'acclimatation de trois à quatre semaines, les animaux sont accouplés: un rat mâle est introduit dans une cage contenant cinq rats femelles à 16:30 p.m. puis retiré le lendemain à 9:30 a.m. Des frottis vaginaux sont immédiatement effectués sur toutes les femelles. La présence de sperme sur le frottis vaginal est considéré comme preuve d'insémination. Le jour de détection de sperme sur le frottis est

considéré comme le jour 1 de la gestation. Au vingtième jour de gestation (i.e. deux à trois jours avant l'accouchement), les rats femelles ayant pris au moins 20 g de poids sont considérées enceintes. Chaque femelle est alors placée seule dans une cage et exposée à un CM d'intensité sélectionnée selon une méthode statistique de randomisation. Un sixième groupe, le groupe témoin, est gardé à l'animalerie pour vérifier l'intégrité et la normalité de la lignée d'animaux utilisée. Les animaux se nourrissent et s'abreuvent *ad libitum*.

La progéniture est sevrée à l'âge de quatre semaines. Les mères sont alors retirées des CM puis à l'intérieur de la portée, les femelles sont séparées des mâles. Cinq groupes de huit animaux (mâles et femelles) sont alors exposés à des CM de 60 Hz d'intensité variant de 0,2 μ T à 2000 μ T du vingtième jour de gestation jusqu'à l'âge du sacrifice soit 6, 11 ou 12 semaines (Figure 3). Les animaux sont exposés aux CM 20 heures par jour, à tous les jours. L'exposition inclut un cycle de 14 heures de luminosité et de 10 heures d'obscurité.

2. CULTURES CELLULAIRES

2.1 Origine des lignées cellulaires

Les lignées continues de cellules YAC-1 et L929 proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA). La lignée cellulaire YAC-1 dérive d'un lymphôme murin induit par le virus leucémique de Moloney (Kiessling *et al.*, 1975). Les cellules de cette lignée sont sensibles à l'action cytolytique des cellules NK et sont utilisées dans les dosages de l'activité des cellules NK de souris et de rat. La lignée L929 est constituée de cellules fibroblastiques murines (Matthews et Neale, 1987) employées pour le dosage du TNF.

Conditions expérimentales	Niveaux d'exposition (μ T)				
	Sham	2	20	200	2000
Animaux dans l'étude					
6 semaines d'exposition	8	8	8	8	8
12 semaines d'exposition	8	8	8	8	8
Témoins					
6 semaines d'exposition	8				
12 semaines d'exposition	8				

FIGURE 3. Protocole d'exposition

2.2 Culture des cellules

2.2.1 Cellules YAC-1

Les cellules YAC-1 sont cultivées en milieu RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) enrichi de 10% de sérum foetal bovin (SFB) (Immunocorp Sciences, Montréal, Québec, Canada), 25 mM d'acide N-2-hydroxyéthyl-piperazine-N-2-éthanesulfonique (HEPES) (Gibco), 50 U/ml de pénicilline (Gibco), 50 µg/ml de streptomycine (Gibco), et de 2 mM de L-glutamine (Gibco). L'énumération cellulaire s'effectue par l'épreuve d'exclusion au bleu trypan 0,1% (Gibco) à l'aide d'un hémacymètre (Scientific Instrument Division, Buffalo, NY, USA). La suspension cellulaire est ajustée à 10^5 cellules/ml avant la mise en culture dans un flacon de polystyrène de 25 cm² (Fisher, Montréal, Québec, Canada). Le milieu est renouvelé à tous les trois à quatre jours et la concentration cellulaire ajustée à 2×10^5 cellules/ml.

2.2.2 Cellules fibroblastiques murines (L929)

Les cellules L929 sont cultivées en milieu RPMI-1640 contenant 10% SFB, 25 mM HEPES, 50 U/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine et de 2 mM de L-glutamine. Les cellules adhérentes sont détachées à tous les trois à quatre jours avec une solution de trypsine 0,05% (Gibco) et d'acide éthylène diamine tétraacétique 0,53 mM (EDTA; Gibco), puis remises en culture à une concentration de 10^5 cellules/ml.

3. PRÉPARATION DES SUSPENSIONS CELLULAIRES

3.1 Suspension de cellules péritonéales

Les rats sont sacrifiés par asphyxie au CO₂, la peau est décollée de l'abdomen préalablement stérilisée, les cellules péritonéales sont recueillies par lavage de la cavité péritonéale avec 30 ml de HBSS (solution saline équilibrée de Hank's; Gibco) refroidi à 4°C, utilisant une seringue hypodermique de 60 ml (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, USA) et une aiguille #18G 1 1/2 (Becton-Dickinson). Les cellules sont décollées de la paroi abdominale par une succession d'aspirations et d'expulsions du liquide puis récupérées dans des tubes coniques de 50 ml (Sarstedt, St-Laurent, Québec, Canada) et gardés sur glace. Elles sont ensuite centrifugées à 500 g pendant 7 minutes à 4°C (centrifugeuse IEC Centra-8R, International Equipment Company, Division of Damon, Needham, MA, USA). Les culots cellulaires sont soumis à un choc osmotique, afin d'éliminer les globules rouges, avec 2 ml d'eau distillée stérile pendant 10 secondes et l'osmolarité est rétablie avec 5 ml de HBSS. Les cellules sont recentrifugées et resuspendues dans 5 ml de RPMI-1640 contenant antibiotiques, L-glutamine, HEPES et 5% SFB.

3.2 Suspension de splénocytes

La rate de chaque animal est prélevée stérilement et triturée dans un pétri de plastique 100 mm x 15 mm (Fisher) contenant 5 ml de RPMI-1640 (Gibco). Les cellules sont récupérées dans des tubes coniques stériles de 13 ml (Sarstedt) puis centrifugées à 400 g durant 7 minutes à 4°C. Les culots cellulaires sont soumis à deux chocs osmotiques avec 4 ml d'eau distillée stérile pendant 10 secondes. L'osmolarité est ensuite rétablie avec 6 ml de RPMI-1640. Les cellules sont alors

filtrées sur pipette pasteur (Fisher) contenant un tampon de coton stérile, centrifugées à 400 g durant 7 minutes à 4°C, puis resuspendues dans 10 ml de RPMI-1640, 10% SFB, HEPES, antibiotiques et L-glutamine. Les cellules sont ensuite dénombrées. La concentration est alors ajustée en fonction de la technique utilisée.

4. DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DES CELLULES NK

Ce test est basé sur le protocole décrit par Reynolds *et al.* (1981). L'activité des cellules NK murines se mesure par une co-culture de cellules spléniques et de cellules tumorales YAC-1 marquées au ^{51}Cr . La lyse des cellules cibles (YAC-1) est mesurée par le largage de ^{51}Cr dans le surnageant.

Les cellules YAC-1 sont lavées avec du milieu complet puis incubées à raison de 10^7 cellules/ml, 90 minutes à 37°C, en atmosphère 5% CO_2 et en présence de 500 μCi de ^{51}Cr (ICN, Costa Mesa, CA, USA). Les cellules sont ensuite lavées deux fois et réincubées pendant 30 minutes à 37°C, en atmosphère 5% CO_2 . Les cellules sont relavées deux fois puis resuspendues en milieu complet à raison de 10^5 cellules/ml.

Un volume de 100 μl de cellules effectrices (cellules spléniques) est distribué en quadruplicata dans des plateaux de 96 puits à fond rond (Flow Laboratories Inc., McLean, VA, USA) contenant 50 μl de milieu/puits. L'activité NK des splénocytes de chaque animal est évaluée à 3 rapports cellules effectrices:cellules cibles (200:1, 100:1 et 50:1). Les cellules YAC-1 (50 μl) sont ensuite ajoutées.

Le largage spontané de ^{51}Cr est déterminé dans 6 cupules contenant 150 μl de milieu et 5×10^3 cellules cibles. Le largage maximal est mesuré dans 6 puits contenant 50 μl de milieu, 5×10^3 cellules cibles et 100 μl de sodium dodécyl sulfate 3% (SDS; ICN). Les plateaux sont centrifugés 5 minutes à 400 g, puis incubés quatre heures à 37°C en atmosphère 5% CO_2 . Les plateaux sont recentrifugés 10 minutes à 400 g, puis les surnageants sont récupérés à l'aide d'un système de collection de surnageant Macrowell ("Skatron Harvesting System", Flow).

La radioactivité libérée dans le surnageant est mesurée dans un compteur Gamma 7000 (Beckman Gamma 7000, Microprocessor Controlled; Beckman Scientific Instrument Division, Irvine, CA, USA). Les résultats sont exprimés en unités lytiques définies comme étant le nombre de cellules effectrices nécessaires pour lyser 20% des cellules cibles et ce, par 10^7 cellules spléniques. Pour ce faire, la formule suivante est utilisée:

$$\% \text{ lyse} = \frac{\text{c.p.m. expérimental} - \text{c.p.m. spontané}}{\text{c.p.m. maximal} - \text{c.p.m. spontané}} \times 100$$

c.p.m. indique le nombre de "coups par minute" de ^{51}Cr largué

c.p.m. maximal représente la radioactivité totale lorsque les cellules et le surnageant sont récoltés tandis que pour les échantillons contenant le "test" ou le témoin, seul le surnageant est prélevé.

5. DOSAGE DE LA PRODUCTION DE PEROXYDE D'HYDROGÈNE

L'évaluation de la production de H_2O_2 est effectuée selon la méthode décrite par Bass *et al.* (1983). Lorsque le 2', 7' dichlorofluorescéine diacétate (DCFH-DA) est ajouté aux cellules, ce produit est déacétylé en dichlorofluorescéine (DCFH) dans le cytoplasme. La molécule de DCFH devient

fluorescente en présence de H₂O₂. Le traitement avec des esters de phorbol active la "flambée oxydative" ("oxidative respiratory burst") et la fluorescence verte (525 nm) produite mesurée au cytofluoromètre en flux permet d'évaluer le niveau de production de H₂O₂.

Les cellules péritonéales totales (10⁶ cellules/ml) sont préparées tel que décrit dans la section 3.1. Des cellules péritonéales adhérentes et non-adhérentes ont été utilisées lors d'analyses subséquentes des populations cellulaires; celles-ci sont préparées tel que décrit à la section 6 à l'exception de récupérer les cellules non-adhérentes. Les cellules sont suspendues dans des tubes de 13 ml (Sarstedt) contenant 2 ml de tampon phosphate salin (PBS) sans Ca⁺², ni Mg⁺² (Gibco) contenant 1 mg/ml de gélatine (Type A, peau de porc; Sigma) et 1 mg/ml de α -D-glucose (Sigma). Les suspensions cellulaires sont chauffées à 37°C puis on ajoute 1 μ l/ml de 5 mM DCFH-DA (Eastman-Kodak, Rochester, NY, USA) (dans de l'éthanol 100%). Les échantillons sont incubés 15 minutes à 37°C, refroidis à 4°C, divisés en aliquots de 1 ml, puis rechauffés à 37°C. Le phorbol myristate acétate (PMA; Sigma) 100 ng/ml, est ajouté à un tube de chaque échantillon alors que le deuxième est utilisé comme témoin. Les tubes sont incubés 20 minutes à 37°C et la variation de fluorescence des cellules est mesurée au cytofluoromètre EPICS C (Coulter Electronics, Division of Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA) muni d'un laser simple à argon émettant à 488 nm et de deux échelles logarithmiques d'intensité. Les photomultiplicateurs sont ajustés à 525 nm pour la détection de la fluorescence verte.

6. PRODUCTIONS D'OXYDE NITRIQUE ET DU FACTEUR NÉCROSANT DES TUMEURS

Les suspensions de cellules péritonéales sont préparées tel que décrit dans la section 3.1. Les cellules sont distribuées dans des plateaux de 24 puits (Flow) à raison de 10^6 cellules/puits, (deux puits/échantillon) puis incubées 2 à 3 heures à 37°C en atmosphère 5% CO_2 , afin de permettre l'adhérence des macrophages. Les cellules non-adhérentes sont éliminées par trois lavages consécutifs avec 500 μl de RPMI-1640 à 37°C , puis le milieu de lavage est substitué par 1 ml de RPMI-1640 contenant de l'HEPES, des antibiotiques et de la L-glutamine. On ajoute alors 500 ng de lipopolysaccharide (LPS) provenant de *E.coli* sérotype 026:B6 (Sigma) dans un puits de chaque échantillon, le deuxième constituant le témoin. Les cellules sont incubées 20 heures à 37°C , en atmosphère 5% CO_2 . Pour effectuer le dosage des nitrites (NO_2^-) libérés dans les surnageants, 100 μl de chaque puits des plateaux à 24 puits est transféré dans des cupules de plateaux à fond plat de 96 puits (Flow). Chaque échantillon est testé en triplicata. Le restant de chaque surnageant est congelé dans des tubes Eppendorf (Fisher) pour la détermination de l'activité TNF.

7. DOSAGE DU FACTEUR DE NÉCROSE DES TUMEURS

7.1 Dosage de l'activité du facteur nécrosant des tumeurs

Ce test est effectué selon le protocole décrit par Matthews et Neale (1987) dans lequel les cellules fibroblastiques L929, adhérentes au plastique, sont utilisées comme cellules cibles. Les cellules sont décollées avec 2 ml de trypsine-EDTA (Gibco), lavées avec du PBS, puis resuspendues dans du milieu complet à raison de 3×10^5 cellules/ml. Des volumes de 75 μl de cette suspension cellulaire sont

répartis dans des microplateaux de 96 puits à fond plat (Flow) en laissant une rangée de huit puits sans cellules comme témoin "blanc" pour le lecteur ELISA. Après une incubation de 18 heures à 37°C en atmosphère 5% CO₂, afin de permettre l'adhérence des cellules au plastique, la prolifération cellulaire est interrompue par l'addition de 75 µl d'actinomycine D (Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada; 2 µg/ml). Cet inhibiteur de la transcription augmente la sensibilité du test. Des volumes de 50 µL des surnageants à doser ou d'une solution de TNF-α murin recombinant (Genzyme, Cambridge, MA, USA; 10³ U/ml) sont ajoutés en triplicata. Des dilutions successives de 1/4 sont alors réalisées directement dans les puits. La densité cellulaire maximale est déterminée par une rangée de 8 puits contenant des cellules L929 et du milieu additionné d'actinomycine D (témoin négatif). Après une incubation de 18 heures à 37°C en atmosphère 5% CO₂, le milieu contenant les cellules mortes est éliminé en inversant les plateaux et les cellules viables sont fixées avec 5% (v/v) de formaldéhyde (Sigma) pendant 5 minutes. Les plaques sont rincées à l'eau courante et les cellules fixées sont colorées avec une solution 1% (p/v) de violet cristal (Sigma) durant 5 minutes. Les plateaux sont ensuite lavés et asséchés. Les cellules sont alors solubilisées avec une solution 33% (v/v) d'acide acétique (Fisher). La densité optique (D.O.) des plaques est lue à 540 nm dans un lecteur ELISA (Bio-tek Instruments, Winooski, VT, USA).

7.2 Calcul de l'activité du facteur nécrosant des tumeurs

L'activité TNF de chaque surnageant de culture des cellules péritonéales a été évaluée en U/ml selon la méthode décrite par Hewlett *et al.* (1989) pour le dosage de l'activité IL-2. Quatre échantillons de 62,5, 125, 250 et 500 U/50 µl sont produits à partir de la solution standard de TNF-α murin recombinant (Genzyme).

Chaque échantillon est dilué quatre fois en base quatre (de 1/4 à 1/256). Chaque dilution a été testé en triplicata. Les résultats sont ensuite transposés sur une courbe de cytotoxicité en fonction de la dilution du surnageant où la cytotoxicité est calculée selon la formule:

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

Cette courbe standard sert à transformer les résultats en unités ASC (aire sous la courbe); les unités ASC sont calculées en additionnant les surfaces formées par les paires de données consécutives sur la courbe, selon l'équation utilisée pour calculer l'aire d'un trapèze: $(a + b) \times h/2$.

Dans cette équation, a et b sont les résultats en % de cytotoxicité de deux dilutions consécutives du même échantillon et h représente la largeur du trapèze formé, ayant ici la valeur de 1 puisqu'il s'agit de deux dilutions consécutives d'une série logarithmique continue. Les quatre dilutions engendrent donc trois trapèzes dont les surfaces sont additionnées pour donner le nombre d'unités ASC, selon l'équation suivante où n représente la dilution:

$$\text{ASC} = \sum \frac{\% \text{ cytotoxicité}_n + \% \text{ cytotoxicité}_{n+1}}{2}$$

Le nombre d'unités ASC de chaque échantillon de TNF- α standard est ensuite reporté sur une droite en fonction du nombre d'unités TNF de l'échantillon. Le nombre d'unités d'un échantillon se calcule par interpolation sur la droite obtenue avec l'ASC versus le nombre d'unités de TNF.

8. MESURE DE LA PRODUCTION D'OXYDE NITRIQUE

La technique de Marletta *et al.* (1988) a été utilisée. Tel que décrit à la section 8, les surnageants de culture produits suite à l'activation des macrophages par le LPS sont distribués dans les cupules de plateaux à fond plat de 96 puits (Flow) à raison de 100 μ l/puits. Les échantillons sont testés en triplicata. On évalue les nitrites libérés dans chaque surnageant en ajoutant à chaque puits 100 μ l du réactif de Greiss constitué de 10% v/v d'acide phosphorique (H_3PO_4 ; BDH, Toronto, Ontario, Canada) 85%, 10 mg/ml de sulfanilamide (BDH), 1 mg/ml de naphthyléthylène diamine dihydrochlorure (NDD; BDH) dans un volume final de 100 ml d'eau distillée déminéralisée. Un témoin négatif est également préparé avec du milieu RPMI-1640 complet. Les plateaux sont incubés 10 minutes à température ambiante puis lus à 540 nm au lecteur ELISA. Le NO_2^- réagit avec le réactif de Greiss en formant un chromophore qui absorbe à 543 nm (Green *et al.*, 1982).

Les concentrations en μ M des nitrites contenus dans les échantillons sont déterminées par rapport à la courbe standard de $NaNO_2$ (Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI, USA) obtenue avec des dilutions de 200 μ M à 1,6 μ M.

9. ANALYSE DES DIFFÉRENTES POPULATIONS MACROPHAGIQUES

Le marquage des différentes populations macrophagiques est effectué sur les suspensions de cellules péritonéales de chaque animal préparées tel que décrit dans la section 3.1. Les cellules sont suspendues dans un tampon phosphate salin (PBS; 40 mM K_2HPO_4 , 10 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 120 mM NaCl) additionné de 0,1% d'azide de sodium (NaN_3 ; Baker, Philipsburg, NJ, USA) et 1% d'albumine sérique bovine (BSA; Sigma, St-Louis, MO, USA). Des volumes de 10^6 cellules/ml sont

répartis dans des tubes à micro-centrifugation (Fisher) contenant préalablement des anticorps monoclonaux biotinylés à la concentration requise. Des anticorps anti-macrophage de rat (clone HIS36; Pharmingen, San Diego, CA, USA) et anti-granulocyte (clone HIS48; Pharmingen) sont utilisés pour marquer les cellules macrophagiques et polymorphonucléaires respectivement.

Les tubes sont incubés pendant 60 minutes sur glace à lumière réduite puis les cellules sont lavées trois fois avec du PBS froid contenant 0,1% NaN₃ (Baker). Un volume de 5 µl de streptavidine conjuguée à la phycoérythrine (S-PE) (Serotec, Oxford, Angleterre) est ensuite ajouté aux échantillons. Les tubes sont réincubés pendant 60 minutes sur glace à lumière réduite. Les cellules subissent ensuite trois lavages avec du PBS froid contenant 0,1% NaN₃ (Baker) et sont fixées à la paraformaldéhyde (Fisher) 0,5%.

L'intensité de la fluorescence et la distribution des cellules marquées sont déterminées à l'aide du cytofluoromètre en flux EPICS C (Coulter Electronics) équipé d'un laser à argon émettant à 488 nm. Les photomultiplicateurs sont ajustés à 560 nm pour la détection de la PE.

10. ANALYSE DES DIFFÉRENTES POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES

Le marquage des différentes populations lymphocytaires est effectué sur les suspensions de cellules spléniques de chaque animal préparées tel que le décrit la section 3.2. Puisqu'il a été démontré que les macrophages/monocytes expriment des antigènes de surface identiques aux molécules CD4 des lymphocytes T auxiliaires (Stewart *et al.*, 1986), cette population est éliminée par adhérence au plastique pendant une heure à 37°C, en atmosphère 5% CO₂. Les cellules non-adhérentes sont suspendues dans du PBS additionné de 0,1% de NaN₃ (Baker) et

1% de BSA (Sigma). Des volumes de $1,5 \times 10^6$ cellules par 100 μ l sont répartis dans des tubes à micro-centrifugation (Fisher) contenant préalablement des anticorps monoclonaux fluorescents à la concentration requise. Un anticorps anti-chaîne kappa (κ) d'immunoglobulines (Igs) de rat (clone MARK-1; Serotec) conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) est utilisé pour marquer les lymphocytes B. Les différentes populations des lymphocytes T sont identifiées par double marquage avec un anticorps anti-CD5 (clone MRC OX-19; Serotec) conjugué à la phycoérythrine (PE) pour les lymphocytes T totaux et un anticorps anti-CD4 (clone W3/25; Serotec) ou un anti-CD8 (clone MRC OX-8; Serotec), tous deux conjugués au FITC afin d'identifier les lymphocytes T auxiliaires ou les cellules T cytotoxiques ou suppressives respectivement. La liaison non-spécifique des anticorps aux cellules est vérifiée par marquage avec des témoins isotypiques anti-immunoglobuline (IgG1) κ de souris (Pharmingen) conjugués au FITC et à la PE.

Les tubes sont incubés pendant 30 minutes sur glace à lumière réduite. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS froid contenant 0,1% NaN_3 (Baker) et fixées à la paraformaldéhyde (Fisher) 0,5%. L'intensité de la fluorescence et la distribution des cellules marquées sont déterminées à l'aide du cytofluoromètre en flux EPICS C (Coulter Electronics). Les photomultiplicateurs sont ajustés à 520 et 560 nm pour la détection de la FITC et de la PE respectivement. La fluorescence spécifique est déterminée pour chaque population lymphocytaire et les populations CD4^+ et CD8^+ sont exprimées en pourcentage de la population CD5^+ à l'intérieur de la fenêtre de sélection (Annexe 1). Les résultats sont présentés en pourcentage de cellules dans la suspension après adhérence.

11. DÉTERMINATION DES CELLULES SÉCRÉTRICES D'ANTICORPS

11.1 Immunisation

La solution antigénique est préparée en lavant les globules rouges de mouton (GRM; Quélab, Montréal, Québec, Canada) trois fois dans du HBSS. Le culot est ensuite resuspendu dans du HBSS pour obtenir une concentration de $1,6 \times 10^9$ GRM/ml. Pour cette détermination, des rats ont été injectés avec 1 ml de la suspension de GRM par voie intra-péritonéale (i.p.). Notons ici que pour ces analyses, les animaux utilisés (21 rats exposés au "sham" et 22 à l'intensité de 2000 μ T) étaient différents de ceux utilisés pour toutes les autres analyses et le temps d'exposition aux CM était de onze semaines.

11.2 Détermination des cellules sécrétrices d'anticorps

La technique décrite par Cunningham et Szenberg (1968) a été utilisée. Quatre jours après l'immunisation, les animaux sont sacrifiés et la rate de chaque animal est prélevée. Les cellules spléniques sont préparées tel que décrit à la section 3.2, la seule exception étant qu'elles sont resuspendues dans un volume final de 15 ml de HBSS. Un dénombrement cellulaire est ensuite effectué.

Les mêmes GRM sont lavés trois fois dans du HBSS et le culot est resuspendu dans du HBSS à raison de 5×10^9 GRM/ml.

Dans des tubes de 5 ml (Sarstedt) sont ajoutés: 50 μ l de la suspension de cellules spléniques, 75 μ l de la suspension de GRM et 500 μ l de complément de cobaye (Cedarlane Laboratories Limited, Hornby, Ontario, Canada) dilué 1/20

(v/v) dans du HBSS. Le témoin est préparé en remplaçant la suspension de splénocytes par 50 µl de HBSS.

Des chambres de Cunningham sont préparées en superposant deux lames de microscope (25 x 75 mm) (Fisher) séparées aux extrémités par une double épaisseur de ruban à double surface adhésive 3M (Pilon, Montréal, Québec, Canada). Les chambres sont remplies par capillarité avec 200 µl du mélange réactionnel. Les lames sont scellées en immergeant les côtés de la chambre dans la paraffine (Fisher) chaude puis incubées 1 heure à 37°C. La lecture des plages d'hémolyse s'effectue à l'oeil nu. Le nombre de cellules productrices d'anticorps (PFC) est calculé par rate ou par 10⁶ cellules spléniques (testé en duplicata) selon les formules suivantes:

$$\text{PFC}/10^6 \text{ splénocytes} = \frac{(P - T) \times 10^6}{N \times v}$$

où P = nombre de PFC observés par échantillon

T = nombre de PFC observés pour le témoin

N = nombre de splénocytes viables /ml de l'échantillon

v = volume de l'échantillon déposé dans la chambre (200 µl)

$$\text{PFC}/\text{rate} = \text{PFC} \times N \times V$$

où PFC = nombre de PFC/10⁶ splénocytes

N = nombre de splénocytes viables/ml de l'échantillon

V = volume total de l'échantillon (15 ml)

12. TESTS STATISTIQUES

12.1 Test de Student

Pour chaque groupe d'exposition (témoin, sham, 2, 20, 200 et 2000 μ T) huit animaux ont été utilisés. Chaque temps d'exposition a été répété deux fois. Le test de conformité a été effectué dans l'optique de regrouper les temps d'exposition identiques (\pm 16 animaux) en normalisant chaque valeur par rapport à la moyenne du premier groupe contenant huit animaux. Les différentes analyses ont été effectuées en triplicata. Le test de comparaison des moyennes ("t" de Student) a été réalisé sur chacun des résultats afin de vérifier si la différence entre l'échantillon testé et le témoin était significative ($p < 0,05$). Dans le cas de l'inégalité des variances, le test "t" modifié de Student a été utilisé.

12.2 Régression linéaire

Le coefficient de corrélation et la régression linéaire ont été utilisés afin de démontrer le degré de corrélation entre les réponses immunitaires aux différents temps d'exposition et l'intensité des CM.

RÉSULTATS

1. ACTIVITÉ DES CELLULES NK

L'activité des cellules NK spléniques provenant de rats exposés aux CM pendant six et douze semaines a été évaluée (Tableau I). Après six semaines d'exposition, les niveaux de l'activité des cellules NK des animaux s'élèvent avec l'intensité du CM, mis à part le groupe exposé à l'intensité 20 μ T, qui présente un niveau semblable à celui du groupe témoin (une baisse de 14% par rapport au groupe "sham"). Une augmentation significative ($p < 0,05$) de 50% a été observée à l'intensité de 2000 μ T. De plus, le test statistique de régression linéaire des résultats par rapport aux intensités de CM indique une relation dose-réponse positive (Figure 4).

Les niveaux de l'activité des cellules NK des animaux exposés pendant douze semaines ne démontrent aucune variation significative entre les différentes intensités. Cependant, comme à six semaines, une diminution de 22% par rapport au groupe "sham" a été notée dans le groupe d'intensité de 20 μ T.

Les réponses obtenues dans le groupe "sham" étaient plus élevées (d'environ 16%; NS) que celles du groupe témoin aux deux temps d'exposition. Par ailleurs, les réponses des animaux exposés ainsi que des témoins étaient plus faibles à douze semaines d'exposition que celles obtenues à six semaines.

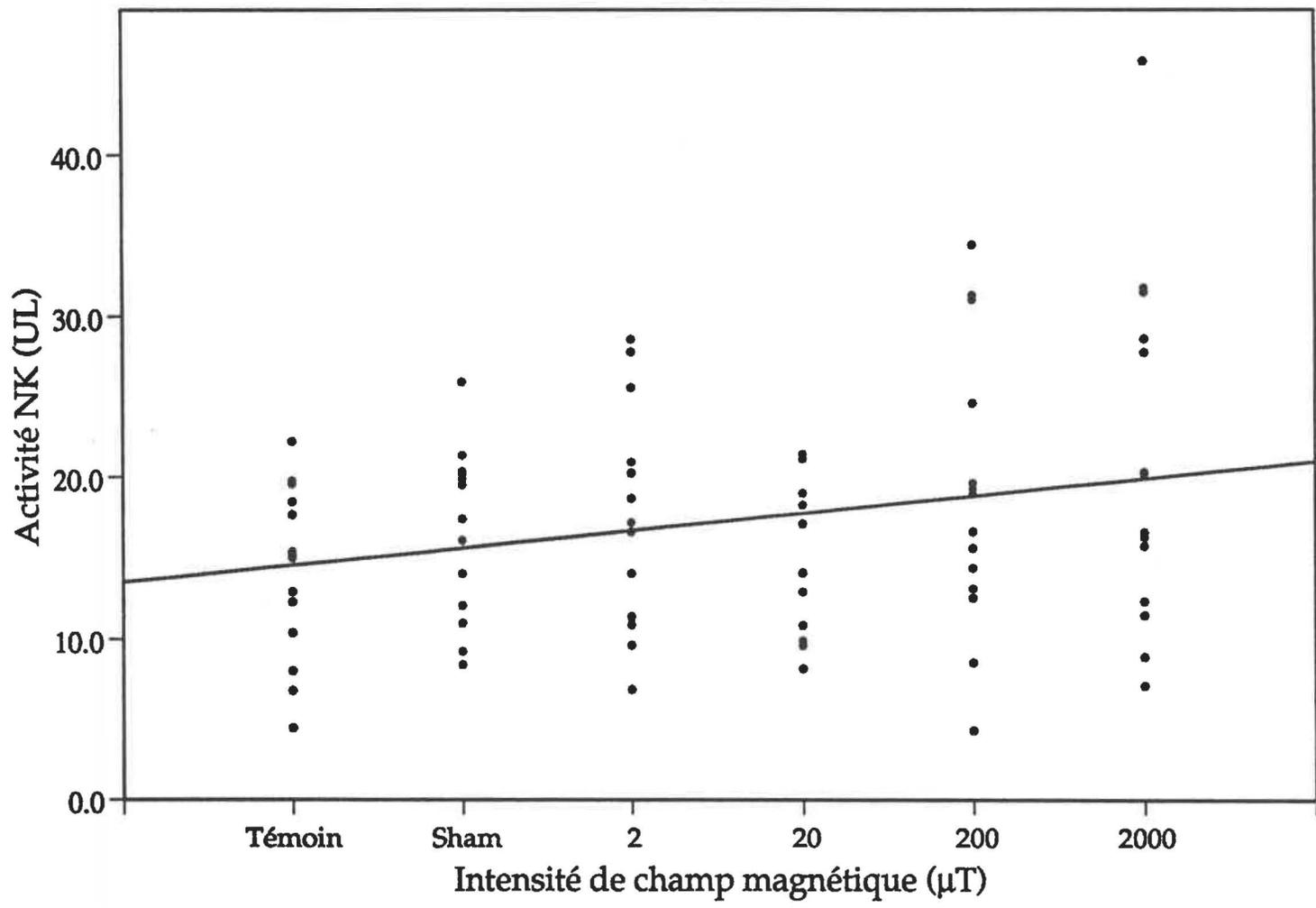
TABLEAU I: Effets de la variation de l'intensité du champ magnétique sur l'activité des cellules NK spléniques de rats Fisher 344/N.

Temps d'exposition	Intensité du champ magnétique (μ T)					
	Témoin	Sham	2	20	200	2000
6 semaines	14,1 \pm 5,3 ^a (n=14)	17,1 \pm 5,1 (n=14)	17,8 \pm 6,7 (n=14)	14,7 \pm 4,6 (n=14)	18,9 \pm 8,8 (n=14)	21,1 \pm 10,8* (n=14)
12 semaines	12,0 \pm 5,4 (n=18)	13,3 \pm 5,0 (n=16)	14,2 \pm 6,3 (n=16)	10,4 \pm 4,5 (n=16)	11,5 \pm 5,0 (n=16)	14,0 \pm 5,7 (n=16)

a Moyenne de n observations (\pm écart-type); * : $p < 0,05$; l'activité NK est exprimée en unités lytiques.

FIGURE 4. Corrélation entre l'activité des cellules NK spléniques et l'intensité de CM suivant six semaines d'exposition.

Une droite a été tracée par régression linéaire avec les moyennes des réponses en activité NK des splénocytes provenant de rats Fisher 344/N exposés pendant six semaines, à chaque intensité de CM. Chaque point correspond à la réponse en activité NK obtenue pour chaque animal testé. Le coefficient de corrélation linéaire de la droite obtenue était de 0,76 ($p < 0,05$).



Ces résultats sont comparables aux réponses obtenues lors d'expériences préliminaires effectuées à 9, 13 et 17 semaines d'exposition, avec trois rats par groupe d'intensité de CM (Figure 5). Ces expériences avaient pour objectif de cerner les temps d'exposition nécessaires pour observer des effets induits par les CM, s'ils en produisaient. Les résultats rapportés ci-haut, proviennent d'expériences reprises deux fois, avec huit animaux par groupe d'intensité, à deux temps d'exposition, pour mieux caractériser l'effet observé après neuf semaines d'exposition, lors des expériences préliminaires. Les résultats obtenus n'indiquaient une influence possible que dans les groupes exposés pendant neuf semaines à l'intensité de 2000 μ T, où l'activité des cellules NK était augmentée de 167% par rapport au témoin et 112% par rapport au groupe "sham", revenant au niveau des groupes témoin et sham à 13 et 17 semaines.

2. PRODUCTION DE PEROXYDE D'HYDROGÈNE

Lors du sacrifice des animaux, les cellules péritonéales ont aussi été prélevées. La production de H_2O_2 , indicateur de la "flambée oxydative", a été évaluée sur la population entière des cellules péritonéales en absence et en présence de PMA. Deux sous-populations ont pu être délimitées par les mesures de volume cellulaire (donnée par la diffusion aux petits angles; "forward light scatter") et de granulosité cellulaire (diffusion à 90°; "90° light scatter") utilisant la cytométrie en flux (Figure 6). Dans toutes les expériences, et ce, pour toutes les intensités, 67% ($\pm 5\%$) de la population totale se retrouvait dans la population majeure alors que 15% ($\pm 3\%$) des cellules se retrouvait dans la population mineure. L'analyse subséquente de ces deux populations, soit par adhérence et par liaison d'Ac monoclonaux anti-granulocyte et anti-

FIGURE 5. Activité des cellules NK spléniques provenant de rats Fisher 344/N soumis à différentes intensités de CM pendant 9, 13 et 17 semaines.

L'activité des cellules NK a été évaluée pour chaque groupe d'intensité de CM aux temps d'exposition 9, 13 et 17 semaines. La valeur représentée par chaque colonne illustre la moyenne des réponses obtenues pour trois animaux testés par groupe d'intensité. Les barres apparaissant au-dessus des colonnes représentent les erreurs-type; ** : $p < 0,005$.

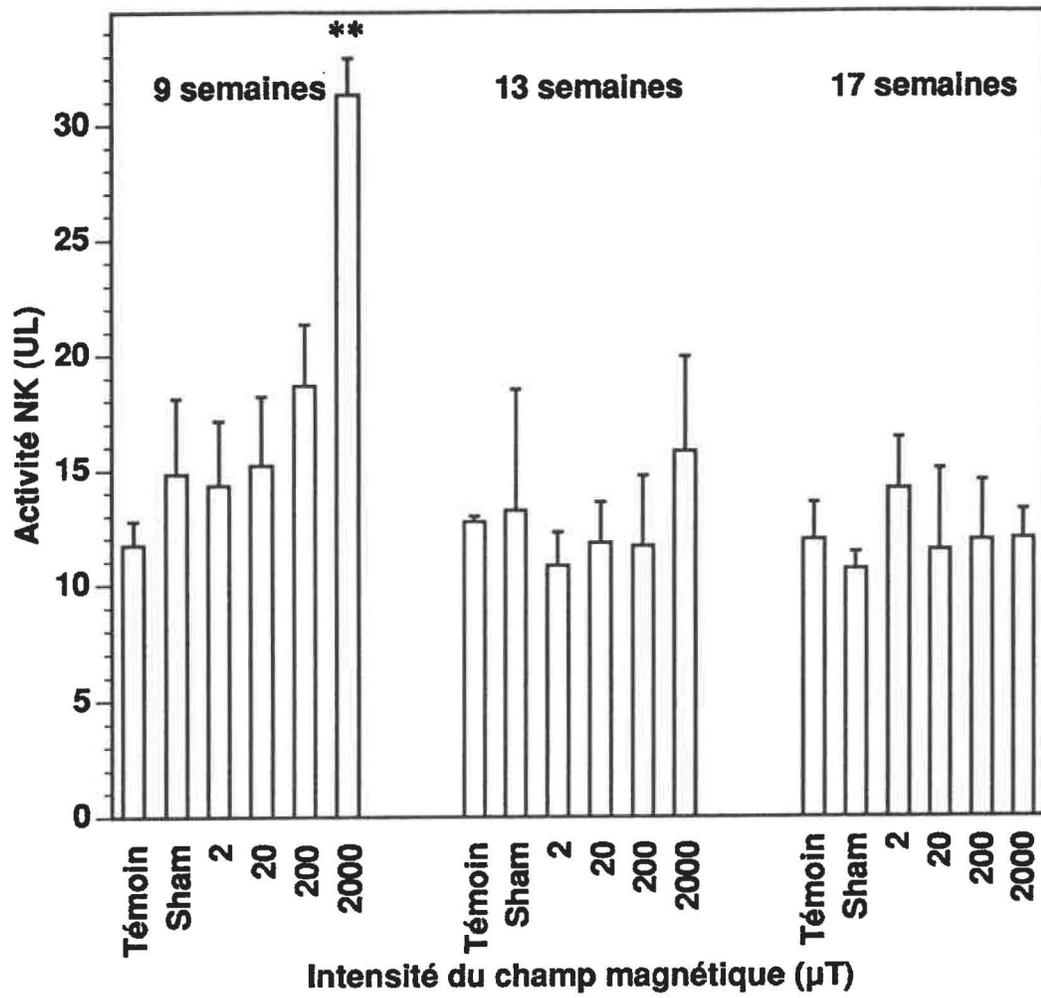
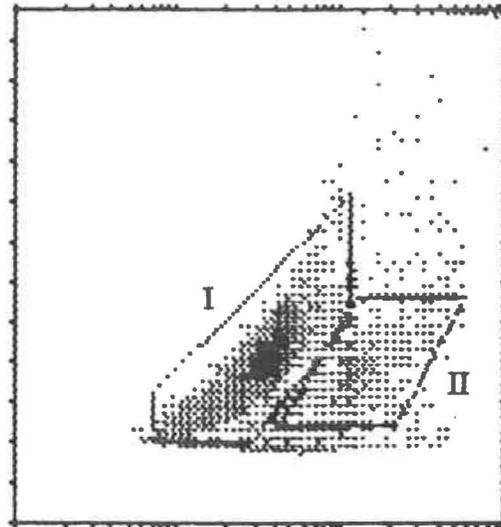


FIGURE 6. Analyse cytofluorométrique de la distribution cellulaire des cellules péritonéales provenant de rats Fisher 344/N exposés aux différentes intensités de CM.

Le nuage de dispersion exprime la valeur logarithmique du volume cellulaire ("forward light scatter"; en abscisse) en fonction de la granulosité cellulaire, unités relatives ("90° light scatter"; en ordonnée). La distribution des cellules péritonéales, telle qu'illustrée, démontre la présence de deux populations délimitées par les deux polygones. La population majeure (I), délimitée par le polygone de gauche, représente 67% ($\pm 5\%$) de la population totale, tandis que la population mineure (II) représente 15% ($\pm 3\%$). Ces valeurs reflètent les distributions des cellules péritonéales provenant d'animaux de tous les groupes.

Diffusion à 90° (granulosité)



Diffusion aux petits angles
(volume cellulaire)

macrophage de rat, n'a pu révéler de différence entre les deux populations (Figures 7A et 7B).

En général, la production de H_2O_2 par la population majeure était plus élevée (de 20% à 66%) que celle de la population mineure, à six et douze semaines d'exposition, en présence et en absence de PMA (Tableaux II et III).

À six semaines d'exposition et pour tous les niveaux d'exposition, les cellules de la population majeure (Tableau II) présentent des niveaux de base (sans PMA) sans variation significative, bien que le groupe de 2 μT démontre une baisse de 7% (NS; $p = 0,31$). Une diminution de 5% dans le même groupe d'intensité est aussi observée à douze semaines d'exposition. En présence de PMA, un agent qui induit la "flambée oxydative", la production de H_2O_2 est identique à toutes les intensités de CM après six semaines d'exposition. Après douze semaines d'exposition, aucune différence n'est observée dans les niveaux stimulés avec le PMA.

En comparant les différents niveaux de production de H_2O_2 par la population majeure à six et douze semaines d'exposition, les niveaux de base augmentent de 45% après douze semaines d'exposition par rapport à ceux de six semaines, mais les niveaux stimulés demeurent semblables.

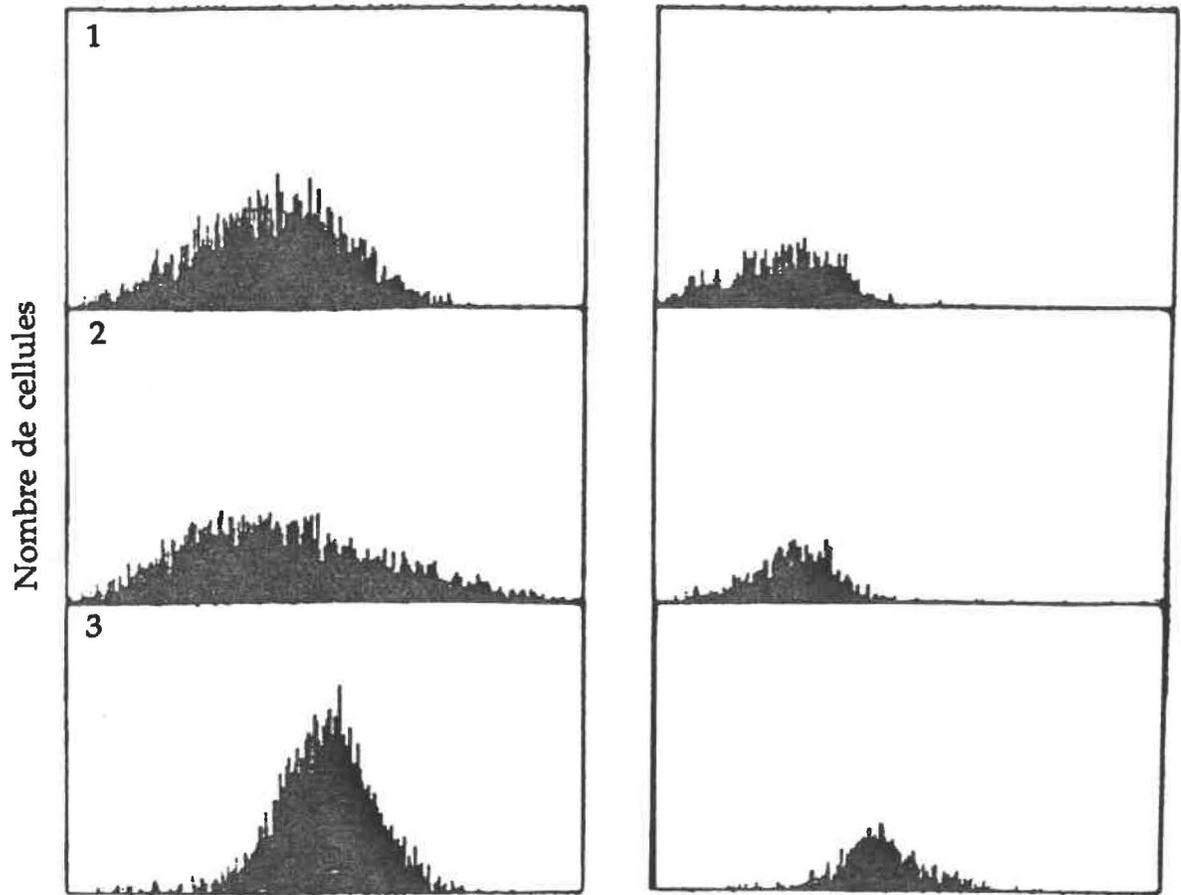
Pour la population mineure (Tableau III), à six semaines d'exposition, les valeurs de sécrétion basale de H_2O_2 sont toutes semblables à celle du témoin. Cependant après douze semaines d'exposition, les intensités de 20, 200 et 2000 μT présentent des taux de sécrétion basale de H_2O_2 un peu plus élevés (4% à 8%) que les groupes témoin et "sham". Ces variations ne sont toutefois pas significatives.

FIGURE 7A Expression des antigènes spécifiques aux macrophages et aux granulocytes à la surface des cellules péritonéales.

La représentation graphique linéaire exprime la valeur logarithmique de l'intensité de fluorescence (en abscisse) en fonction du nombre relatif des cellules (en ordonnée). Les profils cytofluorométriques du marquage des cellules péritonéales adhérentes de la population majeure (I) sont comparés avec ceux de la population mineure (II); (1) cellules seules; (2) cellules en présence de l'anticorps anti-macrophage biotinylé et de la streptavidine-PE; et (3) cellules en présence de l'anticorps anti-granulocyte biotinylé et de la streptavidine-PE. Notez que les deux populations présentent des profils de fluorescence semblables: en présence d'anticorps anti-macrophage (2), aucun déplacement des pics des populations I et II n'est observé; lorsqu'en présence d'anticorps anti-granulocyte (3), les déplacements vers la droite des pics des populations I et II sont approximativement du même taux.

I

II



Intensité de fluorescence

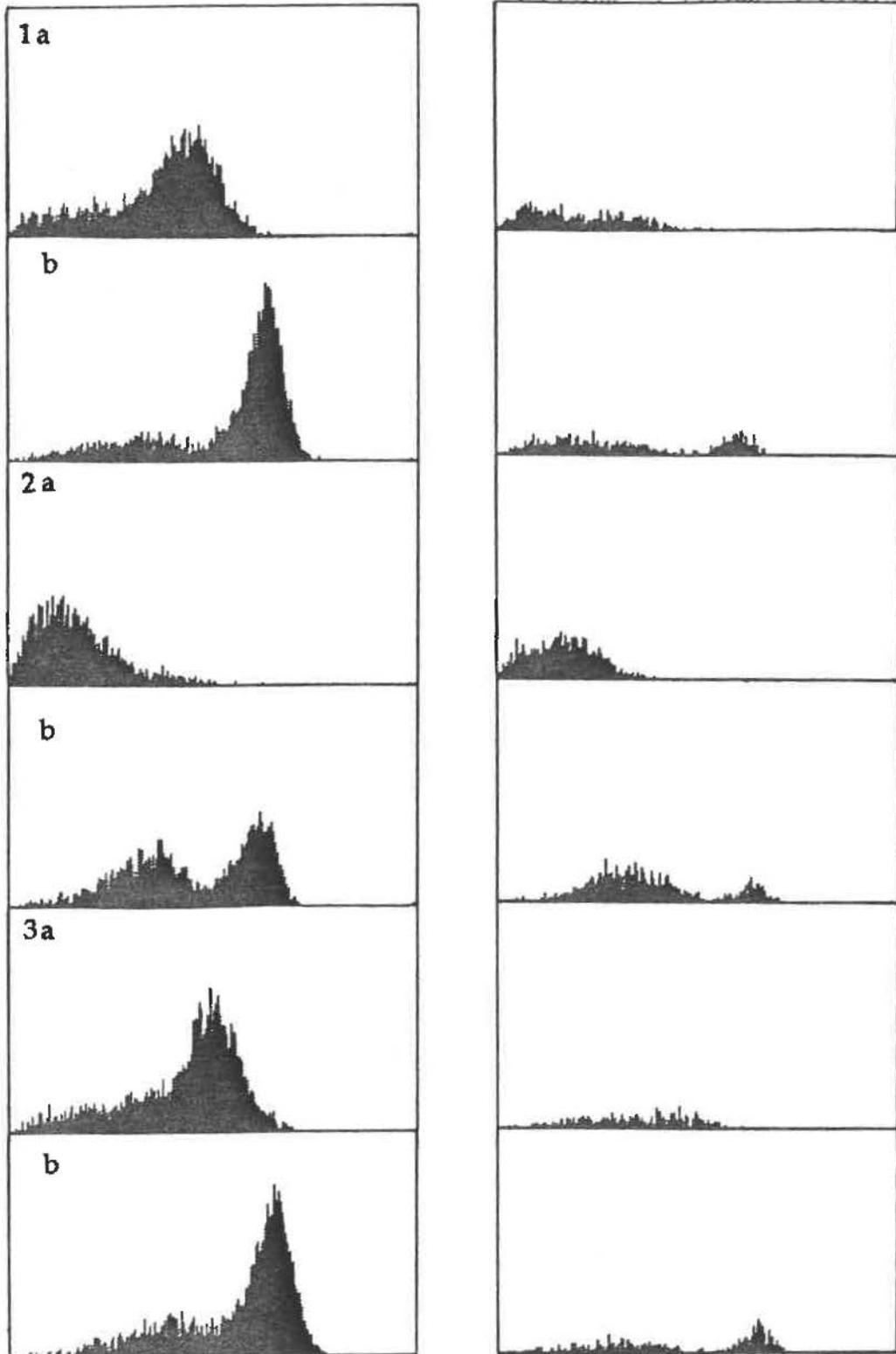
FIGURE 7B Cytofluorogramme de la production de peroxyde d'hydrogène par les cellules péritonéales.

La représentation graphique linéaire exprime la valeur logarithmique de l'intensité de fluorescence (en abscisse) en fonction du nombre relatif des cellules (en ordonnée). Les profils cytofluorométriques du dosage de la production de peroxyde d'hydrogène par les cellules péritonéales de la population majeure (I) sont comparés avec ceux de la population mineure (II); (1) cellules péritonéales totales; (2) cellules péritonéales non-adhérentes; (3) cellules péritonéales adhérentes; (a) en absence de PMA; et (b) en présence de PMA. Notez que les deux populations présentent les mêmes profils de fluorescence: les populations I et II démontrent des déplacements vers la droite identiques lors de l'ajout de PMA (b) et ce, pour chaque type de cellules testé.

I

II

Nombre de cellules



Intensité de fluorescence

TABLEAU II: Effets de la variation de l'intensité du champ magnétique sur la production de H₂O₂ par la population majeure des cellules péritonéales provenant de rats Fisher 344/N.

Temps d'exposition PMA ^a	Intensité du champ magnétique (μT)						
	Témoin	Sham	2	20	200	2000	
6 semaines	-	68 ± 17 ^b	69 ± 16	63 ± 16	66 ± 11	68 ± 17	70 ± 19
	+	141 ± 9 (n=14)	142 ± 9 (n=14)	142 ± 8 (n=16)	142 ± 9 (n=13)	142 ± 11 (n=15)	148 ± 11 (n=13)
12 semaines	-	97 ± 14	94 ± 18	92 ± 21	101 ± 13	99 ± 17	99 ± 21
	+	149 ± 10 (n=16)	146 ± 10 (n=15)	147 ± 9 (n=15)	150 ± 8 (n=14)	152 ± 10 (n=14)	147 ± 6 (n=13)

a Une quantité de 100 ng/ml de PMA a été utilisée pour stimuler la production de H₂O₂ par les cellules péritonéales de rats Fisher 344/N.

b Moyenne de n observations (± écart-type); la quantité de H₂O₂ est exprimée en nombre de canaux moyen (NCM).

TABLEAU III: Effets de la variation de l'intensité du champ magnétique sur la production de H₂O₂ par la population mineure des cellules péritonéales provenant de rats Fisher 344/N.

Temps d'exposition PMA ^a	Intensité du champ magnétique (μT)						
	Témoin	Sham	2	20	200	2000	
6 semaines	-	53 ± 9 ^b	57 ± 11	54 ± 10	55 ± 10	52 ± 11	55 ± 11
	+	85 ± 6 (n=14)	85 ± 8 (n=15)	89 ± 6 (n=16)	90 ± 6* (n= 14)	89 ± 6 (n=16)	93 ± 8* (n=14)
12 semaines	-	78 ± 12	78 ± 17	77 ± 20	84 ± 13	81 ± 16	82 ± 18
	+	107 ± 7 (n=15)	108 ± 9 (n=16)	110 ± 9 (n=14)	111 ± 6 (n=14)	111 ± 10 (n=15)	108 ± 4 (n=15)

a Une quantité de 100 ng/ml de PMA a été utilisée pour stimuler la production de H₂O₂ par les cellules péritonéales de rats Fisher 344/N.

b Moyenne de n observations (± écart-type); * : p < 0,05; la quantité de H₂O₂ est exprimée en nombre de canaux moyen (NCM).

Lors de la stimulation par le PMA, suivant six semaines d'exposition, les groupes d'intensités 2, 20, 200 et 2000 μT montrent des élévations faibles. Les augmentations sont significatives aux intensités de 20 et 2000 μT , de 6% ($p < 0,05$) et 9% ($p < 0,01$) respectivement. De plus, la régression linéaire est significative ($p = 0,001$) et de pente positive (Figure 8), indiquant une relation dose-réponse directe entre la production de H_2O_2 après six semaines d'exposition et l'intensité des CM. À douze semaines d'exposition, des faibles augmentations (3%-4%) sont aussi observées aux intensités de 2, 20 et 200 μT en présence de PMA, mais celles-ci ne sont pas significatives.

En comparant les niveaux de production de H_2O_2 par la population mineure après six et douze semaines d'exposition, les niveaux de base ainsi que les niveaux stimulés augmentent approximativement de 25 canaux à douze semaines d'exposition par rapport à ceux de six semaines.

3. SÉCRÉTION DU FACTEUR DE NÉCROSE DES TUMEURS

Les cellules adhérentes isolées des cellules péritonéales ont été incubées en absence et en présence de LPS pendant 24 heures, puis l'activité $\text{TNF-}\alpha$ des surnageants de culture a été dosée. Le calcul des unités (U) a été effectué à partir des résultats obtenus avec des dilutions de standard TNF (Annexe I).

Après six semaines d'exposition (Tableau IV), une baisse de 44% par rapport au "sham" est enregistrée pour l'intensité de 200 μT dans les niveaux de base de TNF mesurés sur les cellules péritonéales adhérentes. Toutefois, cette variation n'est pas significative puisque les écarts-type sont importants. Pour les animaux exposés pendant douze semaines, les données de production

FIGURE 8. Corrélation entre la production de peroxyde d'hydrogène par la population mineure des cellules péritonéales et l'intensité de CM après six semaines d'exposition.

Une droite a été tracée par régression linéaire avec les moyennes des réponses de production de H_2O_2 par les cellules péritonéales de la population mineure, en présence de PMA, à chaque intensité de CM, après six semaines d'exposition. Chaque point correspond à la réponse de la production de H_2O_2 obtenue pour chaque animal testé. Le coefficient de corrélation linéaire de la droite obtenue était de 0,91 ($p = 0,001$).

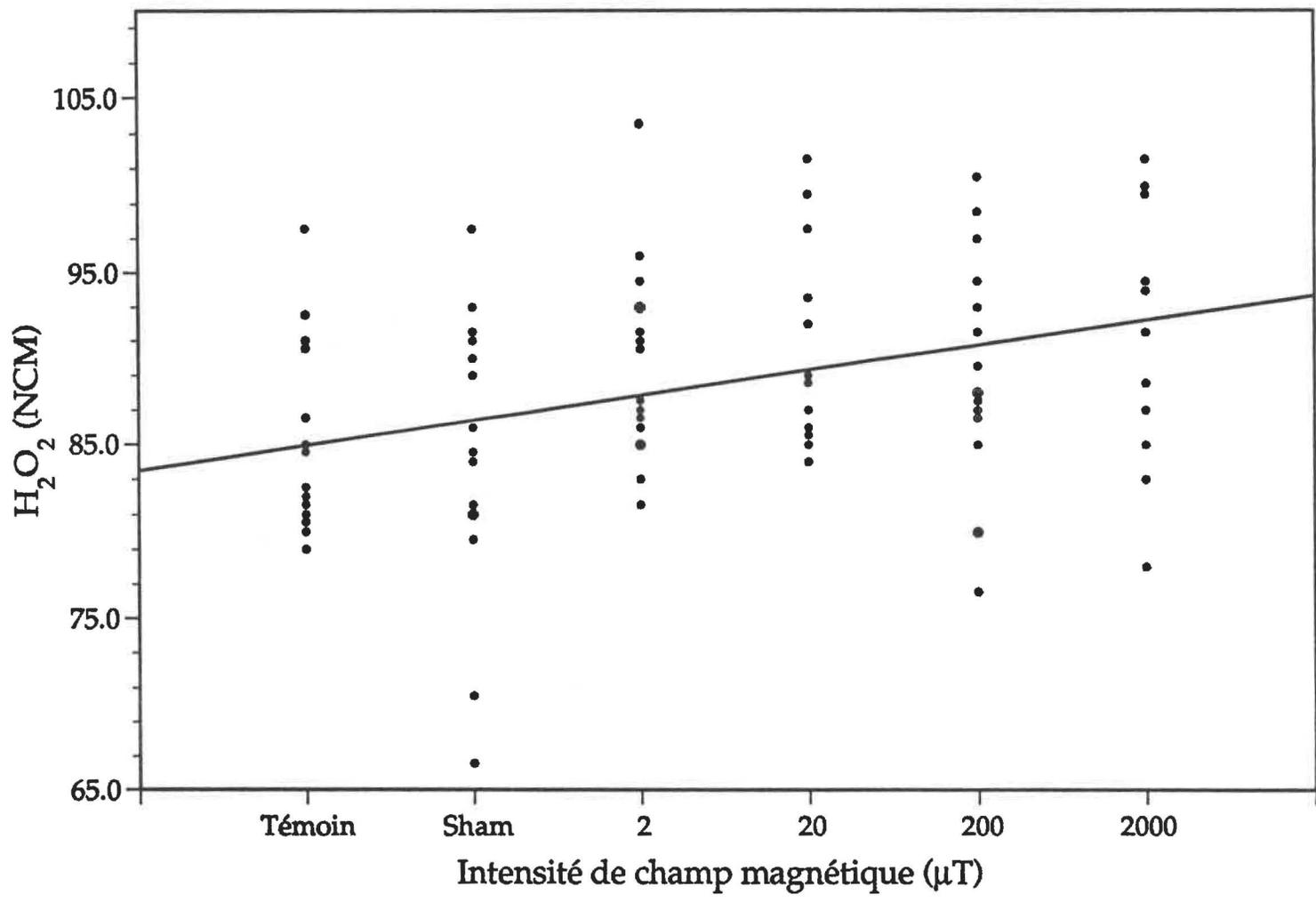


TABLEAU IV: Effets de la variation de l'intensité du champ magnétique sur la production de TNF par les cellules péritonéales de rats Fisher 344/N.

Temps d'exposition	LPS ^a	Intensité du champ magnétique (μ T)					
		Témoin	Sham	2	20	200	2000
6 semaines	-	6,0 $\pm 3,1^b$ (n=16)	8,5 $\pm 5,2$ (n=14)	6,6 $\pm 4,8$ (n=13)	7,8 $\pm 5,7$ (n=13)	4,8 $\pm 2,8$ (n=15)	8,2 $\pm 5,6$ (n=13)
	+	1275 ± 795 (n=15)	1202 ± 313 (n=15)	1349 ± 508 (n=15)	1324 ± 453 (n= 13)	1281 ± 642 (n=16)	1288 ± 623 (n=14)
12 semaines	-	7,2 $\pm 4,5$ (n=14)	6,6 $\pm 4,1$ (n=14)	4,9 $\pm 3,4$ (n=15)	7,3 $\pm 5,6$ (n=14)	4,9 $\pm 2,9$ (n=15)	6,5 $\pm 5,2$ (n=13)
	+	1495 ± 580 (n=18)	1391 ± 484 (n=14)	1492 ± 627 (n=17)	1427 ± 692 (n=15)	1285 ± 276 (n=15)	1568 ± 609 (n=15)

a Une quantité de 500 ng/ml de LPS a été utilisée pour stimuler la sécrétion de TNF par les cellules péritonéales de rats Fisher 344/N.

b Moyenne de n observations (\pm écart-type); la quantité de TNF est exprimée en U/ml.

basale présentent aussi des niveaux inférieurs (de 26%) aux intensités de 2 et 200 μ T. Ces diminutions ne sont toutefois pas significatives.

En présence de LPS, la sécrétion de TNF- α est stimulée par un facteur de 150 à 200 fois, mais aucune intensité de CM n'a pu influencer les niveaux sécrétés après six semaines d'exposition. Pour les animaux exposés pendant douze semaines, les niveaux de production de TNF- α sont, dans la majorité des cas, semblables les uns aux autres sauf pour l'intensité de 200 μ T, alors qu'on observe un niveau inférieur aux autres groupes. La variabilité des réponses à l'intérieur de chaque groupe d'intensité étant trop grande, aucune donnée significative n'a pu être dégagée de ces résultats.

En comparant les expositions de six et douze semaines, les niveaux de sécrétion de TNF- α , en présence de LPS, augmentent d'environ 17% après douze semaines d'exposition. Aucune différence n'est observée entre les niveaux de production basale de TNF- α entre les deux temps d'exposition.

4. PRODUCTION D'OXYDE NITRIQUE

La production de NO₂⁻ a été mesurée dans les mêmes surnageants de culture utilisés pour l'évaluation de l'activité TNF- α . La détermination de la concentration de NO₂⁻ en μ M a été effectuée à partir des résultats obtenus avec des dilutions de standard NaNO₂ (Annexe I).

La sécrétion basale de NO₂⁻ ne démontre aucune variation significative à six semaines d'exposition, ni après douze semaines (Tableau V). Les écarts-type indiquent des variations importantes dans les réponses à l'intérieur de chaque groupe; les résultats obtenus sont difficilement comparables.

TABLEAU V: Effets de la variation de l'intensité des champs magnétiques sur la production de NO_2^- par les cellules péritonéales de rats Fisher 344/N.

Temps d'exposition	LPS ^a	Intensité du champ magnétique (μT)					
		Témoin	Sham	2	20	200	2000
6 semaines	-	1957	1758	1671	1981	2043	2245
		$\pm 919^b$	± 629	± 867	± 855	± 755	± 650
		(n=14)	(n=15)	(n=15)	(n=14)	(n=14)	(n=12)
	+	5014	4961	4613	4749	4884	5344
± 1314		± 1334	± 1185	± 1481	± 1472	± 1763	
	(n=14)	(n=14)	(n=16)	(n=15)	(n=16)	(n=14)	
12 semaines	-	291	536	418	367	353	500
		± 238	± 367	± 308	± 313	± 257	± 328
		(n=15)	(n=14)	(n=15)	(n=15)	(n=14)	(n=14)
	+	1997	2239	2284	1804	1970	2413
± 675		± 689	± 938	± 501	± 866	± 907	
	(n=15)	(n=14)	(n=16)	(n=14)	(n=15)	(n=15)	

a Une quantité de 500 ng/ml de LPS a été utilisée pour stimuler la production de NO_2^- par les cellules péritonéales de rats Fisher 344/N.

b Moyenne de n observations (\pm écart-type); la $[\text{NO}_2^-]$ est exprimée en μM .

Lors de l'addition de LPS, la production de NO_2^- est augmentée par un facteur de 2,5 à six semaines d'exposition, puis par un facteur de 7 après douze semaines. Toutefois, aucune intensité de CM n'a influencé la production de NO_2^- de façon significative.

Les niveaux de production basale de NO_2^- étaient beaucoup plus faibles à douze semaines qu'à six semaines. Les productions stimulées par le LPS après douze semaines d'exposition sont également diminuées jusqu'à 50% par rapport aux expositions de six semaines.

5. MARQUEURS PHÉNOTYPIQUES

Des cellules spléniques ont été marquées avec différents anticorps monoclonaux, puis la proportion de cellules positives a été évaluée par cytofluorométrie. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules dans la suspension après adhérence tel qu'évalué par le processus d'analyse (Annexe 1).

Après six semaines d'exposition (Tableau VI), le pourcentage de lymphocytes T positifs pour le marqueur CD5 est diminué significativement aux intensités de 200 et 2000 μT donnant des baisses de 13% ($p < 0,05$) et 25% ($p < 0,0005$) respectivement. Le groupe d'intensité 2000 μT présente aussi des baisses significatives dans les pourcentages de lymphocytes T CD4^+ et CD8^+ présents dans la population CD5^+ : une baisse de 23% ($p < 0,0001$) est obtenue pour le marqueur CD4 et 17% ($p < 0,005$) pour le CD8. De plus, les régressions linéaires des réponses obtenues pour les marqueurs CD4 et CD8 par rapport aux intensités de CM sont significatives ($p < 0,005$ et $p < 0,05$ respectivement), indiquant dans les deux cas des relations dose-réponse après six semaines

TABLEAU VI: Évaluation par immunofluorescence de divers marqueurs phénotypiques des cellules spléniques de rats Fisher 344/N exposés à différentes intensités de champs magnétiques pendant six semaines.

Marqueurs		Intensité du champ magnétique (μT)					
		Témoin	Sham	2	20	200	2000
CD 5 (cell. T)	% ^a	34,0 $\pm 6,3^b$	31,5 $\pm 3,4$	31,4 $\pm 5,5$	33,0 $\pm 5,2$	29,5 $\pm 4,6^*$	25,4 $\pm 5,4^{**}$
CD 4 (T aux.)	%	20,2 $\pm 3,7$	17,7 $\pm 3,1$	18,1 $\pm 3,6$	19,6 $\pm 3,0$	17,7 $\pm 3,8$	15,6 $\pm 3,2^{**}$
CD 8 (T cyt. et supp.)	%	18,0 $\pm 2,3$	17,4 $\pm 1,8$	16,4 $\pm 2,9$	17,6 $\pm 2,4$	17,2 $\pm 3,8$	15,0 $\pm 2,9^{**}$
rapport CD4 : CD8		1,22 $\pm 0,13$	1,16 $\pm 0,15$	1,21 $\pm 0,14$	1,21 $\pm 0,11$	1,12 $\pm 0,15$	1,16 $\pm 0,17$
		(n=16)	(n=16)	(n=16)	(n=16)	(n=16)	(n=16)
Igs surface (cell. B)	%	35,4 $\pm 5,3$	33,7 $\pm 6,6$	35,1 $\pm 9,9$	30,8* $\pm 6,0$	31,0* $\pm 5,6$	35,7 $\pm 9,2$
		(n=14)	(n=16)	(n=16)	(n=16)	(n=16)	(n=14)

a Pourcentage de cellules dans la suspension après adhérence

b Moyenne de n observations (\pm écart-type); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$

d'exposition (Figure 9). Les pentes de ces droites étant négatives, indiquent que les réponses sont inversement proportionnelles à l'intensité de CM. D'autre part, les deux populations, $CD4^+$ et $CD8^+$, diminuent dans une même proportion à l'intensité 2000 μT , aucune différence n'est donc observée dans le rapport $CD4:CD8$.

Le pourcentage de cellules Igs positives a aussi été évalué par immunofluorescence, et présente des diminutions aux intensités de 20 et 200 μT . Ces différences sont statistiquement significatives ($p < 0,05$) donnant des diminutions de 13% et 12% aux intensités 20 et 200 μT respectivement.

Après douze semaines d'exposition (Tableau VII), des réductions significatives de 14% ($p < 0,05$) sont observées dans le pourcentage de cellules positives pour le marqueur CD5 aux intensités de 2 et 2000 μT . Par contre, les pourcentages de lymphocytes T $CD4^+$ ainsi que les $CD8^+$ présentent des niveaux semblables à ceux des témoins gardés à l'animalerie. De plus, le pourcentage de cellules positives pour les Igs de surface ne démontrent aucune influence visible par les CM à cet âge.

En comparant les résultats obtenus après six semaines d'exposition à ceux de douze semaines, les pourcentages de cellules $CD5^+$, $CD4^+$ ou $CD8^+$ demeurent sensiblement au même niveau. Par contre, une très faible augmentation est notée dans le rapport $CD4:CD8$ à douze semaines ainsi qu'une hausse de 45% dans le pourcentage de cellules Ig^+ .

FIGURE 9. Corrélation entre les pourcentages de lymphocytes T spléniques CD4⁺ ou CD8⁺ et l'intensité de CM après six semaines d'exposition.

Des droites ont été tracées par régression linéaire avec les moyennes des pourcentages de lymphocytes T spléniques a) CD4⁺ ou b) CD8⁺ à chaque intensité de CM, après six semaines d'exposition. Chaque point correspond à la réponse en pourcentage de CD4⁺ ou CD8⁺ obtenue pour chaque animal testé. Les coefficients de corrélation linéaire des droites obtenues étaient de 0,71 pour chacune (CD4⁺: $p < 0,005$; CD8⁺: $p < 0,05$).

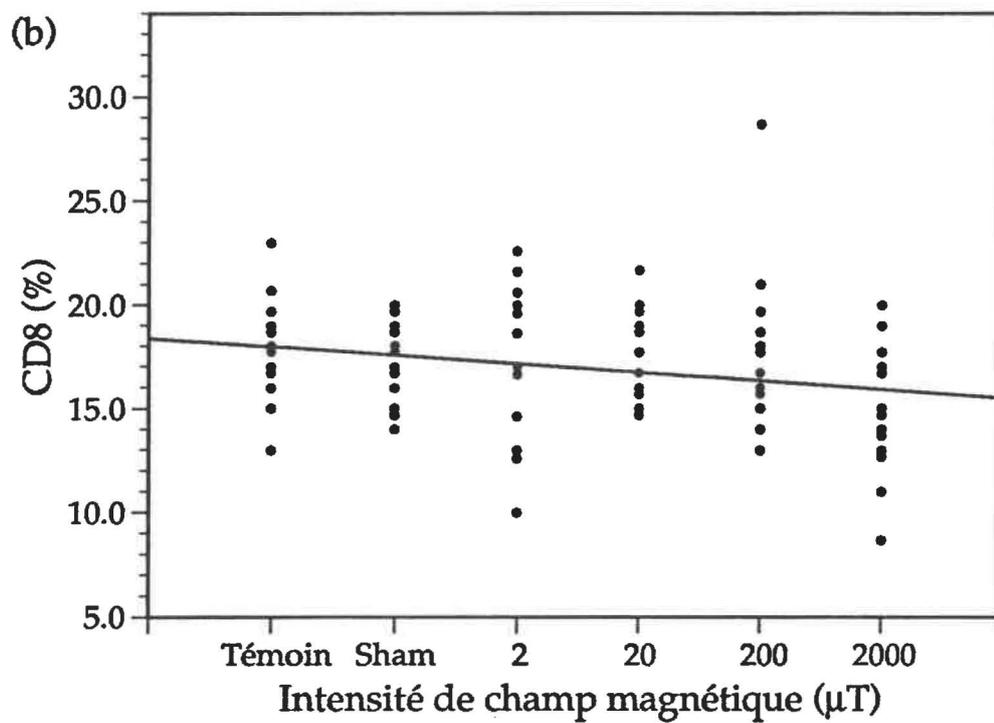
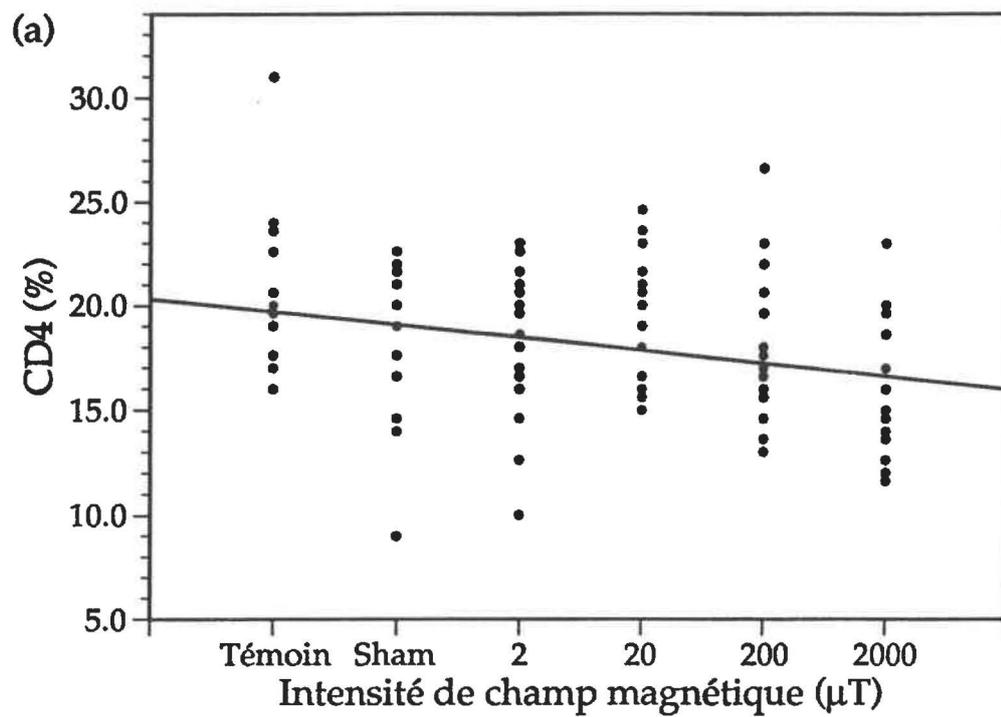


TABLEAU VII: Évaluation par immunofluorescence de divers marqueurs phénotypiques des cellules spléniques de rats Fisher 344/N exposés à différentes intensités de champs magnétiques pendant douze semaines.

Marqueurs		Intensité du champ magnétique (μ T)					
		Témoin	Sham	2	20	200	2000
CD 5 (cell. T)	% ^a	33,8 $\pm 6,7^b$	32,5 $\pm 5,1$	29,3 $\pm 5,4^*$	33,0 $\pm 4,9$	31,0 $\pm 5,6$	29,2 $\pm 5,0^*$
CD 4 (T aux.)	%	18,8 $\pm 2,9$	18,6 $\pm 1,9$	17,6 $\pm 2,2$	19,6 $\pm 3,0$	18,4 $\pm 2,2$	17,3 $\pm 2,0$
CD 8 (T cyt. et supp.)	%	16,7 $\pm 4,2$	16,7 $\pm 3,1$	15,6 $\pm 3,4$	17,5 $\pm 3,2$	16,4 $\pm 3,6$	14,9 $\pm 3,0$
rapport CD4 : CD8		1,28 $\pm 0,19$	1,25 $\pm 0,19$	1,27 $\pm 0,19$	1,18 $\pm 0,25$	1,19 $\pm 0,18$	1,32 $\pm 0,16$
		(n=18)	(n=16)	(n=17)	(n=16)	(n=16)	(n=16)
Igs surface (cell. B)	%	51,8 $\pm 7,9$	52,2 $\pm 5,8$	53,1 $\pm 5,1$	52,4 $\pm 4,9$	52,3 $\pm 5,8$	54,1 $\pm 7,9$
		(n=16)	(n=14)	(n=15)	(n=14)	(n=14)	(n=14)

a Pourcentage de cellules dans la suspension après adhérence

b Moyenne de n observations (\pm écart-type); * p < 0,05; ** p < 0,005

6. CELLULES SÉCRÉTRICES D'ANTICORPS

Cette expérience s'est effectuée sur un groupe différent d'animaux, après onze semaines d'exposition, puisqu'une inoculation i.p. de GRM était nécessaire. Le nombre d'animaux étant limité, nous n'avons pu tester que les groupes "sham" et 2000 μ T. Chez les animaux exposés à l'intensité 2000 μ T, le nombre de plages d'hémolyse formées (PFC) présente une élévation de 62% par rapport au "sham" (de 562 à 910 PFC/10⁶ cellules spléniques) (Tableau VIII). Cette différence est significative ($p < 0,05$).

TABLEAU VIII: Effet d'un champ magnétique de 2000 μ T sur la capacité des cellules B spléniques de rats Fisher 344/N à sécréter des anticorps.

Temps d'exposition	Intensité du champ magnétique (μ T)	
	Sham	2000
11 semaines	562 \pm 320 ^a	910 \pm 673*
	(n=21)	(n=22)

- a Moyenne de n observations (\pm écart-type); * : $p < 0,05$; les cellules produisant des Ac sont exprimées en nombre de plages d'hémolyse formées par 10^6 splénocytes.

DISCUSSION

1. EFFETS DES CHAMPS MAGNÉTIQUES SUR LES LYMPHOCYTES

L'activité des cellules NK et les pourcentages de cellules possédant les marqueurs de surface testés montrent des différences marquées mais non-significatives entre les réponses du groupe témoin (gardé à l'extérieur de la salle d'exposition) et celles du groupe "sham". Ces différences vont toujours dans le même sens de la tendance d'augmentation ou de diminution observée avec les intensités de CM selon le paramètre étudié. Ces divergences pourraient être dues au fait que les modules utilisés pour l'exposition "sham" étaient munis d'appareils de chauffage qui ajustaient la chaleur générée au même niveau que celle générée par le groupe de CM d'intensité 2000 μT . Les faibles hausses de température et de CM produites (0,2 μT) par ces modules pourraient expliquer les écarts observés entre les témoins et les expositions "sham". La sensibilité des réponses biologiques à des faibles changements de température lorsque des modèles expérimentaux ont été soumis à des CE ou CM, a précédemment été décrit par Blackman *et al.* (1991). Les résultats obtenus par ces chercheurs démontrent qu'en utilisant des températures appropriées en présence de CE ou CM, on pouvait augmenter ou diminuer le largage extracellulaire d'ions calciques induit par les CE ou les CM.

1.1 Activité des cellules NK

L'exposition à des CM d'intensité élevée (200 et 2000 μT) augmentent l'activité des cellules NK spléniques de 34% et de 50% respectivement chez les

animaux de six semaines. Les résultats préliminaires (9 semaines; 3 rats par groupe d'intensité), également significatifs à 2000 μ T, appuient ces observations. Les pourcentages de lyse exhibés par les cellules NK spléniques des animaux des groupes témoins étaient comparables à ceux observés par Reynolds et Holden (1982). L'augmentation de l'activité des cellules NK pourrait être due aux altérations causées par les CM sur (1) les mécanismes de reconnaissance ou de cytotoxicité cellulaire en modifiant des structures ou des composantes de la membrane plasmique externe; (2) la production de facteurs immunorégulateurs; ou (3) le nombre de cellules NK qui pourrait être affecté durant l'hématopoïèse. Des analyses d'immunofluorescence pour vérifier cette dernière possibilité sont en cours dans notre laboratoire.

Dans l'étude menée par McLean *et al.* (1991), les souris exposées aux CM de 2000 μ T en présence d'un agent chimique, promoteur de la carcinogénèse, exhibaient une suppression dans l'activité de leurs cellules NK pouvant contribuer à la croissance des tumeurs observées. Cependant, en présence de CM seulement, une augmentation non-significative de 21% dans l'activité des cellules NK spléniques a été notée. Ces résultats appuient nos observations aux mêmes intensités de CM. Cette amplification peut représenter une plus grande efficacité du système de surveillance non-spécifique. D'autre part, une activité des cellules NK anormalement élevée pourrait induire une réaction auto-immune provoquant de l'inflammation qui peut être néfaste pour la défense de l'organisme contre la présence de pathogènes ou de cellules tumorales (Arai *et al.*, 1989; Gergely, 1992).

1.2 Marqueurs phénotypiques

Les réponses des animaux témoins et "sham" pour les différents marqueurs de surface sont comparables avec les taux de marquage retrouvés dans la littérature pour les mêmes marqueurs sur les cellules spléniques de rats normaux (Barclay, 1981; Brideau *et al.*, 1980; Ebersole *et al.*, 1988). Nous considérons donc que les réponses des groupes témoin et "sham" sont normales.

Nous avons observé que les CM induisaient des changements au niveau des différentes populations cellulaires. Après six semaines d'exposition, des diminutions significatives ont été observées surtout chez les rats exposés à l'intensité de 2000 μT , au niveau des lymphocytes T CD4^+ , CD8^+ ainsi que les lymphocytes T CD5^+ , qui sont aussi diminués à douze semaines. Cette dernière population présente également des baisses significatives dans le groupe d'intensité 200 μT à six semaines et dans le groupe de 2 μT à douze semaines. Les lymphocytes B (Ig^+) ont aussi présenté des diminutions significatives à 20 et 200 μT après six semaines d'exposition.

Les régressions linéaires calculées pour les populations lymphocytaires CD4^+ ou CD8^+ démontrent qu'une relation dose-réponse négative existe entre les pourcentages de cellules marquées et l'intensité du CM à six semaines d'exposition. Nos résultats concernant la population CD4^+ corroborent les observations de Fotopoulos *et al.* (1987): une diminution dans le nombre de lymphocytes T auxiliaires chez des personnes volontaires soumis à des CM de TBF. Par contre, ils vont à l'encontre de l'augmentation de la population des lymphocytes T auxiliaires observée par Jankovic *et al.* (1991) qui avaient exposé

les cerveaux de rats adultes à des CM de 60 mT pendant 14, 24 ou 34 jours; le CM était statique, l'intensité était 30 fois plus élevée que l'intensité maximale utilisée dans notre protocole, les durées d'exposition étaient beaucoup plus courtes et les animaux exposés étaient d'âge adulte. Cette équipe a également rapporté une diminution dans la population des lymphocytes T cytotoxiques.

De façon hypothétique, les changements observés dans les réponses de ces analyses pourraient suggérer une modification des antigènes de la surface cellulaire. La structure phénotypique de la membrane plasmique extracellulaire serait ainsi modifiée par les CM. Des altérations de la surface cellulaire au niveau de l'expression de rIL-2 suite à des expositions *in vitro* aux CM ont déjà été rapportées par Bersani *et al.* (1988) et Cossarizza *et al.* 1989b. L'équipe de Liburdy *et al.* (1993) a aussi rapporté des modifications au niveau de la membrane plasmique lors d'une étude sur les effets des expositions *in vitro* à des CM de 22 mT sur le largage de protéines extracellulaires responsables de la transduction de signaux. Selon cette équipe, les CM n'agissent pas de la même façon sur les lymphocytes B que sur les lymphocytes T. L'absence de diminution des lymphocytes B (Ig⁺) que nous avons noté à 2000 μ T est aussi contraire à ce que nous observons pour les lymphocytes T, appuyant l'hypothèse de Liburdy *et al.* (1993).

Le nombre de lymphocytes B (Ig⁺) semble être diminué aux intensités de 20 et 200 μ T sans être aucunement influencé à 2000 μ T. Une relation dose-réponse ne peut donc être appliquée. D'autre part, selon Wei *et al.* (1990) et Litovitz *et al.* (1990), il existe des situations expérimentales où des CM sinusoïdaux de 60 et 72 Hz avec des intensités de 0,8 à 800 μ T, induisent un "effet fenêtre" (réponse biologique qui se produit seulement dans des

intensités/fréquences précises; à l'extérieur de ces conditions, la réponse biologique est modérée ou absente). De même, McLauchlan (1992) propose un rôle pour les radicaux libres hautement réactifs soumis aux CM de TBF dans la production de "fenêtres" d'intensités. Le nombre de lymphocytes B (Ig^+) pourrait en fait être affecté par ce type d'interaction aux intensités de 20 et 200 μT .

1.3 Hypothèses sur l'effet des CM sur les lymphocytes T et cellules NK

Des études récentes menées par Lanier *et al.* (1992a, 1992b) appuient l'hypothèse que les cellules NK et les lymphocytes T partagent des voies communes de développement. Bien que le réarrangement du gène du récepteur des cellules T (TCR) amène une très nette distinction entre ces deux types cellulaires, les lymphocytes T et les cellules NK sont assez similaires au niveau de l'expression d'autres récepteurs membranaires ainsi que dans leurs fonctions effectrices. De plus, selon le même groupe, les cellules NK immunocompétentes se développent avant les lymphocytes T pendant l'ontogénie foetale. Nous pouvons tenter un rapprochement entre ces résultats et les nôtres: (1) l'activité des cellules NK est augmentée par les CM de 2000 μT tandis que le nombre de lymphocytes T totaux est diminué à cette même intensité; et (2) les niveaux de ces paramètres reviennent au niveau de base à douze semaines d'exposition, âge où les rats sont considérés des jeunes adultes. Les CM pourraient moduler l'hématopoïèse, favorisant l'immunité protectrice non-spécifique avant le développement complet des lymphocytes T. De plus, Gorczynska (1987) avait suggéré que les CM affectaient la myélopoïèse puisqu'une baisse du nombre de globules rouges et de mégacaryocytes ainsi qu'une hausse du nombre de granulocytes et de lymphocytes périphériques

sanguins ont été observées lors de l'exposition de cobayes à des CM de 5 et 300 mT. Les hypothèses de Gorczynska (1987) et Lanier *et al.* (1992a, 1992b) peuvent s'appliquer à nos observations; une influence des CM sur l'hématopoïèse pourrait donc favoriser le développement des cellules NK au dépend des lymphocytes T.

D'autres possibilités peuvent être suggérées pour tenter d'expliquer les réponses contraires des cellules NK et des lymphocytes T: les CM agissent directement (de façon opposée) sur les cellules NK et les lymphocytes T; les CM stimulent ou inhibent la production d'un facteur immunomodulateur produisant des effets contraires sur ces populations; ou l'augmentation de l'activité des cellules NK résulte d'une baisse du nombre de lymphocytes T induite par les CM ou vice-versa.

1.4 Cellules sécrétrices d'anticorps

Une différence de 62% est observée dans la production de cellules sécrétrices d'Ac entre l'intensité de 2000 μ T et le groupe "sham" après onze semaines d'exposition. Puisqu'il n'y a pas de témoin non exposé, ce résultat peut être considéré de deux perspectives: l'intensité 2000 μ T présente une augmentation par rapport au groupe "sham"; ou le groupe "sham" démontre une suppression par rapport à l'intensité 2000 μ T. La réponse normale en production de cellules sécrétrices d'Ac chez le rat par la technique utilisée peut varier, de 1000 à 3000 par 10^6 cellules spléniques (Jankovic *et al.*, 1991). Ainsi, comme dans la population de lymphocytes B (Ig^+), les réponses obtenues à l'intensité 2000 μ T se rapprocheraient plus au groupe témoin externe que le groupe "sham".

Dû à l'absence de témoin non exposé, il est difficile d'interpréter ces résultats. De même, nous ne pouvons comparer ces résultats avec ceux de Jankovic *et al.* (1991), qui, suite à une exposition des cerveaux de rats à des CM de 60 mT, présentaient une augmentation dans la production de cellules sécrétrices d'Ac, ainsi que ceux de McCoy et Hefeneider (1993), qui avaient exposé des moutons Ewe à des CM de 3,77 μ T, et ont observé aucun changement. Les travaux de Jankovic *et al.* suggèrent une interaction entre les CM, le système nerveux central (SNC) et le système immunitaire. Ils ont donc proposé que les CM moduleraient le système immunitaire indirectement par le biais du SNC, et ceci au niveau de l'hypothalamus, l'hypophyse ou la glande pinéale. En effet, ces glandes sécrètent des hormones et des neurotransmetteurs qui modulent la réponse immunitaire suivant une liaison spécifique à leur récepteur respectif.

2. EFFETS DES CHAMPS MAGNÉTIQUES SUR LES CELLULES PÉRITONÉALES

Parmi les trois réponses étudiées avec les cellules péritonéales, seule la production de H_2O_2 par la population mineure semble être influencée par les CM. La régression linéaire qui représente une relation dose-réponse, suggère que l'exposition pendant six semaines des rats aux intensités variant de 2 à 2000 μ T a augmenté la production de H_2O_2 , plus particulièrement à 20 et 2000 μ T.

En absence et en présence de LPS, les cellules péritonéales des animaux exposés pendant six et douze semaines ne présentent aucune variation

significative dans les productions de TNF et de NO_2^- entre les intensités de 2, 20, 200, 2000 μT et le témoin ou le "sham".

Récemment, Cossarizza *et al.* (1993) ont démontré un effet des CM de 2500 μT , en absence ou en présence de PHA ou de PMA, sur la production *in vitro* de l'IL-1 β et de l'IL-6 par des monocytes humains. Contrairement à cette observation, McCoy et Hefeneider (1993) ont rapporté des diminutions dans l'activité IL-1 de leucocytes stimulés par le LPS, provenant d'animaux exposés à des CM de 3,77 μT . Les niveaux d'IL-1 et d'IL-6 reflètent le niveau d'activation des monocytes et des macrophages par le LPS ainsi que les niveaux de production d'autres facteurs solubles tels que le TNF et le NO_2^- , qui sont stimulés par l'activation du facteur de transcription NF κ B, protéine kinase A-dépendant (Muroi et Suzuki, 1993). En effet, les résultats obtenus pour la sécrétion de NO_2^- confirment en quelque sorte ceux du TNF- α : les CM ne semblent pas affecter l'activation des cellules péritonéales ni leur capacité de produire du NO_2^- et du TNF- α après six et douze semaines d'exposition. D'autre part, la production de H_2O_2 est un indicateur de la flambée oxidative, qui est induite par le PMA. Cet agent active aussi une voie impliquant le facteur de transcription NF κ B, mais celle-ci est dépendante de la protéine kinase C (Ghosh et Baltimore, 1990). Les réponses démontrées par la population mineure après six semaines d'exposition vont dans le même sens que ceux rapportés par Cossarizza *et al.* (1993). Par contre, nos données de TNF et de NO_2^- obtenues en présence de LPS divergent des résultats de McCoy et Hefeneider. Il faut cependant souligner que les conditions expérimentales étaient différentes. L'intensité des CM, le type d'exposition (*in vitro* versus *in vivo*), le type de test utilisé (ELISA versus test fonctionnel), le temps de stimulation avec le LPS,

l'agent stimulateur, la PHA ou le PMA, ainsi que la quantité de ces stimulants peuvent être des causes de divergence.

De plus, des concentrations optimales de LPS et de PMA ont été utilisées pour activer les cellules péritonéales; la modulation par les différentes intensités de CM, si elle existe, pourrait ainsi être masquée. Par ailleurs, il est plus probable de retrouver des concentrations sub-optimales de mitogènes *in vivo*.

3. EFFETS SUR L'ONTOGÉNIE

Le temps de gestation (21-23 jours), la mortalité ainsi que le poids moyen des animaux, n'ont pas été influencés par la présence de CM. Ces données ont aussi été confirmées par les équipes de Rommereim et Anderson (1989) et Zusman *et al.* (1990), qui n'ont observé aucun effet à ces niveaux, chez des rats en gestation soumis à des CM de 50 ou 60 Hz.

Lorsqu'on compare les rats de six et douze semaines, des différences dues à l'âge des animaux (six versus douze semaines) ont été relevées (1) dans la sécrétion basale de H_2O_2 par la population majeure des cellules péritonéales; (2) dans les productions basale et stimulée par le PMA de H_2O_2 par la population mineure; (3) dans la sécrétion de $TNF-\alpha$ en présence de LPS par les cellules péritonéales; (4) dans les niveaux de production basale et stimulée de NO_2^- par les cellules péritonéales; et (5) dans le pourcentage de cellules Ig^+ identifiant les lymphocytes B. Les faibles pourcentages de lymphocytes B (Ig^+) spléniques notés à six semaines confirment l'immaturation immunologique des rats à cet âge (Ebersole *et al.*, 1984). Les résultats rapportés sur la distribution des lymphocytes T selon l'âge des animaux suggèrent des différences négligeables,

semblables à celles que nous avons notées, dans le nombre total de lymphocytes T entre six et douze semaines d'âge (Gilman *et al.*, 1981; Kay *et al.*, 1979). Quant à l'activité des cellules NK, Reynolds et Holden (1982) ont rapporté eux aussi une faible baisse dans la cytotoxicité des cellules NK avec l'âge (entre 8 à 20 semaines) chez les rats Fischer 344.

4. EFFETS DES CHAMPS MAGNÉTIQUES SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

D'après les résultats observés, les variations les plus importantes dans les réponses immunitaires sont notées aux intensités les plus élevées, soient de 200 et 2000 μT (Tableau IX). Des intensités de cet ordre de grandeur se rencontrent en milieu industriel ou en grande proximité d'appareillage électrique en fonction. Toutefois, le système immunitaire ne semble pas être modifié de façon importante aux intensités de 2 et 20 μT . De plus, les variations ont été observées en majeure partie à six semaines d'exposition, la plupart revenant au niveau du témoin à douze semaines, lorsque la maturité immunologique est atteinte. À six semaines, l'activité des cellules NK spléniques et la production de H_2O_2 par la population mineure des cellules péritonéales présentent une modulation positive par les CM. Une modulation de ce type peut améliorer la performance des cellules effectrices d'une part. D'autre part, des augmentations excessives peuvent devenir néfastes pour le système immunitaire dans sa lutte anti-microbienne ou anti-tumorale s'il se développe une hypersensibilité, une allergie, une réaction auto-immune ou de l'inflammation. Par contre, d'après Luster *et al.* (1992, 1993), la signification clinique des diminutions observées de cette grandeur n'est pas encore bien établie. Il faudrait évaluer dans quelle mesure les diminutions des populations des lymphocytes T CD4^+ , CD8^+ , et des lymphocytes B peuvent affecter

TABLEAU IX: Variations significatives ($p < 0,05$) des champs magnétiques sur les réponses immunitaires.

Paramètres étudiés	Intensité du champ magnétique (μT)				
	Sham	2	20	200	2000
Activité NK ^a	-	-	-	-	+ 50% ^b
CD5 ⁺ (6 sem.)	-	-	-	- 13 % ^b	- 25 % ^b
CD5 ⁺ (12 sem.)	-	- 14% ^b	-	-	- 14% ^b
CD4 ⁺ (T aux.)	-	-	-	-	- 23 % ^b
CD8 ⁺ (Tcyt. et supp.)	-	-	-	-	- 17 % ^b
Ig ⁺ (cell. B)	-	-	- 13% ^b	- 12% ^b	-
PFC (11 sem.)		ND ^c	ND	ND	+ 62 % ^d
Production de H ₂ O ₂ (Pop. II)	-	-	+ 6% ^b	-	+ 9% ^b

a Paramètre évalué à six semaines d'exposition, à moins d'indication contraire.

b Variation significative par rapport au témoin gardé à l'extérieur de la salle d'exposition.

c Non-déterminé

d Variation significative par rapport au "sham"; évalué à 11 semaines seulement.

l'immunité cellulaire et si les augmentations observées au niveau des autres paramètres peuvent compenser pour ce manque. L'augmentation des effecteurs immunitaires non-spécifiques représente possiblement une réponse de compensation ou d'adaptation de l'organisme à l'effet dépressif des CM sur les lymphocytes T et B.

Le mécanisme d'interaction entre les CM et les cellules n'est toujours pas élucidé, mais le retour général des réponses au niveau des témoins extérieur et sham à l'âge de douze semaines, suggère une certaine adaptation aux conditions d'exposition. Cette possibilité a aussi été abordée par Goodman *et al.* (1992) qui tentaient de définir le temps et la durée de l'effet observé suivant une exposition aux CM. De plus, Cook *et al.* (1992) ont rapporté des résultats qui suggèrent que des variations dans les niveaux d'exposition seraient bien plus importants que la durée de l'exposition dans la production d'effet par les CM chez les organismes vivants. Cette propriété de réaction puis d'adaptation caractérise aussi les effets de "stress". Plusieurs auteurs reconnaissent les CM comme étant un stresser biologique non-spécifique détecté par le SNC et qui pourrait être un facteur de risque pour une multitude de maladies, selon la susceptibilité de l'hôte, la réponse aux stressers ou la prédisposition génétique individuelle de l'organisme exposé (Barnothy et Sumegi, 1969; Fotopoulos *et al.*, 1987; Szmigielski, 1993; Villa *et al.*, 1991). Par ailleurs, des études antérieures indiquent que les "stressers" environnementaux peuvent abaisser autant qu'augmenter la réponse immunitaire (Monjan et Collector, 1977).

Cette étude sera réalisée de nouveau dans notre laboratoire, en ajoutant des temps d'exposition plus longs pour vérifier l'effet de la durée de l'exposition sur les paramètres immunitaires. Des périodes de récupération, sans exposition pendant quelques mois, seront aussi ajoutés au protocole expérimental afin de vérifier la réversibilité de l'effet. De plus, d'autres techniques seront mises au point pour tenter de mieux définir les populations des cellules péritonéales et de diminuer les écarts-type dans certaines analyses. Des analyses *in vitro* seront aussi effectuées pour essayer d'identifier le mécanisme d'interaction entre les CM et les cellules du système immunitaire.

CONCLUSION

Le but de ce travail consistait à évaluer l'influence des champs magnétiques de 60 Hz sur la réponse des cellules du système immunitaire. Pour ce faire, nous avons soumis, dès le vingtième jour de gestation (de 21 à 23 jours), des rats à des CM de différentes intensités, soient de 2, 20, 200 et 2000 μT , pendant six ou douze semaines.

Les CM semblent affecter les réponses lymphocytaires surtout en bas âge, après six semaines d'exposition, et surtout lors de l'exposition à des CM de 2000 μT . Nous avons observé une augmentation de l'activité des cellules NK spléniques à six semaines d'exposition aux CM de 2000 μT . Nous avons également observé une diminution des populations de lymphocytes T CD4^+ , CD8^+ , CD5^+ et de lymphocytes B (Ig^+) surtout par l'exposition aux CM de 2000 μT après six semaines. Les populations CD4^+ et CD8^+ démontrent même des relations dose-réponse en présence de CM d'intensité variante. Les paramètres testés à douze semaines ont tous retrouvé leurs niveaux normaux sauf pour la population CD5^+ qui présente des niveaux encore abaissés.

Sauf pour la production de H_2O_2 par la population mineure des cellules péritonéales qui a été potentialisée par les CM et ce, de manière dose-dépendante, les CM ont eu peu d'effet sur les productions de $\text{TNF-}\alpha$, de NO_2^- et de H_2O_2 par les cellules péritonéales.

Nous avons donc démontré que des CM de 2000 μT , intensité retrouvée en milieu industriel ou en grande proximité d'appareillage électrique en

fonction, peuvent moduler de façon positive l'immunité naturelle au niveau des cellules NK et, de façon négative l'immunité cellulaire, au niveau des populations lymphocytaires T et B. Par contre, les cellules péritonéales ne semblent pas être influencées par une exposition aux CM.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de mémoire, le docteur Rosemonde Mandeville. Je suis profondément reconnaissante pour son intérêt, sa compréhension et son support tout au long de ce travail.

J'aimerais exprimer toute ma gratitude au Dr Michel Houde et à Ginette Mercier, pour leur aide considérable dans la réalisation de ce travail ainsi que leurs précieux conseils. Il me fait également plaisir de remercier le docteur Michel Fournier pour ses conseils indispensables dans l'orientation du projet.

Je voudrais aussi remercier Marcel Desrosiers, Marie Désy, Normand Rocheleau, Salwa Sidrac-Ghali, Fawsia Ben-Amor et Denise Clément qui, chacun à leur façon, m'ont apporté une aide précieuse. Leur compétence et leur sourire furent toujours grandement appréciés.

J'aimerais exprimer ma reconnaissance au FCAR qui fut, il va sans dire, d'une aide considérable, ainsi qu'à B.C. Hydro (représenté par Kelly Gibney) et Hydro-Québec (représenté par Daniel Goulet) qui nous ont accordé les subventions pour ce projet.

En terminant, j'aimerais remercier Daniel pour son amour, sa patience, son encouragement, ses conseils, son aide technique et surtout pour son appui moral.

BIBLIOGRAPHIE

- ADEY, W. R. 1988. Cell membranes: the electromagnetic environment and cancer promotion. *Neurochem. Res.* 13: 671-677.
- ADEY, W. R. 1990. Joint actions of environmental nonionizing electromagnetic fields and chemical pollution in cancer promotion. *Environ. Health Persp.* 86: 297-305.
- ALGIRE, G. H., J. M. WEAVER et R. T. PREHN. 1954. Growth of cells *in vivo* in diffusion chambers. I. Survival of homografts in immunized mice. *J. Natl Cancer Inst.* 15: 493-507.
- AM. INST. BIO. SCI. 1985. Biological and human health effects of extremely low frequency electromagnetic fields. Arlington, VA: Am. Inst. Biol. Sci.
- ANICHINI, A., G. FOSSATI et G. PARMIANI. 1987. Clonal analysis of the cytolytic T cell response to human tumors. *Immunol. Today* 8: 385-389.
- ARAI, S., T. KASHO, Y. TOMITA, T. MUNAKATA, H. INOUE et 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.
- BARCLAY, A. N. 1981. The localization of populations of lymphocytes defined by monoclonal antibodies in rat lymphoid tissues. *Immunology* 42: 593-600.
- BARLOZZARI, T., C. W. REYNOLDS et R. B. HERBERMAN. 1983. *In vivo* role of natural killer cells: involvement of large granular lymphocytes in the clearance of tumor cells in anti-asialo GM1-treated rats. *J. Immunol.* 131: 1024-1027..
- BARNOTHY, J. M., M. F. BARNOTHY et I. BOSZORMENYI-NAGY. 1956. Influence of a magnetic field upon the leucocytes of the mouse. *Nature* 177: 577-578.
- BARNOTHY, M. F. et I. SUMEGLI. 1969. Abnormalities in organs of mice induced by a magnetic field. *Nature.* 221: 270-271.
- BASS, D. A., J. W. PARCE, L. R. DECHATELET, P. SZEJDA, M. C. SEEDS et M. THOMAS. 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by

- neutrophils: A graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* 130: 1910-1917.
- BERSANI, F., C. FRANCHESCHI, D. MONTI, A. BOLOGNI, C. GATTI, R. CADOSSO, M. NICHELATTI, G. MOSCHINI, A. COSSARIZZA. 1988. The effects of extremely low frequency pulsed electromagnetic fields (ELF) on human lymphocyte proliferation *in vitro* and DNA repair. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society 10th Annual International Conference: 906-908.
- BEUTLER, B. et A. CERAMI. 1986. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 320: 584-588.
- BLACKMAN, C. F. et S. G. BENANE. 1989. "Influence of magnetic fields on gap junction intracellular communication: Report of a pilot study", dans Annual DOE/EPRI Revue of Research on Biological Effects of 50/60-Hz Electric and Magnetic Fields, Palo Alto.
- BLACKMAN, C. F., S. G. BENANE et D. E. HOUSE. 1991. The influence of temperature during electric- and magnetic-field induced alteration of calcium-ion release from *in vitro* brain tissue. *Bioelectromag.* 12: 173-182.
- BORIDY, E. 1992. "Les phénomènes d'induction électromagnétiques quasi stationnaires", dans *Electromagnétisme, théorie et applications*. Sillery, Qc. Presses de l'Université du Québec. 497-582.
- BRIDEAU, R. J., P. B. CARTER, W. R. McMASTER, D. W. MASON et A. F. WILLIAMS. 1980. Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 10: 609-615.
- BROWN, J. P., J. M. KLITZMAN, I. HELLSTRÖM, R. C. NOWINSKI et K. E. HELLSTRÖM. 1978. Antibody response of mice to chemically induced tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 955-958.
- BUCHMEIER, N. A. et R. D. SCHREIBER. 1985. Requirement of endogenous interferon γ production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7404-7413.
- BYUS, C. V., S. E. PIEPER et W. R. ADEY. 1987. The effects of low-energy 60-Hz environmental electromagnetic fields upon the growth-related enzyme ornithine decarboxylase. *Carcinogenesis* 8: 1385-1389.
- CADOSSI, R., G. B. CECCHERELLI, G. EMILIA, G. TORELLI, P. RUGGIERI, F. BERSANI, A. COSSARIZZA et C. FRANCESCHI. 1988. The effects of low frequency pulsing electromagnetic fields on the response of human lymphocytes to lectins. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 19: 315-322.

- CADOSSI, R., G. EMILIA, G. TORELLI, G. CECCHERELLI, S. FERRARI et P. RUGGIERI. 1985. The effect of low-frequency pulsing electromagnetic fields on the response of human normal lymphocytes to phytohaemagglutinin (PHA). *Bioelectrochem. and Bioenerg.* 14: 115-119.
- CADOSSI, R., P. ZUCCHINI, G. EMILIA, C. FRANCESCHI, A. COSSARIZZA, M. SANTANTONIO, G. MANDOLINI et G. TORELLI. 1991. Effect of low frequency low energy pulsing electromagnetic fields on mice injected with cyclophosphamide. *Exp. Hematol.* 19: 196-201.
- CANTINI, M., A. COSSARIZZA, F. BERSANI, R. CADOSSI, G. CECCHERELLI, R. TENCONI, C. GATTI et C. FRANCESCHI. 1986. Enhancing effect of low frequency pulsed electromagnetic fields on lectin-induced human lymphocyte proliferaton. *J. Bioelectricity* 5: 91-104.
- CAOLA, R. J., D. W. DENO et V. S. W. DYMEK. 1983. Measurements of electric and magnetic fields in and around homes near a 500 kV transmission line. *IEEE Trans. Power Appl. Sys.* PAS-102: 3338-3347.
- CARSWELL, E. A., L. J. OLD, R. L. KASSEL, S. GREEN, N. FIORE et B. WILLIAMSON. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumours. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3666-3670.
- CHIABERRA, A. et B. BIANCO. 1987. "The role of magnetic fields in the EM interaction with ligand binding" dans Chiaberra, A. (ed.): *Mechanistic approaches to interaction of electric and magnetic fields with living systems.* New York. Plenum. 79-95.
- COHEN, M. M., A. KUNSKA, J. A. ASTEMBORSKI et D. McCULLOCH. 1986a. 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. M., A. KUNSKA, J. A. ASTEMBORSKI, D. McCULLOCH et D. A. PASKEWITZ. 1986b. Effect of low-level, 60-Hz electromagnetic fields on human lymphoid cells: I. Mitotic rate and chromosome breakage in human peripheral lymphocytes. *Bioelectromag.* 7: 415-423.
- COLEMAN, M. P., C. M. J. BELL, H. L. TAYLOR et M. PRIMIC-ZAKELJ. 1989. Leukaemia and residence near electricity transmission equipment: a case-control study. *Br. J. Cancer* 60: 793-798.
- CONTI, P., G. E. GIGANTE, E. ALESSE, M. G. CIFONE, C. FIESCHI, M. REALE et P. U. ANGELETTI. 1985a. A role for Ca²⁺ in the effect of very low frequency

- electromagnetic fields on the blastogenesis of human lymphocytes. *FEBS Lett.* 181: 28-32.
- CONTI, P., G. E. GIGANTE, M. G. CIFONE, E. ALESSE, C. FIESCHI et P. U. ANGELETTI. 1985b. Effect of electromagnetic fields on two calcium dependant biological systems. *J. Bioelectricity* 4: 227-236.
- CONTI, P., G. E. GIGANTE, M. G. CIFONE, E. ALESSE, C. FIESCHI, M. BOLOGNA et P. U. ANGELETTI. 1986. Mitogen dose-dependant effect of weak pulsed electromagnetic fields on lymphocyte blastogenesis. *FEBS Lett.* 199: 130-134.
- CONTI, P., G. E. GIGANTE, M. G. CIFONE, E. ALESSE, G. IANNI, M. REALE et P. U. ANGELETTI. 1983. Reduced mitogenic stimulation of human lymphocytes by extremely low frequency electromagnetic fields. *FEBS Letters* 162:156-160.
- COOK, M. R., C. GRAHAM, H.D. COHEN et M. M. GERKOVICH. 1992. A replication study of human exposure to 60-Hz fields: Effects on neurobehavioral measures. *Bioelectromag.* 13: 261-285.
- COSSARIZZA, A., D. MONTI, F. BERSANI, M. CANTINI, R. CADOSSO, A. SACCHI et C. FRANCESCHI. 1989a. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase cell proliferation in lymphocytes from young and aged subjects. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160: 692-698.
- COSSARIZZA, A., D. MONTI, F. BERSANI, R. PAGANELLI, G. MONTAGNANI, R. CADOSSO, M. CANTINI et C. FRANCESCHI. 1989b. 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., D. MONTI, P. SOLA, G. MOSCHINI, R. CADOSSO, F. BERSANI et C. FRANCESCHI. 1989c. DNA repair after γ irradiation in lymphocytes exposed to low-frequency pulsed electromagnetic fields. *Radiation Res.* 118: 161-168.
- COSSARIZZA, A., S. ANGIONI, F. PETRAGLIA, A. R. GENAZZANI, D. MONTI, M. CAPRI, F. BERSANI, R. CADOSSO et C. FRANCESCHI. 1993. Exposure to low frequency pulsed electromagnetic field increases interleukin-1 and interleukin-6 production by human peripheral blood mononuclear cells. *Exp. Cell Res.* 204: 385-387.
- CRAWFORD, R. M., D. S. FINBLOOM, J. OHARA, W. E. PAUL et M. S. MELTZER. 1987. B-cell stimulatory factor-1 (interleukin-4) activates

- macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens. *J. Immunol.* 139: 135-141.
- CUNNINGHAM, A. J. et A. SZENBERG. 1968. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology* 14: 599-601.
- DAVIES, A. J. S., H. FESTENSTEIN, E. LEUCHARS, V. WALLIS et M. DOENHOFF. 1968. A thymic origin for some peripheral blood lymphocytes. *Lancet* 1: 183-184.
- DEMERS, P. A., D. B. THOMAS, K. A. ROSENBLATT, L. M. JIMINEZ, A. McTIERNAN, H. STALSBERG, A. STEMHAGEN, W. D. THOMPSON, M. CURNEN, A. SATARIANO, D. F. AUSTIN, P. ISACSON, R. S. GREENBERG, C. KEY, L. KOLONEL et D. WEST. 1990. Occupational exposure to electromagnetic radiation and breast cancer in males. *Am. J. Epidemiol.* 132: 775-776.
- EBERSOLE, J. L., D. J. SMITH, M. A. TAUBMAN et M. STEFFEN. 1984. Secretory Ig levels in aged rats. *Fed. Proc.* 43: 1913.
- EBERSOLE, J. L., M. J. STEFFEN et J. PAPPO. 1988. Secretory immune responses in ageing rats. II. Phenotype distribution of lymphocytes in secretory and lymphoid tissues. *Immunol.* 64: 289-294.
- EMILIA, G., G. TORELLI, G. CECCHERELLI, A. DONELLI, S. FERRARI, P. ZUCCHINI et R. CADOSSO. 1985. Effect of low-frequency low-energy pulsing electromagnetic fields on the response to lectin stimulation of human normal and chronic lymphocytic leukemia lymphocytes. *J. Bioelectricity* 4: 145-161.
- ESPARZA, I., D. MÄNNEL, A. RUPPEL, W. FALK et P.H. KRAMMER. 1987. Interferon- γ and lymphotoxin or tumor necrosis factor act synergistically to induce macrophage killing of tumor cells and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 166: 589-594.
- FAM, W. Z. 1981. Biological effects of 60-Hz magnetic field on mice. *IEEE Transactions on Magnetism* 17:1510-1513.
- FEYCHTING, M. et A. AHLBOM. 1992. Cancer and magnetic fields in persons living close to high voltage power lines in Sweden. *Lakartidningen* 89: 4371-4374.
- FISCH, H. et G. E. GIFFORD. 1983. *In vitro* production of rabbit macrophage tumour cell cytotoxin. *Int. J. Cancer* 32: 105-112.

- FLODERUS, B., T. PERSSON et C. STENLUND. 1992. Increased risk of leukemias and brain tumours in occupational exposure to magnetic fields. *Lakartidningen*. 89: 4363-4366.
- FLODIN, U., M. FREDRIKSSON, O. AXELSON, B. PERSSON et L. HARDELL. 1986. Background radiation, electrical work, and some other exposures associated with acute myeloid leukemia in a case-referent study. *Arch. Environ. Health*. 41: 77-84.
- FOTOPOULOS, S. S., M. R. COOK, M. M. GERKOVICH, E. KOONTZ, C. GRAHAM et H. D. COHEN. 1987. "60-Hz field effects on human neuroregulatory, immunologic, hematologic and target organ activity" dans Anderson, L. E., B. J. Kelman et R. J. Weigel (eds.): *Interaction of biological systems with static and ELF electric and magnetic fields*. 455-469.
- FRAZIER, M. E., J. A. REESE, J. E. MORRIS, R. F. JOSTES et D. L. MILLER. 1990. Exposure of mammalian cells to 60-Hz magnetic or electric fields: Analysis of DNA repair of induced, single strand breaks. *Bioelectromag.* 11: 229-234.
- GERGELY, P. 1992. The pathogenesis of autoimmune disease. *Immunol. Today* 13: A21-23.
- GHOSH, S. et D. BALTIMORE. 1990. Activation *in vitro* of NF- κ by phosphorylation of its inhibitor I κ B. *Nature* 344: 678-682.
- GIFFORD, G. E. et M. L. LOHMANN-MATTHEWS. 1987. Gamma interferon priming of mouse and human macrophages for induction of tumour necrosis factor production by bacterial lipopolysaccharide. *J. Natl. Cancer Inst.* 78: 121-124.
- GILMAN, P. A., R. G. AMES et M. A. McCAWLEY. 1985. Leukemia risk among U.S. white male coal miners: A case-control study. *J. Occup. Med.* 27: 669-671.
- GILMAN, S. C., B. A. WODA et J. D. FELDMAN. 1981. T lymphocytes of young and aged rats. I. Distribution, density and capping of T antigens. *J. Immunol.* 127: 149-153.
- GOODMAN, G. E., I. HELLSTRÖM, L. BRODZINSKY, C. NICAISE, B. KULANDER, D. HUMMEL et K. E. HELLSTRÖM. 1990. Phase I trial of murine monoclonal antibody L6 in breast, colon, ovarian and lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 8: 1083-1092.
- GOODMAN, R., L. X. WEI, J. C. XU et A. HENDERSON. 1989. Exposure of human cells to low-frequency electromagnetic fields results in quantitative changes in transcripts. *Biochim. Biophys. Acta* 1009: 216-220.

- GORCZYNSKA, E. 1987. The process of myelopoiesis in guinea pigs under conditions of a static magnetic field. *Acta Physiol. Pol.* 38: 425-432.
- GORCZYNSKA, E. et R. WEGRZYNOWICZ. 1991. Glucose homeostasis in rats exposed to magnetic fields. *Invest. Radiol.* 26: 1095-1100.
- GORELIK, E., R. H. WILTROUT, K. OKUMURA, S. HABU et R. B. HERBERMAN. 1982. Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int. J. Cancer* 30: 107-312.
- GRABSTEIN, K. H., D. L. URDAL, R. J. TUSHINSHI, D. Y. MOCHIZUKI, V. L. PRICE, M. A. CANTRELL, S. GILLIS et P. J. CONLON. 1986. Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Science* 232: 506-508.
- GRANDOLFO, M. et P. VECCHIA. 1985. "Natural and man-made environmental exposures to static and ELF electromagnetic fields", dans Grandolfo, M., S. M. Michaelson et A. Rindi (ed.): *Biological effects and dosimetry of static and ELF electromagnetic fields*. New York. Plenum. 49-70.
- GRATTAROLA, M., A. CHIABRERA, G. BONANNO, R. VIVIANI et A. RAVEANE. 1985. "Electromagnetic field effects on phytohemagglutinin (PHA) induced lymphocyte reactivation", dans Chiabrera, A., C. Nicolini et H. Pschwan (ed.): *Interactions between electromagnetic fields and cells*. New York. Plenum. 401-421.
- GREEN, L. C., D. A. WAGNER, J. GLOGOWSKI, P. L. SKIPPER, J. S. WISHNOK et S. R. TANNENBAUM. 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138.
- HANNA, N. 1982. Role of natural killer cells in control of cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 1: 45-64.
- HARVEY, S. M. 1988. Evaluation of residential magnetic field sources. Ontario Hydro Research Report No. E88-17-K.
- HELSON, L., S. GREEN, E. A. CARSWELL et L. J. OLD. 1975. Effect of tumour necrosis factor on cultured melanoma cells. *Nature* 258: 731-732.
- HERBERMAN, R. B. 1986. Natural killer cells in lungs and other tissues and regulation of their activity by suppressor cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 78: 566-570.
- HEWLETT, G., K. G. STUNKEL, et H. D. SCHLUMBERGER. 1989. A method for the quantitation of interleukin-2 activity. *J. Immunol. Methods* 117: 243-246.

- HIBBS, J. B. Jr, R. R. TAINTOR, Z. VAVRIN et E. M. RACHLIN. 1988. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 87-94.
- HIBBS, J. B. Jr, Z. VAVRIN et R. R. TAINTOR. 1987. L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.* 138: 550-565.
- HOUGHTON, A. N., D. MINTZER, C. CORDON-CARDO, S. WELT, B. FLIEGEL, S. VADHAN, E. CARSWELL, M. R. MELAMED, H. F. OETTGEN et L. J. OLD. 1985. Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD₃ ganglioside: A phase I trial in patients with malignant melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1242-1246.
- HOWARD, M. C., A. MIYAJIMA et 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. et 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. et A. MANTOVANI. 1983. Natural killer cells in human solid tumors. *Cancer Metastasis Rev.* 2: 337-350.
- JANKOVIC, B. D., D. MARIC, J. RANIN et J. VELJIC. 1991. Magnetic fields, brain and immunity: effect on humoral and cell-mediated immune responses. *Intern. J. Neurosci.* 59: 25-43.
- JOHNSTON, J. et D. B. WILSON. 1970. Origin of immunoreactive lymphotoxin in rats. *Cell Immunol.* 1: 430-444.
- JONDAL, M. 1987. The human NK cell: A short overview and a hypothesis on NK recognition. *Clin. Exp. Immunol.* 70: 255-262.
- KAY, M. M. B., J. MENDOZA, J. DIVEN, T. DENTON, N. UNION et M. LAJINESS. 1979. Age related changes in the immune system of mice of eight medium and long lived strains and hybrids. I. Organ, cellular and activity changes. *Mech. Ageing Dev.* 11: 295-346.
- KHALIL, A. M., W. QASSEM et F. AMOURA. 1993. Cytogenetic changes in human lymphocytes from workers occupationally exposed to high-voltage electromagnetic fields. *Electro- and Magnetobiology* 12: 17-26.

- KIESSLING, R., E. KLEIN et H. WIGZELL. 1975. "Natural" killer cells in the mouse: I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* 5: 112-117.
- KINCADE, P. W. et 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 et B. J. WOODFORD. 1992. Magnetite biomineralization in the human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7683-7687.
- KLEIN, G., H. O. SJÖGREN, E. KLEIN et K. E. HELLSTRÖM. 1960. Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res.* 20: 1561-1572.
- KRIPKE, M. L. 1974. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. *J. Natl Cancer Inst.* 53: 1333-1336.
- LANCASTER, J. R. Jr et J. B. Jr HIBBS. 1990. EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1223-1227.
- LANIER, L. L., C. CHANG, H. SPITS et J. H. PHILLIPS. 1992. Expression of cytoplasmic CD3 epsilon proteins in activated human adult natural killer (NK) cells and CD3 gamma, delta, epsilon complexes in fetal NK cells. Implications for the relationship of NK and T lymphocytes. *J. Immunol.* 149: 1876-1880.
- LANIER, L. L., H. SPITS et J. H. PHILLIPS. 1992. The developmental relationship between NK cells and T cells. *Immunol. Today* 13: 392-395.
- LECLERC, J. C., E. GOMARD, F. PLATA et J. P. LÉVY. 1973. Cell-mediated immune reaction against tumors induced by oncornaviruses. II. Nature of the effector cells in tumor-cell cytolysis. *Int. J. Cancer* 11: 426-432.
- LERCHL, A., K. O. NONAKA et 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.
- LEUNG, F. C., D. N. ROMMEREIM, R. G. STEVENS, B. W. WILSON, R. L. BUSCHBOM et L. E. ANDERSON. 1988. "Effects of electric fields on rat mammary tumour development induced by 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)" dans *Proceedings of the 10th Annual Bioelectromagnetics Society Meeting, Stamford, Connecticut, Juin 1988*. Frederick, MD: Bioelectromagnetics Society.

- LIBURDY, R. P., D. E. CALLAHAN et J. D. HARLAND. 1993. "Protein shedding and ELF magnetic fields: antibody binding at the CD3 and CD20 receptor sites of human lymphocytes" dans Blank, M. (ed.): *Electricity and magnetism in biology and medicine*. CA. San Francisco Press. 651-653.
- LIN, R. S., P. C. DISCHINGERR, J. CONDE et K. P. FARRELL. 1985. Occupational exposure to electromagnetic fields and the occurrence of brain tumours: An analysis of possible associations. *J. Occup. Med.* 27: 413-419.
- LITOVITZ, T. A., C. J. MONTROSE, R. GOODMAN et E. C. ELSON. 1990. Amplitude windows and transiently augmented transcription from exposure to electromagnetic fields. *Bioelectromag.* 11: 297-312.
- LORIMORE, S. A., C. I. KOWALCZUK, R. D. SAUNDERS et 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.
- LUBEN, R. A., C. D. CAIN, M. CHI-YUN CHEN, D. M. ROSEN et W. R. ADEY. 1982. Effects of electromagnetic stimuli on bone and bone cells *in vitro*: Inhibition of responses to parathyroid hormone by low-energy low-frequency fields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4180-4184.
- 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 et J. H. FEAN. 1988. Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National 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 et 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, C. GENNINGS, A. E. MUNSON et 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 et W. R. ADEY. 1988. Suppression of T-lymphocyte cytotoxicity following exposure to 60-Hz sinusoidal electric fields. *Bioelectromag.* 9: 303-313.

- LYLE, D. B., X. WANG, R. D. AYOTTE, A. R. SHEPPARD et W. R. ADEY. 1991. Calcium uptake by leukemic and normal T-lymphocytes exposed to low frequency magnetic fields. *Bioelectromag.* 12: 145-156.
- MADER, D. L. et S. B. PERALTA. 1992. Residential exposure to 60-Hz magnetic fields from appliances. *Bioelectromag.* 13: 287-301.
- MARLETTA, M. A., P. S. YOON, R. IYENGAR, C. D. LEAF et J. S. WISHNOK. 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate. *Biochem.* 27: 8706-8711.
- MATANOSKI, G. M., P. N. BREYSSE et E. A. ELLIOTT. 1991. Electromagnetic field exposure and male breast cancer. *Lancet* 337: 737.
- MATTHEWS, N. et M. L. NEALE. 1987. "Cytotoxicity assays for tumour necrosis factor and lymphotoxin." dans Morris, A. G. et A. H. Gearing (ed.): *Lymphokines and interferons: A practical approach*. Oxford, Washington. IRL Press. 221-225.
- McCOY, S. L., S. H. HEFENEIDER, B. E. OGDEN et A. S. HALL. 1993. "Effect of 60 Hz electric and magnetic fields from 500 kV transmission line on interleukin-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.
- McLAUHLAN, K. 1992. Are environmental magnetic fields dangerous? *Phys. World* 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 et D. MORRISON. 1991. Cancer promotion in a mouse-skin model by a 60-Hz magnetic field: II. Tumor development and immune response. *Bioelectromag.* 12: 273-287.
- McLEOD, B. R. et A. R. LIBOFF. 1986. Dynamic characteristics of membrane ions in multifield configurations of low-frequency electromagnetic radiation. *Bioelectromag.* 7: 177-189.
- MELTZER, M. S. 1981. Tumor cytotoxicity by lymphokine-activated macrophages: Development of macrophage tumoricidal activity requires a sequence of reactions. *Lymphokines* 3: 319-342.
- MELTZER, M. S. et 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., A. STAMM, S. BUNTENKÖTTER, R. ZWINGELBERG, U. WAHNSCHAFFE et W. LÖSCHER. 1993. Effects of magnetic fields on mammary tumour development induced by 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene in rats. *Bioelectromag.* 14: 131-143.
- MILLER, R. A., D. G. MALONEY, R. WARNKE et R. LEVY. 1982. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N. Engl. J. Med.* 306: 517-522.
- MONJAN, A. A. et M. I. COLLECTOR. 1977. Stress-induced modulation of the immune response. *Science* 196: 307-308.
- MOONEY, N. A., R. E. SMITH et B. W. WATSON. 1986. Effect of extremely-low-frequency pulsed magnetic fields on the mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells. *Bioelectromag.* 7: 387-394.
- MOSMANN, T. R. et R. L. COFFMAN. 1987. Two types of mouse helper T-cell clones . Implications for immune regulation. *Immunol. Today* 8: 223-227.
- MUROI, M. et T. SUZUKI. 1993. Role of protein kinase A in LPS-induced activation of NF- κ B proteins of a mouse macrophage-like cell line, J774. *Cell. Signalling* 5: 289-298.
- MYERS, A., A. D. CLAYDEN, R. A. CARTWRIGHT et S. C. CARTWRIGHT. 1990. Childhood cancer and overhead powerlines: a case-control study. *Br. J. Cancer* 62: 1008-1014.
- NAFZIGER, J., H. DESJOBERT, B. BENAMAR et J. J. GUILLOSSON. 1993. DNA mutations and 50-Hz electromagnetic fields. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 30: 133-141.
- NATHAN, C. F. 1987. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79: 319-326.
- NATIONAL RADIOLOGICAL PROTECTION BOARD. 1992. Documents of the NRPB: Electromagnetic fields and the risk of cancer. NRPB, Chilton, Didcot, Oxon, England. 3(1).
- NING, J., J. CASAMENTO, E. CZERSKA, M. SWICORD, H. AL-BARAZI, C. DAVIS et E. ELSON. 1992. Comparison of the effect of ELF on total RNA content in normal and transformed human cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 649: 353-355.
- NORTH, R. J. 1984. Models of adoptive T-cell-mediated regression of established tumors. *Contemp. Top. Immunobiol.* 13: 243-257.
- OLD, L. J. 1985. Tumour necrosis factor. *Science* 230: 630-632.

- OLD, L. J., E. A. BOYSE, D. A. CLARKE et E. A. CARSWELL. 1962. Antigenic properties of chemically-induced tumors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 101: 80-106.
- ORTALDO, J. R. et R. B. HERBERMAN. 1984. Heterogeneity of natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2: 359-394.
- ORTALDO, J. R., L. H. MASON, B. J. MATHIESON, S. M. LIANG, D. A. FLICK et R. B. HERBERMAN. 1986. Mediation of mouse natural cytotoxic activity by tumour necrosis factor. *Nature* 321: 700-702.
- OSTENSEN, M. E., D. L. THIELE et P. E. LIPSKY. 1987. Tumor necrosis factor- α enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *J. Immunol.* 138: 4185-4191.
- PALLADINO, M. A., M. R. SHALABY, S. M. KRAMER, B. L. FERRAILOLO, R. A. BAUGHMAN, A. B. DELEO, D. CRASE, B. MARAFINO, B. B. AGGARWAL, I. S. FIGARI, D. LIGITT et J. S. PATTON. 1987. Characterization of the antitumor activities of human tumor necrosis factor- α and the comparison with other cytokines: induction of tumor specific immunity. *J. Immunol.* 138: 4023-4032.
- PELLAT, C., Y. HENRY et J. C. DRAPIER. 1990. IFN γ -activated macrophages: detection by electron paramagnetic resonance of complexes between L-arginine-derived nitric oxide and non-heme iron proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166: 119-125.
- PHILLIPS, J. L. 1986. Transferrin receptors and natural killer cell lysis. A study using Colo 205 cells exposed to 60 Hz electromagnetic fields. *Immunology Lett.* 13: 295-299.
- PHILLIPS, J. L. et L. McCHESNEY. 1991. Effect of 72 Hz pulsed magnetic field exposure on macromolecular synthesis in CCRF-CEM cells. *Cancer Biochem. Biophys.* 12: 1-7.
- PHILLIPS, J. L., W. HAGGREN, W. J. THOMAS, T. ISHIDA-JONES et W. R. ADEY. 1992. Magnetic field-induced changes in specific gene transcription. *Biochim. Biophys. Acta* 1132: 140-144.
- POLK, C. 1974. "Sources, propagation, amplitude and temporal variation of extremely low frequency (0-100 Hz) electromagnetic fields", dans Llaurado, J. C., A. Saucés Jr. (ed.): *Biological and Clinical Effects of Low Frequency Magnetic and Electric Fields*. Springfield, Ill. 21-48.

- POLLACK, S. V. et L. A. HOLLENBECK. 1982. *In vivo* reduction of NK activity with anti-NK1 serum: Direct evaluation of NK cells in tumor clearance. *Int. J. Cancer* 29: 203-207.
- POWELL, M. B., B. S. CONTA, M. HOROWITZ et N. H. RUDDLE. 1985. The differential inhibitory effect of lymphotoxin and immune interferon on normal and malignant lymphoid cells. *Lymphokine Res.* 4: 13-26.
- PROSS, H. F. et 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.
- REYNOLDS, C. W. et 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.
- REYNOLDS, C. W., T. TIMONEN et R. B. HERBERMAN. 1981. Natural killer (NK) cell activity in the rat: I. Isolation and characterization of the effector cells. *J. Immunol.* 127: 282-287.
- ROMMEREIM, D. N. et L. E. ANDERSON. 1989. Developmental toxicity evaluation of 60-Hz horizontal magnetic fields in rats. *The Annual Review of Research on Biological Effects of 50 and 60-Hz Electric and Magnetic Fields*, W/L Associates Ltd., Frederick, MD, A17.
- ROSENTHAL, M. et G. OBE. 1989. Effects of 50-Hertz electromagnetic fields on proliferation and on chromosomal alterations in human peripheral lymphocytes untreated or pretreated with chemical mutagens. *Mutat. Res.* 210: 329-335.
- ROUSE, B. T., M. RÖLLINGHOFF et N. L. WARNER. 1972. Anti- θ serum-induced suppression of the cellular transfer of tumor-specific immunity to syngenic plasma cell tumor. *Nature New Biol.* 238: 116-117.
- RUGGIERO, V., K. LATHAM et C. BAGLIONI. 1987. Cytostatic and cytotoxic activity of tumor necrosis factor on human cancer cells. *J. Immunol.* 138: 2711-2717.
- SAVITZ, D. A., H. WACHTEL, F. A. BARNES, E. M. JOHN et 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 et K. PFIZENMAIER. 1987. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor

- (TNF)-alpha: Induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha mediated enhancement of T cell responses. *J. Immunol.* 138: 1786-1790.
- SCHMID, D. S. et N. H. RUDDLE. 1988. "Production and function of lymphotoxin secreted by cytolytic T cells" dans Podack, E. R. (ed.): *Cytolytic Lymphocytes and Complement: Effectors of the Immune System*. Boca Raton, Florida. CRC Press Inc. 61-74.
- SCHREIBER, H. 1993. "Tumor immunology" dans Paul, W. E. (ed.): *Fundamental Immunology*. New York. Raven Press Ltd. 1143-1178.
- SCOTT-WALTON, B., K. M. CLARK, B. R. HOLT, D. C. JONES, S. D. KAPLAN, J. J. KREBS, P. POLSON, R. A. SHEPHERD et J. R. YOUNG. 1979. Potential environmental effects of 765-kV transmission lines: Views before the New York State Public Service Commission, Cases 26529 and 26559, 1976-1978, Springfield, VA: Natl. Tech. Inf. Serv. DOE/EV-0056: II-7.
- SEVERSON, R. K., R. G. STEVENS, W. T. KAUNE, D. B. THOMAS, L. HENSER, S. DAVIS et L. E. SEVER. 1988. Acute nonlymphocytic leukemia and residential exposure to power frequency magnetic fields. *Am. J. Epidemiol.* 128: 10-20.
- SJOBLAD, R. D. 1988. Potential future requirements for immunotoxicology testing of pesticides. *Toxicol. Ind. Health* 4: 391-395.
- SPELLMAN, C. W. et T. B. TOMASI. 1983. Ultraviolet light-induced suppression of antigen presentation. *J. Clin. Immunol.* 3: 105-110.
- STEINHAUER, E. H., A. T. DOYLE, J. REED et A. S. KADISH. 1982. Effective natural cytotoxicity in patients with cancer: Normal number of effector cells but decreased recycling capacity in patients with advanced disease. *J. Immunol.* 129: 2255-2259.
- STERN, F. B., R. A. WAXWEILER, J. J. BEAUMONT, S. T. LEE, R. A. RINSKY, R. D. ZUMWALDE, W. E. HALPERIN, P. J. BIERBAUM, P. J. LANDRIGAN et W. E. Jr MURRAY. 1986. A case-control study of leukemia at a naval nuclear shipyard. *Am. J. Epidemiol.* 123: 980-992.
- STEWART, S. J., J. FUJIMOTO et R. LEVY. 1986. Human T-lymphocytes and monocytes bear the same leu-3 (T4) antigen. *J. Immunol.* 10: 3773-3778.
- STUCHLY, M. A. et K. HANSSON-MILD. 1987. Environmental and occupational exposure to electromagnetic fields. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* 1: 15-17.

- STUER, D. J. et C. F. NATHAN. 1989. Nitric oxide: A macrophage product responsible for cytostatis and respiratory inhibition in tumour target cells. *J. Exp. Med.* 169: 1543-1555.
- SUGARMAN, B. J., B. B. AGGARWALL, P. E. HASS, I. S. FIGARI, M. A. Jr PALLADINO et H. M. SHEPARD. 1985. Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. *Science* 230: 943-945.
- SZMIGIELSKI, S. 1993. Electromagnetic fields and neoplasms with special reference to extremely low frequencies. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 30: 253-264.
- TAKASUGI, M., A. RAMSEYER et J. TAKASUGI. 1977. Decline of natural nonselective cell-mediated cytotoxicity in patients with tumor progression. *Cancer Res.* 37: 413-418.
- TENFORDE, T. S. 1992. Biological interactions and potential health effects of extremely-low-frequency magnetic fields from power lines and other common sources. *Annu. Rev. Publ. Health* 13: 173-196.
- TEVETHIA, S. S., J. W. BLASECKI, G. WANECK et A. L. GOLDSTEIN. 1974. Requirement of thymus-derived θ -positive lymphocytes for rejection of DNA virus (SV 40) tumors in mice. *J. Immunol.* 113: 1417-1423.
- THOMAS, T. L., P. D. STOLLEY, A. STEMHAGEN, E. T. H. FONTHAM, M. L. BLEECKER, P. A. STEWART et R. N. HOOVER. 1987. Brain tumour mortality risk among men with electrical and electric jobs: A case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* 79: 233-238.
- TOMENTIUS, L. 1986. 50-Hz electromagnetic environment and the incidence of childhood tumors in Stockholm County. *Bioelectromag.* 7: 191-207.
- TRINCHIERI, G. et 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 et W. J. BONTINCK. 1988. Identification of immunotoxic effects of chemicals and assessment of their relevance to man. *Food Chem. Toxicol.* 26: 527-539.
- TYNES, T. et A. ANDERSEN. 1990. Electromagnetic fields and male breast cancer. *Lancet* 336: 1596.

- UNANUE, E. R. 1981. The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. Part two: Symbiotic relationship between lymphocytes and macrophages. *Adv. Immunol.* 31: 1-136.
- 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.
- VILLA, M., P. MUSTARELLI et M. CAPROTTI. 1991. Biological effects of magnetic fields. *Life Sciences* 49: 85-92.
- VOS, J., H. VAN LOVEREN, P. WESTER et D. VETHAAK. 1989. Toxic effects of environmental chemicals on the immune system. *Trends Pharmacol. Sci.* 10: 289-292.
- WALLECZEK, J. et 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 Lett.* 271: 157-160.
- WALLECZEK, J. et T. F. BUDINGER. 1992. Pulsed magnetic field effects on calcium signaling in lymphocytes: dependence on cell status and field intensity. *FEBS Lett.* 314: 351-355.
- WARD, P. L., H. K. KOEPPEN, T. HURTEAU, D. A. ROWLEY et H. SCHREIBER. 1990. MHC class I and unique antigen expression by tumors that escaped from CD8⁺ T cell-dependent surveillance. *Cancer Res.* 50: 3851-3858.
- WEI, L. X., R. GOODMAN et A. HENDERSON. 1990. Changes in levels of c-myc and histone H2B following exposure of cells to low-frequency sinusoidal electromagnetic fields: Evidence for a window effect. *Bioelectromag.* 11: 269-272.
- WEISS, A. 1993. "T lymphocyte activation" dans Paul, W. E. (ed.): *Fundamental Immunology*. New York. Raven Press Ltd. 467-504.
- WERTHEIMER, N. 1989. "Extremely low frequency electromagnetic fields as possible promoters of carcinogenesis", dans Weisburger, E. K. (ed.): *Mechanisms of Carcinogenesis*. Dordrecht. Klumer Academic Publ. 148.
- WERTHEIMER, N. et E. LEEPER. 1979. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am. J. Epidemiol.* 109: 273-284.
- WERTHEIMER, N. et E. LEEPER. 1982. Adult cancer related to electrical wire near the home. *Int. J. Epidemiol.* 11: 345-355.

- WHITESIDE, T. L. et R. B. HERBERMAN. 1989. The role of natural killer cells in human disease. *Clin. Immunol. and Immunopath.* 53: 1-23.
- WILSON, B. W., C. W. WRIGHT, J. E. MORRIS, R. L. BUSCHBOM, D. P. BROWN, D. L. MILLER, R. SOMMERS-FLANNIGAN et L. E. ANDERSON. 1990. Evidence for an effect of ELF electromagnetic fields on human pineal gland function. *J. Pineal Res.* 9: 259-269.
- WONG, S., M. FOURNIER, D. CODERRE, W. BANSKA et K. KRZYSTYNIAK. 1992. "Environmental immunotoxicology" dans Peakall, D. (ed.): *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*. London. Chapman et Hall. 167-189.
- YAGA, K., R. J. REITER, L. C. MANCHESTER, H. NIEVES, J. H. SUN et L. D. CHEN. 1993. Pineal sensitivity to pulsed static magnetic fields changes during the photoperiod. *Brain Res. Bull.* 30: 153-156.
- YOKOTA, S., T. D. GEPPERT et P. E. LIPSKY. 1988. Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* 140: 531-536.
- YOST, M. G. et R. P. LIBURDY. 1992. Time-varying and static magnetic fields act in combination to alter calcium signal transduction in the lymphocyte. *FEBS Lett.* 296: 117-122.
- YOUNGSON, J. H. A. M., A. D. CLAYDEN, A. MYERS et R. A. CARTWRIGHT. 1991. A case/control study of adult haematological malignancies in relation to overhead powerlines. *Br. J. Cancer* 63: 977-998.
- ZUSMAN, I., P. YAFFE, H. PINUS et A. ORNOY. 1990. Effects of pulsing electromagnetic fields on the prenatal and postnatal development in mice and rats: *In vivo* and *in vitro* studies. *Teratology* 42: 157-170.
- ZWINGELBERG, R., G. OBE, M. ROSENTHAL, M. MEVISSSEN, S. BUNTENKÖTTER et W. LÖSCHER. 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 Res.* 302: 39-44.

ANNEXE 1.

Méthode de calcul de l'activité du facteur nécrosant des tumeurs

Quatre échantillons de standard TNF- α ont été produits à partir d'un lot de TNF- α murin recombinant (1×10^4 U/ml). Ces échantillons ont été ajoutés à une quantité pré-déterminée de cellules L929 et ont ensuite subi quatre dilutions en base quatre, réalisées directement dans les puits. Le pourcentage de cytotoxicité des cellules L929 en présence de ces dilutions est montrée au Tableau X. Le nombre d'unités ASC de chacun de ces quatre échantillons de standard TNF- α a été calculé et rapporté sur une droite en fonction du nombre d'unités TNF- α (Figure 9). Le nombre d'unités TNF de chacun de ces quatre échantillons de standard TNF- α a été recalculé d'après la pente et l'ordonnée à l'origine de cette droite (Tableau X). Des écarts variant entre 1,4 % et 21,6 % ont été obtenus entre les valeurs connues des échantillons et les valeurs recalculées.

TABLEAU X. Calcul des unités ASC pour la courbe standard d'activité TNF- α .

Nombre d'unités ^a	Dil. ^b	% Lyse ^c	Aire du trapèze ^d (% lyse)	ASC ^e (%)	Nombre d'unités recalculé ^f	Écart ^g (%)
500	2	93,0 ± 1,4 ^h	94,4 ± 4,7	280 ± 10	493	1,4
	3	95,7 ± 4,5	93,8 ± 7,0			
	4	91,9 ± 5,3	91,8 ± 5,6			
	5	91,6 ± 1,7				
250	2	92,0 ± 1,2	91,4 ± 2,1	266 ± 7	263	5,2
	3	90,8 ± 1,7	88,9 ± 4,5			
	4	86,9 ± 4,2	85,7 ± 4,7			
	5	84,4 ± 2,2				
125	2	90,5 ± 1,2	88,9 ± 2,1	258 ± 3	132	5,6
	3	87,2 ± 1,7	89,7 ± 2,1			
	4	92,2 ± 1,2	79,2 ± 1,6			
	5	66,1 ± 1,1				
62,5	2	91,9 ± 1,6	90,2 ± 2,6	253 ± 14	49	21,6
	3	88,5 ± 2,0	87,6 ± 2,7			
	4	86,7 ± 1,8	75,0 ± 13,2			
	5	63,2 ± 13,1				

TABLEAU X (suite).

- a Nombre d'unités d'activité TNF déposé par puits à partir d'un échantillon de TNF- α murin (10^4 U/ml).
- b Dilution du surnageant en base quatre.
- c Le pourcentage de cytotoxicité (% lyse) est obtenu selon l'équation suivante:
- $$\% \text{ Cytotoxicité} = 1 - \frac{\text{D.O. échantillon}}{\text{D.O. maximale}} \times 100$$
- d L'aire du trapèze est calculée selon l'équation $(a + b) \times h/2$ où a et b représentent la longueur des côtés parallèles (la réponse en % lyse) et h , la largeur du trapèze formé, ayant ici la valeur de 1 puisqu'il s'agit de deux dilutions consécutives d'une série logarithmique continue.
- e $ASC = \sum$ Aires des trapèzes.
- f Le nombre d'unités recalculé s'établit à partir de la droite du nombre d'unités ASC en fonction du nombre d'unités TNF du standard (voir Figure 9).
- g $\text{Écart} = \left(\frac{\text{nombre d'unités TNF recalculé}}{\text{nombre d'unités TNF standard}} \times 100 \right) - 100.$
- h Moyenne de trois observations (\pm écart-type).

FIGURE 10. Courbe standard de dosage d'unités d'activité TNF- α .

Cette courbe standard a été réalisée à partir des données du Tableau X. Le coefficient de corrélation linéaire de la droite obtenue était de 0,996.

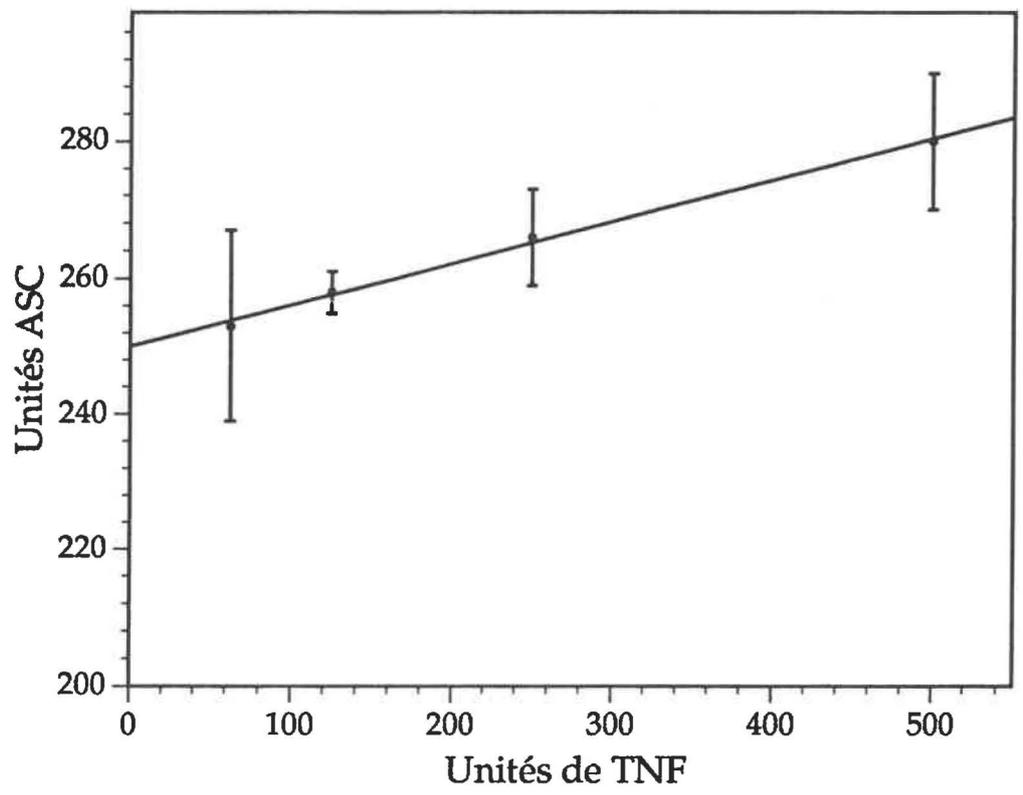


FIGURE 11. Courbe standard utilisée pour la détermination de la concentration de NO_2^- .

Cette courbe standard de NaNO_2 a été obtenue avec des dilutions de $300 \mu\text{M}$ à $1,6 \mu\text{M}$ de NaNO_2 . Le coefficient de corrélation linéaire de la droite obtenue était de 0,9996.

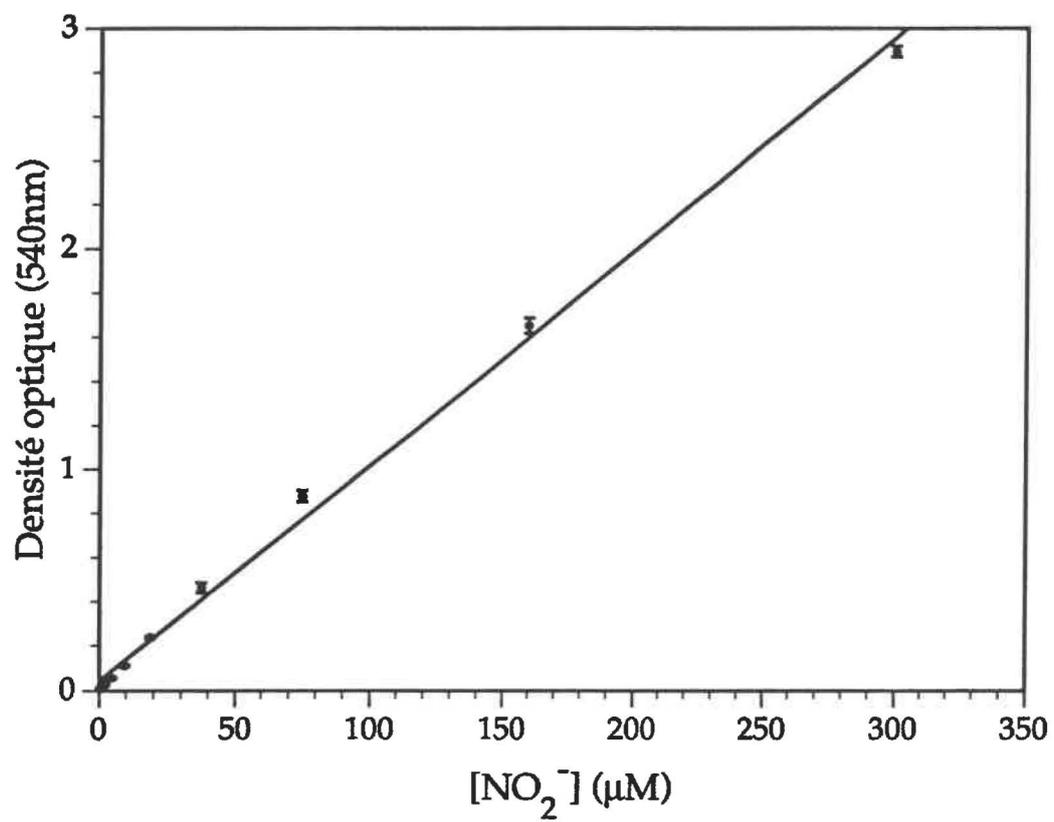
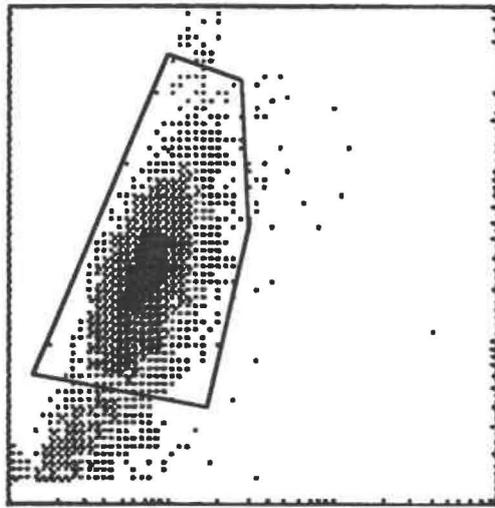


FIGURE 12. Analyse cytofluorométrique de la distribution cellulaire des cellules spléniques non-adhérentes provenant de rats Fisher 344/N exposés aux différentes intensités de CM.

Le nuage de dispersion exprime la valeur logarithmique du volume cellulaire ("forward light scatter"; en abscisse) en fonction de la granulosité cellulaire, unités relatives ("90° light scatter"; en ordonnée). La population délimitée par le polygone représente la fenêtre de sélection utilisée pour déterminer les pourcentages de lymphocytes T CD5⁺, CD4⁺, et CD8⁺, ainsi que les lymphocytes B (Ig⁺). La population non-délimitée du coin inférieur gauche représente les débris cellulaires de globules rouges lysés et de cellules lymphocytaires mortes. Cette distribution était semblable pour toutes les analyses effectuées.

Diffusion à 90° (granulosité)



Diffusion aux petits angles
(volume cellulaire)

FIGURE 13. Expression des antigènes spécifiques aux lymphocytes T à la surface des cellules spléniques non-adhérentes.

La représentation graphique linéaire exprime la valeur logarithmique de l'intensité de fluorescence (en abscisse) en fonction du nombre relatif des cellules (en ordonnée). Le profil cytofluorométrique (a) représente le marquage des lymphocytes T totaux, avec un anticorps anti-CD5 conjugué à la phycoérythrine, en fluorescence verte et, (b), (d) et (f) le représente en fluorescence rouge lorsque l'anti-CD5 est présent seul, en présence d'anticorps anti-CD4 conjugué au FITC ou d'anticorps anti-CD8 conjugué au FITC respectivement; (c) représente le pourcentage des lymphocytes CD4⁺ à l'intérieur de la population CD5⁺, en fluorescence verte; (e) représente le pourcentage des lymphocytes CD8⁺ à l'intérieur de la population CD5⁺, en fluorescence verte; (g) et (h) représentent la liaison non-spécifique des anticorps aux cellules par l'entremise de témoins isotypiques, en fluorescence verte et rouge respectivement; et (i) et (j) représentent l'auto-fluorescence verte et rouge respectivement, des cellules spléniques non-adhérentes non-traitées. Pour évaluer les pourcentages réels des populations, la valeur de la fluorescence verte de liaison non-spécifique (g) est soustraite des valeurs obtenues pour les lymphocytes CD4⁺ (c) et les lymphocytes CD8⁺ (d), et celle de la fluorescence rouge (h) est soustraite de l'anti-CD5 (b).

