

Université du Québec
INRS-Santé

**Réponse des macrophages
murins exposés à des métaux lourds**

Par
Julie De Gagné

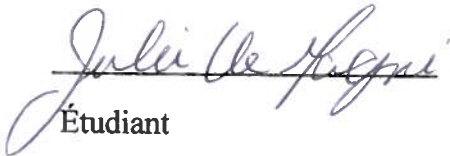
Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences Expérimentales de la Santé

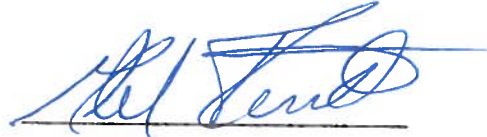
Jury d'évaluation

Examineur interne	Charles Ramassamy, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Catherine Jumarie, Université du Québec à Montréal
Directeur de recherche	Michel Fournier, INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Parmi les polluants environnementaux reconnus pour leur toxicité et leur propagation à travers le monde, les métaux lourds sont certainement d'une première préoccupation. Depuis que l'humain est exposé à des métaux toxiques, les effets potentiels de ces métaux sur le système immunitaire méritent une évaluation. Des études démontrent que les métaux lourds peuvent induire des effets immunomodulateurs tels que l'augmentation de la susceptibilité à des agents infectieux, l'apparition de maladies néoplasiques ainsi que de maladies auto-immunes. Afin de se protéger de cette agression, la cellule fabrique des molécules riches en groupements thiols (cystéines, glutathion, métalloprotéines), qui sont capables de neutraliser les métaux en les liant. Dans le présent travail, nous avons tout d'abord évalué la toxicité des métaux lourds (CdCl_2 , CH_3HgCl , HgCl_2 , SeCl_4 et ZnCl_2) suite à des expositions *in vitro* avec des macrophages. Les tests de viabilité cellulaire et de phagocytose par cytométrie de flux ont été utilisés afin d'évaluer les effets de ces xénobiotiques sur la viabilité et la capacité à phagocyter des macrophages, la phagocytose étant une fonction importante de ces derniers. Nous avons déterminé l'effet de l'activation des macrophages sur la courbe de toxicité des métaux. Nous avons d'abord pu vérifier notre protocole d'activation des macrophages préalablement activés par la Concanavaleine A, en suivant l'augmentation de l'expression du CMH II. Pour ce qui est de l'effet de l'activation cellulaire, nous avons remarqué, pour la plupart des métaux, que les cellules stimulées phagocytent plus que les cellules non stimulées. Par la suite, nous avons déterminé si l'effet protecteur de l'activation est lié à des différences de niveaux intracellulaires de thiols. Nous avons aussi observé que les macrophages ayant subi une activation préalable à l'exposition aux métaux lourds ont une augmentation considérable du niveau intracellulaire en thiols.


Étudiant


Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon directeur de recherche Dr. Michel Fournier pour le support et l'aide fournie lors de mes recherches, de la rédaction de l'article et de ce mémoire. Ses conseils et ses encouragements m'ont permise de mener à terme ce projet d'étude.

Je tiens également à remercier mes collègues du laboratoire, particulièrement Marlène Fortier et Stéphane Pillet pour l'aide technique, leurs judicieux conseils et commentaires constructifs qui m'ont permis de progresser durant mes travaux de recherche.

L'INRS-Institut Armand-Frappier pour son soutien financier durant mes études ainsi qu'à Biophage Inc pour la bourse offerte.

Enfin, j'aimerais remercier les personnes qui m'appuient depuis longtemps dans mes études, mes parents pour leur support financier, leurs précieux conseils et leurs encouragements.

À tous, merci beaucoup!

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iii
Liste des figures	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Introduction.....	12
Chapitre 1 : État des connaissances	13
1.1 Le système immunitaire	13
1.2 Les macrophages.....	16
1.2.1 Différenciation et distribution.....	16
1.2.2 Activation.....	17
1.2.2.1 Pré-activation	19
1.2.2.2 Activation classique type 1	19
1.2.2.3 Activation alternative type 2.....	20
1.2.2.4 Désactivation.....	21
1.2.2.5 Activation classique vs activation alternative.....	21
1.2.3 L'apoptose.....	22
1.2.4 La phagocytose	23
1.3 L'immunotoxicité	24
1.4 Les métaux lourds	26
1.4.1 Les thiols	29
1.4.1.1 Le glutathion	29
1.4.1.2 Les métallothionéines	31
1.4.2 Le stress oxydatif	32
1.4.3 Le cadmium	33
1.4.4 Le mercure	36
1.4.5 Le sélénium	40
1.4.6 Le zinc.....	43
1.5 Le projet de recherche.....	46

Chapitre 2: Articles: Cellular response of mice splenocytes to heavy metals exposure	48
Contribution personnelle.....	48
Résumé en français de l'article	48
Article	50
Chapitre 3:Discussion générale.....	90
Conclusion	102
Bibliographie.....	104
Annexe A: Courbes doses-réponse pour la Concanavaline A	111
Annexe B: Résultats non publiés	114

LISTE DES FIGURES

Mémoire

Figure 1 : Détermination de la concentration optimale et du temps d'incubation optimal de Concanavaline A pour le test de thiols intracellulaires, page 112.

Figure 2 : Détermination de la concentration optimale de concanavaline A pour le test de phagocytose, page 113.

Figure 3: Détermination du pourcentage de macrophages murins qui phagocytent exposés au cadmium (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 115.

Figure 4: Détermination du pourcentage de phagocytose dans des macrophages de rate de souris exposés au mercure inorganique (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 116.

Figure 5: Détermination du pourcentage de macrophages murins qui phagocytent exposés au mercure inorganique (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 117.

Figure 6: Détermination du pourcentage de phagocytose dans des macrophages de rate de souris exposés au mercure organique (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 118.

Figure 7: Détermination du pourcentage de macrophages murins qui phagocytent exposés au mercure organique (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 119.

Figure 8: Détermination du pourcentage de phagocytose dans des macrophages murins exposés au sélénium (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 120.

Figure 9: Détermination du pourcentage de macrophages murins qui phagocytent exposés au sélénium (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 121.

Figure 10: Détermination du pourcentage de phagocytose dans des macrophages murins exposés au zinc (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 122.

Figure 11: Détermination du pourcentage de macrophages murins qui phagocytent exposés au zinc (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 123.

Figure 12: Détermination du niveau de thiols intracellulaires dans des macrophages murins exposés au cadmium (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 124.

Figure 13: Détermination du niveau de thiols intracellulaires dans des macrophages murins exposés au mercure inorganique (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 125.

Figure 14: Détermination du niveau de thiols intracellulaires dans des macrophages murins exposés au zinc (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 126.

Figure 15 : Détermination du pourcentage de viabilité dans des macrophages murins exposés au cadmium (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 127.

Figure 16 : Détermination du pourcentage de viabilité dans des macrophages murins exposés au mercure inorganique (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 128.

Figure 17 : Détermination du pourcentage de viabilité dans des macrophages murins exposés au mercure organique (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 129.

Figure 18 : Détermination du pourcentage de viabilité dans des macrophages murins exposés au sélénium (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 130.

Figure 19 : Détermination du pourcentage de viabilité dans des macrophages murins exposés au zinc (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 131.

Figure 20 : Détermination du pourcentage d'apoptose dans des macrophages murins exposés au cadmium (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 132.

Figure 21 : Détermination du pourcentage d'apoptose dans des macrophages murins exposés au mercure inorganique (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 133.

Figure 22 : Détermination du pourcentage d'apoptose dans des macrophages murins exposés au sélénium (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A, page 134.

Article

Figure 1a. Percentage of viability in mice lymphocytes after 3 hours of exposure to heavy metals (cadmium, organic mercury, inorganic mercury, selenium and zinc) at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M, page 79.

Figure 1b. Percentage of viability in mice macrophages after 3 hours of exposure to heavy metals at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M, page 80.

Figure 2. Mice macrophages expression of I-A^b (MHC of class II) in both activated with concanavaline A and non activated cells, page 81.

Figure 3. ³H-methyl-thymidine incorporation in both activated with concanavaline A and non activated cells, page 82.

Figure 4. Effect of 3 hours exposure to cadmium in both activated and non activated mice macrophages phagocytosis, page 84.

Figure 5. Effect of 3 hours exposure to cadmium in both activated and non activated mice lymphocytes determined by ³H-methyl-thymidine incorporation, page 85.

Figure 6. Determination of intracellular level of thiols in both stimulated and non activated mice splenocytes after a 3 hours organic mercury exposure, page 86.

Figure 7. Determination of intracellular level of thiols in both activated and non activated mice splenocytes after a 3 hours selenium exposure, page 87.

Figure 8. Percentage of apoptosis in mice splenocytes after 3 hours exposure to organic mercury at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M, page 88.

Figure 9. Percentage of apoptosis in mice splenocytes after 3 hours exposure to zinc at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M, page 89.

LISTE DES TABLEAUX

Article

Table 1: IC₅₀ value of all tested metals for the lymphocytes proliferation assay and macrophages phagocytosis assay after 3hours exposure, page 83.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BSA : Bovine serum albumine

CAT : Catalase

CI₅₀ : Concentration provoquant 50% d'inhibition

CMFDA: 5-Chlorométhylfluorescéine diacétate

CMH II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

ConA : Concanavaleine A

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

DMSO : Sulfoxyde de diméthyle

FBS : Sérum de veau fœtal (*Fœtal bovine serum*)

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique

GPx : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion

GST : Glutathion-S-transférase

IFN- γ : Interféron-gamma

IgA : Immunoglobuline chaîne α (alpha)

IgD : Immunoglobuline chaîne δ (delta)

IgE : Immunoglobuline chaîne ϵ (epsilon)

IgG : Immunoglobuline chaîne γ (gamma)

IgM: Immunoglobuline chaîne μ (mu)

IL-4 : Interleukine-4

IL-4R α : Récepteur à interleukine-4 de la chaîne alpha

IL-10 : Interleukine-10

IL-13 : Interleukine-13

MT : Métallothionéine

NEM : N-éthylmalnéimide

NK : cellules tueuses naturelles (Natural Killer)

Pen-Strep : Pénicilline-Streptomycine

PI : Iodure de propidium (*Propidium iodide*)

PKC : Protéines kinases C

SOD : Superoxyde dismutase

TCR : Récepteur de cellules T (T-cell receptor)

TNF : facteur de nécrose des tumeurs (Tumor necrosis factor)

INTRODUCTION

Parmi les polluants environnementaux reconnus pour leur toxicité et leur propagation à travers le monde, les métaux lourds sont certainement d'une première préoccupation. Depuis que l'humain est exposé à des métaux toxiques, les effets potentiels de ces métaux sur le système immunitaire méritent une évaluation. Les métaux lourds peuvent exercer leur toxicité sur différents systèmes physiologiques dont le système immunitaire. Des études démontrent que les métaux lourds peuvent induire des immunosuppressions rendant l'organisme plus susceptible à des infections ou des cancers. Ils peuvent provoquer le déclenchement de réactions immunitaires anormales telles que des allergies, des réactions dites d'hypersensibilité ou des maladies auto-immunes. Afin de se protéger de cette agression, la cellule fabrique des molécules riches en thiols (cystéine, glutathion, métalloprotéines), qui sont capables de neutraliser les métaux. Tout ceci nous amène à étudier la réponse des cellules immunitaires telles que les macrophages murins de la rate utilisés ici comme cellules modèles du système immunitaire suite à une exposition à des métaux lourds.

Cet ouvrage est divisé en trois chapitres. Le premier chapitre se veut une revue de la littérature exposant l'état actuel des connaissances sur les métaux lourds et les macrophages pertinentes au projet de recherche. Le deuxième chapitre consiste en un article qui sera soumis pour publication. Tous les résultats présentés concernant les macrophages proviennent de mes travaux de recherche. L'article contenu dans le deuxième chapitre, présente les résultats de mes travaux et ceux de Mme Marlène Fortier dont le projet consistait à comparer les réponses obtenues chez les lymphocytes. Le troisième chapitre est une discussion générale de l'ensemble de mes résultats obtenus sur la réponse des macrophages murins exposés aux métaux lourds, qui mettra l'accent sur la signification des résultats par rapports aux données de la littérature et sur l'analyse de ces résultats dans leur ensemble. Les résultats qui n'ont pas été publiés sont présentés en annexe.

Chapitre 1

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Le système immunitaire

Le système immunitaire joue un rôle fondamental. Extrêmement complexe, il permet de réagir de façon appropriée à l'infinité d'antigènes différents et potentiellement pathogènes qui pénètrent dans l'organisme, et parfois l'envahissent. Les fonctions essentielles du système immunitaire sont tout d'abord la reconnaissance du soi et du non soi, puis le développement de réactions destinées à éliminer le non soi.

Le système immunitaire est un ensemble complexe de cellules d'organes et de molécules. Le système lymphoïde est composé d'organes lymphoïdes primaires (thymus, foie fœtal et moelle osseuse) et d'organes et tissus lymphoïdes périphériques (rate, ganglions lymphatiques et les formations associées aux muqueuses, plaques de Peyer et amygdales palatines) (Roitt, Brostoff et Male, 1997 : 32-39). Du point de vue des macrophages, la rate est peut-être l'organe le plus complexe, elle est riche en diverses populations de macrophages qui diffèrent en localisation, phénotype et fonctions (Gordon., 1999 : 538). Elle contribue à l'hématopoïèse, elle filtre une proportion substantielle du sang, elle capture de la circulation sanguine des particules et autres matériaux antigéniques et elle joue un rôle dans l'immunité naturelle, humorale et cellulaire (Gordon., 1999 : 538). C'est au sein des organes lymphoïdes périphériques qu'a lieu les rencontres entre cellules immuno-compétentes et antigènes pour initier la réponse immunitaire.

Les réponses immunitaires peuvent être classées en deux grandes catégories : les réponses immunitaires non spécifiques (immunité naturelle) et les réponses immunitaires spécifiques (adaptatives). Si un antigène traverse la première ligne de défense de l'organisme (la peau ou une muqueuse), il déclenche d'abord les phénomènes de l'immunité non spécifique (d'action immédiate), qui s'exerce de la même façon quel que soit l'antigène. Ces mécanismes agissent de façon précoce mais n'entraînent aucune protection de longue durée (Roitt, Brostoff et Male, 1997 : 2; Janeway, Travers et Travers P., 1997 : 1 :28). Les

cellules impliquées dans l'immunité naturelle sont les cellules phagocytaires telles que les monocytes, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles qui ont pour fonction de capter les microorganismes, de les internaliser puis de les détruire (Roitt, Brostoff et Male, 1997 : 2; Janeway et Medzhitov, 2002 : 199). Parfois, cette première réponse n'est pas suffisante et requiert des mécanismes de reconnaissances plus spécifiques d'un antigène pour obtenir une réponse immunitaire plus efficace et de plus longue durée. Ce sont les macrophages qui vont interagir dans un second temps avec les lymphocytes afin d'activer l'immunité spécifique. La réponse immunitaire spécifique (qui se développe en quelques jours) s'améliore à chaque nouveau contact avec l'antigène et garde la mémoire de l'agent infectieux pour empêcher son action pathogène lors d'un nouveau contact (Roitt, Brostoff et Male, 1997 : 2; Janeway et Medzhitov, 2002 : 200). L'antigène peut être reconnu de façon spécifique par le système immunitaire, c'est à dire soit par les lymphocytes T (ou cellules T), les lymphocytes B (ou cellules B) ou les deux. Les lymphocytes T et B ont des récepteurs de surface adaptés pour reconnaître les antigènes; les lymphocytes B reconnaissent les antigènes à l'extérieur de la cellule tandis que les lymphocytes T peuvent détecter les antigènes générés à l'intérieur de la cellule (Roitt, Brostoff et Male, 1997 : 7; Janeway, Travers et Travers P., 1997 : 1 :19). Les lymphocytes B produisent des anticorps qui participent à la défense de l'hôte de trois façons; par neutralisation, opsonisation et par l'activation du complément. L'immunité impliquant la production d'anticorps est référée à l'immunité humorale (Janeway, Travers et Travers P., 1997 : 1 :18-21). Les anticorps (Ac), aussi appelés immunoglobulines (Ig), ont tous la même structure de base mais ils diffèrent au niveau de la région qui se lie à l'antigène. Il existe cinq classes d'anticorps : IgM, IgG, IgA, IgD et IgE. Les anticorps interagissent avec les neutrophiles, les macrophages et autres cellules mononucléées par leur région Fc car ces derniers ont des récepteurs de région Fc à leur surface (Roitt, Brostoff et Male, 1997 : 7). Il existe trois types de récepteurs Fc des IgG exprimés sur les macrophages murins et humains : le RFcγI (CD64) humain a une haute affinité pour les IgG, le RFcγII (CD32) est d'affinité moyenne et le RFcγIII (CD16) a une faible affinité et se

trouve sur une sous-population de monocytes (Roitt, Brostoff et Male, 1997 : 24). Les lymphocytes T, quant à eux, reconnaissent des antigènes présentés à la surface d'autres cellules de l'hôte sous forme de petits fragments peptidiques venant de l'extérieur des cellules (Roitt, Brostoff et Male., 1997 : 7). L'interaction entre les lymphocytes T et les cellules de l'hôte dans la reconnaissance de l'antigène est appelée immunité cellulaire (Janeway, Travers et Travers P., 1997 : 1 :21-22). Les fragments d'antigènes sont présentés en association avec des molécules spécialisées dans cette fonction et codées par un ensemble de gènes, appelé complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les cellules T utilisent leurs récepteurs spécifiques d'antigène (TCR) pour reconnaître les peptides antigéniques associés à ces molécules du CMH (Roitt, Brostoff et Male, 1997 : 7). L'expression du CMH II est induite sur des macrophages stimulés immunologiquement et est utilisée comme marqueur d'activation (Stein et al., 1992 : 287). Il existe un lien étroit entre l'immunité naturelle et spécifique car les mécanismes effecteurs utilisés dans l'immunité naturelle sont essentiellement identiques à ceux activés au stade tardif de la réponse immunitaire adaptative pour éliminer les pathogènes (Janeway, Travers et Travers P., 1997 : 1 :28).

Les réponses immunitaires sont induites par différentes cellules et par les molécules qu'elles sécrètent. Les principales cellules impliquées dans les réactions immunitaires sont les lymphocytes (B, T et LGL), les phagocytes (monocytes, macrophages, neutrophiles, etc), et les cellules accessoires (basophiles, mastocytes, plaquettes, etc).

Une défense de l'hôte efficace contre les infections microbiennes dépend de la vitesse de reconnaissance et l'élimination du pathogène suivit de l'induction des réponses immunitaires appropriées (réponse innée et adaptative) (Linehan, Martinez-Pomares et Gordon., 2000 : 279). Les macrophages jouent un double rôle dans la défense de l'hôte. Ils forment la première ligne de défense dans la réponse immunitaire innée grâce à leur habileté à phagocyter et à tuer les microorganismes, mais ils agissent aussi comme cellules accessoires importantes dans la réponse immunitaire spécifique en attirant et activant d'autres types de cellules ayant un rôle critique dans la réponse (Ma et al., 2003 : 2335; Linehan,

Martinez-Pomares et Gordon, 2000 : 279). Le macrophage est une cellule clé du système de défense car il influence en partie tous les aspects de la réponse inflammatoire et immunologique et joue un rôle essentiel en liant l'immunité acquise et innée.

1.2 Les macrophages

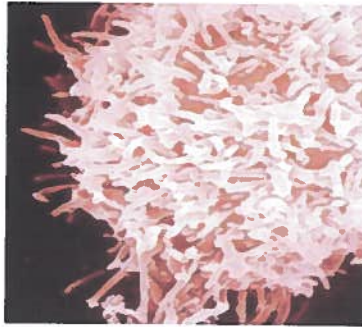


Photo d'un macrophage par microscopie à balayage

1.2.1 Différenciation et distribution

Les macrophages ont premièrement été reconnus par leur grande taille et leurs propriétés à phagocyter. Les macrophages font partie de la lignée des phagocytes mononucléés, ils jouent un rôle important dans le contrôle de la réponse immunitaire et dans la défense de l'hôte vis-à-vis des organismes (Virelizer et Arenzana-Seisdedos., 1985 : 149). En effet, les macrophages interviennent comme première ligne de défense, ils sont responsables de ralentir l'invasion des pathogènes par la phagocytose, ils sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) activant les cellules T (Zelikoff et al., 1994 : 1) et ils participent à la réponse inflammatoire (Unanue et Allen., 1987 : 551). Le développement des macrophages (ou phagocytes mononucléaires) prend naissance dans la moelle osseuse, ils sont dérivés de cellules souches, qui elles, à leur tour, donnent naissance à des monoblastes qui prolifèrent et se différencient en promonocytes, puis en monocytes matures circulants (Adams et Hamilton., 1984 : 286; Roitt, Brostoff et Male., 1997 : 3, 24; Ma et al., 2003 : 2334). Il y a environ 5×10^9 monocytes qui sont produit par jour, afin d'être exportés dans la circulation sanguine (Ma et al., 2003 : 2334). Les monocytes circulants migrent dans les différents tissus de l'organisme où ils se différencient en macrophages

tissulaires (Adams et Hamilton., 1984 : 283; Duffield., 2003 : 28). Suite à une inflammation et un stimulus immunitaire, plusieurs autres monocytes peuvent être recrutés sur le site et donnent lieu à des macrophages activés (Gordon., 1999 : 534). Les macrophages tissulaires ont une longue durée de vie (en terme d'années), ils peuvent localement démontrer une modeste prolifération contribuant ainsi à la maintenance de l'homéostasie des macrophages tissulaires (Ma et al., 2003 : 2334). Chez le fœtus, les macrophages tissulaires (matures) prolifèrent activement pendant le développement des organes. Tandis que chez l'adulte normal, les macrophages tissulaires ne se renouvellent pas largement sauf dans des micro-environnements spécialisés tels que dans les poumons ou au niveau de la glande hypophyse; suite à une lésion, il peut y avoir une prolifération considérable au site local d'inflammation (Gordon., 1999 : 535). La plupart des monocytes/macrophages produits par prolifération locale ou recrutés de la circulation sanguine dans les tissus périphériques, meurent par apoptose. S'ils reçoivent un signal de survit, ils peuvent se différencier et éventuellement, être activés avec ou sans signal de pré-activation (Ma et al., 2003 : 2335).

L'utilisation de l'antigène F4/80, qui est un composant de 160kD de la membrane plasmique des phagocytes mononucléaires, permet de détecter les macrophages en développement et de déterminer leur niveau de maturation et de distribution dans les tissus (Hume, Perry et Gordon., 1984 : 503; Gordon., 1999 : 536). L'antigène F4/80 est exprimé sur les macrophages et sur les précurseurs de macrophages, l'expression de cet antigène augmente pendant la maturation (Hume, Perry et Gordon., 1984 : 510; Adams et Hamilton., 1984 : 291). Par contre, F4/80 est exprimé à de faibles niveaux sur les macrophages activés et sur les éosinophiles (Adams et Hamilton., 1984 : 296).

1.2.2 Activation

Le concept d'activation cellulaire a été développé à partir d'observations de cellules en culture *in vitro* qui réagissaient à une variété de substances en altérant leurs propriétés biochimiques et leurs activités fonctionnelles. Plusieurs processus sont impliqués dans la stimulation des macrophages dont une

augmentation de la taille et du nombre de granules cytoplasmiques (Cruse et Lewis., 1995 :198). Un phagocyte mononucléaire activé par des lymphokines à une taille deux fois plus grosse que les macrophages au repos (Cruse et Lewis., 1995 : 4) Les fonctions vont aussi être altérées. On remarque un métabolisme plus actif ainsi qu'un transport des acides aminées et du glucose, une augmentation de l'activité enzymatique, de la prostaglandine, du GMPc, de l'activateur du plasminogène, du calcium intracellulaire, de la phagocytose, de la pinocytose et de la capacité à lyser les bactéries et les cellules cancéreuses (Cruse et Lewis., 1995 :198). Les macrophages tissulaires existent dans une variété d'états d'activation et ils sont impliqués dans tous les stades de la réponse immunitaire (Cohn., 1978 : 813). Ils assurent d'abord un mécanisme de protection rapide intervenant avant le développement de la réponse cellulaire T. Ils participent à l'initiation de celle-ci par la dégradation et la présentation de l'antigène. Les cellules T sont ensuite activées et produisent des lymphokines. Les macrophages activés deviennent alors des cellules effectrices ils interviennent comme cellules inflammatoires tumoricides et microbicides (Roitt, Brostoff et Male., 1997 : 116). En effet, les macrophages activés peuvent sécréter une série de médiateurs cytotoxiques tels le TNF, des enzymes lysosomales, des protéinases, des protéines cytotoxiques, des molécules du complément et des radicaux libres (Virelizer et Arenzana-Seisdedos., 1985 : 149).

La concanavaline A normalement connue comme un mitogène capable d'induire la prolifération chez les lymphocytes T peut également activer les macrophages. Les lectines sont des protéines généralement d'origine végétale qui se lient aux sucres mais que l'on retrouve également chez les animaux et les bactéries. Parmi les lectines connues, la concanavaline A extraite du haricot sabre, lie spécifiquement les résidus α -D-glucose et α -D-mannose (Voet et Voet, 1998 :258). La concanavaline A est un homotétramère à pH physiologique avec une masse moléculaire de 102.5 kDa (Suen et al., 2000 : 369). La ConA induit différentes réponses cellulaires en se liant par sa partie carbohydrate aux glycoprotéines et aux glycolipides situés sur la membrane plasmique de différents types de cellules (Suen et al., 2000 : 369).

1.2.2.1 Pré-activation

La pré-activation est une première étape très efficace avant une activation complète, la cellule est préparée par une insulte initiale et elle est prête lors d'une insulte subséquente (Ma et al., 2003 : 2336). Cependant, la cellule pré-activée, n'a pas le phénotype d'une cellule activée et par conséquent ne produit pas de cytokines pro-inflammatoires ou autres médiateurs cytotoxiques (Ma et al., 2003 : 2336). Les macrophages tissulaires sont souvent pré-activés avant de subir l'activation classique ou ils subissent une activation alternative (Ma et al., 2003 : 2335). L'activation est toujours accompagnée par la désactivation ou par la mort cellulaire (Ma et al., 2003 : 2335).

1.2.2.2 Activation classique type 1

La compréhension de l'activation classique des macrophages remontent aux années 60 et provient d'études qui montrent que l'infection des souris avec *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) ou *Listeria monocytogenes* accroît l'activité antimicrobienne des macrophages de façon antigène-non-spécifique (Gordon., 2002 : 23). Plusieurs facteurs peuvent amener les macrophages vers un phénotype d'activation classique. En effet, en présence de cellules ou cytokines de type Th1 (cytotoxicité et inflammation), les macrophages sont activés ou amenés à devenir des cellules effectrices où la capacité à tuer les microorganismes intracellulaires est augmentée (Erwing et al., 1998 : 1983; Duffield., 2003 : 28; Ma et al., 2003 : 2336). L'IFN- γ semble être le stimulus le plus important dans l'activation des macrophages (Ma et al., 2003 : 2336). L'IFN- γ induit l'expression des molécules du CMH II et les récepteurs Fc γ , augmente la respiration oxydative et la libération de TNF, augmente la production de cytokines pro-inflammatoires, diminue sélectivement l'activité du récepteur mannose (Bonecchi et al., 2000 : 3862; Gordon., 2002 : 27). Par contre, ce ne sont pas toutes les cytokines qui amènent les macrophages à être activés classiquement.

Lors de l'inflammation, il y a une augmentation des cellules en apoptose au site d'inflammation. Certaines de ces cellules apoptotiques sont des neutrophiles, beaucoup sont dérivées du tissu inflammé lui-même, incluant les cellules stromales et parenchymales (Duffield., 2003 : 29). Le macrophage activé classiquement, tue les cellules stromales et parenchymales résidentes par apoptose (Duffield., 2003 : 30). Apparemment, les macrophages activés classiquement, sont également capables de réguler d'autres populations de leucocytes inflammatoires en induisant l'apoptose chez les neutrophiles et les lymphocytes (Duffield., 2003 : 30). Les macrophages ont un arsenal de cytokines et de radicaux libres ayant des propriétés pro-apoptotiques sur différentes cellules (Duffield., 2003 : 30). Les macrophages activés classiquement sont aussi responsables de la destruction de la matrice qui supporte l'architecture cellulaire (Duffield., 2003 : 31).

1.2.2.3 Activation alternative type 2

L'activation alternative des macrophages par l'IL-4 et l'IL-13 est beaucoup moins définie. Ces cytokines sont généralement produites dans des réponses de type Th2 (anticorps et défense anti-parasitaire), particulièrement dans les allergies, les réponses cellulaires et humorales aux parasites et pathogènes extracellulaires (Loke et al., 2002 : 7; Gordon., 2002 : 23). L'activation de type 2 est une activation alternative en présence d'IL-4 et d'IL-13 qui signalent aux macrophages en partie par un récepteur commun, IL-4R α (Gordon., 2002 : 27; Ma et al., 2003 : 2337). L'IL-4 et l'IL-13 ont pour effet d'induire l'expression des molécules du CMH II et d'augmenter le niveau d'activité des récepteurs mannoses des macrophages dans le but d'accroître les mécanismes d'apprêtement et de présentation des antigènes (Stein et al., 1992 : 287; Goerdts et al., 1999 : 223; Bonecchi et al., 2000 : 3862; Gordon., 2002 : 27; Ma et al., 2003 : 2337). Contrairement à l'activation de type classique, les macrophages activés alternativement démontrent une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, une génération des cytokines anti-inflammatoires et ils sont

résistants à la ré-activation (Erwing et al., 1998 : 1983; Bonecchi et al., 2000 : 3862; Loke et al., 2002 : 8; Duffield., 2003 : 29).

Les macrophages activés alternativement *in vitro* peuvent induire des cellules stromales à proliférer (Duffield., 2003 : 32). D'autres études ont démontré que les macrophages ou au moins une population de macrophages au site d'inflammation sont responsables de la génération des composantes de la matrice (Duffield., 2003 : 31).

1.2.2.4 Désactivation

La désactivation des macrophages est un processus actif et contrôlé, elle peut être atteinte avec des cytokines anti-inflammatoires, telle que l'IL-10 (Ma et al., 2003 : 2337). L'apoptose est aussi un processus de désactivation des macrophages car elle permet de retirer les cellules inflammatoires du site d'inflammation (Ma et al., 2003 : 2335).

1.2.2.5 Activation classique vs activation alternative

Les macrophages inflammatoires et les macrophages résidents sont capables de phagocyter les débris, les microorganismes et les particules opsonisées. Ils jouent aussi un autre rôle dans les tissus inflammés, ils éliminent les cellules apoptotiques. Les macrophages limitent les dégâts de l'inflammation en éliminant rapidement les cellules apoptotiques, tel les neutrophiles (Savill et al., 1989 : 865). Lorsque les macrophages ingèrent des particules opsonisées ou autres pathogènes cela déclenche une réponse inflammatoire, contrairement à l'ingestion de cellules apoptotiques (Duffield., 2003 : 32). En effet, il a été démontré que l'ingestion de cellules apoptotiques par les macrophages engendre la désactivation de ceux-ci (Duffield., 2003 : 32). Plusieurs études *in vitro* ont démontrées que l'ingestion de cellules apoptotiques par les macrophages (qui peuvent être des neutrophiles, lymphocytes ou cellules stromales), les rendent réfractaires à la production de médiateurs pro-inflammatoires (Duffield., 2003 : 32; Duffield et al., 2001 : 1397; Fadok et al., 1998 : 890; Voll et al., 1997 : 350). Les deux types d'activation sont nécessaires à la limitation des dommages et à la

guérison d'un tissu inflammé. L'ingestion de cellules apoptotiques par les macrophages classiquement activés déclenche un signal permettant de changer leurs propriétés destructrices en des propriétés plutôt réparatrices (macrophages classiquement activés).

1.2.3 L'apoptose

Il y a déjà plus de 30 ans, qu'il a été rapporté que les cellules pouvaient mourir par suicide cellulaire programmé. Cette auto-destruction, qualifiée d'apoptose, s'amorce dans les cellules endommagées, devenues inutiles, voire dangereuses pour l'organisme. L'apoptose est considérée comme une mort cellulaire « ordonnée », procédant par différentes phases soit une phase d'induction, une phase de régulation et une phase effectrice (Laucat., 2000 : 136; Ségal-Bendirdjian., 1999 : 376). L'un des aspects morphologiques caractéristiques de l'apoptose est l'importante condensation à la fois du noyau et du cytoplasme ce qui induit une diminution significative du volume cellulaire. La membrane plasmique va bourgeonner et conduire à la formation de corps apoptotiques par les phagocytes, la cellule va signaler son état apoptotique à son environnement notamment grâce au changement de localisation des molécules de phosphatidylsérines qui passent d'une orientation cytoplasmique vers une orientation extracellulaire (Duffield., 2003 : 29; Laucat., 2000 : 136; Ségal-Bendirdjian., 1999 : 376). L'un des points majeurs de l'apoptose est que l'intégrité de la membrane plasmique n'est jamais altérée au cours du processus, ce qui permet d'éviter tout déversement du contenu cellulaire et ainsi prévenir tout dommage infligé aux tissus alentours (Duffield., 2003 : 29; Laucat., 2000 : 136; Ségal-Bendirdjian., 1999 : 376). Par opposition à l'apoptose, la nécrose est considérée comme une mort cellulaire « désordonnée ». En effet au cours de la nécrose, les cellules vont se gorger d'eau ce qui va entraîner la lyse de leur membrane plasmique. Cette véritable explosion cellulaire conduit au relargage dans le milieu environnant du contenu cytoplasmique. Les organelles vont elles aussi avoir tendance à gonfler. L'ADN nucléaire va être dégradée de manière

aléatoire par des endonucléases activées notamment par des protéases (Laucat., 2000 : 136; Ségal-Bendirdjian., 1999 : 376).

1.2.4 La phagocytose

La phagocytose est un processus qui a été conservé au cours de l'évolution, utilisé par plusieurs cellules pour ingérer des pathogènes microbiens, des corps apoptotiques ou nécrotiques. C'est un processus critique pour l'immunité innée, par lequel les leucocytes et autres cellules ingèrent des particules qui ont une taille excédant environ 1 μ m (Greenberg et Grinstein., 2002 : 136). Les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques sont des phagocytes spécialisés. Les monocytes (précurseurs des macrophages) sont souvent inclus parmi les phagocytes professionnels, toutefois, ils ont une réponse phagocytaire réduite par rapport aux neutrophiles et aux macrophages (Garcia-Garcia et Rosales., 2002 : 1092; Gordon., 2002 : 927). Ces cellules présentatrices d'antigènes (CPA), expriment une grande variété de molécules à leur surface leur permettant de reconnaître les pathogènes potentiels avant l'engouffrement et de participer à la signalisation intracellulaire (Gordon., 2002 : 927). Il existe deux classes de récepteurs localisés à la surface des cellules permettant la phagocytose, les récepteurs opsoniques et non-opsoniques (Linehan, Martinez-Pomares et Gordon., 2000 : 279). Les récepteurs opsoniques reconnaissent les composantes du sérum, qui vont se déposer sur les microorganismes. Les plus connus sont les récepteurs Fc qui interagissent avec les immunoglobulines et les récepteurs qui reconnaissent le complément (Linehan, Martinez-Pomares et Gordon., 2000 : 279). L'induction de la phagocytose via ces récepteurs dépend donc de la spécificité des immunoglobulines pour l'antigène, et l'activation appropriée du complément (Linehan, Martinez-Pomares et Gordon., 2000 : 279). Les récepteurs non-opsoniques, peuvent par eux-mêmes distinguer les cellules et les molécules inoffensives des microorganismes ou de leurs composantes sécrétées potentiellement dangereuses (Linehan, Martinez-Pomares et Gordon., 2000 : 279). Parmi ceux-ci il y a le récepteur mannose qui reconnaît les résidus spécifiques des sucres à la surface des microorganismes (Adams et Hamilton., 1984 : 295; Garcia-

Garcia et Rosales., 2002 : 1092). Le récepteur mannose est l'un des récepteurs à lectines exprimé par les macrophages le mieux caractérisé et qui est impliqué dans la défense de l'hôte. L'affinité du récepteur mannose pour les oligosaccharides est déterminée par les résidus terminaux et a été démontrée pour être : L-fucose > D-mannose ≥ D-N-acetyl-glucosamine >>> D-galactose (Stahl et al., 1978 : 1399; Linehan, Martinez-Pomares et Gordon., 2000 : 282). Une fois le système activé, la cellule phagocytaire entoure le pathogène de pseudopodes qui fusionnent, permettant ainsi l'endocytose de celui-ci dans un phagosome (Roitt, Brostoff et Male., 1997 : 9). Ensuite, la fusion du phagosome avec les lysosomes conduit à la digestion du contenu par les enzymes lysosomiales (Roitt, Brostoff et Male., 1997 : 9; Garcia-Garcia et Rosales., 2002 : 1092).

1.3 L'immunotoxicité

Le système immunitaire est constamment exposé à des produits toxiques qui peuvent altérer les fonctions et la réponse immunitaire. On distingue quatre grandes catégories de manifestations immunotoxiques : l'immunosuppression, l'hypersensibilité, l'auto-immunité et les syndromes d'activation et d'hyperéosinophilie (Kouassi et al, 2003 : 691).

L'immunosuppression engendrée par des xénobiotiques, se remarque généralement par une diminution de la résistance vis-à-vis des infections microbiennes, virales et parasitaires (Kouassi et al, 2003 : 691).

Les xénobiotiques et les médicaments sont susceptibles d'induire des réactions d'hypersensibilité (allergies), la substance chimique ou ses produits de biotransformation jouant le rôle d'haptène. Les réactions allergiques résultent alors d'une seconde exposition au même antigène ou à des expositions ultérieures (Kouassi et al, 2003 : 692). Les réponses d'hypersensibilités ont été divisées en quatre catégories basées sur le mécanisme immunitaire impliqué. Le type I ou réaction anaphylactique implique les IgE (dans le cas de l'humain) qui par leur liaison aux récepteur Fcε des mastocytes induit des réactions allergiques (Zelikoff et al., 1993 : 1). Une exposition subséquente à l'allergène active les mastocytes à relâcher ou générer des médiateurs chimiques ayant des propriétés inflammatoires

(Zelikoff et al., 1993 : 1). Les organes cibles impliqués dans les réactions de type I sont le tractus gastro-intestinal, la peau, les poumons et la vascularisation (Zelikoff et al., 1993 : 1). Les réactions de type II, généralement associées avec les réactions auto-immunes, sont générées par les IgG et les IgM. Les anticorps dirigés contre des antigènes portés par des cellule cibles ou contre des antigènes étrangers, comme des globules rouges transfusés lient par les récepteur Fc situés à la surfaces des cellules effectrices telle que les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles et des cellules K, induisent un phénomène de cytotoxicité ou une lyse dépendant du complément (Zelikoff et al., 1993 : 2; Roitt, Brostoff et Male., 1997 : 289). Les réactions de type III arrivent lorsque des complexes immuns se déposent dans les tissus, activent le complément et attirent les polynucléaires qui produisent des lésions locales (Zelikoff et al., 1993 : 2; Roitt, Brostoff et Male., 1997 : 289). Les réactions de type IV arrivent lors d'un second contact avec l'antigène, les lymphocytes T sensibilisés libèrent des lymphokines. Celles-ci induisent une réaction inflammatoire, attirent et activent les macrophages qui libèrent des médiateurs (Zelikoff et al., 1993 : 2; Roitt, Brostoff et Male., 1997 : 289).

Les maladies auto-immunes provoquées par des xénobiotiques sont la conséquence d'une dérégulation du système immunitaire consistant en une réponse dirigée contre les constituants du «soi» (Kammüller et al, 1989; Kouassi et al, 2003 : 692).

Au cours de la première injection de certains anticorps monoclonaux ou lors de traitements par l'IL-2 recombinantes à fortes doses ou suite à une intoxication par certaines toxines bactériennes qui contaminent accidentellement les aliments ou l'eau de consommation, il est possible d'observer un syndrome d'activation accompagné d'hyperthermie, de malaise, de diarrhée, de fuite capillaire avec œdème cérébral et pulmonaire (Kouassi et al, 2003 : 694). Parmi les contaminants de l'environnement reconnus pour leur toxicité et retrouvés à l'échelle mondiale, les métaux lourds sont certainement au centre des préoccupations.

1.4 Les métaux lourds

Les métaux lourds sont des polluants largement répandus dans l'environnement et l'humain y est fréquemment exposé. Pendant de nombreuses années, les industries situées à proximité de cours d'eau ont rejeté leurs effluents dans ceux-ci. A ce phénomène (de plus en plus limité par l'installation de station d'épuration au sein même des sites industriels), il faut ajouter l'érosion et le ruissellement de l'eau sur les sols et chaussées. L'eau constitue un élément fondamental en matière de pollution, puisque dans le cas des métaux, comme pour d'autres composés, celle-ci va favoriser de nombreuses réactions chimiques. L'eau transporte les métaux lourds, et les inserts dans la chaîne alimentaire (algues, poissons, etc.). L'industrialisation et la pratique intensive de l'agriculture ont considérablement augmentées la concentration environnementale des métaux, comme dans le cas du cadmium, à un point tel que les niveaux dangereux sont certainement atteints dans un nombre croissant d'écosystèmes (Foulkes., 2000 : 234). Les principales voies d'exposition aux métaux lourds se font par l'inhalation de l'air ambiant, par l'ingestion de nourriture et d'eau et possiblement par l'absorption à travers la peau (Jonnalagadda et Prasada Rao., 1993 : 585). Les données épidémiologiques sur des cohortes humaines et les études sur des animaux de laboratoire exposés à ces produits chimiques révèlent que les métaux lourds peuvent affecter plusieurs systèmes physiologiques dont le système immunitaire.

La toxicité des métaux lourds va être influencée par plusieurs facteurs dont les interactions avec les métaux essentiels, la formation de complexes métaux-protéines, l'âge et le stade de développement de l'individu, les habitudes de vie, la spéciation du métal et le statut du système immunitaire de l'hôte (Goyer., 2001 : 693). L'interaction d'un métal toxique avec un métal essentiel se produit lorsque le métal toxique est métabolisé de façon similaire au métal essentiel (Goyer., 2001 : 693). Les complexes métal-protéine sont impliqués dans la détoxification ou la protection contre la toxicité des métaux lourds. De cette façon, les métallothionéines forment des complexes avec le cadmium, le zinc, le cuivre et d'autres métaux (Goyer., 2001 : 693). Les jeunes enfants et les personnes âgées

sont beaucoup plus susceptibles que les adultes à la toxicité résultant d'une exposition à des niveaux particulier de métaux (Goyer., 2001 : 693). Les habitudes de vie tel que consommer de l'alcool ou fumer la cigarette peuvent influencer indirectement la toxicité des métaux. En effet, la fumée de cigarette contient des métaux toxiques comme le cadmium. La consommation d'alcool peut influencer la toxicité des métaux en modifiant la diète et en réduisant la quantité de minéraux essentiel assimilés (Goyer., 2001 : 693). La forme chimique ou la spéciation des métaux est un facteur important en termes de distribution des métaux dans l'organisme et l'effet toxique de ceux-ci (Goyer., 2001 : 693). Le statut du système immunitaire de l'hôte est une autre variable toxicologique qui entre en ligne de compte lorsque le métal produit des réactions immunitaires telles que des réactions d'hypersensibilité (Goyer., 2001 : 693). De plus, les activités immunomodulatoires engendrées par des agents environnementaux sont grandement influencées par la génétique des animaux exposés. En effet, les rats Brown Norway sont susceptibles de développer des réactions auto-immunes induites par le mercure tandis que les rats Lewin sont résistants mais beaucoup plus susceptibles face aux immunosuppressions engendrées par le mercure (Lawrence et McCabe Jr. 2002 : 296).

Les métaux lourds modifient l'immunocompétence des cellules par une variété de mécanismes. Dépendamment du métal, de la concentration et de la biodisponibilité de celui-ci, la modification peut être soit immunostimulante ou immunosuppressive (Lawrence et McCabe., 2002 : 293). Le système immunitaire est crucial pour la protection de l'hôte contre les agents infectieux et les néoplasmes. Une augmentation ou une diminution de n'importe quelle fonction immunitaire peut, potentiellement, détruire l'équilibre nécessaire à l'immunorégulation et ainsi produire une cascade d'événements secondaires incluant la résistance de l'hôte compromise, des dommages aux tissus ou aux organes (Zelikoff et al., 1993 : 3). Certains métaux lourds (mercure, cadmium, plomb) possèdent des propriétés immunosuppressives qui proviennent en partie de leurs effets cytotoxiques, par induction d'apoptose ou de nécrose dans les cellules du système immunitaire, entraînant une diminution de la résistance aux infections

(Kouassi et al, 2003 : 692). L'immunotoxicité des métaux lourds se fait de deux façons majeures. Les polluants augmentent l'immunoréactivité directement par des effets produits sur des cellules immunitaires spécifiques ou indirectement via des effets produits sur l'immunorégulation (Lawrence., 1985 : 341; Zelikoff et al., 1994 : 1). Les effets indirects sur la régulation amène le développement de réactions allergiques (réactions d'hypersensibilités) ou des réponses auto-réactives inappropriées résultant dans le développement de désordres auto-immuns (Lawrence, 1985 : 341; Zelikoff et al., 1994 : 1). De plus, l'exposition aux métaux lourds peut supprimer les mécanismes de défense immunitaires dont les conséquences vont mener à une augmentation de la susceptibilité de l'hôte aux agents infectieux et/ou au développement de cancers (Lawrence, 1985 : 341; Schuppe et al., 1998 : 149; Zelikoff et al., 1994 : 1). Quand l'équilibre qui empêche un individu d'avoir une réponse immunitaire contre le «soi» devient perturbée, une réponse immunitaire inappropriée auto-réactive est observée. Cette réponse auto-immune peut se manifester par la production d'anticorps dirigés contre le «soi» ou contre le «soi» modifié ou par la destruction des tissus par les cellules T ou les macrophages (Zelikoff et al., 1993 : 2). Les maladies auto-immunes ne sont pas seulement produites par une réponse immunitaire dirigée contre les protéines du «soi» mais peuvent aussi être engendrées par la liaison des polluants aux tissus ou aux protéines du sérum. En effet, la liaison des polluants aux protéines (hapténisation) est le mécanisme le plus probable par lequel les métaux lourds vont engendrer une sensibilisation de l'hôte (Zelikoff et al., 1993 : 2). Avec les années plusieurs métaux lourds ont été associés avec l'induction de désordres auto-immuns, parmi ceux-ci l'or et le mercure ont beaucoup été étudié. Le mécanisme exact par lequel l'auto-immunité se produit chez un individu n'est pas clair, beaucoup de théories incluant le relâchement d'antigènes séquestrés, la diminution de la fonction des cellules T suppressives, l'augmentation de l'activité des cellules T-helper (Th) ont été proposées pour expliquer les origines de l'auto-immunité (Zelikoff et al., 1994 : 2; Roitt, Brostoff et Male., 1997 : 164).

Les cellules T réagissent seulement aux antigènes présentés sous forme de peptides linéaires liés aux molécules du CMH II situé à la surface des cellules

présentatrices d'antigènes (CPA). Il a donc été proposé que les métaux se lient aux molécules du CMH ou au peptide présenté dans la niche peptidique du CMH et que ces complexes seraient reconnus par les cellules T. Les ions des métaux peuvent de cette façon altérer les processus physiologiques et la présentation des protéines du soi et les peptides causant ainsi des cellules T auto-réactives (Schuppe et al., 1998 : 149). D'autres études *in vitro* suggèrent que certains métaux sous forme de sels sont capables d'induire des signaux de co-stimulation afin d'activer les cellules T, ils peuvent aussi induire la production de cytokines pro-inflammatoires ou affecter directement les mécanismes des récepteurs des CPA servant de médiateurs pour l'endocytose (Schuppe et al., 1998 : 149).

Les isoformes variés des protéines kinases C (PKC) font partie de la famille des sérine-thréonine kinases qui jouent un rôle important dans la signalisation intracellulaire. En effet, elles régulent beaucoup de processus cellulaires essentiels incluant la différenciation, l'apoptose, l'expression des gènes, la réponse immunitaire, la production d'hormones et de neurotransmetteurs et la fonction des transporteurs, des récepteurs et des canaux ioniques (DeMoor et Koropatnick., 2000 :370). Les métaux lourds peuvent altérer l'activité des isoformes des PKC. Il a été noté que de faibles doses (de l'ordre du micromolaire) de plomb et de méthylmercure inhibaient les PKC partiellement purifiées de cerveau de rat (DeMoor et Koropatnick., 2000 :370). De plus, une concentration de 10 μ M de Pb²⁺, Cd²⁺ et Zn²⁺ inhibait la phosphatidylserine/Ca²⁺ qui induit l'activité de la PKC α purifiée (DeMoor et Koropatnick., 2000 :370).

1.4.1 Les Thiols

1.4.1.1 Le glutathion (GSH)

Les métaux lourds tels que le mercure et le cadmium ont une forte affinité pour les groupements thiols et peuvent donc perturber les fonctions métaboliques des cellules (Hultberg, Andersson et Isaksson., 1998 : 203; Foulkes, 2000 : 234). En effet, les ions des métaux peuvent réagir avec les groupements thiols (cystéines) des protéines qui sont impliquées au niveau de la fonction de plusieurs enzymes, de la structure des protéines et des récepteurs (Hultberg, Andersson et

Isaksson., 1998 : 204). Les cellules des mammifères ont développé des mécanismes afin de minimiser les effets toxiques induits par une variété de produits chimiques et de produits oxydatifs normaux provenant du métabolisme cellulaire (Reed., 1990 : 603). La protection de la cellule face à un stress peut être accomplie de deux façons, soit en utilisant un système enzymatique ou en utilisant un système non-enzymatique. La superoxide dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) sont considérées comme des enzymes primaires anti-oxydantes tandis que le glutathion, N-acétylcystéine, les thiols, les vitamines C, A et E et les métallothionéines (MT) sont des petites molécules non-enzymatiques anti-oxydantes (Sugiyama., 1994 : 1). Le cycle d'oxydo-réduction du glutathion est un important mécanisme endogène de protection. Le glutathion (GSH) est un tripeptide retrouvé dans toutes les formes de vie aérobiques et est présent en grande concentration (de l'ordre du millimolaire) dans les cellules des mammifère, il existe sous deux formes, soit la forme réduite (GSH) ou la forme oxydée (GSSG) (Hultberg, Andersson et Isaksson., 2001 : 93 ; Reed., 1990 : 603; Meister et Anderson., 1983 : 715). Les cellules eucaryotes possèdent trois réservoirs majeurs de glutathion, 90% du glutathion cellulaire est retrouvé dans le cytosol, 10% dans les mitochondries et une faible proportion dans le réticulum endoplasmique (Lu., 1999 : 1169). Il est normalement le thiol intracellulaire le plus répandus, il est impliqué directement ou indirectement dans plusieurs phénomènes biologiques importants, incluant la synthèse des protéines et de l'ADN, l'activité enzymatique, le métabolisme, la protection des cellules et la modulation de la prolifération cellulaire (Meister et Anderson., 1983 : 712; Lu., 1999 : 1169). Le glutathion protège les cellules contre les dommages reliés au stress oxydatif, aux radicaux libres et tout autre type de toxicité (Hultberg, Andersson et Isaksson., 2002 : 103). Il est synthétisé à partir du glutamate, de la cystéine et de la glycine par l'action séquentielle des enzymes γ -glutamylcystéine synthétase et glutathion synthétase (Hultberg, Andersson et Isaksson., 2001 : 93; Lu., 1999 : 1169; Reed., 1990 : 604; Meister et Anderson., 1983 : 721). La fonction primaire du cycle γ -glutamylcystéine, est de fournir continuellement une

source de cystéine car la disponibilité de la cystéine est le facteur limitant dans la synthèse du glutathion (Hultberg, Andersson et Isaksson., 2001 : 93).

Plusieurs facteurs différents peuvent changer le contenu intracellulaire en GSH, tels que la présence de métaux lourds, de fortes concentrations de glucose et les chocs thermiques (Dickinson et Forman., 2002 : 1021). En effet, il a été démontré que la production de glutathion est stimulée par la présence d'agents qui forment des complexes avec celui-ci, comme par exemple, le mercure et les quinones (Hultberg, Andersson et Isaksson., 2001 : 94). De plus, la réponse cellulaire face à un stress implique souvent des changements dans le contenu intracellulaire en glutathion, qui sera premièrement consommé dans la réaction visant à éliminer le composé nocif et ensuite remplacer soit par la réduction enzymatique (GSSG transformé en GSH) ou par la synthèse *de novo* (Dickinson et Forman., 2002 : 1019). Le contenu intracellulaire en glutathion est défini par la balance entre l'utilisation et la synthèse (Dickinson et Forman., 2002 : 1021). Une diminution de 20 à 30% du niveau total de glutathion peut affaiblir la défense de la cellule contre l'action toxique de composés et induire ainsi des lésions et la mort cellulaire (Reed., 1990 : 603). Dans une étude, il a été démontré que l'effet principal des ions du mercure et du cadmium sur une lignée cellulaire était une forte augmentation de la synthèse du glutathion (Hultberg, Andersson et Isaksson., 1998 : 209).

1.4.1.2 Les métallothionéines (MTs)

La métallothionéine est une autre molécule qui protège les cellules de la toxicité des métaux; c'est une protéine riche en cystéine qui se lie avec avidité à plusieurs métaux lourds (Hultberg, Andersson et Isaksson., 1998 : 204). Cette protéine a été isolée pour la première fois en 1957 dans le cortex des reins de chevaux et fut définie comme étant un composé contenant du cadmium et du zinc (Vallee et Falchuk., 1993 : 86). Elle est composée de 61 à 68 acide aminée incluant 20 cystéines et ayant un poids moléculaire compris entre 6000 et 7000 Da (Cosson., 1992 : 50; Vallee et Falchuk., 1993 : 86; Miles et al., 2000 : 37; Coyle et al., 2002 : 627). Il y a quatre isoformes de la MT. MT-1 et MT-2 sont des

isoformes ayant une vaste distribution dans les tissus, plus particulièrement le foie, le pancréas, l'intestin et les reins tandis que MT-3 et MT-4 sont retrouvés principalement dans le cerveau et la peau (Davis et Cousins., 2000 : 1085). Détectées dans tous les tissus des vertébrés étudiés, elles atteignent des concentrations maximales dans le foie, les reins et l'intestin (Cosson., 1992 : 50; Coyle et al., 2002 : 628). Certains types cellulaires en semblent cependant dépourvus : les cellules conjonctives, les cellules de l'endothélium vasculaires et certains leucocytes (Cosson., 1992 : 50). Les métallothionéines sont des protéines cytoplasmiques, mais elles ont aussi été détectées dans les noyaux de cellules hépatiques ou rénales (Cosson., 1992 : 50; Miles et al., 2000 : 43). Dans le compartiment extracellulaire, elles se rencontrent dans le plasma, l'urine et la bile (Cosson., 1992 : 50).

Il est fréquemment dit que leur rôle biologique primaire reste une énigme mais l'induction possible de leur synthèse par différents éléments, en particulier certains métaux lourds, est l'une des caractéristiques des MT qui leur a valu l'intérêt de nombreux chercheurs (Coyle et al., 2002 : 630). Également, le rôle protecteur des MT vis-à-vis des métaux toxiques est admis depuis longtemps. Les ions métalliques divalents sont liés aux cystéines dans des structures tétraédriques et leur affinité pour les sites de fixation de la MT varie. La stabilité de la liaison avec le cuivre est 100 fois plus élevée que celle avec le cadmium, elle-même 1000 fois plus forte que celle avec le zinc; le mercure et l'argent ont une affinité pour la MT plus grande que celle du cuivre (Cosson., 1992 : 51; Miles et al., 2000 : 37). Lorsque les métaux toxiques (Cd, Ag ou Hg) pénètrent à l'intérieur de la cellule, il y a une compétition entre tous les ions métalliques (Cu, Zn, Cd, Ag, Hg) pour tous les ligands intracellulaires dont des métalloprotéines parmi lesquelles la MT en plus ou moins grande abondance (Cosson., 1992 : 53).

1.4.2 Le stress oxydatif

Certains métaux tels que le chromium, le nickel, le cadmium et le mercure ont été rapportés être des agents potentiellement carcinogènes et/ou toxiques chez les humains et les animaux (Sugiyama., 1994 : 1). De plus, ces métaux produisent

des dommages à l'ADN et induisent la peroxydation des lipides *in vitro* et *in vivo* (Sugiyama., 1994 : 1). Des études ont démontrées que la génération de radicaux libres tels que les espèces réactives de l'oxygène, qui sont bien connues pour produire un grand nombre d'effets toxiques, sont impliqués au moins en partie, dans le processus de carcinogenèse et de toxicité des métaux lourds (Sugiyama., 1994 : 1). Les espèces réactives de l'oxygène sont très nocives car elles ont le potentiel de causer des lésions importantes aux cellules. En effet, elles peuvent engendrées des dommages considérables à l'ADN en modifiant les bases ou en coupant les brins d'ADN, elles altèrent l'activité des enzymes et cause la peroxydation des lipides (Sugiyama., 1994 : 1). Parmi les espèces réactives de l'oxygène, $\bullet\text{OH}$ est particulièrement réactif et il est formé via la réaction de Fenton et/ou de Haber-Weiss tels que décrites par Sugiyama (Sugiyama., 1994 : 1). Plusieurs métaux carcinogènes ont été rapportés pour réagir avec des espèces réactives de l'oxygène utilisant les réactions de Fenton/Haber-Weiss pour produire $\bullet\text{OH}$ (Sugiyama., 1994 : 2). Le système de défense cellulaire antioxydant, en éliminant les radicaux libres, joue un rôle important dans la protection contre la toxicité des métaux lourds.

1.4.3 Cadmium

Le cadmium est un métal très toxique et l'exposition de l'humain au cadmium est de façon générale augmentée. Les vapeurs de cadmium sont oxydées rapidement pour produire de l'oxyde de cadmium dans l'air. En présence de gaz réactifs tels que le dioxyde de carbone, les vapeurs d'eau, le dioxyde de soufre ou le chlorure d'hydrogène, les vapeurs de cadmium réagissent pour produire du carbonate de cadmium, de l'hydroxyde de cadmium, du dichlorure de cadmium ou du sulfate de cadmium (Jonnalagadda et Prasada Rao., 1993 : 586). La plupart des sels de cadmium sont pratiquement insolubles dans l'eau mais peuvent être transformés en produits solubles dans la nature sous l'influence de l'oxygène et des acides (Jonnalagadda et Prasada Rao., 1993 : 585). Le cadmium est rejeté dans l'environnement par des sources naturelles et industrielles. Les réserves d'eau potable sont contaminées par le cadmium à cause de la pollution provenant

des opérations minières et métallurgiques sur le minerais de zinc, de cuivre et de plomb, ainsi que la fabrication des pigments pour la peinture et le plastique, des alliages dans les véhicules automobiles, l'utilisation de fertilisant conventionnel à base de phosphate et les fertilisants composés de boues commerciales (Goyer, 2001 : 691; Leffel et al., 2003 : 233). La plupart du cadmium rejeté dans l'eau par des sources industrielles est rapidement adsorbé par des particules de matière où il va se déposer ou rester en suspension dépendamment des conditions locales (Jannalagadda et Prasada Rao, 1993 : 585). Le cadmium dissous se retrouve donc à de faibles concentrations même dans l'eau corporelle des organismes qui transportent de grandes quantités de métal (Jannalagadda et Prasada Rao, 1993 : 585). La plus grande partie du cadmium trouvée dans les mammifères, les oiseaux et les poissons est de forme inorganique et probablement liée aux protéines (Jannalagadda et Prasada Rao, 1993 : 585). Le cadmium tend à s'accumuler dans les viscères des vertébrés, spécialement dans le foie et dans les reins et les concentrations sont généralement plus élevées chez les organismes plus âgés (Jannalagadda et Prasada Rao, 1993 : 587). Au Japon, la maladie Itai-itai, qui est caractérisée par de multiples dysfonctionnements du tubule rénal, c'est produite lors d'un déchargement de cadmium dans une rivière provenant d'une mine (Sugiyama., 1994 : 8). En effet, quand les concentrations de cadmium dans les reins sont élevées, il y a apparition de dysfonctionnements tubulaires rénales manifestées par une augmentation de cadmium dans l'urine (Goyer, 2001 : 691; Jannalagadda et Prasada Rao, 1993 : 585; Zelikoff et al., 1994 : 1). Plus il y a de cadmium dans les reins ou le foie, plus le dysfonctionnement tubulaire rénale est sévère. Lorsque l'exposition est continue, le dysfonctionnement peut progresser en néphropathie interstitielle chronique qui n'est pas un processus réversible ou au mieux peut être réversible en partie tout dépendant du niveau de sévérité (Zelikoff et al., 1993 : 3). L'absorption du cadmium est augmenté par des déficiences en calcium et en fer par des diètes faibles en protéines. Les diètes faibles en calcium stimulent la synthèse de protéines qui lient le calcium et qui augmentent l'absorption du cadmium (Goyer., 2001 : 700). De plus, une déficience en fer augmente considérablement l'absorption du cadmium dans la diète des animaux et

des humains lors d'études expérimentales. Les humains déficients en fer absorbent environ 24% du cadmium ajouté dans un gruau contrairement à moins de 1% absorbé chez les individus n'étant pas déficients en fer (Jannalagadda et Prasada Rao, 1993 : 588). En effet, des femmes avec de faibles niveaux de ferritine dans le sérum ont démontrées avoir deux fois plus d'absorption du cadmium que la normale (Goyer., 2001 : 700). L'absorption gastro-intestinal est beaucoup moins importante que l'absorption par les voies respiratoires, elle est d'environ 5 à 8% (Goyer., 2001 : 700). Le cadmium est transporté dans le sang par la liaison aux globules rouges, par l'albumine, une grosse protéine du plasma et seulement une petite partie du cadmium dans le sang est transporté par les métallothionéines (Goyer., 2001 : 700). Quand des niveaux critiques de cadmium sont atteint, la liaison de la métallothionéine avec le cadmium n'offre plus de protection et le cadmium devient toxique (Zelikoff et al., 1993 : 3). Le placenta synthétise des métallothionéines dans le but de protéger le fœtus du cadmium maternel, mais une augmentation de l'exposition peut exposer le fœtus au cadmium (Goyer., 2001 : 700).

L'exposition au cadmium pour la population se fait majoritairement par la fumée de cigarette, la nourriture et la consommation d'eau. De plus, l'utilisation de boue comme fertilisant contamine les sols et le cadmium peut alors s'accumuler dans les légumes comme les épinards, la laitue et le tabac (Leffel et al., 2003 : 233). Les moules et les huîtres sont une source importante de contamination par le cadmium dans la diète et contiennent 100 à 1000 µg/kg (Goyer., 2001 : 699). La consommation quotidienne de cadmium provenant de la nourriture, l'eau et l'air varient considérablement en Amérique du Nord et en Europe mais elle peut être estimée à environ 10 à 40 µg/jours (Goyer, 2001 : 691). Un fumeur qui consomme en moyenne un ou deux paquets de cigarette par jour double sa consommation quotidienne en cadmium (Goyer, 2001 : 691).

Il a été démontré que le cadmium est carcinogène chez l'humain pour les poumons et possiblement la prostate et il induit une variété de tumeurs dans les organes chez les animaux de laboratoires incluant les poumons, les testicules et la prostate (Sugiyama., 1994 : 8). Une carence en métallothionéine est une raison

pour laquelle les testicules et la prostate sont des organes cibles pour l'induction de tumeurs par le cadmium (Snow., 1992 : 51). Le cadmium génère la production de peroxyde d'hydrogène dans les cellules polymorphonucléaires du sang périphérique chez l'humain (Sugiyama., 1994 : 8; Zhong et al., 1990 :7564). Une autre étude a aussi démontrée que le cadmium induit la production d'O₂⁻ dans les phagocytes stimulés à la digitonine, les granulocytes humains ou les macrophages alvéolaires chez le rat (Sugiyama., 1994 : 8). Il a été démontré que le cadmium augmente les réponses immunitaires humorales à de faibles niveaux d'exposition alors que des niveaux plus élevés n'entraînent aucun effet ou entraînent une diminution de la production d'anticorps et une diminution constante de l'immunité à médiation cellulaire (Daum, Shepherd et Noelle, 1993 : 383; Descotes, 1992 : 385). Le cadmium affecte aussi les macrophages. Il a été démontré que le cadmium est très toxique pour les macrophages et qu'il diminue leur capacité à phagocyter (Koller, 1980 : 269). Il a été démontré par des études in vitro sur des cellules immunitaires suite à des expositions au cadmium, une diminution de l'activité phagocytaire et microbicide des macrophages alvéolaires et péritonéaux. De plus, le cadmium est cytotoxique pour ces mêmes cellules (Zelikoff et Thomas, 1998).

1.4.4 Mercur

Le mercure a pollué notre environnement et s'est avéré être extrêmement toxique. Le mercure peut être retrouvé sous trois formes différentes, soit élémentaire, organique ou inorganique. Le transport, la bioaccumulation et la transformation du mercure inorganique se produit à partir de la conversion des composés du mercure en méthylmercure (Jannalagadda et Prasada Rao, 1993 : 593). Le mercure métallique est rapidement oxydé en Hg²⁺ dans l'organisme et s'accumule dans diverses organes tels que les reins et le cerveau produisant des effets neurologiques et néphrotoxiques dose-dépendants (Shuppe et al., 1998 : 150). La source la plus importante de mercure provient du dégazage naturel de la croûte terrestre, incluant la terre, les rivières et l'océan, et cette source s'estime à une production d'environ 2700 à 6000 tonnes par an (Goyer., 2001 : 709).

Le mercure élémentaire est rejeté dans l'environnement par des sources naturelles telles que l'action volcanique ou par des sources industrielles comme les opérations minières. Il est en partie drainé dans l'eau des rivières, des étangs, des lacs et des océans où il se dépose dans les sédiments pour être méthylé par des bactéries (Jannalagadda et Prasada Rao, 1993 : 585; Thompson et al., 1998 : 299). Les niveaux environnementaux de méthylmercure dépendent entre autre de l'équilibre entre la déméthylation et la méthylation faite par les bactéries (Jannalagadda et Prasada Rao, 1993 : 593). Le méthylmercure est absorbé efficacement par tous les organismes vivants à cause de sa grande liposolubilité (Jannalagadda et Prasada Rao, 1993 : 593). En effet, le mercure organique par sa propriété lipophile est capable de traverser le placenta et la barrière sang-cerveau via un transporteur d'acide aminée, et par le fait même affecter le système nerveux (Sugiyama., 1994 : 12; Kerper et al., 1992 : 761). Le méthylmercure produit peut entrer dans la chaîne alimentaire pour atteindre des concentrations maximales dans la chair des gros poissons carnivores (Jannalagadda et Prasada Rao, 1993 : 593; Thompson et al., 1998 : 299). Pour la population en générale, les apports aigus de mercure seront donc principalement dépendant de la consommation de poissons et de la concentration de méthylmercure dans ces derniers (Sweet et Zelikoff, 2001 : 161; Zelikoff et al., 1994 : 1). À Minamata, au Japon, des personnes furent empoisonnées par la consommation de poisson ayant absorbé de grandes quantités de mercure dues à la contamination des effluents municipaux par des rejets industriels (Sugiyama., 1994 :12).

Les amalgames dentaires composés d'un mélange de mercure et d'autres métaux est une autre source importante d'exposition au mercure (Sugiyama., 1994 :12). En effet, le mercure contenu dans les amalgames dentaires se vaporise très lentement produisant une exposition chronique aux vapeurs de mercure. Seulement un faible pourcentage de la population devient sensibilisé au mercure de cette façon et développe des allergies ou des dermatites (Zelikoff et al., 1993 : 3). Le mercure métallique ou élémentaire se volatilise en vapeur à la température ambiante et la majeure partie de l'exposition des humains au vapeur de mercure se fait par inhalation. La vapeur de mercure diffuse à travers la membrane des

alvéoles, elle est liposoluble et a donc une grande affinité pour les globules rouges et le système nerveux central (Goyer., 2001 : 710). Les travailleurs exposés aux vapeurs de mercure peuvent développer une protéinurie due au dépôt de complexes immuns dans la membrane basale des cellules épithéliales du glomérule rénale (Zelikoff et al., 1993 : 3). Le dépôt contient des antigènes complexés avec les IgG, les IgM et la molécule C3 du complément induisant une réaction inflammatoire qui pourrait être caractérisée comme une forme de glomérulonéphrite (Zelikoff et al., 1993 : 3).

Le mercure inorganique sous forme de sel peut être divalent ou monovalent. Des expositions à de grandes doses de dichlorure de mercure sont directement toxiques pour les cellules tubulaires rénales, tandis qu'une exposition chronique à faibles doses induit une maladie immunologique du glomérule (Goyer, 2001 : 691). L'exposition des cellules T au dichlorure de mercure serait responsable de multiples liaisons croisées entre les récepteurs à la surface des cellules et de la phosphorylation exagérée des protéines tyrosines kinases causant des signaux de transduction aberrants (DeMoor et Koropatnick., 2000 :373). L'absorption gastro-intestinale de mercure inorganique sous forme de sel dans la diète de souris est d'environ 15% et d'environ 7% chez les humains tandis que l'absorption de méthylmercure est de l'ordre de 90 à 95% (Goyer., 2001 : 710). Il est clair que le méthylmercure provenant d'expositions environnementales, est la forme la plus importante en terme de toxicité et de risque à la santé. Une exposition au méthylmercure est neurotoxique pour les adultes et est toxique pour les fœtus durant la grossesse (Goyer, 2001 : 691). De plus, il a aussi été démontré que des expositions au mercure affectent grandement le système immunitaire. Le méthylmercure a un effet d'inhibition sur les réponses immunitaires primaires et secondaires chez les souris exposées durant le développement embryonnaire jusqu'à l'âge de 9 semaines (Koller, 1980 : 269). Des expositions prolongées sur des souris Webster à des concentrations subcliniques (1 ppm) de méthylmercure augmentent la susceptibilité de l'hôte à des virus (Wild et al., 1997 : 34). Le mercure organique et inorganique sont des agents connus pour causer des désordres auto-immuns (Lawrence et McCabe, 2002 : 293; Shenker, Guo et

Shapiro, 2000 : 89; Strenzke et al., 2001 : 257; Zelikoff et al., 1994 : 1) et induire la synthèse d'IgE, qui joue un rôle crucial dans la manifestation d'allergies (Strenzke et al., 2001 : 257). Le mercure est aussi associé à l'induction de réactions d'hypersensibilités de type I, II, III et IV (Zelikoff et al., 1994 : 2). De plus, il y a une possibilité que ces dysfonctionnements immunitaires influencent le développement et la progression de cancers (Shenker, Guo et Shapiro, 2000 : 89). En effet, le mercure organique et inorganique causent de la génotoxicité telle que des altérations à l'ADN simple brin et des modifications aux chromosomes des cellules de mammifères (Sugiyama., 1994 :12; Costa et al., 1991 : 255). Dans les cellules, le mercure se lie à une variété d'enzymes incluant celles présentes dans les microsomes et les mitochondries, produisant ainsi des lésions non spécifiques ou engendrant la mort cellulaire (Goyer., 2001 : 710). Le mercure a une affinité particulière pour les ligands ayant des groupements sulfhydryl. Dans les cellules du foie, le méthylmercure forme des complexes solubles avec la cystéine ou le glutathion, qui sont sécrétés dans la bile et réabsorbés par le tractus gastro-intestinal (Goyer., 2001 : 710). Il a aussi été démontré que les ions mercuriques du mercure inorganique interagissent avec le glutathion en présence de peroxyde d'hydrogène seul ou avec celui produit par les mitochondries afin de promouvoir la formation d'une multitude de radicaux libres (Woods et al., 1990a : 253; Woods et al., 1990b : 261; Sugiyama., 1994 :13). Il a été suggéré que les complexes formés par les ions mercuriques avec le glutathion ou la cystéine seraient une forme de transport physiologique du mercure dans les cellules (Hultberg, Andersson et Isaksson., 2001 : 99). De plus, la co-administration de GSH avec du mercure inorganique induit une augmentation du niveau de mercure dans les reins, suggérant que le mercure est transporté aux reins sous forme d'un complexe mercure-GSH (Sugiyama., 1994 : 14). Le mercure, mais pas sous la forme méthylée, induit la synthèse de métallothionéines probablement seulement dans les cellules des reins, mais contrairement au complexe métallothionéine-cadmium, la demi-vie est relativement plus courte (Goyer., 2001 : 710). Le mercure dans les cellules rénales est alors localisé dans les lysosomes (Goyer., 2001 : 710).

1.4.5 Sélénium

Le sélénium existe naturellement dans plusieurs états d'oxydation et quelques unes de ces formes chimiques sont volatiles (Jonnalagadda et Prasada Rao., 1993 : 591). Le sélénium dans son état +6 ou sélérate, est stable dans des conditions alcalines et oxydantes et le sélénium est plus facilement disponible pour les plantes dans les sols alcalins (Jonnalagadda et Prasada Rao., 1993 : 591). Le sélénium à l'état +4 ou sélénite se produit naturellement mais en solution alcalines, il tend à être oxydé lentement à l'état +6 si l'oxygène est présent (Jonnalagadda et Prasada Rao., 1993 : 591). Dans la nature ou dans les systèmes biologiques, le sélénium peut aussi être retrouvé sous forme de sélénium élémentaire (Se^0) et sous forme de séléride (Se^{2-}) (Goyer., 2001 : 718). L'eau des rivières et l'air ont des niveaux de sélénium qui varient selon des facteurs géographiques et environnementaux (Goyer., 2001 : 691). Le contenu en sélénium dans les plantes varie énormément selon la concentration retrouvée dans les sols variant selon les régions. Les plantes et les animaux convertissent la plupart du sélénium retrouvé dans les céréales, les grains et les légumes en sélénium-méthionine (Se-Met) et l'incorporent dans les protéines de méthionéine en place (Tapiero, Townsend et Tew., 2003 : 135). Se-Met est environ moins de 50% du contenu total en sélénium dans les plantes tandis que les sélélocystéines (Se-Cys), méthyl-sélénium-cystéine et gamma-glutamyl-sélénium-méthyl-cystéine ne sont pas incorporés dans les plantes (Tapiero, Townsend et Tew., 2003 : 135). Les mammifères sont incapables de synthétiser la Se-Met et seulement la Se-Cys a été détectée chez les rats ayant une diète en sélénium sous la forme de sélénite (Tapiero, Townsend et Tew., 2003 : 135). Chez les mammifères le Se-Met est absorbé par le petit intestin via un système de transport d'acide aminée Na^+ -dépendant (Tapiero, Townsend et Tew., 2003 : 134). Le sélénium issu de notre alimentation est un élément essentiel pour les animaux et les humains (Tapiero, Townsend et Tew., 2003 : 134). Les fruits de mers, spécialement les crevettes, la viande, les céréales et les produits laitiers sont en partie les aliments où on retrouve la plus grande teneur en sélénium (Goyer., 2001 : 691; Tapiero, Townsend et tew., 2003 : 134).

L'accumulation de sélénium dans les organes chez l'humain a été démontrée selon l'ordre décroissant suivant dans les tissus : les reins > le foie > la rate > le pancréas > les testicules > les muscles du cœur > l'intestin > les poumons > le cerveau (Jonnalagadda et Prasada Rao., 1993 : 592). La toxicité par le sélénium se produit lorsque la quantité ingérée dépasse la capacité à excréter (Goyer., 2001 : 719). La toxicité par le sélénium a été suspectée chez des animaux et des humains vivants dans des régions où le sol était relativement riche en sélénium, contribuant à un contenu très élevé dans la végétation (Goyer., 2001 : 720). En effet, il y a plusieurs espèces de plantes qui sont classifiées comme étant des accumulateurs de sélénium et pouvant contenir des niveaux de sélénium allant de 100 à 10000 mg/kg (Goyer., 2001 : 720). Ces plantes poussent généralement dans des zones non agricoles et lorsqu'elles sont consommées par des êtres vivants, des symptômes apparaissent après quelques semaines causant des syndromes tels que le syndrome du «chancelant aveugle» (blind staggers) ou la maladie d'alkali (alkali disease) (Goyer., 2001 : 720; Tinggi., 2003 : 105). Les premiers symptômes qui surviennent lors du syndrome du chancelant aveugle sont : une vision affectée, une diminution de l'appétit et une tendance à marcher en rond, ils peuvent progresser à plusieurs degrés de paralysie et à la mort causée par un arrêt respiratoire (Goyer., 2001 : 720; Hogberg et Alexander., 1986 : 482). La maladie d'alkali est un empoisonnement des chevaux et du bétail suite à l'ingestion continue de plantes ayant plus de 5mg mais moins de 50 mg/kg de sélénium et elle est caractérisée par des changements dystrophiques des sabots et par un pelage rugueux (Tinggi., 2003 : 106). Basée sur des expériences faites sur des animaux, la toxicité du sélénium produit une perte de fertilité et des défauts congénitaux. Le sélénium est considéré comme étant embryotoxique et tératogène (Goyer., 2001 : 720). Il y a eu de nombreuses études faites sur la toxicité du sélénium chez les animaux mais le mode d'action du sélénium au niveau cellulaire et moléculaire n'est pas encore vraiment compris (Tinggi., 2003 : 107). Des études ont suggéré que la toxicité du sélénium peut être due aux interactions du sélénite avec le glutathion pour former des sélénotrissulfides qui produisent des

espèces réactives de l'oxygène tel que le superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (Soares et al., 2003 : 627; Tinggi., 2003 : 107).

Le sélénium a été identifié pour être un composant important de l'enzyme glutathion peroxydase (GSHPx), qui est caractérisée comme une protéine tétramérique avec quatre atomes de sélénium par molécule (Tinggi., 2003 : 104). Cette enzyme utilise le glutathion pour réduire le peroxyde dans les cellules, de façon à protéger la membrane lipidique et possiblement les protéines et l'ADN des dommages produits par les radicaux libres et les oxydants (Goyer., 2001 : 691; Soares, Folmer et Rocha., 2003 : 627). L'activité de GSHPx et le niveau de sélénium dans le sang sont influencés par la diète et l'apport du sélénium par la nourriture qui sont les principales sources de sélénium (Tinggi., 2003 : 107).

Une déficience en sélénium est fortement mise en lien avec la maladie de Keshan, une cardiomyopathie endémique chez les enfants, dans certaines régions de la Chine (Jannalagadda et Prasada Rao., 1993 : 585; Soares, Folmer et Rocha., 2003 : 627). Une déficience en sélénium affecte le métabolisme du glutathion en augmentant la synthèse dans le foie et aussi le contenu dans le plasma (Tapiero, Townsend et Tew., 2003 : 135). Une augmentation du GSH génère une diminution de la cystéine et donc un mauvais fonctionnement au niveau de la synthèse des protéines (Tapiero, Townsend et Tew., 2003 : 135).

Ce ne sont pas tous les métaux qui sont nocifs pour le système immunitaire. En effet, le sélénium active généralement la réponse immunitaire plutôt que de l'inhiber (Koller., 1980 : 269). Il stimule la réponse primaire et secondaire, mais empêche aussi la diminution de la réponse d'anticorps produite par le méthylmercure lorsque les deux métaux sont donnés simultanément dans la diète des souris (Koller., 1980 : 269). Le sélénium aide à diminuer le taux de mortalité relié au cancer. Un mécanisme possible de l'effet protecteur du sélénium a été postulé, le sélénium inhiberait la formation de malonaldéhyde, un produit issu lors des dommages aux tissus engendré par la peroxydation, qui est un processus carcinogène (Goyer., 2001 : 720). La toxicité environnementale par le sélénium chez l'humain est rare, cependant, des effets toxiques ont été rapportés et causeraient de l'anémie et la leucopénie (Tinggi., 2003 : 106). De plus,

l'utilisation du sélénium dans l'industrie et l'agriculture a augmenté considérablement dans les quatre dernières décennies et aucun rapport de toxicité environnementale au sélénium a été soumis dans la plupart des parties du monde à l'exception de la Californie du sud, dans le refuge national de Kerterson où des poissons et des oiseaux ont été rapportés morts ou ayant des difformités (Tinggi., 2003 : 106).

1.4.6 Zinc

Le zinc est un élément essentiel, il est connu pour jouer un rôle central dans la régulation des fonctions cellulaires et la maintenance des fonctions immunitaires. Le zinc est largement utilisé dans les fonctions biologiques, cependant il n'est que le 27^{ième} élément le plus disponible sur la terre (Vallee et Falchuk., 1993 : 79). Plus de 200 métalloenzymes requièrent le zinc comme co-facteur. Il est aussi nécessaire pour une variété de protéines et il est essentiel pour la fonction normale de la cellule (Demoor et Koropatnick., 2000 : 374; Goyer., 2001 : 720). Le zinc est impliqué dans le métabolisme des protéines, des acides nucléiques, des carbohydrates et des lipides. Il est aussi impliqué dans le contrôle de la transcription des gènes et d'autres processus biologiques fondamentaux (Vallee et Falchuk., 1993 : 79). Une déficience en zinc peut engendrer plusieurs effets cliniques importants comme une diminution de l'immunité, un mauvais fonctionnement des sens tels que le goût et l'odorat, un mauvais fonctionnement de la mémoire et une diminution de la spermatogenèse chez les mâles (Shankar et Prasad., 1998 : 447S). Une déficience en zinc peut être causée par une diète inadéquate, une augmentation de l'excrétion, une déficience conditionnée ou des causes génétiques (Vallee et Falchuk., 1993 : 100). À l'opposé, une exposition excessive au zinc est très peu commune et demande de très longues expositions. Le zinc ne s'accumule pas lors d'expositions continue mais celui contenu dans l'organisme est modulé par des mécanismes homéostatiques qui agissent principalement sur l'absorption et les niveaux de zinc dans le foie (Goyer., 2001 : 720). Les mécanismes homéostatiques qui régulent son insertion, sa distribution et son excrétion dans les cellules et tissus est tellement efficace qu'aucun désordre

n'est associé avec une accumulation excessive en zinc contrairement au fer, au cuivre, au mercure et à d'autres métaux (Vallee et Falchuk., 1993 : 79). L'induction de petits peptides de faibles poids moléculaires comme les thionéines peuvent capter le zinc à un taux de 7 molécules de zinc par molécules de thionéine (Vallee et Falchuk., 1993 : 99). Aucune des protéines importantes physiologiquement requérant le zinc n'est impliquées dans des manifestations toxicologiques (Vallee et Falchuk., 1993 : 99). De plus, aucun désordre comparable à ceux associés comme par exemple au cuivre dans la maladie de Wilson ou au fer dans l'hémochromatose n'est connu dans le cas du zinc (Vallee et Falchuk., 1993 : 99). Seulement 20 à 30% du zinc ingéré sera absorbé (Goyer., 2001 : 720). Tout le zinc intracellulaire est associé à des macromolécules et les concentrations de zinc libre, non-lié, sont extrêmement faibles (DeMoor et Koropatnick., 2000 : 374). Le zinc est sous forme de cation divalent (Zn^{2+}) lorsqu'il est lié aux enzymes et aux autres protéines (Vallee et Falchuk., 1993 : 81). Ces propriétés chimiques sont particulièrement favorables à une multitude d'interactions car aux conditions physiologiques, le zinc n'est pas réduit ou oxydé, le rendant très stable en milieu biologique (Vallee et Falchuk., 1993 : 81). En effet, le zinc est un agent anti-oxydant protégeant les cellules des dommages reliés aux radicaux libres générés durant l'activation du système immunitaire (Shankar et Prasad., 1998 : 456S). De plus, le zinc induit la formation des métallothionéines (MTs), qui jouent un rôle important dans la protection contre les métaux non essentiels comme le cadmium et dans la protection contre les espèces réactives de l'oxygène qui causent du stress oxydatif (Zödl et al., 2003 : 324). Il a été démontré que le zinc est essentiellement non toxique, il est ni carcinogène, ni mutagène et ni tératogène (Vallee et Falchuk., 1993 : 99).

Le rôle de la métallothionéine dans l'homéostasie du zinc est particulièrement important surtout dans des conditions où le zinc est limité (DeMoor et Koropatnick., 2000 : 374).

Le zinc est largement retrouvé dans l'environnement, il est présent dans la nourriture, l'eau et l'air (Goyer, 2001 : 720). Les fruits de mer, la viande, les grains, les produits laitiers, les noix et les légumineuses contiennent un haut

niveau de zinc, tandis que les légumes en contiennent moins, même s'ils absorbent le zinc appliqué au niveau des sols (Goyer, 2001 : 691). Une diète adéquate en zinc est estimée à 8-11 mg par jour de zinc chez les adultes en santé (Zödl et al., 2003 : 324).

Le zinc est connu pour jouer un rôle central dans le système immunitaire et des personnes ayant une déficience en zinc ont une susceptibilité augmentée face à une variété de pathogènes (Shankar et Prasad., 1998 : 447S; Unoshima et al., 2001 : 29). Il est clair que le zinc affecte de multiples aspects du système immunitaire allant de la barrière de la peau à la régulation des gènes au niveau des lymphocytes. Le zinc est crucial pour le développement normal et la fonction des cellules qui sont impliquées dans l'immunité non-spécifique comme les neutrophiles et les cellules tueuses naturelles (NK pour "natural killer") (Shankar et Prasad., 1998 : 447S; Unoshima et al., 2001 : 29). Une déficience en zinc affecte aussi le développement de l'immunité acquise en modifiant certaines fonctions des lymphocytes T comme l'activation de la production de cytokines de type Th1 et des lymphocytes B comme le développement et la production des anticorps, particulièrement les immunoglobulines G (Shankar et Prasad., 1998 : 447S). Les macrophages étant des cellules importantes impliquées dans plusieurs fonctions immunitaires ils sont aussi influencés de façon défavorable par une déficience en zinc. Celle-ci peut dérégler les mécanismes intracellulaires leurs servant à tuer, à produire des cytokines et à phagocyter (Shankar et Prasad., 1998 : 447S). L'effet d'une déficience en zinc sur la fonction des macrophages a été examiné chez des souris infectées avec *T. cruzi*. Le pourcentage de macrophages péritonéaux associés avec le parasite, le nombre de *T. cruzi* à l'intérieur de chaque macrophage et l'habileté à tuer ce trypanosome étaient réduits (Vallee et Falchuk., 1993 : 98). L'apoptose est augmentée par une déficience en zinc (Shankar et Prasad., 1998 : 447S). Le zinc inhibe à fortes ou à faibles doses la capacité des macrophages murins du péritoine à phagocyter (Koller, 1980 : 269; Shankar et Prasad, 1998 : 447S). Une déficience en zinc est marquée par une atrophie du thymus et une réduction de la synthèse d'anticorps provoquée par l'interférence de la fonction des lymphocytes T helper (Koller, 1980 : 269). De

plus, elle affecte aussi la mémoire immunitaire (Vallee et Falchuk, 1993 : 79) et diminue la résistance aux infections selon plusieurs études faites sur les animaux et l'humain (Shankar et Prasad, 1998 : 447S). Par contre, une augmentation de l'apport en zinc par des suppléments, améliore la réponse immunitaire, module la production de cytokines dans plusieurs types cellulaires et module la fonction immunitaire (Unoshima et al., 2001 : 28). En effet, des études sur des souris recevant des suppléments de zinc ont montré une augmentation de la fonction des lymphocytes T et des macrophages. Les souris sont aussi plus résistantes aux toxines (Shankar et Prasad., 1998 : 449S).

1.5 Le projet de recherche

L'exposition au mercure et au cadmium peut perturber le système immunitaire et rendre l'organisme plus susceptible à des infections ou des cancers. Ils peuvent également provoquer le déclenchement de réactions immunitaires anormales telles que des allergies, des réactions dites d'hypersensibilité ou de l'auto-immunité. Il s'avère donc nécessaire d'étudier les effets engendrés sur le système immunitaire, de l'exposition aux métaux lourds à fortes doses au niveau cellulaires. Dans un premier temps, nous avons évalué la toxicité (*in vitro*) du mercure, du cadmium, du sélénium et du zinc sur les cellules du système immunitaire (i.e. les lymphocytes et les macrophages).

Les macrophages jouent un rôle important dans la fonction immunitaire car ils sont impliqués à tous les niveaux de celle-ci. En effet, ils forment la première ligne de défense dans la réponse immunitaire innée et ils agissent comme cellules accessoires importantes dans la réponse immunitaire spécifique. Nous avons donc évalué si les métaux lourds, suite à des expositions *in vitro* pouvaient moduler la capacité des macrophages à phagocyter.

L'activation altère les propriétés biochimiques et l'activité fonctionnelle des cellules. L'activation des cellules en modifiant leurs métabolismes offrirait-elle une meilleure protection contre une exposition à des contaminants? Pour répondre à cette question, nous avons évalué les différences de susceptibilité entre des cellules stimulées avec de la con A et des cellules qui n'ont pas été stimulées.

Par la suite, il s'agissait de vérifier si l'effet protecteur de l'activation était lié à des différences de niveau intracellulaire de thiols en comparant les courbes doses-réponses.

Nous avons aussi mesuré l'apoptose chez les cellules stimulées ou non stimulées après une exposition aux métaux lourds afin de déterminer si cette fonction pouvait être affectée par des contaminants. L'apoptose est un processus de désactivation des macrophages car elle permet de retirer les cellules inflammatoires du site d'inflammation. Les métaux lourds, en entravant le processus normal d'apoptose, pourraient causer une accumulation de cellules activées dans l'organisme, lesquelles pourraient à leur tour entraîner une maladie auto-immune ou une inflammation très importante.

Pour les fins de l'article, un autre objectif s'ajoute à ceux-ci, qui était de comparer les différences de contenus en thiols intracellulaires entre les macrophages et les lymphocytes ainsi que leur différence de sensibilité vis-à-vis des métaux lourds. Comprendre les effets des métaux sur les fonctions des cellules immunitaires aidera à déterminer le risque associé à des expositions aux métaux lourds. L'évaluation de ces mécanismes immunitaires élémentaires donne une bonne indication de l'état du système immunitaire suite à une exposition à des contaminants. De telles données permettront d'enrichir les connaissances sur la toxicité des métaux lourds sur le système immunitaire et sur la réponse cellulaire suite à une agression par ces polluants.

Chapitre 2

ARTICLE : CELLULAR RESPONSE OF MICE SPLENOCYTES TO HEAVY METALS EXPOSURE

Contribution personnelle

Tout d'abord, permettez-moi de préciser ma participation dans l'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire. Ceci comprend la recherche bibliographique, la planification et les manipulations des expérimentations, l'analyse statistique et la synthèse des résultats qui sont en lien avec les macrophages. L'article présente les résultats provenant de mes travaux de recherche et ceux de Mme Marlène Fortier dont le projet consistait à comparer les réponses obtenues chez les lymphocytes.

Résumé de l'article (français)

Parmi les contaminants environnementaux reconnus pour leur toxicité et leur propagation à travers le monde, les métaux lourds sont certainement d'une première occupation. Depuis que l'homme est exposé à des métaux toxiques, les effets potentiels de ces métaux sur le système immunitaire méritent d'être évalués. Des études démontrent que les métaux lourds peuvent induire des effets immunomodulateurs tels que l'augmentation de la susceptibilité à des agents infectieux, l'apparition des maladies néoplasiques ainsi que des maladies auto-immunes. Des études démontrent que des cellules activées produiraient plus de thiols que des cellules au repos et seraient plus résistantes à l'effet néfaste des métaux lourds. Dans cette étude, nous avons voulu démontrer, l'effet de l'activation des lymphocytes et des macrophages sur la toxicité de certains métaux lourds tels que le mercure (organique et inorganique), le cadmium, le zinc et le sélénium. Nous avons mesuré la prolifération lymphoblastique pour les lymphocytes, la phagocytose pour les macrophages ainsi que le niveau de thiols intracellulaires dans ces deux populations. Pour la prolifération lymphoblastique, et la phagocytose, les cellules activées sont significativement plus résistantes que les cellules au repos pour le mercure, le cadmium et le zinc. Le niveau de thiols

est significativement augmenté chez les lymphocytes et les macrophages activés et ce, pour toutes les expositions avec les métaux. Nous avons aussi observé que les macrophages activés produisent plus de thiols que les lymphocytes activés pour ces mêmes expositions in vitro. Les résultats suggèrent que l'activation des lymphocytes et des macrophages entraîne une augmentation du niveau de thiols intracellulaires leur procurant une meilleure protection contre l'effet néfaste des métaux lourds.

Article

Title: Cellular response of mice splenocytes to heavy metals exposure

Authors: Julie De Gagné¹✦, Marlène Fortier¹✦, Gaston Chevalier² and Michel Fournier¹*

¹ INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER-Human Health Research Center
245 boul. Hymus
Pointe-Claire (Québec) H9R 1G6
CANADA

² Université du Québec à Montréal (UQAM), Département des sciences biologiques, 1200 St-Alexandre, Montréal, Qc, Canada, H3B 3H5

✦Both authors contributed equally to this study

* To whom all correspondence should be sent

Michel Fournier
INRS-Institut Armand-Frappier, Human Health Research Center
245 Hymus Boul. Pointe-Claire,
Québec, Canada, H9R 1G6
Tel: (514) 630-8824
Fax: (514) 630-8850
E-mail: Michel.Fournier@inrs-iaf.quebec.ca

Key Words: immunotoxicity, activation, heavy metals, thiols

ABSTRACT

Among environmental contaminants recognised for their toxicity and world-wide presence, heavy metals are certainly a major concern. Laboratory research and epidemiological data of human cohorts occupationally exposed to these chemicals indicate that metals can interact with several physiological systems of the body. They can also elicit a number of immunomodulatory effects leading ultimately to an enhanced susceptibility to microbial agents and to the appearance of neoplastic diseases and autoimmune phenomena. Heavy metals also provoke changes in the function(s) of immune cells. These changes are contingent upon the type of metal, the dose and the animal species. A striking biological effect of heavy metals is the induction of intracellular thiols (cysteins, glutathion, metallothioneins). Thiols are involved in many physiological processes, including protection from free radical damage, and detoxification of chemicals. The purpose of this study was to assess the differences of susceptibility in both activated and non-activated cells in the presence of heavy metal. We evaluated the effects of certain heavy metals such as mercury (organic and inorganic), cadmium and zinc chloride, as well as others metals, on murine splenocytes. We performed the lymphoblastic proliferation test for lymphocytes and a phagocytosis test for the macrophages. We also developed methods in order to quantitate the intracellular thiols content differences in immune cells from different populations (i.e. lymphocytes and macrophages). From our findings, we concluded that the levels of thiols in the activated cells are greater than in the non-activated cells following exposures to various heavy metals; macrophages were more resistant than lymphocytes to the toxic effects of heavy metals and activated cells are more resistant than cells at rest. One possible explanation is that the macrophages produce more thiols than the lymphocytes and this provides increased protection from the deleterious effects of heavy metals.

INTRODUCTION

Among environmental contaminants recognized for their toxicity and world-wide presence, heavy metals are certainly a major concern. Certain heavy metals are essential for life in trace amounts but can become toxic under certain conditions (e.g. zinc and selenium). Others, for which no biological function has been established, are toxic even at very low levels (e.g. mercury and cadmium) (DeMoor and Koropatnick, 2000 : 367). Heavy metals are persistent and ubiquitous in the environment and they originate both from natural sources and from human activities. Laboratory research and epidemiological data of human cohorts occupationally exposed to these chemicals indicate that metals can affect several physiological systems of the body. One mechanism whereby metals can alter health is through modulation of the immune homeostasis. Imbalances in immune regulation by metals can lead to an enhanced susceptibility to microbial agents and to the appearance of neoplastic diseases and autoimmune phenomena.

Elemental mercury is disseminated in the environment due to natural events and human activities. In aquatic environments, mercury is primarily converted to methylmercury (MeHg) by microbial action, and can accumulate in certain species of fish and marine mammals (Jannalagadda and Prasada Rao, 1993 : 585; Thompson and al., 1998 : 299). Exposure to mercury results mainly from the ingestion of prey contaminated with MeHg (Thompson and al., 1998 : 299). Cadmium is also ubiquitous in the environment due to natural events and to human activities. For the general population, cadmium exposure occurs primarily through contaminated drinking water, food supplies (Leffel and al., 2003 : 233) and cigarette smoking (Goyer, 2001 : 691; Misra and al., 2002 : 327). Cadmium tends to be accumulated in the viscera of vertebrates, especially the liver and the kidneys (Tsangaris and Tzortzatou-Stathopoulou, 1998 : 143). Selenium is an essential trace element for animals and humans that is obtained from dietary sources such as cereals, grains and vegetables (Tapiero, Townsend and Tew, 2003 : 134). The nutritional importance of selenium is thought to be attributable to its function as a component of the active site of the enzyme glutathione peroxidase

(GSH-Px) (Tapiero, Townsend and Tew, 2003 : 134). Selenium has the potential to produce adverse health effects from both excess and deficiency (Goyer., 2001: 720). Selenium can produce loss of fertility and congenital defects and is considered embryotoxic and teratogenic on the basis of animal experiments (Goyer., 2001: 720). The most extensively documented deficiency of selenium in humans is Keshan disease. This is an endemic cardiomyopathy that occurs most frequently in children under 15 years of age and in women of child-bearing age (Goyer., 2001: 720). Zinc is an essential micronutrient that is involved in the regulation of cellular functions and the maintenance of immune function (Unoshima and al., 2001 : 28). Zinc is ubiquitous in the environment so that it is present in most food sources, water and air (Goyer, 2001 : 691). Zinc toxicity from excessive ingestion is uncommon, but a deficiency results in a wide spectrum of clinical effects because more than 200 metalloenzymes require zinc as a cofactor (Goyer, 2001 : 691).

When immune cells are affected by foreign products, cells respond to extracellular signals through a variety of mechanisms, including immune cells stimulation, i.e. immune induction initiated by interaction of extracellular ligands such as cytokines and other signaling molecules. The immune induction clearly depends on a critical interrelationship between the phagocytes and the lymphocytes. Activated immune cells display an augmentation of intracellular thiols, phagocytosis (macrophages) and proliferation (lymphocytes) and are more resistant when exposed to heavy metals. Most of the major intracellular pathways including membrane transport processes, protein, RNA, and DNA synthesis show increased activity in lectin-stimulated cells (Hamilos, Mascali and Wedner, 1991 : 75). Thiols-containing compounds are involved in the function of many enzymes, structural proteins and receptors, and heavy metals may severely disturb many metabolic functions in the cell (Hultberg, Andersson and Isaksson, 1998 : 203). Glutathione (GSH), a ubiquitous tripeptide is the most abundant (millimolar range) intracellular non-proteinic thiol. Glutathione forms complexes with several heavy metal ions and may thus function in the protection against metal toxicity (Dickinson and Forman, 2002 : 488; Hultberg, Andersson and Isaksson, 2001 :

93). It is well known that lymphocyte proliferation in response to mitogenic lectins is directly dependant upon glutathione availability (Hamilos, Zelarney and Mascali, 1989 : 223). There is a correlation between GSH and activation but the precise role for GSH in the activation process remains unclear.

The purpose of our study was to evaluate the toxicity of five selected heavy metals found in the environment on activated and non-activated immune cells from different cell populations : lymphocytes and macrophages. The immune competence of cells was determined using the phagocytosis assay for macrophages and blastogenesis for lymphocytes. In each cell population the levels of intracellular thiols and apoptosis were assessed. Dose-response curves were used to study the immunotoxic potential of each metal for each population of cells.

MATERIAL AND METHODS

Substances under investigation

The following five heavy metals were selected: cadmium chloride (CdCl_2), mercuric chloride (CdCl_2), methylmercuric chloride (CH_3HgCl), selenium tetrachloride (SeCl_4) and zinc chloride (ZnCl_2) from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). A stock solution of MeHg and ZnCl_2 was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and anhydrous ethyl alcohol (Commercial Alcohols Inc.; Brampton, On, Canada) respectively. For the other metals, the stock solutions were prepared in distilled water. The chemicals were diluted in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (Gibco Life Technologies; Grand Island, NY, USA) so that the final DMSO or anhydrous ethyl alcohol concentration in the culture did not exceed 0.1%.

Preparation of cell suspensions

C57/BL6 female mice were obtained from Charles River Canada Inc (Qc, Canada). Mice arrived at the animal facility at 3-4 weeks of age, and were placed in an exposure room with an automatic 12h light/dark cycle and fed a standard rodent diet and tap water *ad libitum*. After 2 weeks of acclimation, the mice were killed by CO_2 inhalation and the spleen was aseptically removed and placed in RPMI 1640 medium. The suspension of splenocytes was obtained by passage of the spleen tissue through a nylon mesh into a supplemented RPMI 1640 culture medium (Brousseau et al., 1999: 22). The viability of cells was controlled by trypan blue dye exclusion using a light microscope before culturing the cells. The concentration of murine macrophages was adjusted to 1×10^6 cells/ml in culture medium and lymphocytes were adjusted to 5×10^6 cells/ml in the same medium.

Cells stimulation

The cells were activated by exposure to Concanavalin A (Con A) from Sigma Aldrich (St-Louis, MO, USA) to a final concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for macrophages and 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for lymphocytes and incubated at 37°C in a 5% CO_2

atmosphere for up to 30 minutes and 24 hours respectively. The non-activated cells (without Con A) were exposed to supplemented RPMI for the same time at the same conditions. After the exposure, cells were washed and then resuspended in supplemented RPMI.

Determination of macrophage antigen expression

We used fluorescent monoclonal antibodies from Cedarlane (Hornby, Ont, Canada) directed against I-A^b (MHC class II) antigen expressed most highly on B cells, macrophages, dendritic cells and certain epithelial cells and another directed against F4/80 antigen expressed on most macrophages. The cells were cultured in two replicates at 5×10^5 cells per tubes. The cells were washed twice and were incubated with 5 μ l of FITC anti-mouse I-A^b for up to 30 minutes at 4°C. After incubation, the cells were washed and reincubated with 5 μ l of purified anti-mouse CD32/CD16 used as an Fc receptor blocking antibody before the incubation with PE anti-mouse macrophage F4/80 or PE rat IgG_{2b} (isotype control) for up to 30 minutes at 4°C. The stained cells were analyzed with a FACSCalibur flow cytometer from Becton Dickinson (Rutherford, NJ, USA).

Exposure protocol

Splenocytes were exposed to individual metals (CdCl₂, CH₃HgCl, HgCl₂, SeCl₄ and ZnCl₂) to final concentrations of 10^{-9} M to 10^{-3} M in order to obtain dose-response curves. Murine splenocytes were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for up to 3 hours. After the exposure, the cells were washed and then resuspended in RPMI medium for the viability, phagocytosis and lymphoblastogenesis assays as well as in PBS containing 1% of glucose (PBS-G) for the evaluation of intracellular levels of thiols.

Cell viability using flow cytometry

Viability and cytotoxicity were assessed after a 3 hour exposure to the metals. The cells were cultured in two replicates per treatment group at 5×10^5 cells per tubes. Propidium iodide (PI) was added to each tube to a final concentration of 1.5

µg/ml. Cytolethality and viability were determined after PI staining, measuring the PI fluorescence of 5000 cells at 600 nm by flow cytometry.

Apoptosis assay using YO-PRO-1 and PI dyes

Apoptosis is a carefully regulated process of cell death that occurs as a normal part of development. Exposure to low concentrations of xenobiotics or drugs can induce inappropriately regulated apoptosis. The assay was performed using the Vybrant[®] Apoptosis Assay kit from Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA). It detects apoptosis on the basis of changes that occur in the permeability of cell membranes. The cells were cultured in two replicates per treatment group at 1×10^6 cells per tubes. 1 µl of the YO-PRO-1 stock solution and 1 µl of the PI stock solution were added to each tube and the cells were incubated on ice for up to 30 minutes. At the end of the incubation period, the stained cells were analyzed by flow cytometry, using an excitation wavelength of 488 nm and measuring the fluorescent emission at 530 nm (FL1) and > 575 nm (FL3).

Determination of macrophages phagocytic activity

Macrophages have a variety of biological functions; phagocytosis, one of the most common, was assessed by determining the ingestion of latex fluorescent beads by flow cytometry. The cells were cultured in two replicates per treatment group at 5×10^5 cells per tubes. The cells were incubated under constant agitation at 37°C for 90 minutes (optimal time for assay) with latex fluorescent beads at an approximate ratio of 100:1 beads/cells. At the end of the exposure period, the cells were layered over a 3% bovine serum albumine (BSA) gradient and centrifuged at 150xg for 8 min at 4°C to remove free beads or beads which had slightly adhered to the surface of the cells. The cell pellets were then resuspended in 0.5 ml of 0.5% phosphate-buffered formalin, and the number of engulfed beads was determined using a FACSCalibur flow cytometer.

Determination of lymphocytes proliferation

In order to obtain final metal concentrations of 10^{-3} M to 10^{-9} M, 100 μ l of (5×10^5) activated and non-activated cells, 100 μ l of Con A (2.5 μ g/ml) and 10 μ l of each concentrations of the different metals (10^{-2} M to 10^{-8} M) were plated in flat bottom 96 well-plates under sterile conditions for a 48 hours incubation period (37°C, 5% CO₂) in triplicates. 0.5 μ Ci of ³H-methyl-thymidine from ICN (Costa Mesa, California, USA) was added to each well 18 hours prior to harvest (Brousseau et al., 1999: 77). The incorporation of ³H-methyl-thymidine was measured using a RackBeta from LKB (Turku, Finland) scintillation counter.

Evaluation of intracellular level of thiols

A 5 mM stock solution of the 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) probe from Molecular Probe (Eugene, Oregon, USA) was prepared in DMSO and stored at 4°C in the dark. The cells were cultured in two replicates per treatment group at 5×10^5 cells per tubes. The murine splenocytes were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for up to 45 minutes with the fluorescent CMFDA probe to a final concentration of 5 μ M. After the exposure period, the cells were washed and suspended in 0.5 ml of PBS. The more thiols a cell possesses, the more fluorescent the cell is and this fluorescence can be measured using a FACSCalibur (Becton Dickinson) flow cytometer. A negative control group was included using N-ethylmaleimide (NEM) to block intracellular thiols groups. The cells were treated with 100 μ M of NEM for 10 minutes, then wash before staining with CMFDA.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation. The results were tested for homogeneity using an analysis of variance (ANOVA). Significant differences between treatment and control and between the activated and non-activated cultures were determined by Tukey test using the JMP IN computer software (SAS institute Inc, Cary, NC, USA). Differences between treatment means were considered significant when $p < 0.05$. Determination of IC₅₀ values was performed

by linear regression ($y = a + bx$) with at least 3 points chosen in a linear section of the dose-response curve with Excel (Microsoft Inc.).

RESULTS

Mice splenocytes cell viability after heavy metals exposure

When several metals are considered it is possible to compare the sensitivity of exposed cells, as illustrated in Figures 1a and 1b. For the viability assay, both inorganic and organic mercury induced a cytotoxic effect. Organic mercury was more cytotoxic than inorganic mercury for macrophages and lymphocytes. There was a significant decrease in splenocytes viability cultured in the presence of organic mercury at concentrations ranging from 10^{-5} M to 10^{-3} M. The same effect was observed at concentrations ranging from 10^{-4} M to 10^{-3} M when cells were exposed to inorganic mercury. Cadmium induced a slight but significant decrease in macrophages viability at a concentration of 10^{-3} M and for the lymphocytes a significant decrease was observed at concentrations ranging from 10^{-4} M to 10^{-3} M. For lymphocytes, zinc induced a cytotoxic effect at concentrations ranging from 10^{-4} M to 10^{-3} M whereas selenium induced a cytotoxic effect at lower concentrations (i.e. from 10^{-5} M to 10^{-3} M; Fig. 1a). However, zinc was more cytotoxic than selenium at a concentration of 10^{-3} M (Fig. 1a). There was no significant difference in macrophages viability when cultured in the presence of selenium or zinc (Fig. 1b).

Determination of activated and non activated macrophage antigen I-A^b expression

We performed I-A^b and F4/80 assays to verify if Con A was a good activator of spleen macrophages. I-A^b synthesis is an expression marker of an activated state of the cell and F4/80 is a plasma membrane component found in most macrophages. In Figures 2a and 2b, the cells that expressed both I-A^b and F4/80 are in the upper right quadrant. When the cells were cultured in the presence of Con A (Fig. 2b) the expression of the I-A^b antigen was increased when compared to the cells that were not exposed to Con A (Fig. 2a). Figure 2c shows the shift of the FL-1 fluorescent peak when the cells were exposed to Con A, indicating an increase of FL-1 fluorescence.

3H-methyl-thymidine incorporation in activated and non activated lymphocytes

Lymphocytes proliferation after a pre-incubation of the lymphocytes with Con A (for activated cells) and RPMI (for non-activated cells) is shown in Figure 3. The proliferation was higher in cells that were pre-incubated with Con A than in cells that were not pre-incubated.

Determination of IC₅₀ value for lymphocytes and macrophages

Linear regressions were performed on the data in order to obtain IC₅₀ values for the lymphocytes proliferation assay and macrophages phagocytosis assay (i.e. 50% suppression of phagocytosis and proliferation). These data are presented in Table 1. Our results show that for all heavy metals an effect was observed in both lymphocytes and macrophages. IC₅₀ could be calculated for all heavy metals except for selenium in macrophages as a result of the lack of measurable effect. Organic mercury was the most toxic compound towards lymphocyte proliferation and phagocytosis assay, with IC₅₀ values of 3.66×10^{-7} M for non-activated lymphocytes and 7.46×10^{-5} M for non-activated macrophages. IC₅₀ values were in the range of 10^{-7} M to 10^{-5} M for the non-activated lymphocytes and of 10^{-7} M to 10^{-4} M for the activated lymphocytes. IC₅₀ values were in the range of 10^{-5} M to 10^{-4} M for the non-activated macrophages and 10^{-4} M for the activated macrophages. The IC₅₀ values for the stimulated cells were significantly higher than the non-activated cells when exposed to cadmium, inorganic mercury and zinc for the lymphocytes and organic mercury for both populations when exposed.

Macrophages phagocytic activity after cadmium exposure

Figure 4 presents an example of a dose-response curve of phagocytic activity obtained with macrophages exposed to various concentrations of cadmium. There was a significant increase of phagocytosis when activated cells were exposed to a low concentration (10^{-7} M). At higher concentrations (i.e. 10^{-3} M), cadmium impaired phagocytic activity. The phagocytosis percentage was higher in

activated cells than in non-activated cells, and significant differences were observed at all concentrations as well as in cells not exposed to cadmium. Differences between activated cells and non-activated cells were observed when the macrophages were exposed to selenium and inorganic mercury (data not shown).

Lymphocytes proliferation after cadmium exposure

Figure 5 presents an example of a dose-response curve of lymphocytes proliferation obtained when cells were exposed to various concentrations of cadmium. There was a significant decrease of proliferation at 10^{-8} M for both activated and non-activated cells, in activated cells at 10^{-7} M and in non-activated cells at 10^{-6} M whereas a significant increase occurred in non-activated cells at 10^{-7} M. As cadmium concentration increased the trend was toward immunosuppression. Indeed at 10^{-5} M and higher, cadmium drastically impaired lymphocytes proliferation. There were significant differences at all concentrations between the non-activated and activated cells except at 10^{-7} M, 10^{-4} M and 10^{-3} M (Fig. 5). Similar results were obtained for mercury compounds, zinc and selenium (data not shown).

Evaluation of intracellular level of thiols

Figure 6 presents an example of a dose-response curve of intracellular levels of thiols in lymphocytes and macrophages obtained when cells were exposed to various concentrations of organic mercury. Activated splenocytes displayed a significant increase in intracellular thiols levels when exposed to organic mercury at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-6} M. There was also a significant increase in activated cells that were not exposed to metal when compared to non-activated cells. There was a significant increase in intracellular thiols content when activated lymphocytes were exposed to organic mercury at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-6} M when compared to the control. In contrast, non-

activated macrophages showed a significant decrease in intracellular thiols level when exposed to organic mercury at 10^{-8} M. There was a significant decrease in both activated and non-activated cells when exposed to higher concentrations of organic mercury (i.e. from 10^{-5} M to 10^{-3} M)

Figure 7 presents an example of a dose-response curve of intracellular level of thiols in lymphocytes and macrophages obtained when cells were exposed to various concentrations of selenium. There was a significant difference between non-activated and activated splenocytes at all concentrations even for cells that were not exposed to selenium. There was a significant increase of intracellular thiols in activated lymphocytes when exposed to selenium at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-4} M and from 10^{-7} M to 10^{-4} M in non-activated lymphocytes. However, a higher concentration of selenium (i.e. 10^{-3} M) induced a significant decrease in intracellular thiols levels in activated macrophages and in both activated and non-activated lymphocytes. Moreover, when compared to non-activated cells, activated cells showed a significant increased in intracellular thiols content following exposure to cadmium, inorganic mercury and zinc (data not shown). The intracellular thiols content of both activated and non-activated macrophages was significantly higher than in lymphocytes when exposed to heavy metals (Figs. 6, 7 and data not shown).

Apoptosis in splenocytes after heavy metals exposure

Figure 8 presents an example of a dose-response curve of lymphocytes and macrophages apoptosis obtained when cells were exposed to various concentrations of organic mercury. There was a significant increased in the apoptosis of mice splenocytes when cultured with organic mercury at concentrations ranging from 10^{-5} M to 10^{-3} M. However, low concentrations of organic mercury (i.e. from 10^{-8} M to 10^{-7} M) induced a significant decrease of apoptosis in activated macrophages. There was a significant difference between non-activated and activated cells at all concentrations for macrophages and at concentrations ranging from 10^{-8} M to 10^{-7} M and from 10^{-5} M to 10^{-3} M for

lymphocytes. Activated macrophages showed a higher percentage of apoptosis than non-activated macrophages when cultured with low concentration of organic mercury (i.e. from 10^{-9} M to 10^{-6} M and even in cells that were not exposed to organic mercury). In contrast, non-activated macrophages showed a higher percentage of apoptosis than activated macrophages when cultured with the higher concentrations of organic mercury (i.e. 10^{-5} M to 10^{-3} M). Contrary to macrophages, activated lymphocytes showed a higher percentage of apoptosis than non-activated lymphocytes when cultured with higher concentrations of organic mercury (i.e. 10^{-5} M to 10^{-3} M). Non-activated lymphocytes showed a higher percentage of apoptosis than activated lymphocytes when cultured with low concentration of organic mercury (i.e. significant from 10^{-9} M to 10^{-8}).

Figure 9 presents an example of a dose-response curve of lymphocytes and macrophages apoptosis obtained when cells were exposed to various concentrations of zinc. There was a significant increase in the apoptosis of mice splenocytes when cultured with zinc at a concentration of 10^{-3} M and activated lymphocytes showed a significantly higher percentage of apoptosis than non-activated lymphocytes at this concentration. Zinc induced a significant increase in apoptosis at 10^{-8} M, 10^{-5} M and 10^{-4} M in non-activated lymphocytes, at 10^{-7} M and 10^{-4} M in activated lymphocytes and at 10^{-7} M in non-activated macrophages when compared to their respective control. There was a significant difference between non-activated and activated macrophages at all concentrations as well as in cells that were not exposed to zinc except at 10^{-3} M and at concentrations of 10^{-7} M, 10^{-4} M and 10^{-3} M for lymphocytes.

DISCUSSION

Heavy metals toxicity

Industrialization has caused a dramatic increase of heavy metal concentrations in the environment. Their potential toxicity has been demonstrated on numerous physiologic systems including the immune system. Heavy metals such as mercury, cadmium, zinc and selenium constitute a large group of environmental and occupational agents that can cause immunomodulatory effects (Lawrence and McCabe, 2002 : 293). The purpose of this study was to increase our understanding of the toxic effects of these metals on the immune system using *in vitro* assays to assess cell competence.

For the first objective of this research, we established the cytotoxic potential of several heavy metals (organic mercury, inorganic mercury, cadmium, zinc and selenium) on lymphocyte and macrophage cells. To achieve this first objective, we generated a dose-response curve for each metal. This allowed us to assess the potential of each metal to affect viability in both cell populations after an *in vitro* exposure. Our results clearly demonstrate that the sensitivity of lymphoid cells varies considerably with metal species as well as between cell populations (i.e. lymphocytes or macrophages) and treatments (activated or non-activated). Quantitation of the sensitivity using IC_{50} indicates that organic mercury was the most potent inhibitor of macrophages phagocytosis and lymphocytes proliferation. Organic mercury was the most cytotoxic compound with a cytotoxic concentration of $\geq 10^{-5}M$ followed by inorganic mercury with a cytotoxic concentration of $\geq 10^{-4}M$ (Figs. 1a and 2b). Thus, cytotoxic potential of methylmercury for splenocyte cells appeared to be at least ten times greater than the cytotoxicity of mercury chloride (Voccia and al., 1994 : 37). For the other metals that were considered less toxic for the immune system, we observed different cytotoxic potentials for the macrophages and the lymphocytes. The cytotoxic concentration of cadmium in lymphocytes was $\geq 10^{-4}M$, followed by selenium $\geq 10^{-4}M$ and by zinc $\geq 10^{-3}M$ (Fig. 1A). Zinc appeared to be more cytotoxic than selenium at a concentration of $10^{-3}M$. For the macrophages, the

cytotoxic concentration of cadmium was $\geq 10^{-3}\text{M}$ and was slightly lower for zinc. Our results also demonstrate that the lymphocytes are more sensitive to the heavy metals studied than the macrophages.

In addition, quantitation of the sensitivity using IC_{50} indicates that organic mercury was the most potent inhibitor of macrophages phagocytosis and lymphocytes proliferation (Table 1). Organic mercury was the most potent inhibitor of phagocytosis and proliferation with the lowest IC_{50} (i.e. $7.46 \times 10^{-5}\text{M}$ and $3.66 \times 10^{-7}\text{M}$ respectively) followed by inorganic mercury (i.e. $3.18 \times 10^{-4}\text{M}$ and $1.79 \times 10^{-6}\text{M}$) and cadmium (i.e. $4.88 \times 10^{-4}\text{M}$ and $6.28 \times 10^{-6}\text{M}$). Selenium and zinc were the least immunotoxic metals with respect to proliferation and produced similar IC_{50} (i.e. $5.89 \times 10^{-5}\text{M}$ and $8.35 \times 10^{-5}\text{M}$ respectively). However, selenium was less cytotoxic than zinc with respect to phagocytosis since selenium did not induce a decrease of 50% in phagocytosis activity. The same heavy metal modulation was observed *in vitro* on primary humoral immune responses of lymphocyte activities (Lawrence, 1981 : 439).

Activation

The effectiveness of Con A to activate macrophages and the lymphocytes when exposed to heavy metals was confirmed. Our results show that when the macrophages were in the presence of Con A (activated) there was an increase in the expression of I-A molecule (CMH II) when compared to the cells that were cultured in the absence of Con A (non-activated) (Fig. 2c). Since the I-A molecule is expressed on cells other than the macrophages, we simultaneously analyzed the expression of the antigen F4/80 (presented in Figs. 2a and 2c) which is present on the surface of the macrophages and absent on all other types of cells that are not defined as mononuclear phagocytes (Hume, Perry and Gordon, 1984 : 503). This assay demonstrated that the expression of the histocompatibility II major complex by the macrophages which was increased in the activation phase was clearly associated with the presence of lymphocyte T antigens (Adams, 1982 : 285; Adams and Hamilton, 1984 : 283). Furthermore, studies have shown an

increased expression of the molecule I-A on activated macrophages (Adams and Hamilton, 1984 : 283; Unanue and Allen, 1987 : 551). The membrane expression of the I-A molecule (CMH II) was therefore an excellent expression marker for the macrophages in an activated state (Unanue, 1984 : 395). In the case of lymphocytes, the incorporation of tridiated thymidine in the activated cells is much more evident than in the cells at rest (Fig. 3). Lymphocytes normally exist as resting cells in the G₀ phase of the cell cycle and when activated with Con A they rapidly enter G₁ and progress through the cell cycle (Janeway, Travers and Travers., 1997: 2:39). Analysis of the incorporation of ³H-thymidine into the DNA of cells when cultured in presence of Con A demonstrated the activating properties of Con A.

The second part of this research was aimed at demonstrating the significant differences between activated (with Con A) and non-activated cells in the presence of heavy metals. When immune cells are affected by foreign agents, cells respond to extracellular signals through a variety of mechanisms, including immune cells activation. The immune activation depends on a critical interrelationship between the phagocytes and the lymphocytes. We noticed that the phagocytosis percentage was significantly higher in activated cells than in non-activated cells at all metal concentrations except 10⁻³M, as well as in cells that were not exposed to cadmium. Our results clearly demonstrate that Con A significantly increased phagocytosis in macrophages. Cadmium induced a significant decrease in phagocytosis for both activated and non-activated at a concentration of 10⁻³M when compared to their respective controls but activated cells showed a greater phagocytic activity (non-significant) than non-activated cells. However, there was a significant phagocytosis increase when activated cells were exposed to a concentration of 10⁻⁷M, as cadmium tends to stimulate phagocytosis at low concentrations. At a higher concentration at which toxicity increased (i.e. decreased cell viability), an impairment of macrophage phagocytic activity and a decrease in lymphocytes proliferation was notable. Activated lymphocytes showed a significant increase in proliferation when compared to the

cells at rest. Statistically significant results were achieved for all concentrations except 10^{-7}M , 10^{-4}M , and 10^{-3}M . Similar results were achieved with the other four metals (results not shown). Our results show that cell activation has a protective effect against cadmium induced impairment of phagocytic activity or proliferation, since the percentages of proliferation and phagocytosis were greater in activated cells than in non-activated cells.

The activation of T lymphocytes and macrophages with Con A also produced a change in the concentration levels of IC_{50} . For each metal, we calculated the IC_{50} of the splenocytes that were previously exposed to Con A in order to compare them with cells that had not been exposed to Con A (Table 1). We noticed that the activated cells required a greater amount of the metal to show 50% of inhibition in phagocytic activity of the macrophages and the lymphocyte proliferation (Table 1). The differences between activated and non-activated cells were all significant except when the cells were exposed to selenium. The IC_{50} values obtained for lymphocytes when exposed to organic mercury were $7.68 \times 10^{-7}\text{M}$ for activated cells and $3.66 \times 10^{-7}\text{M}$ for the cells at rest. Activated cells were 2.10 times more resistant than non-activated cells when exposed to organic mercury and 2.30 times more resistant when exposed to inorganic mercury. The difference between activated cells and non-activated cells was higher when cells were exposed to zinc or to cadmium.

The IC_{50} values obtained for macrophages when exposed to organic mercury were $1.42 \times 10^{-4}\text{M}$ for activated cells and $7.46 \times 10^{-5}\text{M}$ for the cells at rest. Activated macrophages were 1.90 times more resistant than non-activated cells when exposed to organic mercury. The differences between the activated states were observed for all the metals tested but were not significant; no data was recorded for selenium because this metal did not impair phagocytic activity enough to show 50% of inhibition.

Thiols-protection effects

Ions of metals such as mercury and cadmium are known to exhibit a high affinity for thiol groups and may therefore severely disturb many metabolic functions in the cell (Hultberg, Andersson and Isaksson., 1998: 203). Glutathione (GSH) is the most abundant, non-protein thiol, being found in the millimolar range in most cells (Dickinson and Forman, 2002 : 488). The response of a cell to a stressor, such as heavy metals, involves changes in thiol content (Dickinson and Forman, 2002 : 488). Glutathione is considered an important cofactor in lymphocyte activation and proliferation (Knight, 2000 : 145). This would suggest that modulation of cellular thiols may contribute to the immunomodulatory effects of heavy metals. The intracellular level in thiols was measured with the CMFDA which is a non-fluorescent probe that can diffuse through membranes. An advantage of using CMFDA to measure intracellular thiol levels is its ability to facilitate quantitative measurements of living cells (Zurgil et al., 1999: 32). Since the induction of metallothionein biosynthesis by metal ions is relatively slow, considerable toxicity by metal ions could occur before the establishment of effective levels of metallothionein (Hultberg, Andersson and Isaksson., 1998: 204). Hultberg (1998) suggests that glutathione could possibly function as a primary defense against metal ion toxicity during this period. Since the exposure time with the heavy metals was three hours, the GSH may be in part, the principal component that was measured in our research. Furthermore, it has previously been demonstrated that GSH was the dominant thiol inside the cell and that cysteine is largely found on the outside of the cell (Hultberg, Andersson and Isaksson, 2001 : 93). Immediately after the CMFDA penetrates the cell, esterase hydrolysis converts it to fluorescent 5-chloromethyl fluorescein (CMF) via a process called fluorochromasia (Zurgil and al., 1999 : 23). Intracellular CMF reacts with thiols on proteins and peptides to form an impermeant, fluorescent aldehyde-conjugate product (SH-F) (Zurgil and al., 1999 : 26). However, there are non-linked CMF residuals in the cell that can bias the results and the concentration of intracellular free CMF changes as the remaining free CMF continues to bind to thiol residues. Therefore, the ratio between the two subgroups will change with time (Zurgil and

al., 1999 : 23). At lower CMFDA concentrations (2.5 and 5 μM) and during a period of time ranging from 10 to 30 minutes, accumulated free CMF molecules are processed by GST (glutathion-S-transferase) resulting in a covalently bound fluorescent product (Zurgil and al., 1999 : 23). Therefore, in order to minimize the non-specific fluorescence of the free CMF composite, a low concentration of CMFDA (i.e. 5 μM) was used to ensure that the bound fluorophore is dominant. Furthermore, increasing the incubation period with the CMFDA probe beyond 30 minutes will also help to minimize free CMF molecules.

Difference in the level of thiols

Once the parameters of the probe were established, we had to determine whether the protective effect of the activation of the cells with Con A paralleled an increase of intracellular thiols level. In fact, we noticed that the cells that were activated by the Con A presented an intracellular thiols level greater than the cells that were not activated. This tendency was noticed in all cells that were exposed to the five heavy metals. There was a significant increase in intracellular thiols content when activated lymphocytes were exposed to organic mercury at concentration ranging from 10^{-9}M to 10^{-6}M when compared to the control. Many different conditions are known to change intracellular glutathione content including heavy metals. Exposure to compounds that generate reactive species such as heavy metals can increase the content of GSH by increasing the rate of GSH synthesis (Dickinson and Forman, 2002: 1021). There was a significant decrease of glutathione in both activated and non-activated cells when exposed to higher concentrations of organic mercury (i.e. from 10^{-5}M to 10^{-3}M ; Fig. 8). Decrease in intracellular glutathione has been demonstrated in *in vitro* and *in vivo* studies involving heavy metals (Yasutake and Hirayama, 1994 : 512). Even a partial depletion of intracellular GSH pool has a dramatic consequence on the process of blast transformation and proliferation, as well as for the generation of cytotoxic T cells (Zurgil and al., 1999: 31). Non-activated macrophages showed a significant decrease in intracellular thiols levels when exposed to low a

concentration of organic mercury (i.e. 10^{-8} M) which demonstrates that non-activated macrophages may be more sensitive (Fig. 8).

There was a significant difference in intracellular thiols concentrations between non-activated and activated splenocytes at all concentrations even in cells that were not exposed to selenium, demonstrating that Con A increased intracellular thiols (Fig. 9). Furthermore, there was a significant increase of intracellular thiols in activated lymphocytes when exposed to selenium at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-4} M and from 10^{-7} M to 10^{-4} M in non-activated lymphocytes showing that selenium may increase the intracellular thiols content as well. However, a higher concentration of selenium (i.e. 10^{-3} M) induced a significant decrease in intracellular thiols level in activated macrophages and in both activated and non-activated lymphocytes. Once more, activated cells showed a higher level of intracellular thiols than non-activated cells (Fig. 9). These results clearly demonstrated that activated cells are more resistant than non-activated cells since the percentage viability of activated cells is greater than non-activated cells. It was demonstrated that the activation of cells by a mitogen such as Con A or PHA significantly increased the content of intracellular GSH (Lawrence, Song and Weber, 1996 : 611). Most intracellular mechanisms such as membrane transport, protein synthesis and RNA and DNA synthesis see their activity increase following an activation of lectine (Hamilos, Mascali and Wedner, 1991 : 75). In this sense, activation protects the cells since cellular activity is increased as well as the thiols content allowing for the sequestration of a greater quantity of metals.

Lymphocytes and Macrophages comparison

In order to demonstrate the difference of susceptibility to heavy metals of two cellular populations of the splenocytes, we compared the intracellular levels of thiols as well as a percentage of apoptosis present in the cells when they are exposed to the heavy metals. We noticed that the macrophages had a significantly greater intracellular level of thiols than the lymphocytes. This was noted for

exposures to selenium and organic mercury (Figs. 6 and 7). The same observations held true in the case of cadmium, zinc, and inorganic mercury exposures (results not shown). Macrophages contain a considerable quantity of cysteine and this allows them to synthesize glutathione and even to participate in the creation of glutathione in the lymphocytes. Macrophage activity was demonstrated to deliver a great number of reduced cysteine which in turn increase intracellular glutathione of activated T cells that are in close proximity (Droge and al., 1995 : 255). This phenomenon can also be explained by the fact that morphologically, macrophages have a small sized core which leaves a greater intracytoplasmic space while lymphocytes have a very large core and very little intracytoplasmic space. Since macrophages have thiol levels greater than those of lymphocytes, they would tend to be more resistant against the toxicity of heavy metals.

High concentrations of metals also induced a higher percentage of apoptosis in lymphocytes than in macrophages. That was the case for the activated cells and the non-activated cells when exposed to organic mercury and activated cells when exposed to zinc (Figs. 8 and 9) and as well as for cadmium, inorganic mercury and selenium (results not shown). Previous work had shown that low levels of organic mercury (0.6 to 5 μM) induce apoptosis in human T-cells (DeMoor and Koropatnick, 2000 : 367). Our results demonstrate that activated macrophages present a higher percentage of apoptosis at concentrations ranging from 10^{-9}M to 10^{-6}M when exposed to organic mercury and from 10^{-9}M to 10^{-4}M when exposed to zinc. This was also true for cells that were not exposed to heavy metals. We observed a low level of apoptosis induced by Con A in macrophages at concentrations where metals are not cytotoxic. Con A, normally a mitogen of T-lymphocytes, was found to be a cell-cycle-independent apoptosis inducing agent in cultured murine macrophage PU5-1.8 cells (Suen and al., 2000: 369). Activated lymphocytes displayed a higher percentage of apoptosis than non-activated lymphocytes when cultured with high concentrations of organic mercury and zinc. Impairment of apoptosis activity leads to an accumulation of activated cell in the

body which in turn can lead to auto-immune phenomena or inflammation. Apoptosis has been identified as the major mechanism by which inflammatory cells are removed during an inflammatory injury (Ma and al., 2003: 2335). Our results clearly demonstrate the difference of susceptibility present in both cellular populations, and that lymphocytes are much more sensitive than macrophages when they are exposed to heavy metals.

REFERENCES

- ADAMS, D. O. 1982. "Molecules, membranes and macrophages activation". Immunology today, vol. 3. p. 285-287.
- ADAMS, D. O. and T. A. Hamilton. 1984. "The cell biology of macrophages activation". Ann. Rev. Immunol., vol. 2. p. 283-318.
- DEMOOR, J. M. and D. J. Koropatnick. 2000. "Metals and cellular signaling in mammalian cells". Cellular and Molecular Biology, vol. 46. no. 2, p. 367-81.
- DICKINSON, D. A. and H. J. Forman. 2002. "Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol". Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 973. p. 488-504.
- DROGE, W., R. Kinscherf., S. Mihm., D. Galter., S. Roth., H. Gmünder., T. Fischbach and M. Bockstette. 1995. "Thiols and the immune system: Effect of N-acetylcysteine on the T cell system in human subjects". Methods in enzymology, vol. 251. p. 255-270.
- GOYER, R. A. 2001. "Toxic effects of metals". In C. D. Klaassen et al. Casarett and Doull's Toxicology, 5th éd., p. 691-736. New York.
- HAMILOS, D. L., J. J. Mascali. and H. J. Wedner. 1991. "The role of glutathione in lymphocyte activation--II. Effects of buthionine sulfoximine and 2-cyclohexene-1-one on early and late activation events". International Journal of Immunopharmacology, vol. 13. no. 1, p. 75-90.
- HAMILOS, D. L., P. Zelarney. and J. J. Mascali. 1989. "Lymphocyte proliferation in glutathione-depleted lymphocytes: direct relationship between glutathione availability and the proliferative response". Immunopharmacology, vol. 18. no. 3, p. 223-35.
- HULTBERG, B., A. Andersson. and A. Isaksson. 1998. "Alterations of thiol metabolism in human cell lines induced by low amounts of copper, mercury or cadmium ions". Toxicology, vol. 126. no. 3, p. 203-12.
- HULTBERG, B., A. Andersson. and A. Isaksson. 2001. "Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol". Toxicology, vol. 156. no. 2-3, p. 93-100.
- HUME, D. A., V. H. Perry. and S. Gordon. 1984. "The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localisation of antigen F4/80: macrophages associated with epithelia". The anatomical record, vol. 210. p. 503-512.

JANEWAY, C. A., J. Travers and P. Travers. 1997. Immunobiologie. 2th éd. Paris, Bruxelles : De Boeck & Larcier.

JANNALAGADDA, S. B. and P. V. V. Prasada Rao. 1993. "Toxicity, bioavailability and metal speciation". Comparative Biochemistry and Physiology, vol. 106C. no. 3, p. 585-595.

KNIGHT, J. A. 2000. "Review: Free Radicals, Antioxidants, and the Immune System". Annals of Clinical and Laboratory Science, vol. 30. no. 2, p. 145-158.

LAWRENCE, D. A. 1981. "Heavy metal modulation of lymphocyte activities. 1. In vitro effects of heavy metals on primary humoral immune responses". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 57. no. 3, p. 439-51.

LAWRENCE, D. A. and M. J. McCabe. 2002. "Immunomodulation by Metals". International Immunopharmacology, vol. 2. no. 2-3, p. 293-302.

LAWRENCE, D. A., R. Song. and P. Weber. 1996. "Surface thiols of human lymphocytes and their changes after in vitro and in vivo activation". Journal of Leukocyte Biology, vol. 60. no. 5, p. 611-8.

LEFFEL, E. K., C. Wolf., A. Poklis. And K. L. White. 2003. "Drinking water exposure to cadmium, an environmental contaminant, results in the exacerbation of autoimmune disease in the murine model". Toxicology, vol. 188. p. 233-250.

MA, J., T. chen., J. Mandelin., A. Ceponis., N. E. Miller., M. Hukkanen., G. F. Ma and Y. T. Konttinen. 2003. "Regulation of macrophage activation". CMLS Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 60. p. 2334-2346.

MISRA, U. K., G. Gawdi., G. Akabani and S. V. Pizzo. 2002. "Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: the role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms". Cellular Signalling, vol. 14. no. 4, p. 327-40.

SUEN, Y. K., K. P. Fung., Y. M. Choy., C. Y. Lee., C. W. Chan and S. K. Kong. 2000. "Concanavaline A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells through clustering of mitochondria and release of cytochrome c". Apoptosis, vol. 5. p. 369-377.

TAPIERO, H., D. M. Townsend. and K. D. Tew. 2003. "The antioxidant role of selenium and seleno-compounds". Biomedicine & Pharmacotherapy, vol. 57. p. 134-144.

THOMPSON, S. A., K. L. Roellich., A. Grossmann., S. G. Gilbert. and T. J. Kavanagh. 1998. "Alterations in immune parameters associated with low level methylmercury exposure in mice". Immunopharmacology and

Immunotoxicology, vol. 20. no. 2, p. 299-314.

TSANGARIS, G. T. and F. Tzortzatos-Stathopoulou. 1998. "Cadmium induces apoptosis differentially on immune system cell lines". Toxicology, vol. 128. no. 2, p. 143-50.

UNANUE, E. R. 1984. "Antigen-presenting function of the macrophage". Ann. Rev. Immunol , vol. 2. p. 395-428.

UNANUE, E. R. and P. M. Allen. 1987. "The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells". Science, vol. 236. p. 551-557.

UNOSHIMA, M., A. Nishizono., Y. Takita-Sonoda., H. Iwasaka and T. Noguchi. 2001. "Effects of zinc acetate on splenocytes of endotoxemic mice: enhanced immune response, reduced apoptosis, and increased expression of heat shock protein 70". Journal of Laboratory and Clinical Medicine, vol. 137. no. 1, p. 28-37.

VOCCIA, I., Krzystyniak, M., Flipo, D and Fournier, M. 1994. "In vitro mercury-related cytotoxicity and functional impairment of the immune cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". Aquatic Toxicology, p. 37-48.

YASUTAKE, A. and K. Hirayama. 1994. "Acute effects of methylmercury on hepatic and renal glutathione metabolisms in mice". Archives of Toxicology, vol. 68. no. 8, p. 512-6.

ZURGIL, N., M. Kaufman., I. Solodiev. and M. Deutsh.. 1999. "Determination of cellular thiol levels in individual viable lymphocytes by means of fluorescence intensity and polarization". Journal of Immunological Methods, vol. 229. no. 1-2, p. 23-34.

Legends of figures

Figure 1a. Percentage of viability in mice lymphocytes after 3 hours of exposure to heavy metals (cadmium, organic mercury, inorganic mercury, selenium and zinc) at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M. * denotes a significant difference when compared to the control with $p < 0,05$.

Figure 1b. Percentage of viability in mice macrophages after 3 hours of exposure to heavy metals at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M. * denotes a significant difference when compared to the control with $p < 0,05$.

Figure 2. Mice macrophages expression of I-A^b (MHC of class II) in both activated with concanavaline A and non activated cells. The non activated cells that expressed both F4/80 and I-A^b (a). The activated cells that expressed both F4/80 and I-A^b (b). The shifting of the fluorescence that indicated an augmentation of the expression of I-A^b in activated macrophages (c). * denotes a significant difference when compared to the non activated cells with $p < 0,05$.

Figure 3. ³H-methyl-thymidine incorporation in both activated with concanavaline A and non activated cells. * denotes a significant difference when compared to the non activated cells with $p < 0,05$.

Figure 4. Effect of 3 hours exposure to cadmium in both activated and non activated mice macrophages phagocytosis. * denotes a significant difference when compared to the non activated cells with $p < 0,05$. • (non activated), ♦ (activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0,05$.

Figure 5. Effect of 3 hours exposure to cadmium on cell proliferation in both activated and non activated mice lymphocytes determined by ³H-methyl-thymidine incorporation. * denotes a significant difference when compared to the non activated cells with $p < 0,05$. • (non activated), ♦ (activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0,05$.

Figure 6. Determination of intracellular level of thiols in both activated and non activated mice splenocytes after a 3 hours organic mercury exposure. * denotes a significant difference when compared to the non activated cells with $p < 0,05$. • (non activated), ♦ (activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0,05$.

Figure 7. Determination of intracellular level of thiols in both activated and non activated mice splenocytes after a 3 hours selenium exposure. * denotes a significant difference when compared to the non activated cells with $p < 0,05$. • (non activated), ♦ (activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0,05$.

Figure 8. Percentage of apoptosis in mice splenocytes after 3 hours exposure to organic mercury at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M. * denotes a significant difference when compared to the control with $p < 0,05$. • (non activated), ◆ (activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0,05$.

Figure 9. Percentage of apoptosis in mice splenocytes after 3 hours exposure to zinc at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M. * denotes a significant difference when compared to the control with $p < 0,05$. • (non activated), ◆ (activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0,05$.

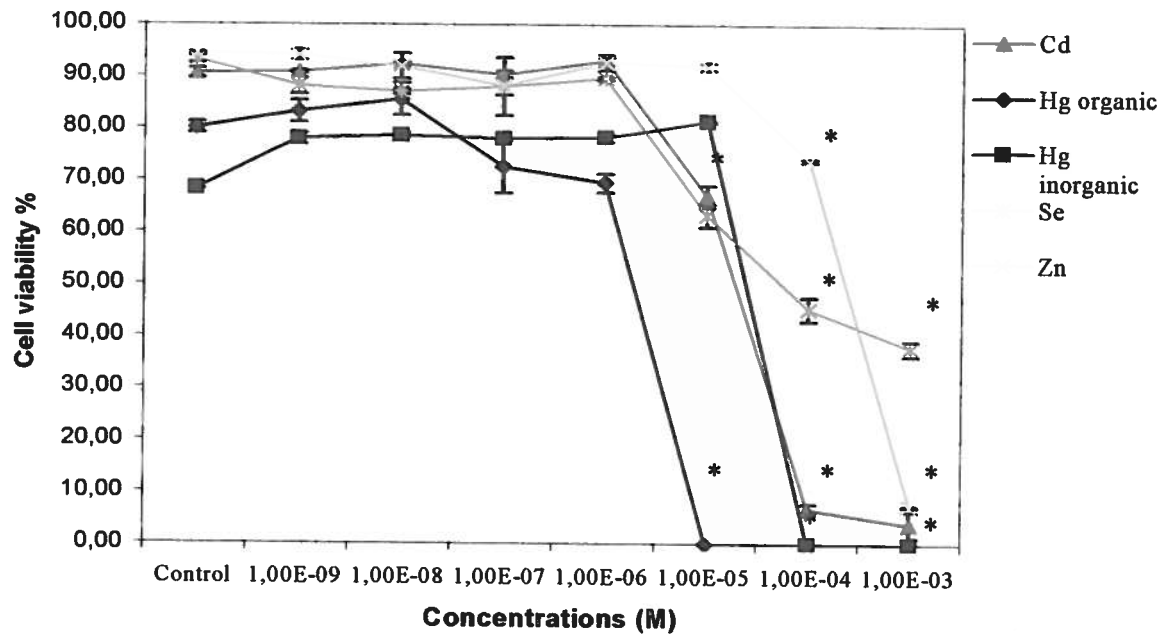


Figure 1a.

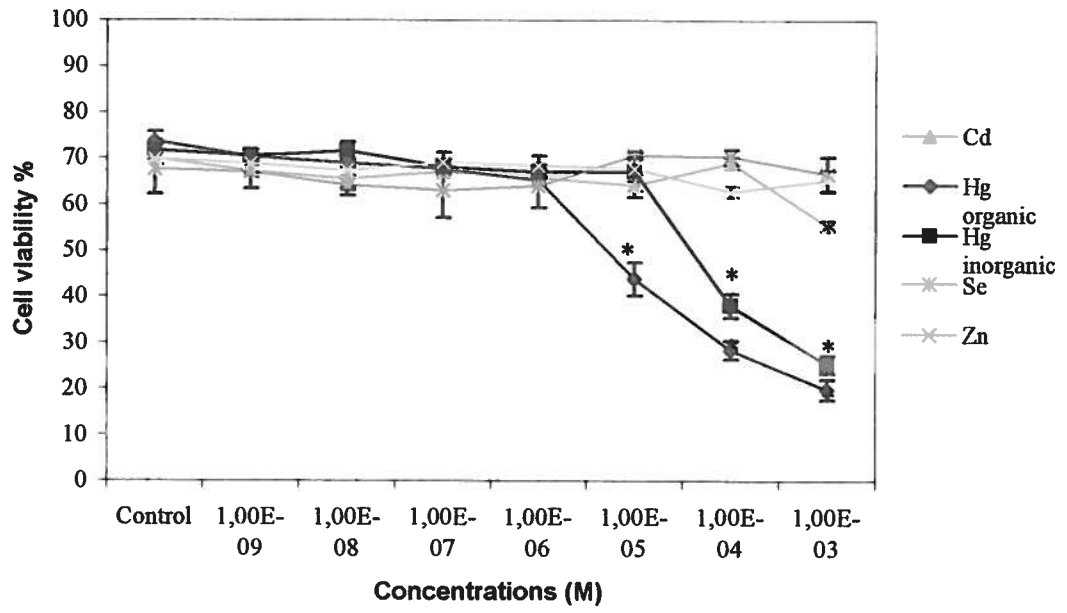


Figure 1b.

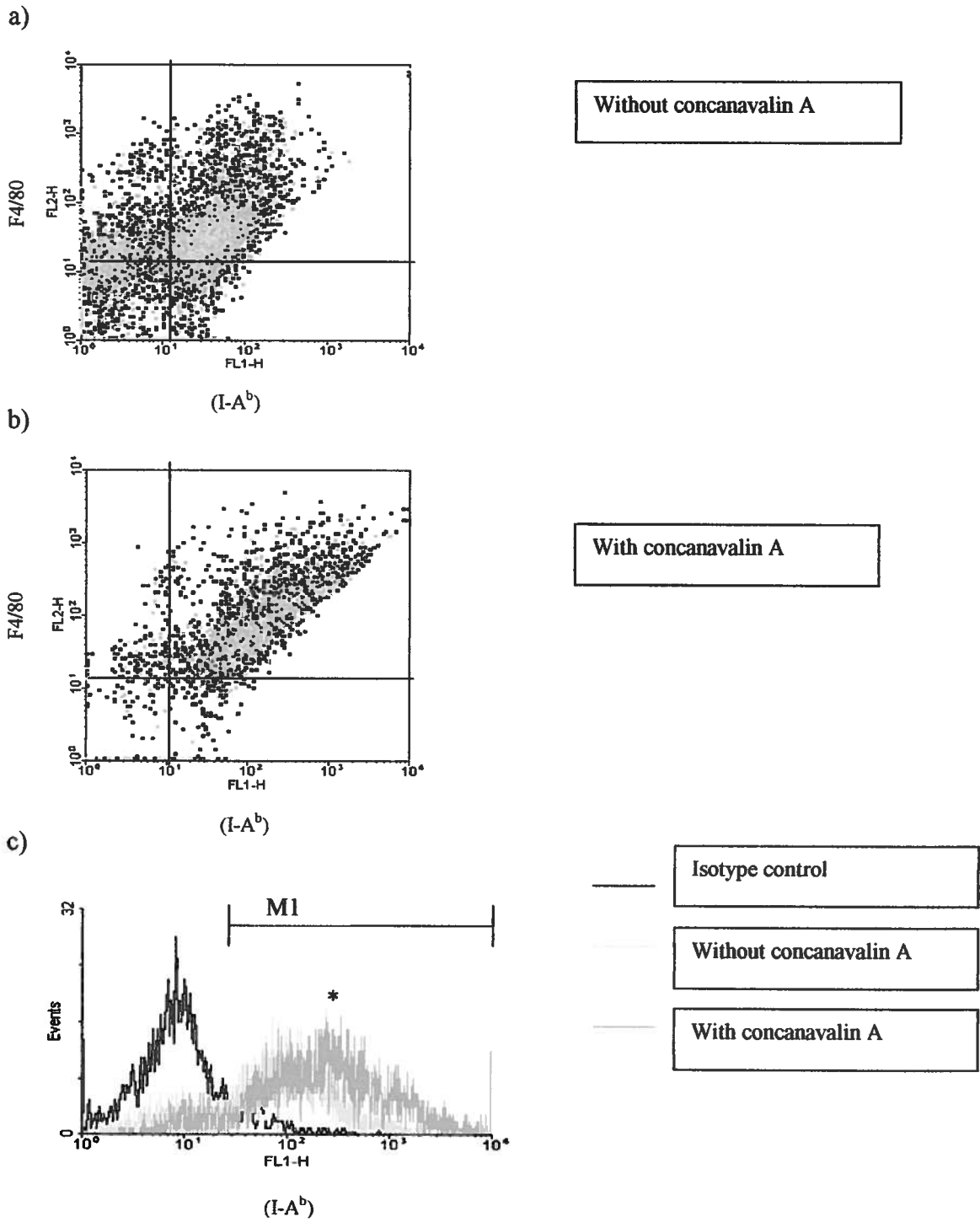


Figure 2.

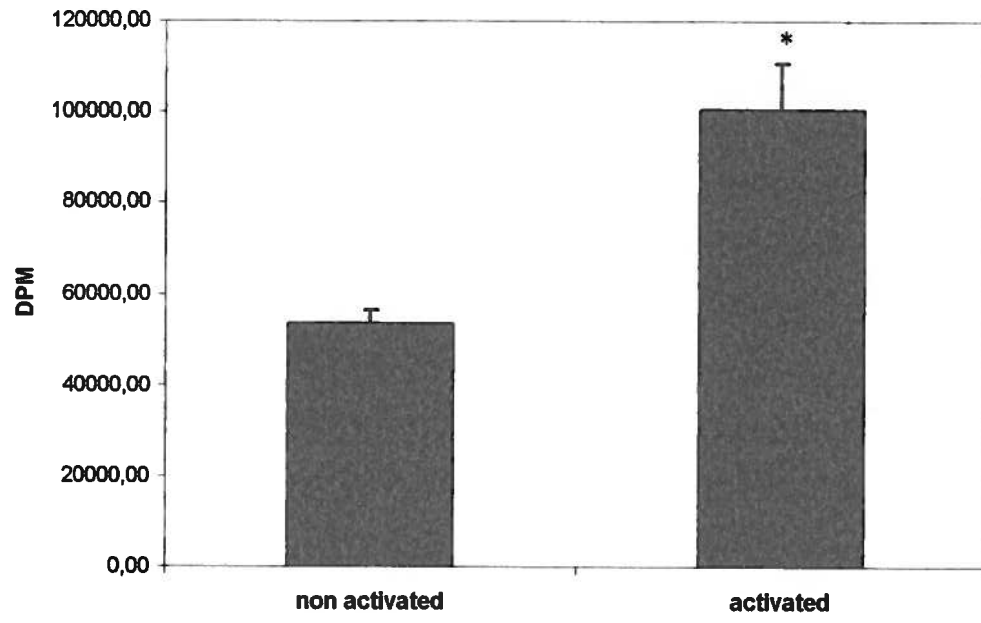


Figure 3.

Table 1. IC₅₀ value of all tested metals for the lymphocytes proliferation assay and macrophages phagocytosis assay after 3 hours of exposure.

	Non activated		activated	
	Lymphocytes	Macrophages	Lymphocytes	Macrophages
Cadmium	6,28E10 ⁻⁶ M	4,88E10 ⁻⁴ M	4,19E10 ⁻⁵ M*	5,63E10 ⁻⁴ M
Inorganic mercury	1,79E10 ⁻⁶ M	3,18E10 ⁻⁴ M	5,32E10 ⁻⁶ M*	3,67E10 ⁻⁴ M
Organic mercury	3,66E10 ⁻⁷ M	7,46E10 ⁻⁵ M	7,68E10 ⁻⁷ M*	1,42E10 ⁻⁴ M*
Selenium	5,89E10 ⁻⁵ M	N.A.	6,98E10 ⁻⁵ M	N.A.
Zinc	8,35E10 ⁻⁵ M	5,44E10 ⁻⁴ M	5,57E10 ⁻⁴ M*	5,58E10 ⁻⁴ M

* denotes a significant difference when compared to the non activated cells with p < 0,05.

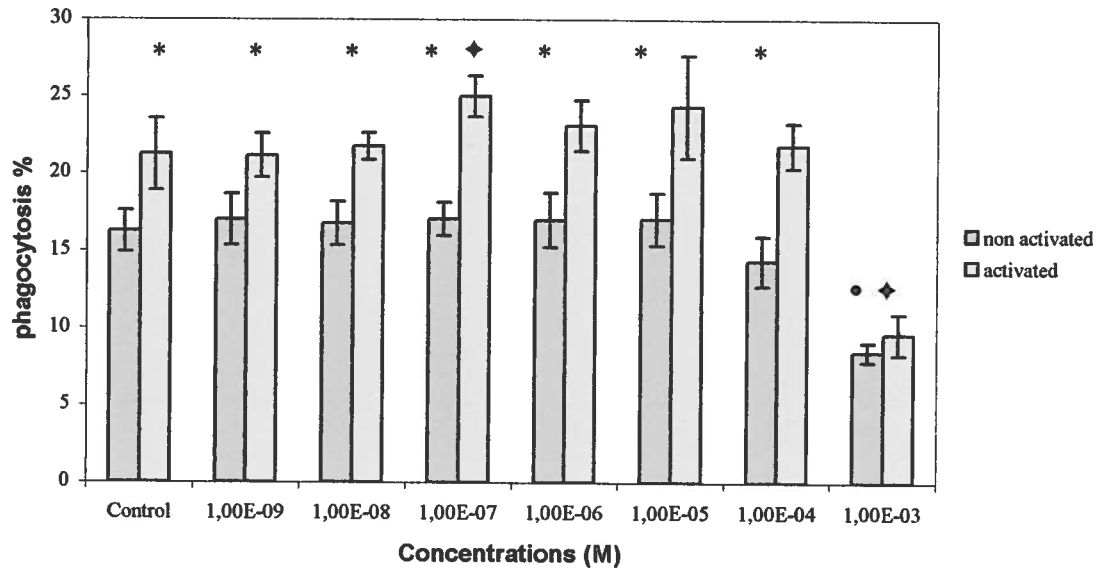


Figure 4.

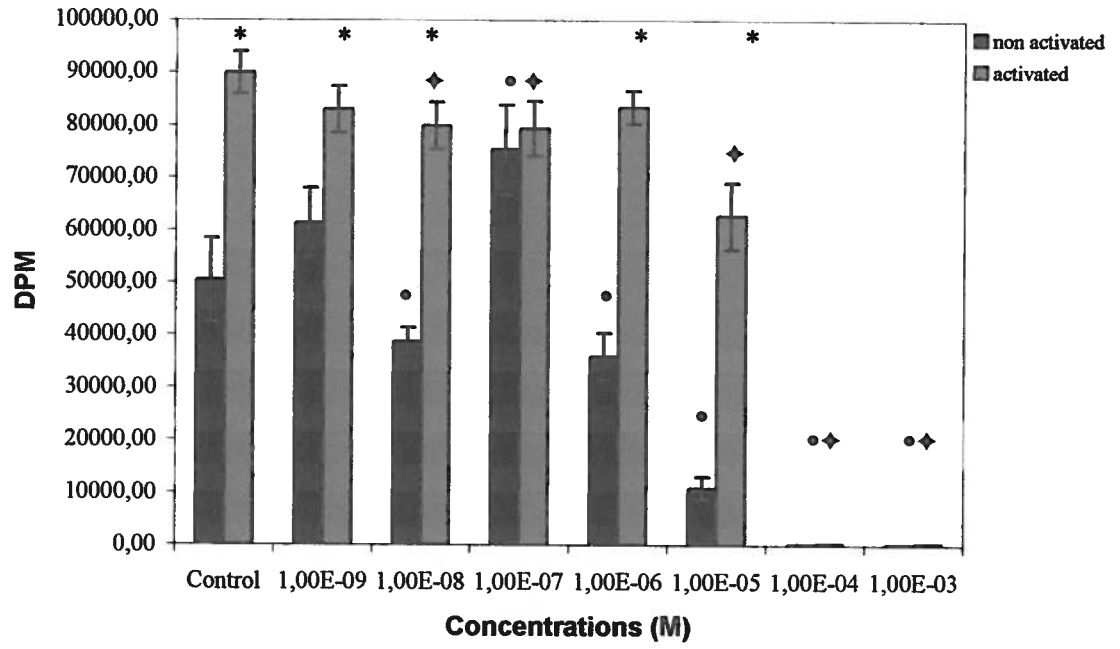


Figure 5.

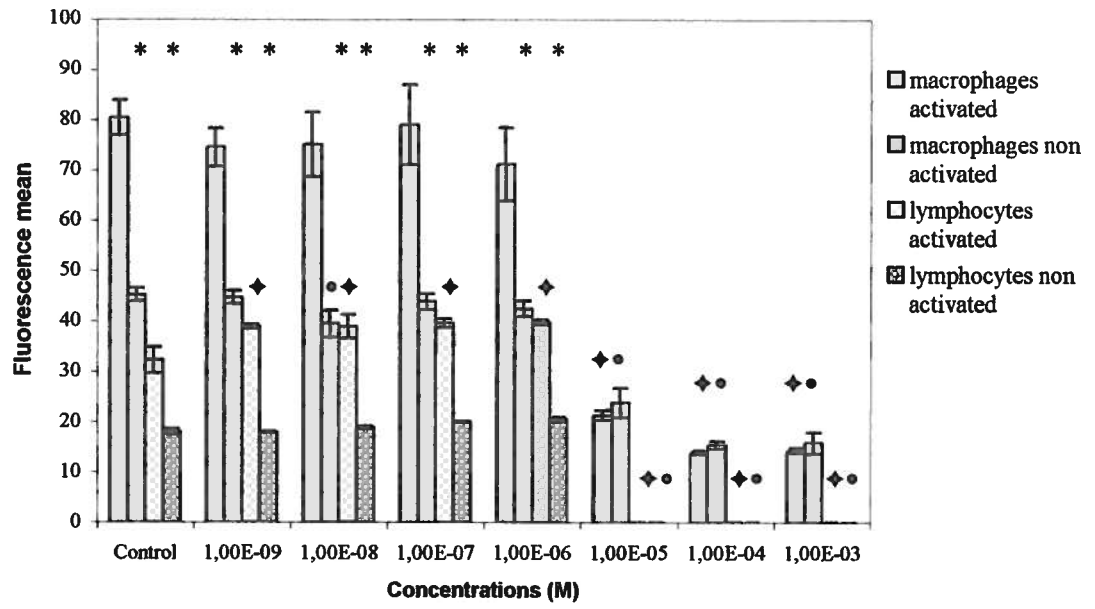


Figure 6.

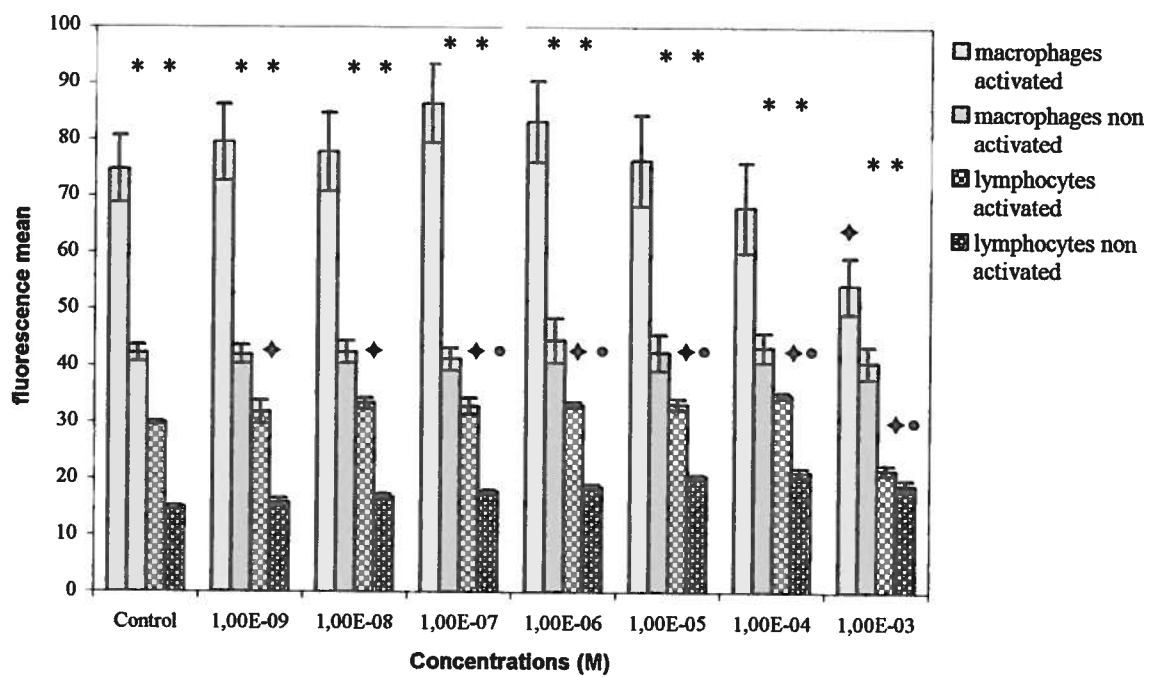


Figure 7.

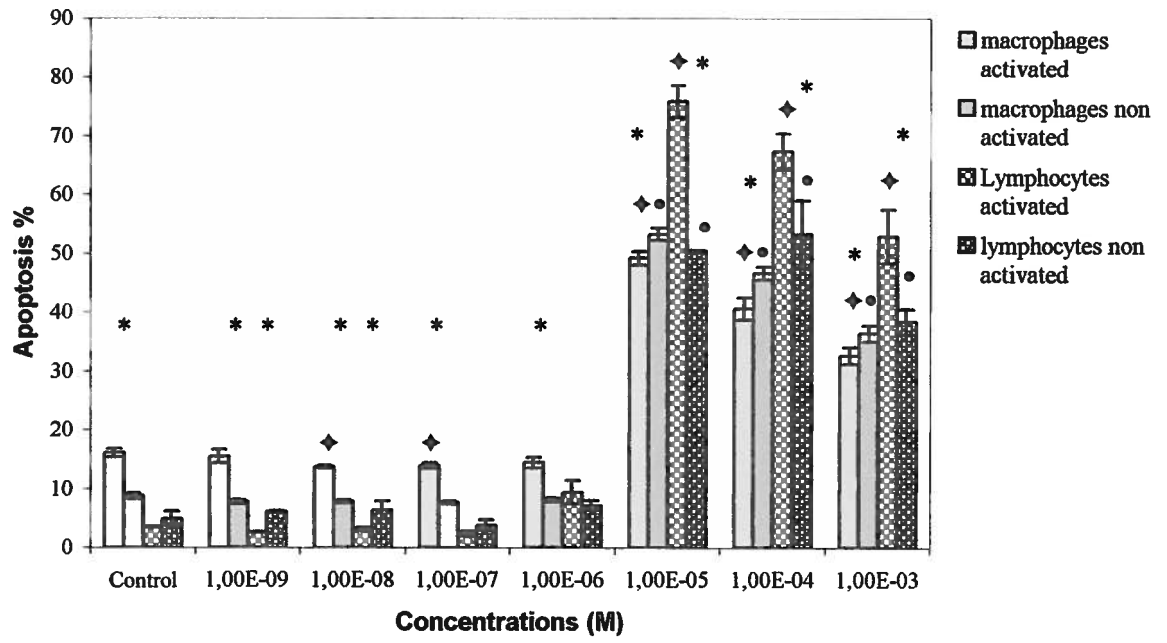


Figure 8.

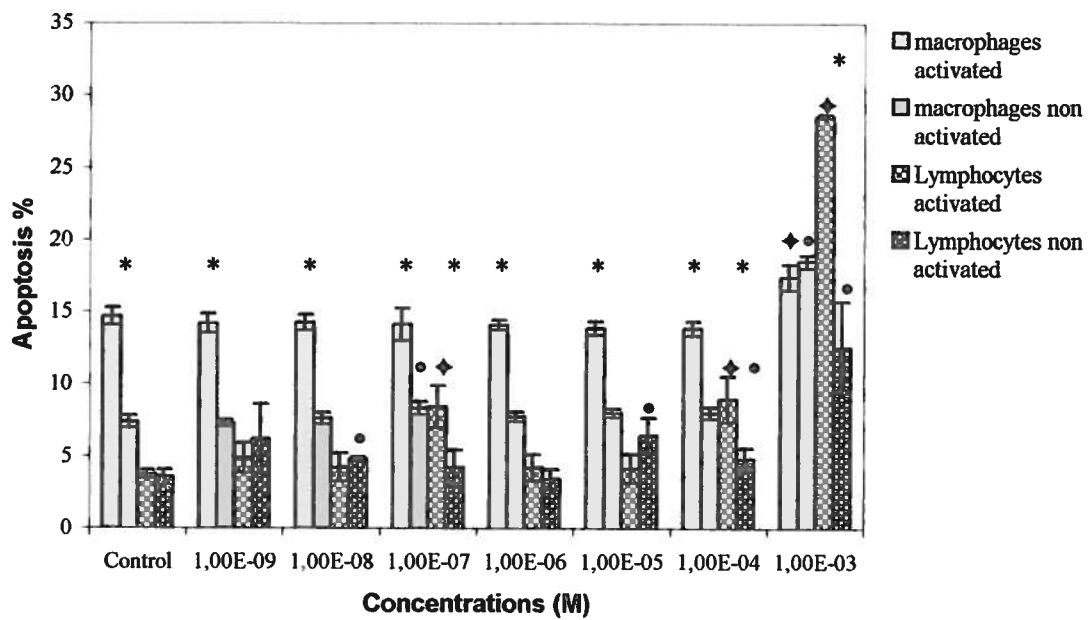


Figure 9.

Chapitre 3

DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans ce chapitre, il sera question de dégager l'essentiel des résultats obtenus plus particulièrement sur la réponse des macrophages murins dans les diverses expériences qui ont eu lieu tout au long de ce projet de recherche. Nous tenterons de saisir la signification de ces résultats en créant des liens avec certains travaux retrouvés dans la littérature.

Évaluation de la toxicité *in vitro* des métaux lourds dans les macrophages

Le premier objectif de cette étude était de déterminer le potentiel cytotoxique et la CI_{50} pour l'essai de la phagocytose des cinq métaux lourds étudiés afin d'évaluer leur toxicité sur les macrophages. Pour accomplir cet objectif, nous avons fait des expériences de courbe doses-réponses afin d'évaluer la capacité des métaux à tuer et à inhiber 50% de la phagocytose des macrophages provenant de la rate de souris LD_{50} et CI_{50} respectivement). Il est connu que les métaux lourds sont cytotoxiques pour les cellules mais cela dépend majoritairement de la sorte du métal, de la dose et de l'espèce. Les concentrations cytotoxiques *in vitro* du mercure chez les macrophages sont de $\geq 10^{-4}M$ pour le mercure inorganique et de $\geq 10^{-5}M$ pour le mercure organique (chapitre 2, figure 1B). De cette façon, le potentiel cytotoxique du mercure organique semble être dix fois plus élevé que celui du mercure inorganique. Nous avons remarqué que le potentiel cytotoxique est beaucoup plus faible pour les autres métaux. En effet, le potentiel cytotoxique du cadmium est de $\geq 10^{-3}M$, il affecte légèrement mais significativement la viabilité des macrophages à cette concentration. Le potentiel cytotoxique du zinc et du sélénium est nul puisqu'ils n'affectent aucunement la viabilité des macrophages (chapitre 2, figure 1B). Des études *in vitro* sur la toxicité des métaux lourds affectant l'immunité humorale place certains métaux dans l'ordre suivant, allant du plus toxique au moins toxique : mercure > cuivre > cadmium > cobalt > chromium > manganèse > zinc > sélénium; plomb et nickel (Lawrence, 1985 : 341).

Un des paramètres testés, fut la phagocytose, une fonction clé chez les cellules phagocytaires et un paramètre important impliqué dans la réponse immunitaire innée et même importante dans le développement de réponses immunes plus complexes telles que la réponse humorale et cellulaire. Afin de confirmer la cytotoxicité des métaux lourds étudiés, nous avons calculé la concentration de chaque métal qui induit 50% d'inhibition de la phagocytose (CI_{50}) chez les macrophages. Le mercure organique inhibe 50% de la phagocytose à une concentration de $7,46 \times 10^{-5}M$ tandis que le mercure inorganique a le même effet à une concentration de $3,18 \times 10^{-4}M$ (chapitre 2, tableau 1). Le cadmium est moins toxique avec une concentration inhibitrice de $4,88 \times 10^{-4}M$ suivit du zinc à $5,44 \times 10^{-4}M$ alors que le sélénium n'est pas cytotoxique car il n'induit aucune inhibition de la phagocytose des macrophages à toutes les concentrations testées (chapitre 2, tableau1). Il était aussi possible de calculer la LD_{50} , c'est à dire, la concentration de métal où l'on retrouve 50% de mortalité cellulaire. Le mercure organique induit 50% de mortalité à une concentration de $2.61 \times 10^{-5}M$ et à une concentration de $3.58 \times 10^{-4}M$. La LD_{50} n'a pu être calculée pour le cadmium, le zinc et le sélénium puisqu'ils n'induisent pas un taux de mortalité cellulaire allant jusqu'à 50%. En effet, à une concentration de $10^{-3}M$, le cadmium affecte significativement la viabilité cellulaire d'environ 10% tandis que le sélénium et le zinc ne l'affectent pas comme il a été mentionné en début de chapitre. Donc le pourcentage de phagocytose diminue avec la viabilité lorsque les cellules sont exposées à une des deux formes de mercure tandis que la phagocytose est diminuée même si la viabilité cellulaire est peu affectée lorsque les macrophages sont mis en culture avec le zinc ou le cadmium. Nos résultats démontrent clairement que le mercure organique est l'inhibiteur le plus puissant de la phagocytose avec la IC_{50} et la LD_{50} la plus faible, suivit du mercure inorganique, vient ensuite le cadmium, le zinc et le sélénium. D'autres études faites sur la toxicité des métaux sur la phagocytose chez d'autres espèces telles que la *Xénopus* (petite grenouille), la truite arc-en-ciel ou les mollusques montrent que le mercure organique est définitivement l'inhibiteur potentiel de la phagocytose suivi du mercure inorganique, du cadmium et du zinc (Fournier et al., 2000 : 416).

Il est intéressant de constater que la sensibilité face aux métaux lourds varie selon le métal, la concentration et l'espèce dans laquelle l'étude est effectuée.

La prolifération des lymphocytes T permet de développer une réponse immunitaire plus spécifique et plus complexe. Mesurer la prolifération des lymphocytes T suite à une exposition aux métaux lourds nous permettait d'avoir une idée sur les effets possibles des métaux lourds sur la réponse à médiation cellulaire. Pour les fins de l'article, afin de confirmer la cytotoxicité des métaux lourds étudiés, nous avons calculé la concentration de chaque métal qui induit 50% d'inhibition de la prolifération (CI_{50}) chez les lymphocytes T. La toxicité des métaux lourds sur les lymphocytes est semblable à celle retrouvée chez les macrophages mise à part quelques différences. En effet, nous avons remarqué que le sélénium induit 50% d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T à une concentration de $5.89 \times 10^{-5}M$ tandis que les macrophages ne semblent pas être affectés lorsqu'ils sont exposés à ces mêmes concentrations. Le mercure organique est le plus toxique puisque qu'il induit le même effet avec une CI_{50} beaucoup plus faible que les autres métaux. Ensuite vient le mercure inorganique, le cadmium le sélénium et le zinc. Il est intéressant de comparer la sensibilité des lymphocytes et des macrophages après avoir été exposés aux métaux lourds. Les lymphocytes T sont beaucoup plus sensibles que les macrophages lorsqu'ils sont exposés aux métaux car les CI_{50} sont de 10 à 20 fois plus faibles pour induire le même effet que nous observons chez les macrophages (c'est à dire, 50% d'inhibition).

Détermination de l'effet de l'activation des macrophages sur la courbe de toxicité

Ensuite, avant même de vérifier l'effet de l'activation des macrophages sur leur sensibilité aux métaux, nous avons vérifié que la Concanavaleine A était un bon activateur pour stimuler les macrophages. Nous avons tout d'abord montré qu'il y avait des différences significatives entre les cellules activées et non activées par la con A et par la suite nous avons établi les conditions optimales,

c'est à dire, le temps d'incubation des cellules avec la Con A et la concentration optimale. Pour ce faire nous avons fait des courbes dose-réponse avec des concentrations de Con A allant de 0 à 40 µg/mL (concentration finale) mesurant le taux de thiols intracellulaires et la phagocytose. La concentration optimale choisie fut 20 µg/mL car c'est à cette concentration qu'on retrouvait une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées et ce pour la phagocytose et niveau de thiols intracellulaires. Le temps le plus court montrant une différence significative entre les cellules activées et non activée était de 30 minutes. Afin de confirmer ces résultats, nous avons exposé les cellules à la Con A aux conditions optimales et par cytométrie de flux nous avons mesuré l'expression des marqueurs F4/80 et I-A^b. I-A^b encode pour l'antigène CMH de classe II exprimé à la surface des cellules de souris. Les antigènes CMH de classe II sont fortement exprimés sur les cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules B, les macrophages les cellules dendritiques et certaines cellules épithéliales. Puisque la molécule Ia est exprimée sur d'autres cellules que les macrophages, nous avons aussi mesuré l'expression de l'antigène F4/80 qui est présent à la surface des macrophages et absent sur tous les autres types de cellules qui ne sont pas définis comme étant des phagocytes mononucléés (Hume, Perry et Gordon, 1984 : 503). Nos résultats démontrent que les macrophages mis en présence de Con A ont une augmentation de l'expression de la molécule Ia (CMH II) par rapport aux cellules qui n'ont pas été mises en présence de Con A (chapitre 2, figure 2a et 2b). Il est intéressant de constater que les résultats présentés à la figure 2c montrent que le pic de fluorescence associé à l'expression de la molécule Ia des cellules activées est significativement déplacé vers la droite que le pic des cellules non activées démontrant ainsi une augmentation de l'expression du CMH II. Des études ont aussi montré une augmentation de l'expression de la molécule Ia sur les macrophages activés (Adams et Hamilton, 1984 : 283). L'expression membranaire de la molécule Ia chez la souris (CMH II) est donc un bon marqueur du macrophage au stade activé (Unanue, 1984 : 395).

Ayant vérifié que la Con A stimulait vraiment les macrophages, nous avons par la suite vérifié l'effet de l'activation des macrophages sur leur sensibilité aux métaux lourds. Les cellules ont été activées avant une exposition aux métaux lourds tel que décrit dans l'article présenté au chapitre 2 (matériel et méthodes). Nous avons activé les cellules avant leurs expositions aux métaux lourds car nous voulions étudier les effets des métaux lourds sur des cellules déjà activées et non sur le potentiel des cellules à être activées en présence des métaux lourds. La phagocytose a été déterminée par les cellules qui ont phagocyté plus de trois billes tandis que les cellules qui ont phagocyté une bille et plus représentent les cellules qui phagocytent. Nous avons remarqué que les cellules stimulées ont un pourcentage de phagocytose nettement plus élevé que les cellules non stimulées. Cet effet est observé sur les cellules qui ont été exposées au cadmium à toutes les concentrations testées sauf à $10^{-3}M$ où l'on remarque une baisse significative par rapport au témoin pour les cellules activées et non activées (chapitre 2, figure 4). À faible concentration de cadmium, soit à $10^{-7}M$, on remarque une augmentation significative de la phagocytose chez les cellules activées par rapport à son témoin. Le pourcentage de phagocytose est nettement plus élevé chez les cellules activées lorsqu'elles sont exposées au sélénium et ce, à toutes les concentrations testées (Annexe B, Figure 8). On remarque que le sélénium induit une légère augmentation significative de la phagocytose chez les cellules non activées par rapport à leur témoin aux concentrations suivantes : $10^{-9}M$, $10^{-7}M$ et $10^{-5}M$. Le sélénium induit aussi une augmentation significative de la phagocytose chez les cellules activées mais nettement plus marquée à une concentration de $10^{-7}M$. On observe aussi une différence significative au niveau de la phagocytose entre les cellules activées et non activées lorsqu'elles sont exposées au mercure inorganique mais pas à toutes les concentrations testées (Annexe B, Figure 4). Cette différence est observée à $10^{-9}M$, $10^{-8}M$, $10^{-6}M$ et $10^{-4}M$. Le mercure inorganique induit une diminution significative par rapport à leur témoin de la phagocytose chez les cellules activées à des concentrations de $10^{-9}M$, $10^{-6}M$, $10^{-5}M$, $10^{-4}M$ et $10^{-3}M$, à des concentrations de $10^{-4}M$ et $10^{-3}M$ chez les cellules non activées et une augmentation significative à $10^{-7}M$. Il est

intéressant d'observer que les cellules activées ont un pourcentage de phagocytose plus élevé que les cellules non activées à des concentrations où l'on a une diminution significative par rapport à leur témoin de l'activité phagocytaire comme par exemple à $10^{-4}M$, démontrant ainsi une plus grande efficacité de la part des cellules activées par rapport aux cellules non activées (Annexe B, figure 4). Le même phénomène est observé chez les macrophages qui ont été exposés au mercure organique. En effet, à fortes concentrations de mercure, c'est à dire des concentrations allant de $10^{-5}M$ à $10^{-3}M$, on remarque des différences significatives. À ces concentrations, les cellules activées ont un pourcentage de phagocytose plus élevées que les cellules non activées et ce, même si le mercure induit une diminution significative de la phagocytose par rapport à leur témoin (Annexe B, figure 6). Le zinc induit une augmentation de la phagocytose à une concentration de $10^{-6}M$ chez les cellules activées, il induit également une diminution de la phagocytose à plus forte concentration, c'est à dire à $10^{-3}M$ autant chez les cellules activées que chez les cellules non activées (Annexe B, figure 10). Il n'y a pas de différence significative entre les cellules activées et non activées mise à part à une concentration de $10^{-4}M$ on remarque que les cellules non activées ont un pourcentage de phagocytose plus élevé que les cellules activées (Annexe B, Figure 10). Par la suite, nous avons calculé les CI_{50} des macrophages qui avaient été préalablement exposés à la Con A afin de comparer les concentrations inhibitrices avec les cellules qui n'avaient pas été mises en présence de ConA pour chacun des métaux. Nous avons remarqué que les cellules activées ont besoin d'une plus grande quantité de métal par rapport aux cellules non activées pour obtenir 50% d'inhibition de la phagocytose. En effet, on dénote une différence significative par rapport aux cellules non activées en présence de mercure organique. Malgré l'absence de différences significatives après l'analyse statistique, on observe la même tendance pour les cellules exposées au cadmium, au mercure inorganique et au zinc (chapitre2, tableau 1). La même tendance est observée chez les lymphocytes, les cellules activées ont des CI_{50} plus élevées que les cellules non activées et les différences sont significatives pour tous les métaux sauf le sélénium mais les cellules activées démontrent quand même une CI_{50} plus

élevé. Il est intéressant de remarqué que les lymphocytes activés sont également plus sensibles aux métaux lourds que les macrophages activés par des différences allant de 10 à 20 fois et même jusqu'à 30 fois plus sensibles.

Les macrophages interviennent comme première ligne de défense non spécifique en phagocytant les microorganismes et en libérant des cytokines (Roitt, Brostoff et Male, 1997). Par la suite, ils participent à l'initiation de la réponse cellulaire T par la dégradation et la présentation de l'antigène (ils jouent le rôle de CPA) (Roitt, Brostoff et Male, 1997). Selon nos résultats, le pourcentage de cellules qui phagocytent (c.a.d. le pourcentage de cellules qui phagocytent une bille et plus) est généralement plus élevé chez les cellules non stimulées par rapport aux cellules stimulées lorsqu'elles sont exposées au mercure organique et au zinc (significatif pour presque toutes les concentrations) (Annexe B, Figure 7 et 11). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que lors de l'activation, une partie des macrophages deviennent la positives afin de présenter l'antigène aux cellules T et ainsi ils sont moins disponibles pour intervenir comme première ligne de défense. Cependant, malgré qu'ils soient moins nombreux que les macrophages non activés ils demeurent plus efficaces puisque que les pourcentages de phagocytose sont généralement plus élevés chez cette population de cellules lorsqu'ils sont exposés à la majorité des métaux étudiés. À la figure 7 de l'annexe B, à fortes concentrations ($10^{-4}M$ et $10^{-3}M$) de mercure organique, le pourcentage de cellules qui phagocytent est diminué mais la phagocytose chez les cellules stimulées est significativement moins affectée. Nous remarquons la même tendance lorsque les cellules sont exposées au cadmium ($10^{-5}M$, $10^{-4}M$ et $10^{-3}M$) et au mercure inorganique ($10^{-4}M$ et $10^{-3}M$) mais sans différences significatives (Annexe B, figure 3 et 5).

Déterminer si l'effet protecteur de l'activation est en liaison avec des différences de niveaux intracellulaires de thiols

Après avoir vérifié la réponse phagocytaire des macrophages sur la courbe de toxicité, il devenait donc important de mesurer le taux intracellulaire en

thiols (cystéines, glutathion, métalloprotéines) car il joue un rôle important au niveau de la fonction cellulaire. Le niveau intracellulaire en thiols a été mesuré à l'aide de la sonde CMFDA, une sonde non fluorescente qui peut diffuser à travers la membrane. Le GSH est sûrement le principal composé qui a été mesuré lors de nos travaux de recherche puisque l'induction de la biosynthèse de la métallothionéine par les ions métalliques est relativement lente, avant l'établissement de niveau effectif de métallothionéines, une toxicité considérable peut être engendré par les métaux (Hultberg, Andersson et Isaksson., 1998 : 204; Singhal, Anderson et Meister., 1987 : 220). Le glutathion agit donc comme première ligne de défense contre les ions métalliques durant cette période (Miles et al., 2000 : 47; Hultberg, Andersson et Isaksson., 1998 : 204; Singhal, Anderson et Meister., 1987 : 222). De plus, il a déjà été démontré que le glutathion était le thiol dominant à l'intérieur de la cellule et que la cystéine se retrouvait en majorité à l'extérieur de la cellule (Hultberg, Andersson et Isaksson, 2001 : 93). La synthèse des métallothionéines peut être induite par différents éléments, en particulier certains métaux toxiques mais elles sont déjà présentes dans la cellule à un certain niveau de base associées à un métal. En effet, quand les métaux toxiques (Cd, Ag ou Hg) pénètrent dans la cellule, il y a une compétition entre tous les ions métalliques (Cu, Zn, Cd, Ag, Hg) pour tous les ligands intracellulaires dont des métalloprotéines parmi lesquelles la MT en plus ou moins grande abondance (Cosson., 1992 : 53). L'affinité des ions métalliques pour les sites de fixation de la MT varie ainsi que la demi-vie biologique de la MT varie en fonction de la nature du métal associé (Cosson., 1992 : 53).

Une fois dans la cellule, la sonde est hydrolysée par une estérase non spécifique pour être convertie en 5-chlorométhyl fluorescéine (CMF) par un processus appelé fluorochromasia (Zurgil et al., 1999 : 23). La sonde clivée va se lier avec les thiols sur les protéines et les peptides pour former un produit fluorescent qui précipite dans la cellule. Par contre, il reste des résidus CMF non liés dans la cellule qui peuvent biaiser les résultats. Il est connu que la concentration de CMF libre dans la cellule change dans le temps au fur et à

mesure que CMF libre continue à se lier aux groupements thiols (Zurgil et al., 1999 : 23). Par contre, à des concentrations diluées de CMFDA (2,5 et 5 μM) et durant une période de temps se situant entre 10 et 30 minutes, les molécules CMF libres accumulées sont transformées par l'enzyme GST (glutathion-S-transférase) en produits fluorescents liés (Zurgil et al., 1999 : 23). Afin de minimiser la fluorescence non spécifique provenant des composés CMF libres, la concentration optimale utilisée fut de 5 μM et le temps d'incubation des cellules avec la sonde CMFDA fut de 45 minutes. Nous avons utilisé une concentration de CMFDA faible afin de diminuer la quantité de CMF libre et augmenté le temps d'incubation de la sonde afin de permettre aux résidus CMF libre de se lier aux groupements thiols tel que décrit par Zurgil et al.

Une fois les paramètres de la sonde établis, il s'agissait par la suite, de vérifier si l'effet protecteur de l'activation des cellules avec la ConA était en liaison avec une augmentation du niveau intracellulaire en thiols. En effet, nous avons remarqué que les cellules qui ont été activées par la ConA, présentaient un niveau intracellulaire en thiols plus élevé que les cellules qui n'ont pas été activées. Cet effet est observé autant sur les cellules qui ont été exposées à différentes concentrations de métaux (mercure, cadmium sélénium et zinc) que sur les cellules qui n'ont pas été exposées aux métaux lourds, nous indiquant que la concanavaline A induit une augmentation considérable du niveau de thiols intracellulaires. Nous pouvons noter des différences significatives à toutes les concentrations pour les cellules exposées au sélénium (chapitre 2, figure 7). On note une diminution du niveau de thiol à 10^{-3}M mais les cellules ayant été activé présentent un niveau de thiols supérieur aux cellules non activées. Lorsque les cellules sont exposées au cadmium et au zinc (Annexe B, figure 12 et 14), nous avons pu noter des différences significatives à toutes les concentrations sauf à 10^{-3}M . Il est intéressant de souligner que lorsque les cellules sont exposées à des concentrations de 10^{-4}M , il y a une diminution significative du niveau de thiols par rapport au témoin mais les cellules activées présentent un niveau de thiols significativement supérieur aux cellules non activées. On remarque la même

tendance pour les cellules qui ont été exposées à des concentrations de 10^{-3} M de zinc mais par contre les différences ne sont pas significatives. Les cellules qui ont été exposées au mercure organique (chapitre 2, figure 6), ne présentent pas de différences significatives à des concentrations allant de 10^{-5} M à 10^{-3} M ainsi que les cellules qui ont été exposées au mercure inorganique (Annexe B, figure 13) ne présentent pas de différences significatives à des concentrations de 10^{-4} M et 10^{-3} M mais on note une diminution significative du niveau de thiols à ces concentrations. À des concentrations de 10^{-5} M de mercure inorganique, où on note une diminution du niveau de thiols, les cellules activées présentent également un niveau de thiols supérieur aux cellules non activées. Il a été démontré que l'activation des cellules par un mitogène tel que la Concanavaleine A ou la PHA augmentait significativement le contenu intracellulaire en GSH (Lawrence, Song et Weber, 1996 : 611). La plupart des mécanismes intracellulaires tels que les processus de transports membranaires, la synthèse des protéines, la synthèse d'ARN et d'ADN voient leur activité augmentée suite à une stimulation par une lectine (Hamilos, Mascali et Wedner, 1991 : 75). En ce sens, la stimulation protège la cellule puisque l'activité cellulaire est augmentée, de même que le contenu en thiols permettant ainsi la séquestration d'une plus grande quantité de métal. Il est également intéressant de mettre en évidence qu'à fortes concentrations de métal (avant cytotoxicité marquée), où l'on remarquait une différence significative du niveau de thiols supérieur chez les cellules activées, on remarquait un pourcentage de phagocytose supérieur et ces mêmes cellules présentaient une CI_{50} plus élevée que les cellules non activées.

De plus, la même tendance est observée chez les lymphocytes, les cellules activées ont des niveaux de thiols intracellulaires supérieurs aux cellules non activées (Chapitre 2, figures 6 et 7). On observe ce phénomène pour les cellules exposées au mercure organique ainsi qu'au sélénium de même que les cellules non exposées aux métaux lourds, suggérant l'effet d'activation par la concanavaleine A. On dénote également un niveau de thiols plus élevé chez les macrophages que chez les lymphocytes. En effet, les macrophages ont une

quantité considérable de cystéine, ce qui leur permet de synthétiser du glutathion et même de participer à la formation du glutathion chez les lymphocytes. Il a été montré que les macrophages activés délivraient un grand nombre de cystéine réduite pour ainsi augmenter le niveau intracellulaire en glutathion des cellules T activées se situant aux alentours (Droge et al., 1995 : 255). De plus, les lymphocytes ont un niveau de thiols intracellulaires beaucoup plus faible que les macrophages et les lymphocytes sont plus sensibles aux métaux lourds que les macrophages et ce, par des différences allant même jusqu'à 30 fois plus sensibles que les macrophages.

Détermination du pourcentage d'apoptose suite à une exposition aux métaux lourds

Nous avons aussi mesuré l'apoptose chez les cellules stimulées ou non stimulées après une exposition aux métaux lourds afin de déterminer si cette fonction pouvait être augmentée par ces contaminants et de comparer cette augmentation chez les cellules activées et chez les cellules non activées. À faibles concentrations de métal, c'est à dire, avant de noter des dommages cytotoxiques, à des concentrations différentes dépendamment du métal ainsi qu'en absence de métal, les macrophages activés présentent un pourcentage d'apoptose significativement plus élevé que les macrophages non activés suggérant que la ConA induit un faible pourcentage d'apoptose. Des études ont démontré que la ConA par l'aggrégation des mitochondries et la libération du cytochrome *c* chez les macrophages murins PU5-1.8 induisaient la mort programmée (c.à.d. l'apoptose) (Suen et al., 2000 : 376). On dénote également une diminution significative de l'apoptose par rapport au témoin des cellules activées à des concentrations de mercure organique et inorganique de 10^{-8} M et 10^{-7} M et une augmentation significative à 10^{-5} M lorsque les macrophages activés et non activés sont exposés au mercure inorganique (Chapitre 2, figure 8 et Annexe B, figure 21). À fortes concentrations de mercure, de 10^{-5} M à 10^{-3} M et de 10^{-4} M à 10^{-3} M respectivement pour le mercure organique et inorganique, il y a une augmentation considérable de l'apoptose chez les cellules activées et non activées. Cependant,

on dénote un pourcentage significativement plus élevé chez les cellules non activées. On remarque à faibles concentrations de cadmium (10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-6} M et 10^{-5} M) une diminution significative de l'apoptose chez les cellules activées ainsi qu'une augmentation significative à plus forte concentration (10^{-3} M) chez les cellules activées et non activées (Annexe B, figure 20). De plus, à cette même concentration, les cellules activées présentent un pourcentage d'apoptose plus faible que les cellules non activées. La même tendance est observée chez les cellules qui ont été exposées au zinc et au sélénium. À une concentration de zinc de 10^{-3} M, les macrophages semblent avoir un pourcentage d'apoptose légèrement plus faible que les cellules non activées mais la différence n'est pas significative (Chapitre 2, figure 9). À des concentrations de 10^{-4} M et 10^{-3} M de sélénium, les cellules non activées présentent un pourcentage d'apoptose plus élevé que les cellules non activées (Annexe B, figure 22). Il semblerait qu'à faible concentration, certains métaux lourds entravent le processus d'apoptose chez les cellules activées en diminuant significativement le processus par rapport au témoin. À faibles concentrations, certains métaux lourds semblent entraver le processus de désactivation des macrophages. Il est aussi intéressant de constater qu'à fortes concentrations de métal, on a une augmentation considérable de la mort cellulaire programmée et que les cellules non activées sont plus sensibles à ce phénomène que les cellules activées.

En général, les lymphocytes présentent un pourcentage d'apoptose plus élevés que les macrophages à fortes concentrations de mercure organique et de zinc. Par contre, les lymphocytes activés ont un pourcentage d'apoptose plus élevé que les lymphocytes non activés. Encore une fois, les lymphocytes semblent beaucoup plus sensibles que les macrophages aux effets toxiques engendrés à forte concentration par les métaux lourds.

CONCLUSION

Cette étude avait pour but d'évaluer l'effet de cinq métaux lourds retrouvés dans l'environnement sur la réponse des macrophages *in vitro*, de façon à obtenir des données immunotoxicologiques afin d'établir le risque associé à des expositions au mercure, au cadmium au zinc et au sélénium.

Nous avons tout d'abord montré que le mercure organique est le métal présentant le potentiel cytotoxique le plus élevé car il possède la plus faible concentration inhibant 50% de la phagocytose. Le mercure inorganique présente un potentiel cytotoxique et une concentration inhibitrice dix fois moins élevée que le mercure organique. Le sélénium n'est pas cytotoxique pour les macrophages car il n'induit pas d'inhibition au niveau de la phagocytose et n'affecte pas la viabilité cellulaire.

Par la suite nous avons démontré que les cellules activées présentaient un pourcentage de phagocytose plus élevé que les cellules non activées. Les cellules activées sont moins sensibles car elles ont besoin d'une plus grande quantité de métal par rapport aux cellules non activées pour obtenir 50% d'inhibition de la phagocytose. Nous avons également déterminé que l'effet protecteur de l'activation était lié à des différences de niveaux intracellulaires de thiols. En effet, les cellules activées présentent une augmentation significative du niveau intracellulaire en thiols par rapport aux cellules non activées et ce, pour des expositions à tous les métaux étudiés. Nous avons également démontré qu'à forte concentration de métal, les macrophages non activées présentaient un pourcentage de phagocytose nettement plus élevé que les cellules activées démontrant également une sensibilité accrue de la part des cellules non activées.

Finalement, nous avons comparé les différences de susceptibilité des macrophages et des lymphocytes en comparant les niveaux intracellulaires de thiols, le pourcentage d'apoptose et la concentration inhibant 50% de leurs

activités. Nous avons constaté que les lymphocytes sont beaucoup plus sensibles que les macrophages à l'effet toxique des métaux lourds puisqu'ils présentent un pourcentage d'apoptose plus élevé à fortes concentrations de métal et un niveau intracellulaire en thiols moins élevé que les macrophages ainsi qu'une CI_{50} jusqu'à 30 fois plus faible que les macrophages.

Ces résultats viennent combler le manque de données *in vitro* concernant l'activation des cellules et les différences de susceptibilité par rapport à des cellules non activées. Ces données permettent d'enrichir nos connaissances sur la réponse des macrophages suite à une agression par les métaux lourds. Ces résultats constituent donc, de nouvelles données qui pourraient servir de base à des études ultérieures.

Des travaux s'intéressant à d'autres fonctions des cellules immunitaires, telle la production d'espèce réactives de l'oxygène, l'évaluation de l'expression de différents marqueurs de surface, l'utilisation d'autres activateurs pour activer les cellules via différents récepteurs afin de comparer les réponses obtenues pourraient venir s'ajouter aux données obtenues afin d'élargir l'éventail des paramètres mesurables de la réponse des macrophages lors d'une agression. Des études *in vivo* étudiant les mêmes fonctions étudiées dans ce projet seraient aussi souhaitables afin de comparer les réponses *in vivo* avec les résultats *in vitro* obtenus. Finalement, il faudrait étudier les propriétés anti-oxydantes du zinc et du sélénium en pré-traitant les souris avec ces métaux avant de les exposer à des métaux plus toxiques et voir si ces métaux ont un effet de protection sur les cellules.

BIBLIOGRAPHIE

ADAMS, D. O. 1982. "Molecules, membranes and macrophages activation". Immunology today, vol. 3. p. 1982.

ADAMS, D. O., et T.A. Hamilton. 1984. "The cell biology of macrophages activation". Ann. Rev. Immunol, vol. 2. p. 283-318.

BONECCHI, R., Facchetti, F., Dusi, S., Luini, W., Lissandrini, D., Simmelink, M., Locati, M., Bernasconi, S., Allavena, P., Brandt, E., Rossi, F., Mantovani, A. et Sozzani, S. 2000. "Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes". The journal of Immunology, vol. 164. p. 3862-3869.

COHN, Z. A. 1978. "The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future". The journal of immunology, vol. 121. no. 3, p. 813-816.

COSSON, R. 1992. "Les Méthallothionéines". Analysis Magazine, vol. 20 (6). P. 50-53.

COSTA, M., N.T. Christie., O. Cantoni., J.T. Zelikoff., X.W. Wang. et T.G. Rossman. «DNA damage by mercury compounds: an overview» In T. Suzuki. (éd) Advances in mercury toxicology. New York: Plenum Press. P. 255-273.

COYLE, P., J. C. Philcox., L. C. Carey. Et A. M. Rofe. 2002. "Metallothioneine: The multipurpose protein". CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 59. p. 627-647.

DAUM, J. R., D.M. Shepherd et R. J. Noelle. 1993. "Immunotoxicology of cadmium and mercury on B-lymphocytes--I. Effects on lymphocyte function". International Journal of Immunopharmacology, vol. 15. no. 3, p. 383-94.

DAVIS, S. R. et R. J. Cousins. 2000. "Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function". American Society for Nutritional Sciences, vol. 130. p. 1085-1088.

DEMOOR, J. M. et D.J. Koropatnick. 2000. "Metals and cellular signaling in mammalian cells". Cellular and Molecular Biology, vol. 46. no. 2, p. 367-381.

DESCOTES, J. 1992. "Immunotoxicology of cadmium". IARC Scientific Publications, no. 118, p. 385-90.

DICKINSON, D. A., et H. J. Forman. 2002. "Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol". Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 973. p. 488-504.

DROGE, W. et al. 1995. "Thiols and the immune system: Effect of N-acetylcysteine on the T cell system in human subjects". Methods in enzymology, vol. 251. p. 255-270.

DUFFIELD, J.S., Ware, C.F., Ryffel, B. et Savil, J. 2001. "Suppression by apoptotic cells defines tumor necrosis factor-mediated induction of glomerular mesangial cell apoptosis by activated macrophages". American Journal of Pathology, vol. 159. p. 1397-1404.

DUFFIELD, J.S. 2003. "The inflammatory macrophages: a story of Jekyll and Hyde". Clinical Science, vol. 104. p. 27-38.

ERWING, L-P., D.C. Kluth, G.M. Walsh. Et A.J. Rees. 1998. "Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines". The journal of Immunology, vol. 161. p. 1983-1988.

FADOK, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P. W., Wescott, J.Y. et Henson, P.M. 1998. "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE2, and PAF". Journal of Clinical Investigation, vol.101. p. 890-898.

FOULKES, E. C. 2000. "Transport of toxic heavy metals across cell membranes". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, vol. 223. no. 3, p. 234-240.

GARCIA-GARCIA, E. et C. Rosales. 2002. "Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis". Journal of Leukocyte Biology, vol. 72. p. 1092-1108.

GOERDT, S., O. Politz., K. Schledzewski., R. Birk., A. Gratchev., P. Guillot., N. Hakiy., C-D. Klemke., E. Dippel., V. Kodelja et C.E. Orfanos. 1999. "Alternative versus classical activation of macrophages". Pathobiology, vol.67. p.222-226.

GORDON, S. 1999. «Macrophages and the immune response». In W.E. Paul, (éd.). Fundamental Immunology, Fourth Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999, p. 533-545.

GORDON, S. 2002. "Pattern recognition receptors: doubling up the innate immune response". Cell, vol. 111. p. 927-930.

GORDON, S. 2003. "Alternative activation of macrophages". Nature, vol.3. p.23-35.

GOYER, R. A. 2001. "Toxic effects of metals". In C. D. Klaassen et al. Casarett and Doull's Toxicology, 5th éd., p. 691-736. New York.

GREENBERG, S. et S. Grinstein. 2002. "Phagocytosis and innate immunity". Current Opinion in Immunology, vol. 14. p. 136-145.

HAMILOS, D. L., Mascali, J. J., et Wedner, H. J. 1991. "The role of glutathione in lymphocyte activation--II. Effects of buthionine sulfoximine and 2-cyclohexene-1-one on early and late activation events". International Journal of Immunopharmacology, vol. 13. no. 1, p. 75-90.

HOGBERG, J. et J. Alexander. 1986. «Selenium» In : L. Friberg., G. Nordberg et V.B. Vouk. (éds). Handbook on the toxicology of metals, 2d ed. Specific metals. Amsterdam: Elsevier. P. 482-512.

HULTBERG, B., Andersson, A., et Isaksson, A. 1998. "Alterations of thiol metabolism in human cell lines induced by low amounts of copper, mercury or cadmium ions". Toxicology, vol. 126. no. 3, p. 203-212.

HULTBERG, B., Andersson, A., et Isaksson, A. 2001. "Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol". Toxicology, vol. 156. no. 2-3, p. 93-100.

HUME, D. A., Perry, V. H., et Gordon, S. 1984. "The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localisation of antigen F4/80: macrophages associated with epithelia". The anatomical record, vol. 210. p. 503-512.

JANEWAY, C. A., R. Medzhitov. 2002. "Innate Immune recognition". Annual Review of Immunology, vol. 20. p. 197-216.

JANEWAY, C. A., J. Travers et Travers P. 1997. Immunobiologie. 2th éd. Paris, Bruxelles : De Boeck & Larcier.

JANNALAGADDA, S. B. et Prasada Rao, P. V. V. 1993. "Toxicity, bioavailability and metal speciation". Comparative Biochemistry and Physiology, vol. 106C. no. 3, p. 585-595.

KERPER, L.E., N. Ballatori. et T.W. Clarkson. 1992. "Methylmercury transport across the blood-brain barrier by amino acid carrier". American Journal of Physiology, Vol262. p. 761-765.

KOLLER, L. D. 1980. "Immunotoxicology of heavy metals". Int. J. Immunopharmacology, vol. 2. p. 269-279.

KOUASSI, E., J.-P. Revillard, M. Fournier, P. Ayotte, R. Roy, P. Brousseau. 2003. «Système immunitaire». In M. Guérin, P. Gosselin, S. Cordier, C. Viau, P. Quénel, et E. Dewailly, (éd.). *Environnement et santé publique : fondements et pratiques*. p. 687-698.

LAWRENCE, D. A. 1985. "Immunotoxicity of heavy metals". *Immunotoxicology and Immunopharmacology*, p. 341-353.

LAWRENCE, D. A. et M.J. McCabe Jr. 2002. "Immunomodulation by Metals". *International Immunopharmacology*, vol. 2. no. 2-3, p. 293-302.

LAWRENCE, D. A., Song, R., et Weber, P. 1996. "Surface thiols of human lymphocytes and their changes after in vitro and in vivo activation". *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 60. no. 5, p. 611-8.

LEFFEL, E. K. et al. 2003. "Drinking water exposure to cadmium, an environmental contaminant, results in the exacerbation of autoimmune disease in the murine model". *Toxicology*, vol. 188. p. 233-250.

LINEHAN, S.A., L. Martinez-Pomares, et S. Gordon. 2000. "Macrophage lectins in host defence". *Microbes and infection*, vol.2. p. 279-288.

LOKE, P., M.G. Nair., J. Parkinson., D. Guiliano., M. Blaxter. et J.E. Allen. 2002. "IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype". *BMC Immunology*, vol. 3. p. 7-17.

MA, J., T. Chen, J. Mandelin, A. Ceponis, N. E. Miller, M. Hukkanen, G. F. Ma, et Y. T. Kontinen. 2003. "Regulation of macrophage activation". *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 60. p. 2334-2346.

MILES, A. T., G. M. Hawksworth., J. H. Beattie. et V. Rodilla. 2000. "Induction, regulation, degradation et biological significance of mammalian metallothioneins". *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 35 (1). P. 35-70.

REED, D. J. 1990. "Glutathione: toxicological implications". *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 30. p. 603-31.

RIEUX-LAUCAT, F. 2000. "Signalisation de l'apoptose par Fas". *Hématologie*. Vol.6. no.2. p. 136-142.

ROITT, I., J. Brostoff et D. Male. 1997. *Immunologie*. 4th éd. Paris, Bruxelles : DeBoeck Université.

SAVILL, J.S., A.H. Wyllie., J.E. Henson., M.J. Walport., P.M. Henson. Et C.

Haslett. 1989. Journal of Clinical Investigation, vol. 83. p. 865-875.

SCHUPPE, H. C., A.C. Rönnau., S.V. Schmiedeberg., T. Ruzicka., E. Gleichmann. Et P. Griem. 1998. "Immunomodulation by Heavy Metal Compounds". Clinics in Dermatology, vol. 16. no. 1, p. 149-157.

SÉGAL-BENDIRDJIAN, E. 1999. "Mort cellulaire: signalisation et exécution de l'apoptose". Hématologie, vol. 5 no.5. p. 376-387.

SHANKAR, A. H. et A. S. Prasad. 1998. "Zinc and Immune Function: the Biological Basis of Altered Resistance to Infection". American Journal of Clinical Nutrition, vol. 68. no. 2, p. 447S-463S.

SHENKER, B. J., Guo, T. L., et Shapiro, I. M. 2000. "Mercury-Induced Apoptosis in Human Lymphoid Cells: Evidence That the Apoptotic Pathway Is Mercurial Species Dependent". Environmental Research, vol. 84. no. 2, p. 89-99.

SINGHAL, R.K., M.E. Anderson. et A. Meister. 1987. "Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity". FASEB J.vol.1. p. 220-223.

SNOW, E. T. 1992. "Metal carcinogenesis:mechanistic implications". Pharmacology & Therapeutics, vol. 53. p. 31-65.

SOARES, J. C. M., V. Folmer. et J. B. T. Rocha. 2003. "Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzymes in mice". Basic nutritional investigation, vol. 19. p. 627-632.

STAHL, P.D., J.S. Rodman, M.J. Miller, P.H. Schlesinger. 1978. "Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, lysosomal glycosidases by alveolar macrophages". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 75. p. 1399-1403.

STEIN, M., S. Keshav., N. Harris. et S. Gordon. 1992. "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation". Journal Exp. Med, vol. 176. p. 287-292.

STRENZKE, N. et al. 2001. "Mercuric Chloride Enhances Immunoglobulin E-Dependent Mediator Release From Human Basophils". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 174. no. 3, p. 257-263.

SUEN, Y.K., K.P. Fung, Y.M. Choy, C.Y. Lee, C.W. Chan. et S.K. Kong. 2000. "Concanavaline A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells through clustering of mitochondria and release of cytochrome c". Apoptosis, vol. 5. p. 369-377.

SUGIYAMA, M. 1994. "Role of cellular antioxydant in metal-induced damage".

Cell Biology and Toxicology, vol. 10. p.1-22.

SWEET, L. I. et Zelikoff, J. T. 2001. "Toxicology and immunotoxicology of mercury: a comparative review in fish and humans". Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews, vol. 4. no. 2, p. 161-205.

TAPIERO, H., D.M. Townsend. et K.D. Tew. 2003. "The antioxidant role of selenium and seleno-compounds". Biomedicine & Pharmacotherapy, vol. 57. p. 134-144.

TINGGI, U. 2003. "Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review". Toxicology letter, vol. 137. p. 103-110.

THOMPSON, S. A. et al. 1998. "Alterations in immune parameters associated with low level methylmercury exposure in mice". Immunopharmacology and Immunotoxicology, vol. 20. no. 2, p. 299-314.

UNANUE, E. R. 1984. "Antigen-presenting function of the macrophage". Ann. Rev. Immunol , vol. 2. p. 395-428.

UNANUE, E. R. et Allen, P. M. 1987. "The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells". Science, vol. 236. p. 551-557.

UNOSHIMA, M., A. Nishizono., Y. Takita-Sonoda., H. Iwasaka. et T. Noguchi. 2001. "Effects of zinc acetate on splenocytes of endotoxemic mice: enhanced immune response, reduced apoptosis, and increased expression of heat shock protein 70". Journal of Laboratory and Clinical Medicine, vol. 137. no. 1, p. 28-37.

VALLEE, B. L. et K. H. Falchuk. 1993. "The biochemical basis of zinc physiology". Physiological Reviews, vol. 73. no. 1, p. 79-118.

VIRELIZER, J. L. et Arenzana-Seisdedos, F. 1985. "Immunological functions of macrophages and their regulation by interferons". medical biology, vol. 63. p. 149-159.

VOET, D. et J.G. Voet. 1998. Biochimie. Bruxelles: De Boeck Université s. a.,1361p.

VOLL, R.E., M. Herrmann, E.A. Roth, C. Stach, J.R. Kalden, et I. Girkontaite. 1997. "Immunosuppressive effects of apoptotic cells". Nature (London), vol. 390. p. 350-351".

WILD, L. G. et al. 1997. "Immune system alteration in the rat after indirect exposure to methyl mercury chloride or methyl mercury sulfide". Environmental Research, vol. 74. no. 1, p. 34-42.

WOODS, J.S., C.A. Calas., L.D. Aicher., B.H. Robinson. et C. Mailer. 1990a. "Stimulation of porphyrinogen oxidation by mercuric ion. I. Evidence of free radical formation in the presence of thiols and hydrogen peroxide". Mol. Pharmacol. Vol. 38. p. 253-260.

WOODS, J.S., C.A. Calas. et L.D. Aicher. 1990b. "Stimulation of porphyrinogen oxidation by mercuric ion. II. Promotion of oxidation from the interaction of mercuric ion, glutathione and mitochondria-generated hydrogen peroxide". Mol. Pharmacol. Vol. 38. p. 261-266.

ZELIKOFF, J. T. et al. 1994. "Immunomodulation by metals". Fundamental and Applied Toxicology, vol. 22. no. 1, p. 1-7.

ZELIKOFF, J. T. et P. T. Thomas. 1998. Immunotoxicology of environmental and occupational metals. Taylor & Francis éd. London, Angleterre .

ZHONG, Z., W. Troll., K.L. Koenig. et K. Frenkel. 1990. "Carcinogenic sulfide salts of nickel and cadmium induce H₂O₂ formation by human polymorphonuclear leukocytes". Cancer Res. Vol.50. p. 7564-7570.

ZÖDL, B., M. Zeiner., M. Sargazi., N. B. Roberts., W. Marktl., I. Steffan. Et C. Ekmekcioglu. 2003. "Toxic and biochemical effects of zinc in caco-2 cells". Journal of inorganic Biochemistry, vol. 97. p.324-330.

ZURGIL, N., M. Kaufman., I. Solodiev. et M. Deutsch. 1999. "Determination of cellular thiol levels in individual viable lymphocytes by means of fluorescence intensity and polarization". Journal of Immunological Methods, vol. 229. no. 1-2, p. 23-34.

ANNEXE A
Courbe doses-réponse pour la Concanavaline A

Avant même d'effectuer les tests de phagocytose et de niveau de thiols intracellulaires en présence des métaux lourds, la concentration optimale de Concanavaline A et le temps de stimulation ont été préalablement déterminés. Il s'agissait d'avoir une différence considérable par rapport aux cellules témoins (sans Concanavaline A), et de choisir la même concentration pour tous les tests.

Thiols intracellulaires/Con A

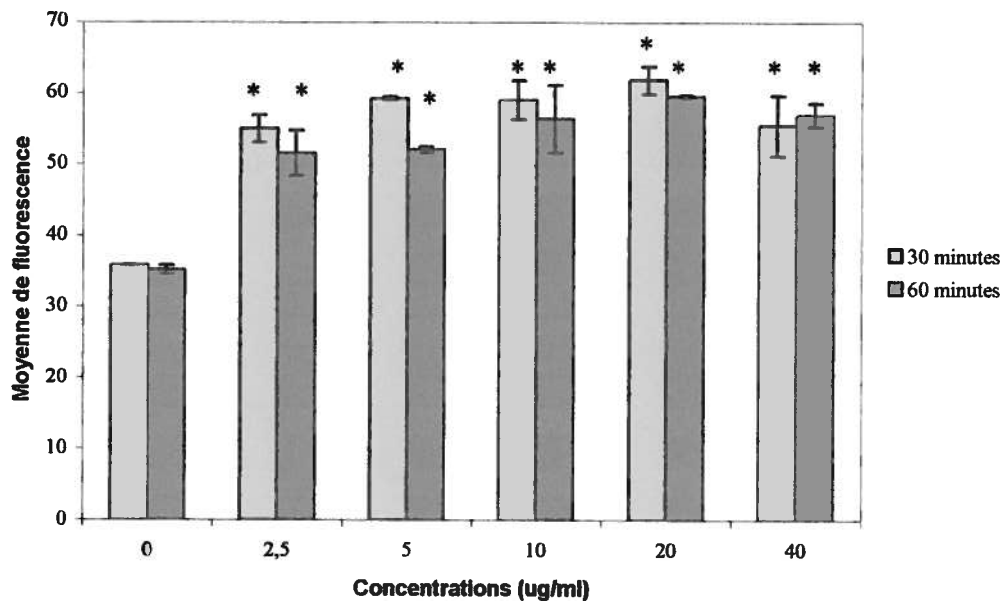


Figure 1: Détermination de la concentration optimale de Concanavaline A et du temps optimal avec le test de thiols intracellulaires. Dans ce cas-ci, une bonne réponse est obtenue avec 30 et 60 minutes d'incubation, donc le temps le plus court sera sélectionné, c'est-à-dire, 30 minutes d'incubation avec la Concanavaline A. Toutes les concentrations pourraient être utilisées à titre de concentration optimale pour ce test car elles sont toutes significativement différentes. * indique une différence significative par rapport au témoin.

Phagocytose/Con A

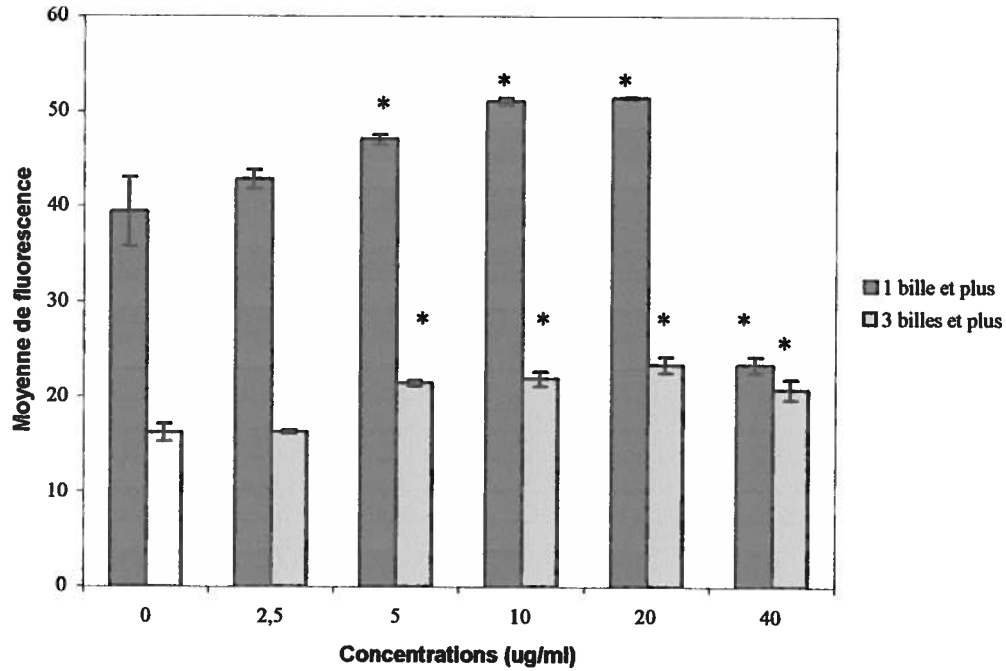


Figure 2: Détermination de la concentration optimale de Concanavaline A avec le test de la phagocytose. Il s'agissait de choisir la concentration où il y avait une différence pour une bille et plus et trois billes et plus par rapport aux cellules témoin. La concentration optimale choisie était de 20 $\mu\text{g/ml}$. Avant chaque exposition avec les métaux lourds, les cellules ont été stimulées avec cette concentration pendant 30 minutes. * indique une différence significative par rapport au témoin.

ANNEXE B
Résultats macrophages
(non publiés)

Phagocytose 1 bille et plus/cadmium

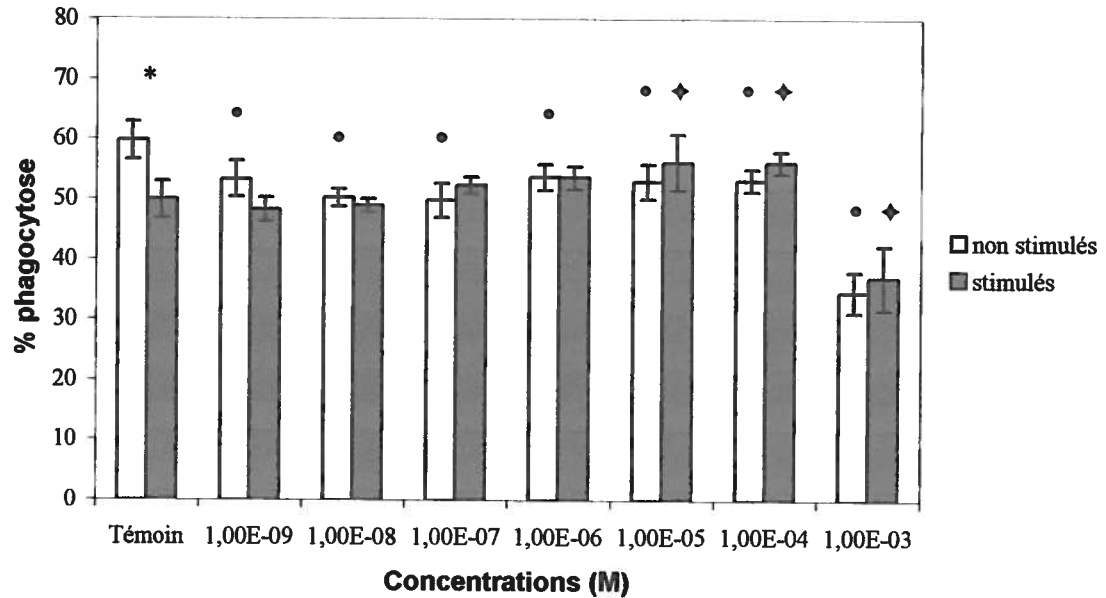


Figure 3: Détermination du pourcentage de macrophages murins qui phagocytent exposés au cadmium (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. • (non stimulées), ◆ (stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

Phagocytose 3 billes et plus/mercure inorganique

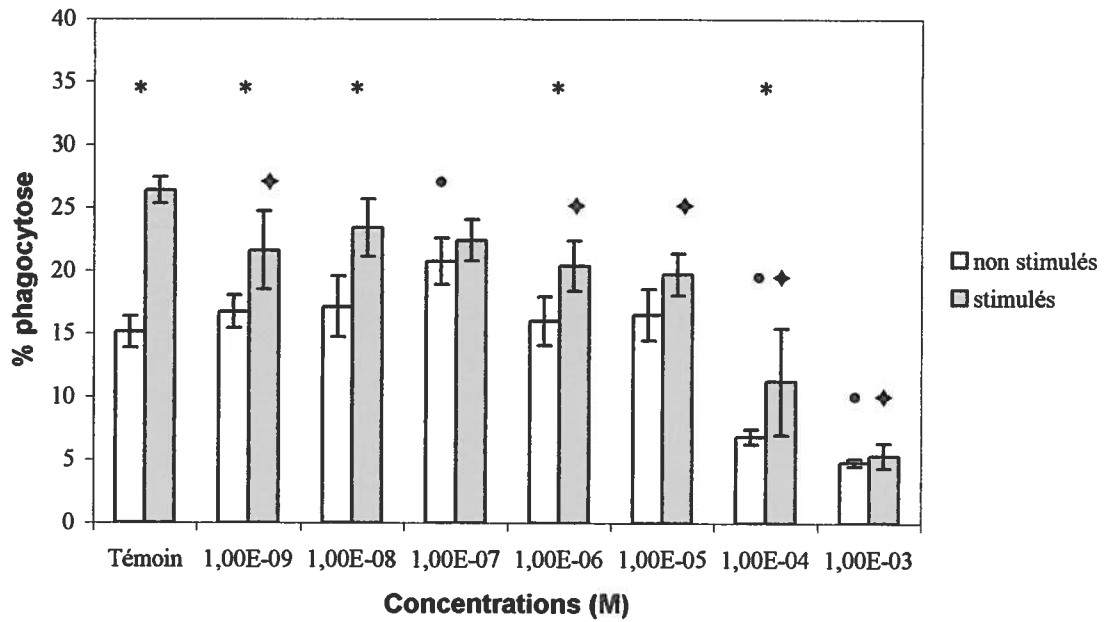


Figure 4: Détermination du pourcentage de phagocytose dans des macrophages de rate de souris exposés au mercure inorganique (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. • (non stimulées), ◆ (stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

Phagocytose 1 bille et plus/mercure inorganique

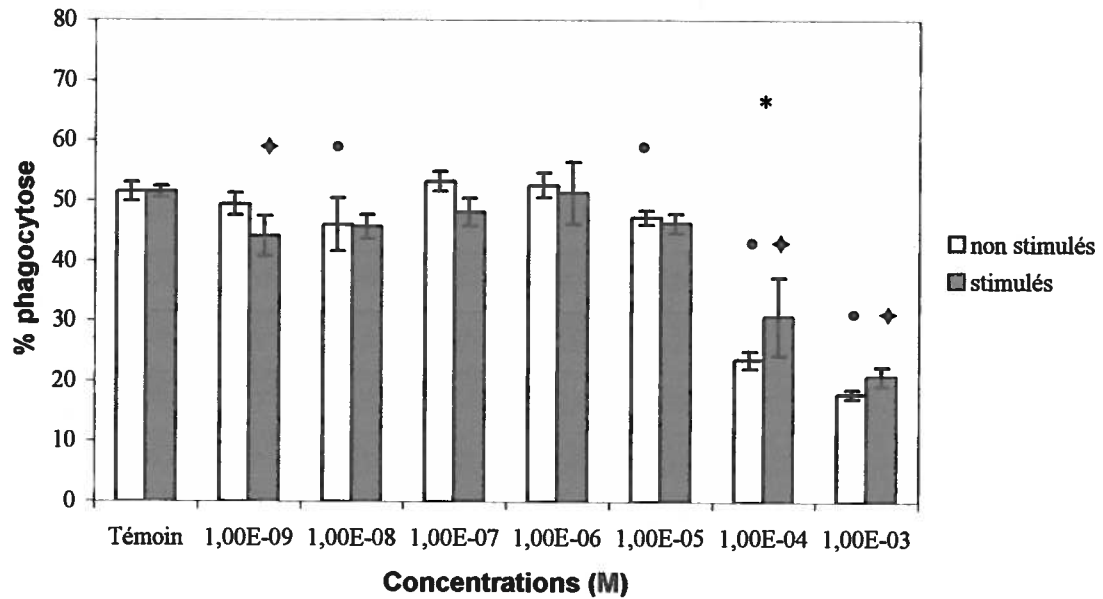


Figure 5: Détermination du pourcentage de macrophages murins qui phagocytent exposés au mercure inorganique (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavale A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. • (non stimulées), ♦ (stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

Phagocytose 3 billes et plus/mercure organique

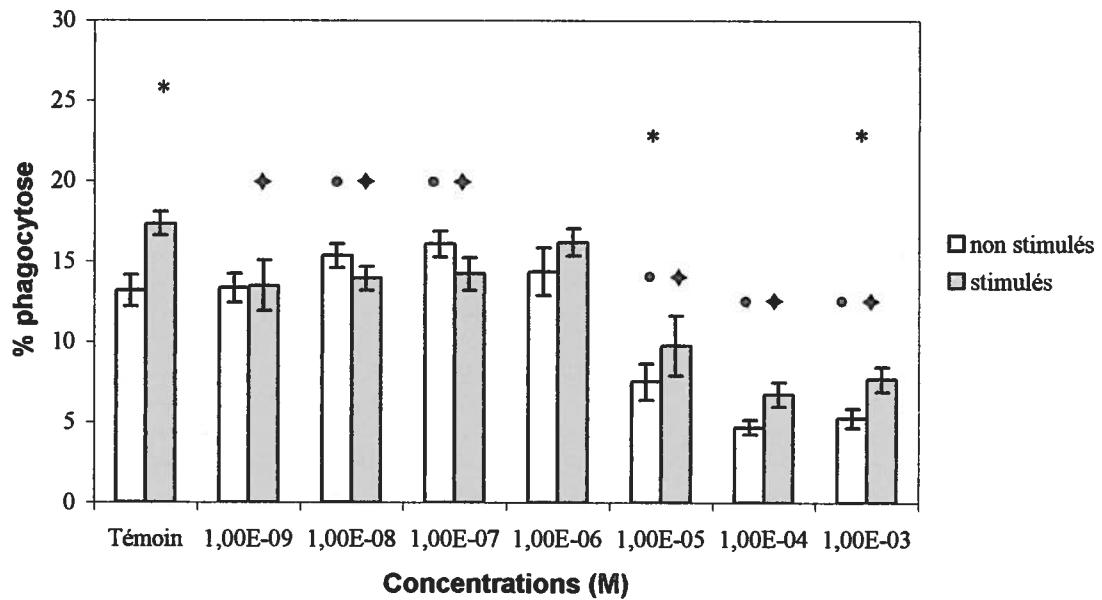


Figure 6: Détermination du pourcentage de phagocytose dans des macrophages de rate de souris exposés au mercure organique (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. • (non stimulées), ♦(stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

Phagocytose 1 bille et plus/mercure organique

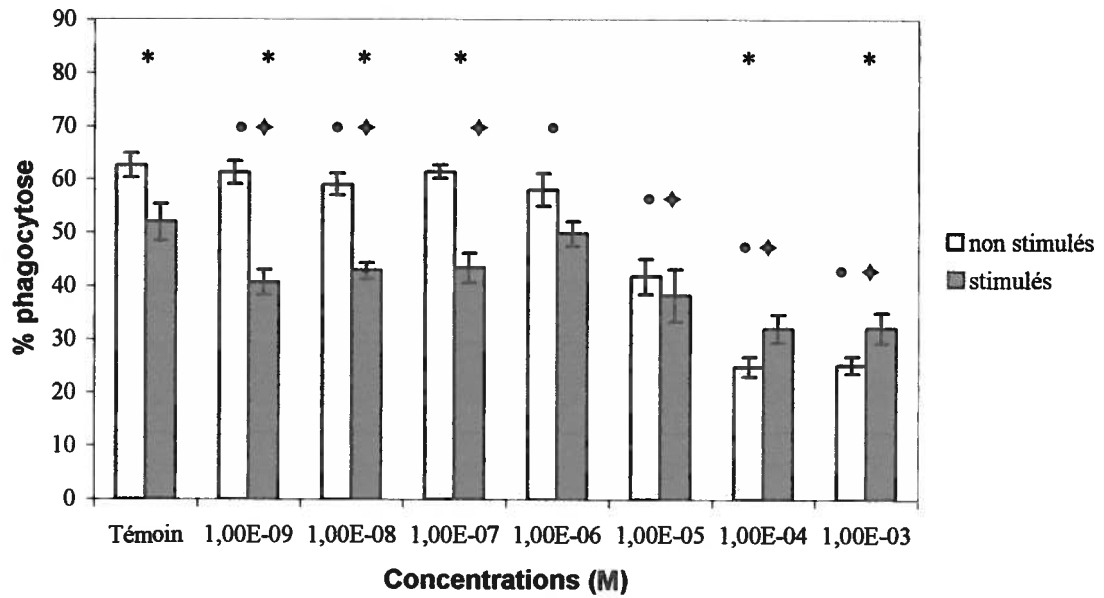


Figure 7: Détermination du pourcentage de macrophages murins qui phagocytent exposés au mercure organique (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavale A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. • (non stimulées), ♦(stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

Phagocytose 3 billes et plus/sélénium

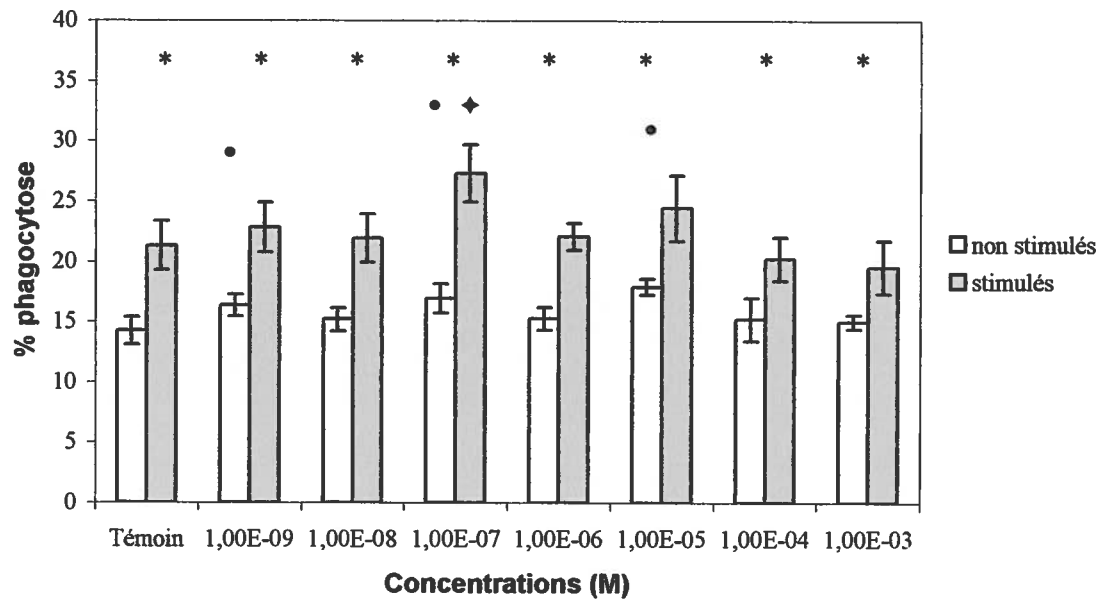


Figure 8: Détermination du pourcentage de phagocytose dans des macrophages murins exposés au sélénium (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. • (non stimulées), ♦ (stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

Phagocytose 1 bille et plus/sélénium

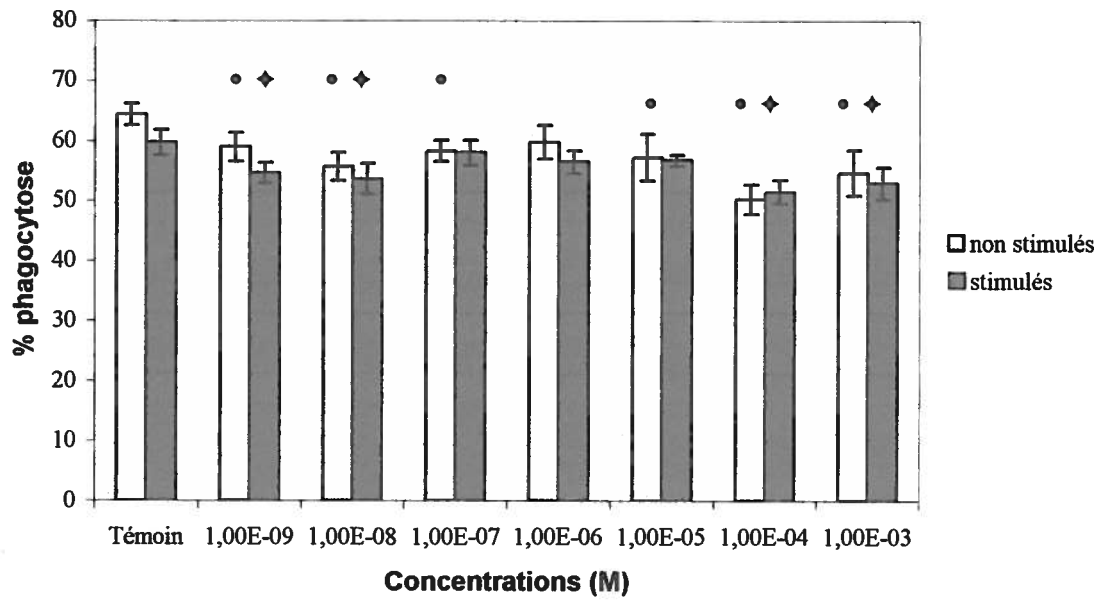


Figure 9: Détermination du pourcentage de macrophages murins qui phagocytent exposés au sélénium (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A. • (non stimulées), ♦ (stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

Phagocytose 3 billes et plus/zinc

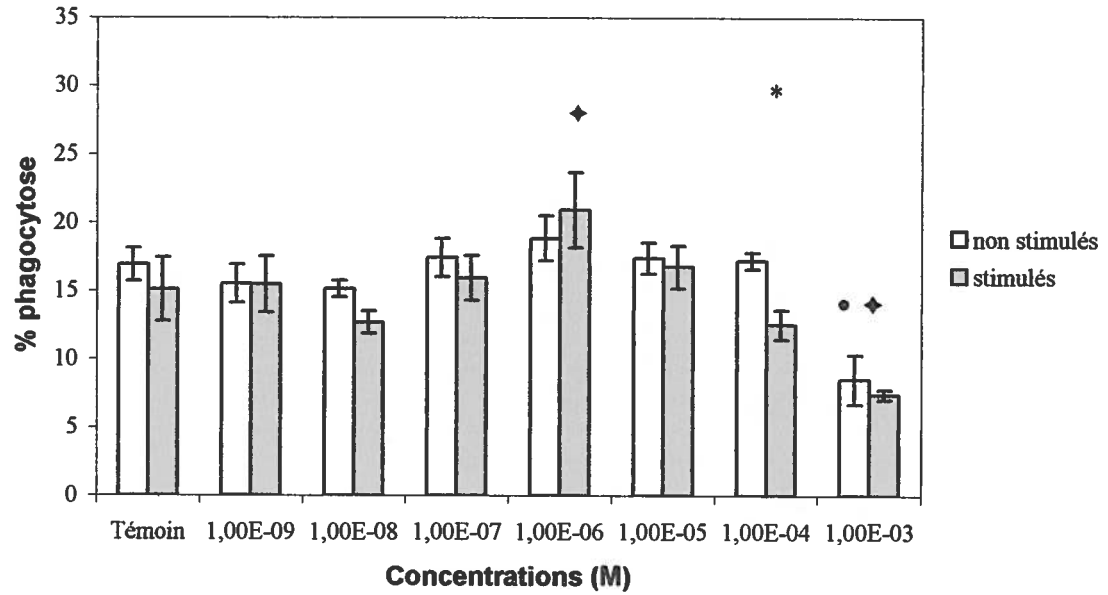


Figure 10: Détermination du pourcentage de phagocytose dans des macrophages murins exposés au zinc (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. • (non stimulées), ♦(stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

Phagocytose 1 bille et plus/zinc

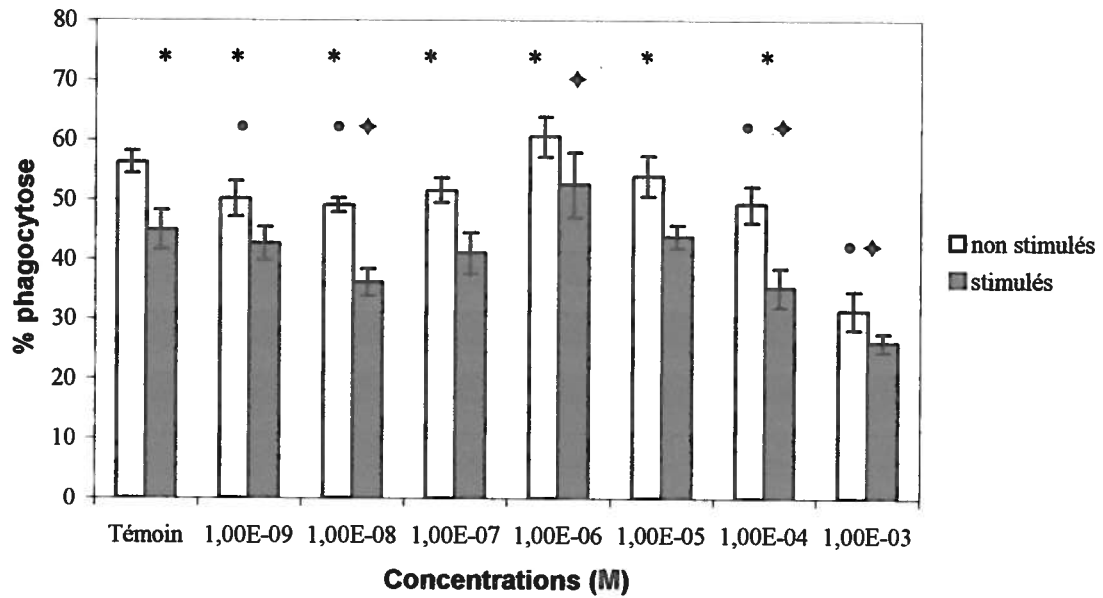


Figure 11: Détermination du pourcentage de macrophages murins qui phagocytent exposés au zinc (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavale A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. • (non stimulées), ◆ (stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

Niveau intracellulaire en thiols/cadmium

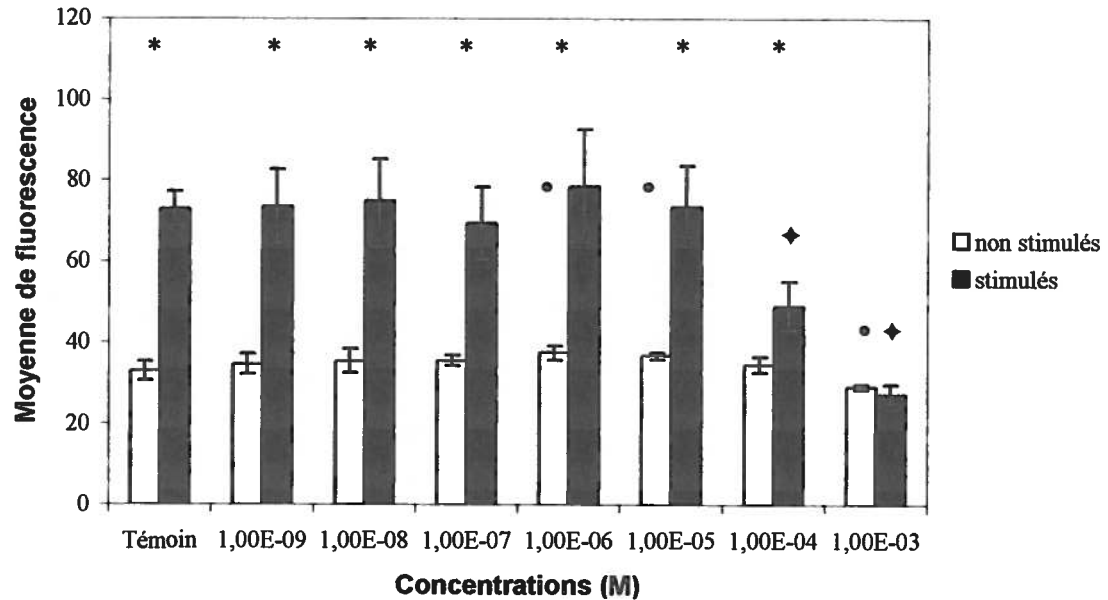


Figure 12: Détermination du niveau de thiols intracellulaires dans des macrophages murins exposés au cadmium (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaleine A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. • (non stimulées), ♦(stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

Niveau intracellulaire en thiols/mercure inorganique

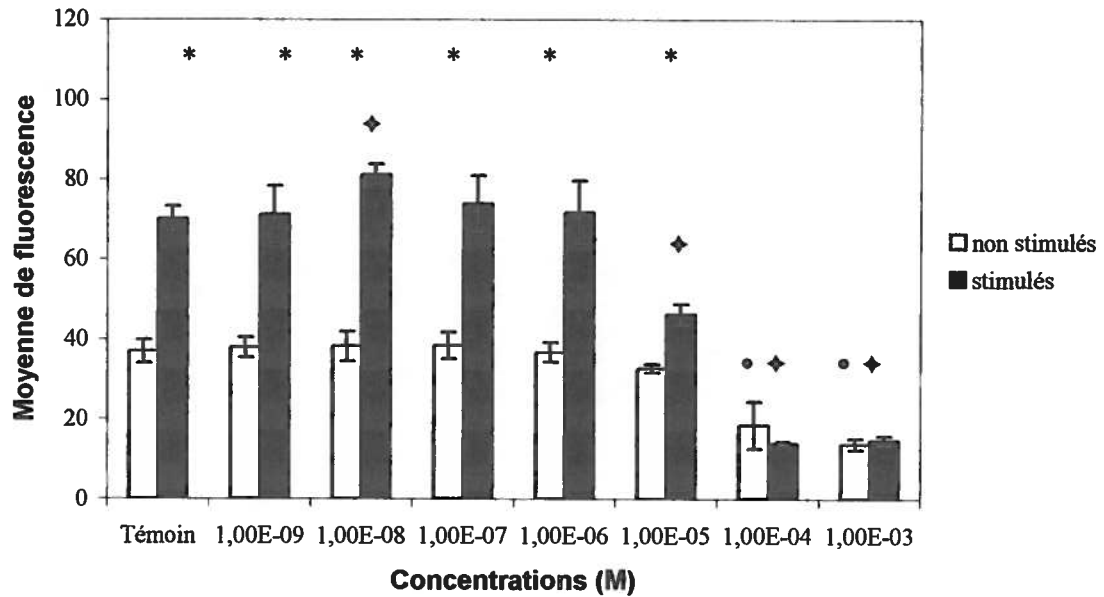


Figure 13: Détermination du niveau de thiols intracellulaires dans des macrophages murins exposés au mercure inorganique (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavale A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. • (non stimulées), ♦ (stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

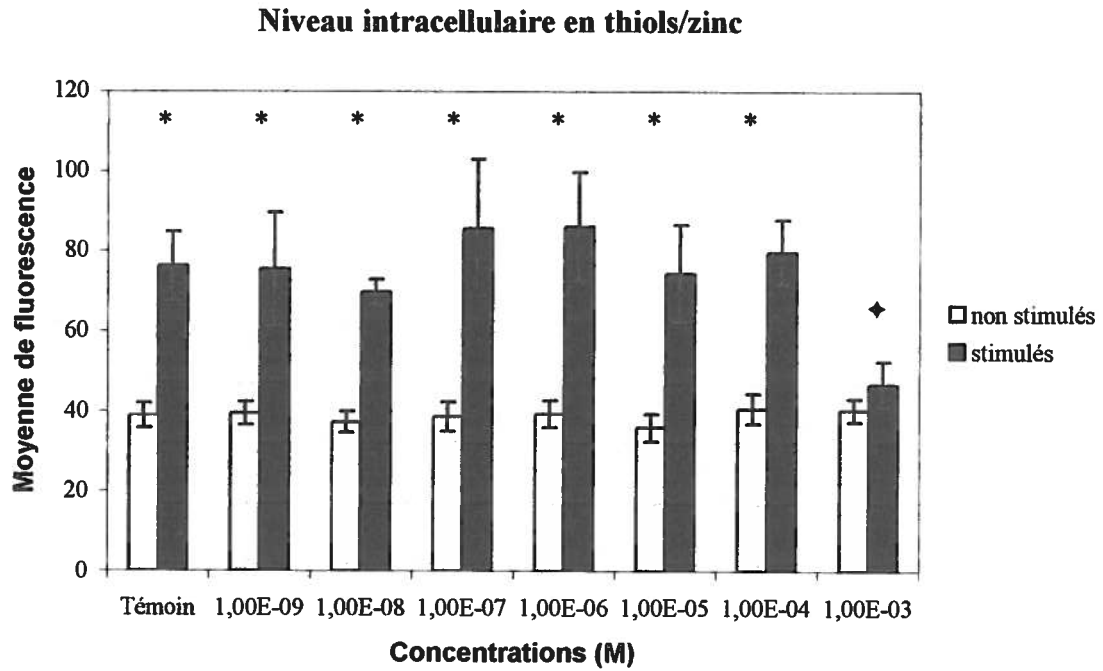


Figure 14: Détermination du niveau de thiols intracellulaires dans des macrophages murins exposés au zinc (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaleine A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. ◆ (stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

viabilité/cadmium

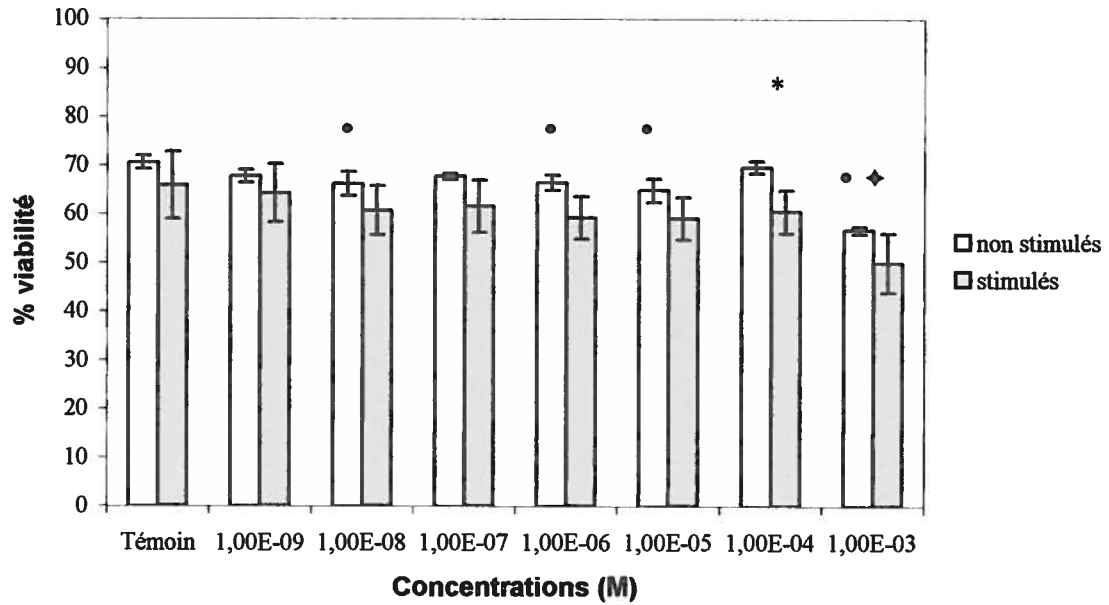


Figure 15 : Détermination du pourcentage de viabilité dans des macrophages murins exposés au cadmium (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. • (non stimulées), ♦ (stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

viabilité/mercure inorganique

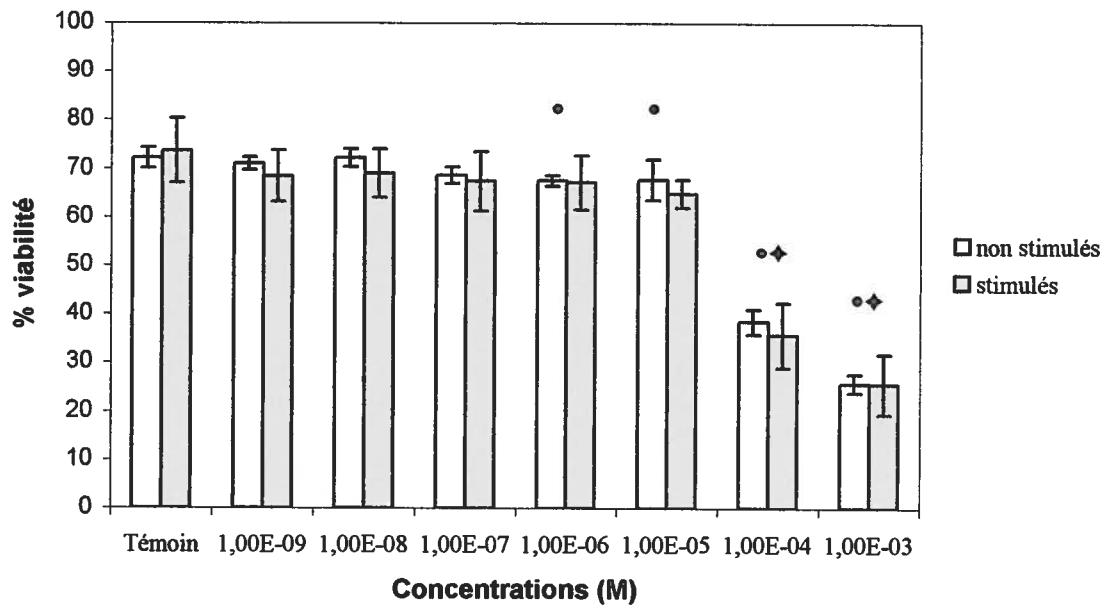


Figure 16 : Détermination du pourcentage de viabilité dans des macrophages murins exposés au mercure inorganique (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. • (non stimulées), ♦ (stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

viabilité/mercure organique

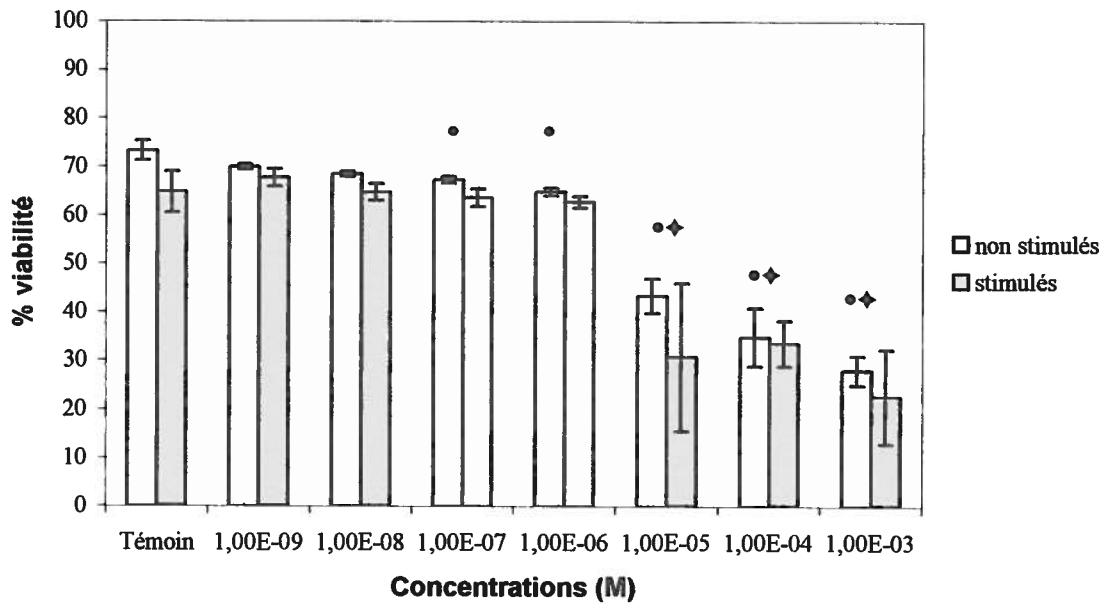


Figure 17 : Détermination du pourcentage de viabilité dans des macrophages murins exposés au chlorure de mercure organique (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. • (non stimulées), ◆ (stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

viabilité/sélénium

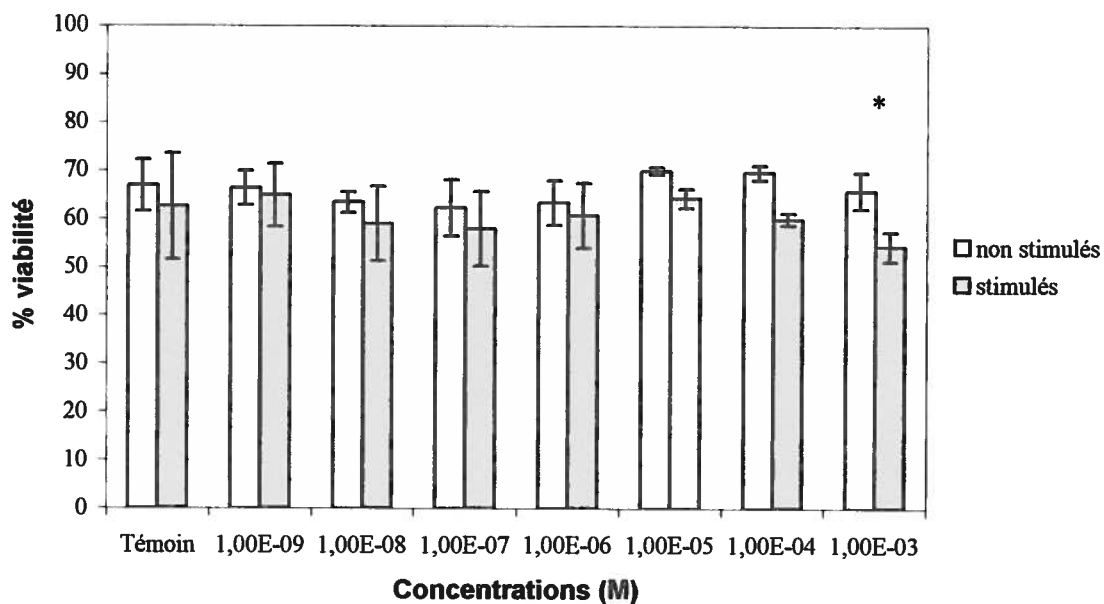


Figure 18 : Détermination du pourcentage de viabilité dans des macrophages murins exposés au sélénium (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées.

viabilité/zinc

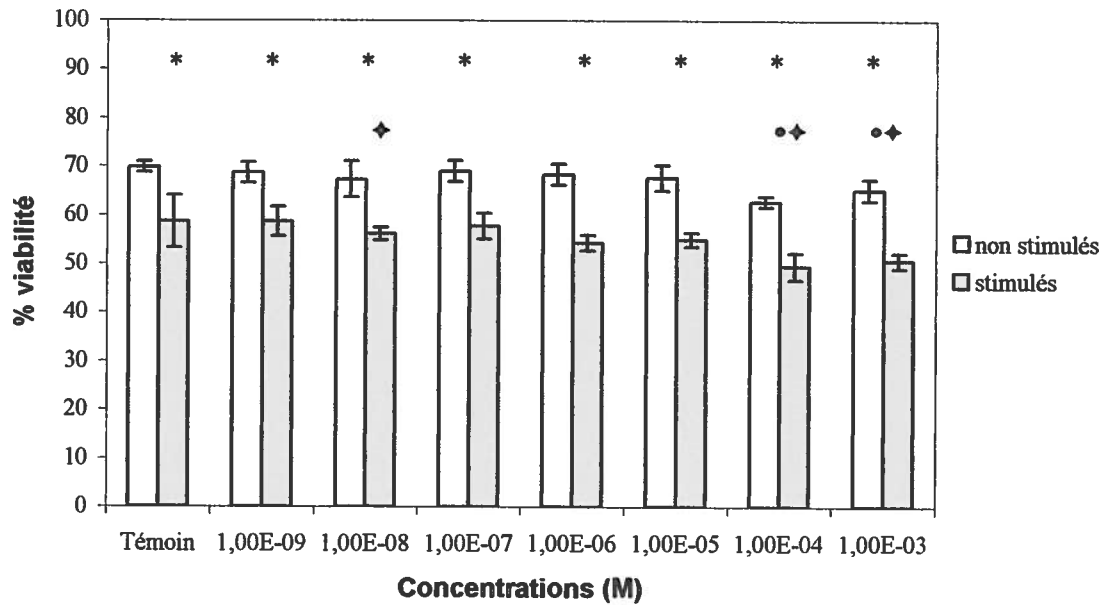


Figure 19 : Détermination du pourcentage de viabilité dans des macrophages murins exposés au zinc (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. • (non stimulées), ♦ (stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

apoptose/cadmium

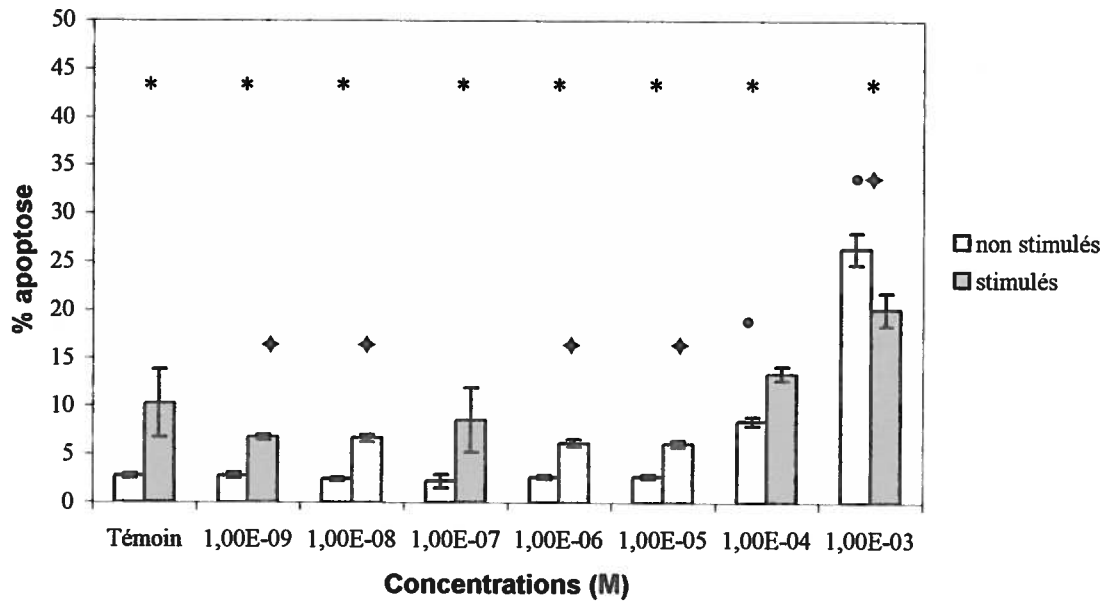


Figure 20 : Détermination du pourcentage d'apoptose dans des macrophages murins exposés au cadmium (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. • (non stimulées), ♦ (stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

apoptose/mercure inorganique

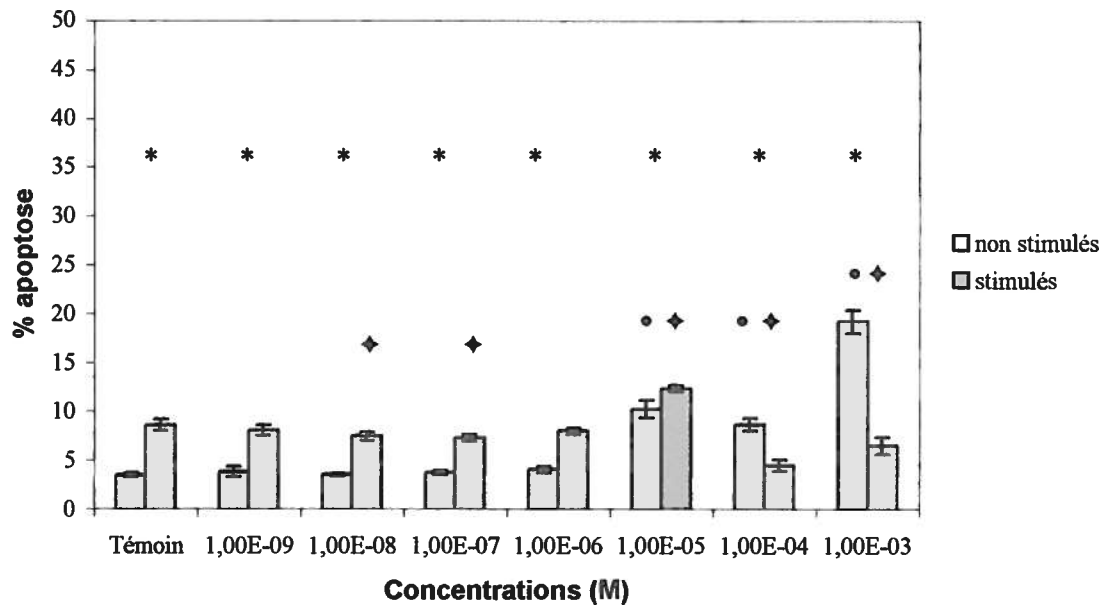


Figure 21 : Détermination du pourcentage d'apoptose dans des macrophages murins exposés au mercure inorganique (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. • (non stimulées), ◆(stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.

apoptose/sélénium

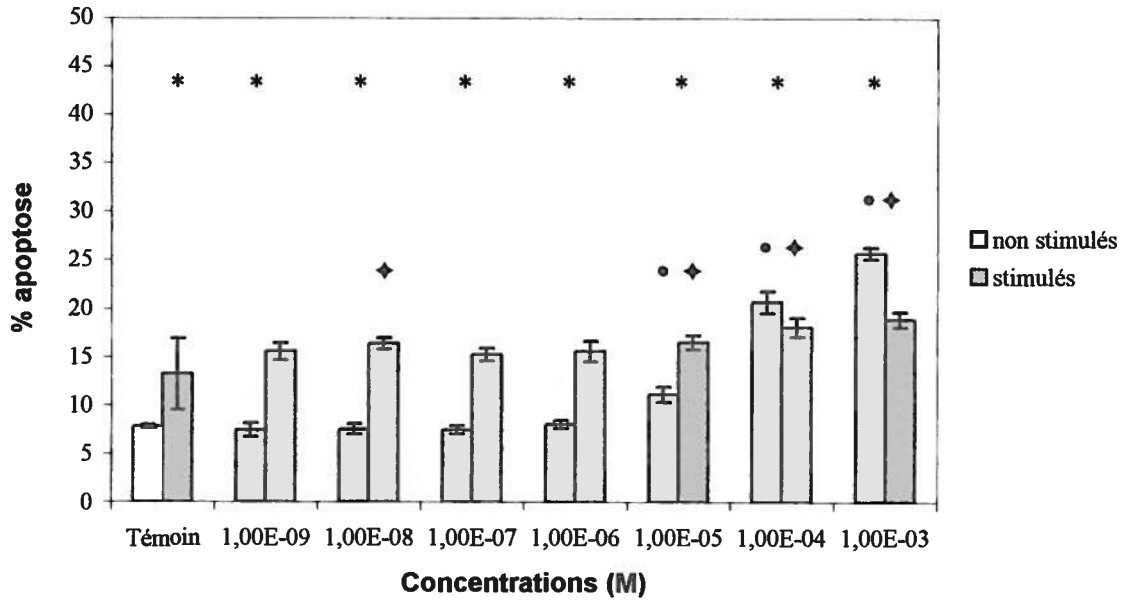


Figure 22 : Détermination du pourcentage d'apoptose dans des macrophages murins exposés au sélénium (3 heures) à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-3} M stimulés ou non avec de la Concanavaline A. * indique une différence significative entre les cellules stimulées et non stimulées. • (non stimulées), ♦ (stimulées) indiquent une différence significative par rapport au témoin.