

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en santé humaine

LES EFFETS DU BÉRYLLIUM SUR L'IMMUNITÉ NATURELLE

Par
Anne Larrivée

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

Jury d'évaluation

Examineur interne	Jacques Bernier INRS-Institut Armand-Frappier Centre de recherche en santé humaine
Examineur externe	Gaston Chevalier Département de Biologie Université du Québec à Montréal
Directeur de recherche	Michel Fournier INRS-Institut Armand-Frappier Centre de recherche en santé humaine
Codirectrice de recherche	Pauline Brousseau Biophage Inc.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche le Dr. Michel Fournier pour sa confiance.
Je désire également remercier ma co-directrice, Dr. Pauline Brousseau pour son aide et son support.

Je tiens également à remercier Clément Desrochers pour son aide et ses bonnes idées.

Un merci particulier à mon équipe chez Biophage Inc. Chaque personne m'a été d'une grande aide!

Merci à Biophage et à Pauline Brousseau de m'avoir permis de faire cette maîtrise.

Merci à mon père Gilles Larrivée pour son appui dans mes études.

Merci à mes amis pour leur présence et leur support.

Finalement merci à Jean-François Alix pour sa présence, sa bonne humeur, sa patience et son amour.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
LISTE DES FIGURES	V
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VII
RÉSUMÉ	IX
INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTÉRATURE	3
1. LE SYSTÈME IMMUNITAIRE	3
2. CELLULES EFFECTRICES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE	4
2.1 Les Lymphocytes T	7
2.2 Les cellules Tueuses Naturelles (NK)	10
2.3 Les Monocytes/Macrophages	11
2.4 Lymphocytes B	13
3. RÉPONSE IMMUNITAIRE	13
4. LE CYCLE CELLULAIRE	14
5. IMMUNOTOXICOLOGIE	15
5.1 Immunosuppression	15
5.2 Hypersensibilité	16
5.2.1 Type I (Hypersensibilité immédiate)	16
5.2.2 Type II (Hypersensibilité anticorps-dépendant)	17
5.2.3 Type III	17
5.2.4 Type IV (Hypersensibilité à médiateurs cellulaires ou hypersensibilité retardée)	17
5.3 Auto-immunité	21
5.4 Réponse inflammatoire chronique	22
6. LE BÉRYLLIUM	23
7. MÉCANISME D' ACTION DU BÉRYLLIUM	24
8. ÉTUDES ÉPIDÉMIOLOGIQUES	25
9. MODÈLE EXPÉRIMENTAL	31
MATÉRIEL ET MÉTHODES	32

1. CULTURE CELLULAIRE	32
1.1 Origine de la lignée H36.12J	32
1.2 Culture des cellules.....	32
2. LA PHAGOCYTOSE CHEZ LES MACROPHAGES H36.12J	32
3. MESURE D'INDUCTION DE L' APOPTOSE ET OBSERVATION DU CYCLE CELLULAIRE.....	36
4. LA FLAMBÉE OXYDATIVE.....	36
5. PRODUCTION D'OXYDE D' AZOTE.....	37
6. PHÉNOTYPAGE AVEC LES ANTICORPS CD11b ET CD68.....	38
7. DOSAGE DE LA PRODUCTION D'IL-1 β , D'IL-6 ET DE TNF- α PAR ELISA...	39
8. TEST STATISTIQUE	40
RÉSULTATS.....	41
1. PHAGOCYTOSE CHEZ LES MACROPHAGES H36.12J.....	41
2. MESURE D'INDUCTION DE L' APOPTOSE ET OBSERVATION DU CYCLE CELLULAIRE.....	48
3. PRODUCTION DE PEROXYDE D'HYDROGÈNE.....	56
4. PRODUCTION D'OXYDE D' AZOTE.....	62
5. PHÉNOTYPAGE DES MARQUEURS CD11b ET CD68.....	64
6. DOSAGE DE LA PRODUCTION D'IL-1 β , D'IL-6 ET DE TNF- α PAR ELISA...	71
DISCUSSION.....	72
1. PHAGOCYTOSE CHEZ LES H36.12J	73
2. MESURE D'INDUCTION DE L' APOPTOSE ET OBSERVATION DU CYCLE CELLULAIRE.....	74
3. PRODUCTION DE PEROXYDE D'HYDROGÈNE ET FLAMBÉE OXYDATIVE	75
4. PRODUCTION D'OXYDE NITRITE.....	76
5. PHÉNOTYPAGE AVEC LES ANTICORPS CD11b ET CD68	76
6. DOSAGE DE LA PRODUCTION D'IL-1 β , D'IL-6 ET DE TNF- α PAR ELISA..	78
CONCLUSION	79
RÉFÉRENCES	81

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. Organes et cellules du système immunitaire.....	5
FIGURE 2. Activation des lymphocytes T.....	8
FIGURE 3. Réaction d'hypersensibilité de type IV	19
FIGURE 4. Interaction entre le Be , les cellules présentatrices d'antigènes, les lymphocytes T CD4 ⁺ et les cytokines.....	27
FIGURE 5. Diagramme représentant la phagocytose chez les macrophages H36.12J	34
FIGURE 6. Phagocytose de billes de latex fluorescentes par les H36.12J	43
FIGURE 7. Phagocytose chez les H36.12J après exposition au Be	46
FIGURE 8. Cytofluorogramme de l'apoptose et du cycle cellulaire des H36.12J.....	50
FIGURE 9. Apoptose chez les H36.12J après 72 heures d'exposition au Be	52
FIGURE 10. Cycle cellulaire chez les H36.12J après 72 heures d'exposition au Be.	54
FIGURE 11. Cytofluorogramme de la production de peroxyde d'hydrogène par les H36.12J.....	57
FIGURE 12. Flambée oxydative chez les H36.12J après 24 et 72 heures d'exposition au Be.....	59
FIGURE 13. Effet du Be sur l'expression des récepteurs CD11b et CD68 par les cellules H36.12J après une heure d'exposition.....	66
FIGURE 14. Effet du Be sur l'expression des récepteurs CD11b et CD68 chez les cellules H36.12J après 72 heures d'exposition.....	68

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. Effet du NaN_3 sur la phagocytose de billes fluorescentes par les H36.12J après 2 heures d'exposition	45
TABLEAU 2. Effet du Be et du LPS sur la production de NO_2^- par les cellules H36.12J et les Raw 264.7 après 72 heures d'exposition.....	63
TABLEAU 3. Dosage par ELISA des cytokines IL-6 et TNF- α dans le surnageant des cellules Raw 264.7 et H36.12J après 18 heures d'exposition au Be	72

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
Ag :	Antigène
ARN :	Acide Ribonucléique
Be :	Béryllium
BSA :	“Bovine Serum Albumine”
Ca :	Calcium
CD :	Classe de Différenciation
CMH :	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CPA :	Cellules Présentatrice d’ Antigène
DCFH :	dichlorofluorescéine
DCFH-DA :	“2,7 dichlorofluorofluorescéine diacétate“
ELISA :	“Enzyme-Linked Immunosorbant Assay”
GM-CSF:	“granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d’hydrogène
Ig :	Immunoglobuline
IL :	Interleukine
IFN :	Interféron
LAK :	“Lymphokines activated killer”
LPS :	Lyopolysaccharide
MCB :	Maladie Chronique reliée au béryllium
Mg :	Magnésium
mg :	Milligramme
ml :	Millilitre
NDD :	Naphthyléthylène diamine dihydrochlorure
ng :	Nanogramme
NK :	Cellule Tueuse Naturelle
nm :	Nanomètre
NO :	Oxyde d’azote
PBS :	“Phosphate Buffered Saline”

PBMC:	“Peripheral blood mononuclear cells”
PI:	Iodure de propidium
PMA:	“Phorbol Myristate Acetate”
ROS:	Intermédiaires oxygénés réactifs
SVF:	Sérum de veau foetal
TBT:	Tributylétain
TCR:	Récepteur de cellules T
TMB :	Tétraméthyl benzedine
Tc :	T cytotoxique
Th :	T auxiliaire
TNF :	“Tumor Necrosis Factor”
µg:	microgramme
µl:	microlitre

RÉSUMÉ

Le béryllium (Be) est un métal reconnu pour induire une réponse immunitaire et des inflammations chez les gens exposés. En effet ce métal est souvent associé à des maladies pulmonaires en fonction des niveaux d'exposition. Une forte exposition peut causer de graves maladies pulmonaires. Une exposition chronique peut entraîner des désordres pulmonaires chroniques comme des sensibilisations au Be et si les individus exposés ne sont pas retirés du milieu d'exposition ce problème peut dégénérer en béryllose (MCB).

Les macrophages sont les premières cellules arrivées sur les lieux afin de séquestrer et d'éliminer les xénobiotiques. Ils sont aussi impliqués dans les réactions inflammatoires. Nous avons choisi de travailler avec des macrophages afin de voir les modifications au niveau des fonctions de ces cellules.

À partir des tests effectués, nous avons observé une diminution de la phagocytose chez les macrophages. Nous avons également observé une augmentation du pourcentage des cellules en apoptose et une modification du cycle cellulaire chez les macrophages. La production de peroxyde d'hydrogène est plus élevée en présence de Be et la production de cytokines (TNF- α) est également augmentée. Nous avons regardé les changements au niveau des récepteurs de surface chez les macrophages par cytométrie et nous avons observé une augmentation du pourcentage de cellules exprimant le CD68, un récepteur qui pourrait être impliqué dans la prise en charge et la présentation de l'antigène et également dans la protection des membranes du lysosome contre les attaques des enzymes hydrolytiques. Ces résultats démontrent que le Be affecte les fonctions des macrophages ce qui pourrait expliquer, du moins en partie, l'initiation des réactions inflammatoires chroniques.



Étudiant



Directeur de recherche

INTRODUCTION

Le Be est un métal de faible poids moléculaire très présent dans l'environnement. Il détient plusieurs propriétés intéressantes qui font qu'il est très utilisé dans différentes industries. Une exposition au Be et à ses poussières à longterm a été associée à des maladies pulmonaires. Une forte exposition au Be à un niveau de toxicité aiguë, peut causer des inflammations des voies respiratoires et des pneumonies chimiques. Une exposition chronique au Be à plus faibles niveaux cause des désordres pulmonaires comme une sensibilisation au Be (réponse immunitaire spécifique contre le Be) et si les individus ne sont pas retirés des milieux d'exposition, ils peuvent développer une béryllose qui se caractérise par une inflammation et une présence de granulomes au niveau des poumons. Ces granulomes consistent en une accumulation de macrophages et de lymphocytes T au niveau des poumons. Cette présence de granulomes affecte les fonctions pulmonaires des individus touchés. Les individus souffrant de béryllose ne peuvent pas être guéris, ils ne peuvent qu'être soulagés en prenant des anti-inflammatoires.

Le mécanisme par lequel le Be induit des sensibilisations ou des bérylloses est encore inconnu. Par contre l'équipe de Sawyer a soulevé l'hypothèse que le Be serait pris en charge par les macrophages, ré-exprimé à la surface des cellules et par la suite il y aurait production de cytokines inflammatoires et présentation spécifique du Be aux lymphocytes T via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Sawyer *et al.*, 2002). Il y aurait ensuite apoptose ou nécrose chez les macrophages et le Be non détruit serait ré-introduit dans l'organisme et repris en charge par d'autres macrophages. Ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi les individus souffrent d'inflammation chronique.

Nous sommes partis de cette hypothèse pour soulever plusieurs objectifs de travail. Les macrophages sont les premières cellules à intervenir dans l'initiation d'une réponse immunitaire en prenant en charge les molécules étrangères. Par contre, lors d'une exposition au Be, les molécules ne sont pas éliminées normalement puisque l'inflammation persiste. Nous avons trouvé une lignée de macrophages qui sont sensibles

au Be et qui produisent du TNF- α en sa présence. Nous avons effectué des tests classiques en immunotoxicologie afin de voir les effets du Be sur les fonctions des macrophages qui sont sensibles au Be. Nous avons fait des tests afin d'évaluer les changements au niveau de la phagocytose, de l'apoptose et du cycle cellulaire chez ces macrophages. Ensuite nous avons regardé les effets du Be sur la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de nitrate d'oxyde (NO) des macrophages. Le peroxyde d'hydrogène joue un rôle dans le maintien de l'inflammation. Nous avons également observé les modifications survenues au niveau de l'expression de certains marqueurs de surface suite à une exposition au Be. Finalement nous avons dosé la production de cytokines inflammatoires après une exposition au Be.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

Le système immunitaire est une combinaison très complexe de différents organes, cellules et médiateurs chimiques qui travaillent ensemble pour identifier, séquestrer et éliminer des substances étrangères. Chez les mammifères, les organes du système immunitaire sont représentés principalement par le thymus, la rate, la moelle osseuse et également par le système lymphatique et le système lymphoïde associé aux muqueuses ou MALT. Ce dernier est observé dans la sous-muqueuse des tractus gastro-intestinal, respiratoire et uro-génital (Roitt, Brostoff and Male, 1993)

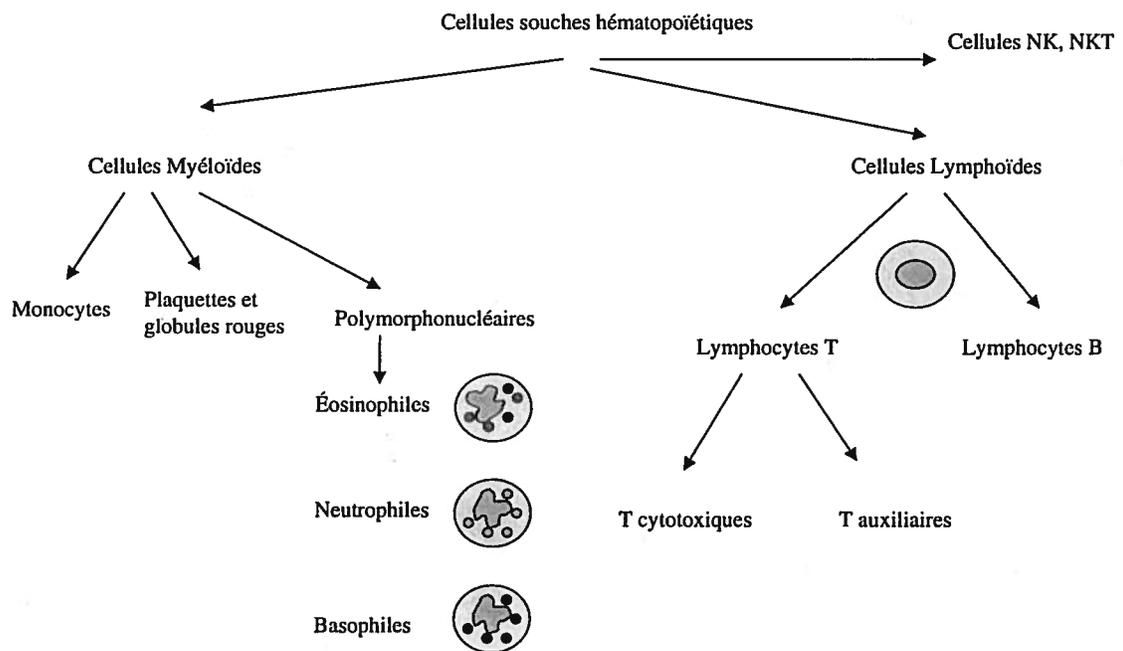
Le rôle du système immunitaire est de préserver l'intégrité de l'organisme. Ce système est en charge de reconnaître le soi du non-soi. Le soi représente les différents tissus, organes et cellules de l'organisme. Le non-soi comprend les pathogènes opportunistes, incluant les bactéries, les virus et les cellules modifiées ou transformées. La grande complexité de notre système immunitaire représente bien sa grande importance. Si notre organisme échoue dans la reconnaissance du non-soi, il peut rapidement devenir en danger et succomber à de graves infections ou maladies. D'un autre côté, si notre système immunitaire est incapable de considérer nos propres tissus ou organes comme étant soi et ainsi déclencher une réponse immunitaire, nous pouvons développer de graves maladies auto-immunes. Le système immunitaire est donc un gardien qui nous prévient des infections et des maladies mais il peut également être un destructeur très puissant et envahissant. Le fait que plusieurs erreurs puissent se glisser au niveau de notre défense immunitaire, a permis d'identifier plusieurs organes, cellules et facteurs solubles, comme étant des agents permettant de régulariser et de surveiller notre organisme afin de minimiser les dommages (Roitt, Brostoff and Male, 1993).

2. CELLULES EFFECTRICES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

Les cellules du système immunitaire comprennent principalement les lymphocytes et les phagocytes. Parmi ces derniers, nous pouvons mentionner les macrophages, les neutrophiles, et les éosinophiles. Les lymphocytes sont les acteurs principaux lors d'une réponse immunitaire spécifique. On retrouve trois principales classes de lymphocytes, les B, les T et les cellules tueuses naturelles (NK). Les cellules NK dérivent d'une étape intermédiaire entre la différenciation des cellules myéloïdes et des cellules lymphoïdes (Figure 1). Les cellules NK ont une fonction cytotoxique, elles ne reconnaissent pas spécifiquement leur cible. Elles font parties de l'immunité naturelle et interviennent rapidement lors d'une infection. Les lymphocytes T peuvent se différencier dans le thymus en deux classes : les T auxiliaires (Th) qui régularisent la fonction des autres cellules par les cytokines (hypersensibilité retardée) et les T cytotoxiques qui tuent les cellules infectées et cancéreuses. Les médiateurs chimiques du système immunitaire comprennent les anticorps, les immunoglobulines et les cytokines (Roitt, Brostoff and Male, 1993).

FIGURE 1. Organes et cellules du système immunitaire.

Les cellules souches hématopoïétiques donnent naissance à deux lignées distinctes : lymphoïde et myéloïde. Elles se différencieront en cellules T (dans le thymus) ou en cellules B (dans le foie fœtal ou dans la moelle osseuse) selon le microenvironnement dans lequel elles se retrouvent. L'origine des cellules NK et des cellules présentatrices d'antigène n'est pas encore claire mais elles proviennent toutes des cellules souches hématopoïétiques.



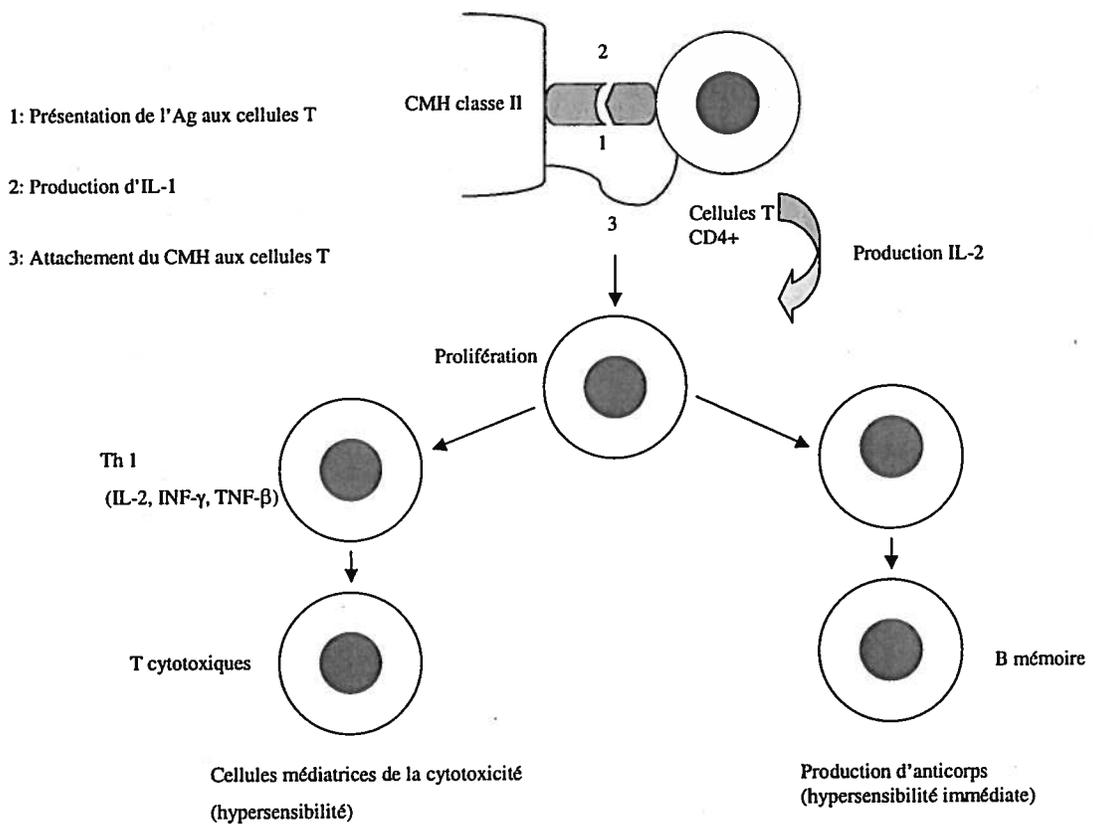
2.1 Les Lymphocytes T

Les lymphocytes T s'associent aux molécules du CMH via le TCR. Chaque peptide immunogénique contient des sites qui se lient au CMH et d'autres sites qui sont reconnus par les cellules T. Parmi les lymphocytes T on retrouve deux classes majeures: les cellules T qui expriment le CD4 et qui reconnaissent un antigène associé à la molécule du CMH de classe II et les cellules exprimant le CD8 qui reconnaissent un antigène associé au CMH de classe I. Les cellules T CD4⁺ (T auxiliaire) (T_H) reconnaissent des antigènes exogènes (bactéries). Les cellules T CD8⁺ (T cytotoxiques (T_c)) reconnaissent des antigènes endogènes synthétisés par la cellule cible comme par exemple des antigènes viraux.

Le principal mécanisme de la régulation du système immunitaire est l'activation des lymphocytes Th et la sécrétion de lymphokines par ceux-ci. Cette activation des lymphocytes T entraîne par la suite une cascade d'évènements comme la sécrétion de cytokines et la prolifération des lymphocytes T (Figure 2). Les lymphocytes T sont activés par la présence d'antigène et de l'interleukine-1 (IL-1) sécrétée par les macrophages (Weiss, 1993). La production d'IL-2 par les Th déclenche la prolifération des lymphocytes T qui sont dirigés spécifiquement contre les antigènes et maintient leur activation. Les autres cellules du système immunitaire sont activées par la présence de peptides étrangers et la réponse immunitaire est amplifiée par l'IL-2 produite par les Th. Les Th activées se divisent en deux groupes : les Th1 et Th2. Les cellules Th1 sécrètent de l'Interféron (IFN)- γ ,

FIGURE 2. Activation des lymphocytes T

L'activation se fait premièrement par la présentation de l'antigène aux lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigène. Cette présentation et l'attachement aux cellules T entraînent la production par les cellules présentatrices d'antigène d'IL-1 mais aussi d'IL-6 et d'INF- α . Les cellules T produisent et expriment par la suite de l'IL-2 et elles prolifèrent. Les cellules se différencient en Th 1 (cellules T cytotoxiques) ou en Th 2 (cellules B mémoire) (Fontenot et al., 2002). Chacune de ces deux dernières sous-population peut bloquer l'activité de l'autre sous-population.



du « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor » (GM-CSF), du facteur des nécroses des tumeurs (TNF)- β , de l'IL-2, de l'IL-3 tandis que les cellules T_H2 produisent du GM-CSF, de l'IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10 (Mosmann et Coffman, 1987). L'IL-4 et IL-5 sont impliquées dans la division des lymphocytes B et lors de leur différenciation en plasmocytes qui synthétisent et sécrètent des anticorps. L'IL-4, le GM-CSF et l'IFN- γ induisent la cytotoxicité chez les macrophages. Ces macrophages sécrètent par la suite du TNF- α (Crawford *et al.*, 1987).

L'immunité induite par les lymphocytes T joue un rôle important chez les gens sensibilisés au Be. Les cellules T activées par le Be expriment le TCR avec la chaîne V β 3 et la séquence d'acide aminé CDR3 qui est un segment variable du TCR et qui augmente les contacts entre les peptides et les CMH. Le Be modifie l'activation des cellules T en augmentant la présentation de l'antigène au CMH grâce à une molécule d'acide glutamique (GLU 69) (Fontenot *et al.*, 1999) (Comhair *et al.*, 1999).

2.2 Les cellules Tueuses Naturelles (NK)

Les cellules NK sont dérivées des grands lymphocytes granulaires. Elles représentent environ 5 % des cellules du sang circulant et des cellules de la rate. Les cellules LAK (lymphokines activated killer) dérivent de l'activation des cellules NK par l'IL-2. Ces cellules ont une grande activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses. Elles interagissent avec les cellules cancéreuses de façon non spécifique en faisant directement contact avec les membranes de ces cellules (Whiteside et Herberman, 1989). D'un autre côté, les cellules NK expriment le CD16, un récepteur de surface. Elles peuvent alors se fixer à la portion Fc des anticorps anti-tumoraux présents sur les cellules cancéreuses et détruire ainsi ces cellules. Ce dernier mécanisme est anticorps dépendant et donc plus spécifique que le premier (Jondal, 1987; Ortaldo et Herberman, 1984).

2.3 Les Monocytes/Macrophages

En plus des lymphocytes T et des NK, une autre population importante du système immunitaire est les monocytes/macrophages et leur dérivés. On retrouve les monocytes en circulation dans le sang. Ils circulent environ 8 heures puis migrent par la suite pour devenir des macrophages tissulaires. Les macrophages jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie normale des tissus en sécrétant des facteurs de croissance et en faisant une surveillance. Ils tuent les cellules cancéreuses et jouent le rôle de cellules présentatrices d'antigène (CPA). Les macrophages sont les principales cellules de l'immunité de l'hôte lors d'une infection par un pathogène. On retrouve les macrophages dans la majorité des tissus. Ces cellules sont impliquées dans l'inflammation, la défense de l'hôte et lors d'une première réponse contre des substances étrangères et des pathogènes. Leur rôle principal est d'intercepter les antigènes, les transformer et les ré-exprimer à leur surface pour la présentation aux lymphocytes T. Cette présentation de l'antigène aux cellules T entraîne la production de cytokines telles que l'IL-1 et le TNF. Cette interaction entre les macrophages et les lymphocytes T contribue à produire des signaux négatifs et positifs qui vont entraîner des stimulations ou des inhibitions au niveau du système immunitaire. Les lymphocytes T et les macrophages utilisent les cytokines produites pour communiquer entre eux. Les cellules Th produisent des cytokines qui affectent les fonctions des macrophages comme par exemple leur sécrétion de cytokines, la présentation de l'antigène, leur influence sur la population des Th. D'un autre côté, les cytokines produites par les macrophages vont également influencer la production de cytokines par le Th (Al-Sarireh *et al.*, 2000).

Les macrophages, sous l'influence des Th et des cytokines sécrétées (surtout de l'INF- γ), vont produire de l'oxyde d'azote (NO). Le NO possède une grande activité cytotoxique ayant comme habilité de tuer des bactéries, des virus, des protozoaires et des cellules cancéreuses. Par contre il peut être très dommageable pour les tissus de l'hôte comme d'être impliqué dans des inflammations chroniques. Le NO est très réactif et il est produit suite à l'oxydation de l'acide aminé L-arginine en L-citrulline et en NO par l'enzyme NO-synthase (NOS). La forme inductible de NOS (iNOS) est produite en grande quantité

lorsque les macrophages sont stimulés par des cytokines pro-inflammatoires (Hibbs *et al.*, 1988; Stuer et Nathan, 1989). L'INF- γ à son tour va augmenter la production de certaines cytokines comme le TNF- α qui possède une activité anti-virale et l'IL-12 qui augmente l'activité cytotoxique des cellules. D'un autre côté les cytokines peuvent avoir une influence négative sur les macrophages. L'INF- γ inhibe la production d'IL-10 chez les macrophages. L'IL-4 produite par les Th 2 bloque la production de plusieurs cytokines inflammatoires par les macrophages comme le TNF- α , l'INF- γ et l'IL-12. On ne peut pas uniquement parler du mécanisme d'action des macrophages puisqu'il est inter relié avec d'autres cellules du système immunitaire. Les cellules Th 1 et 2 jouent un grand rôle dans la régulation des macrophages (Scheurich *et al.*, 1987; Yokota *et al.*, 1988).

Les macrophages possèdent des capacités de phagocytose et de pinocytose. De plus, ils possèdent plusieurs mécanismes cytotoxiques. Le principal mécanisme des macrophages activés est la possibilité de sécréter des intermédiaires oxygénés réactifs (ROS), l'anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le déséquilibre de la membrane plasmique, lors de la phagocytose ou de la liaison avec un récepteur approprié, initie la flambée oxydative. Lors de la flambée oxydative, un complexe oxydase associé à la membrane et qui dépend du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) et de la flavoprotéine, réduit l' O_2 en O_2^- au niveau de la membrane plasmique. Tous les macrophages expriment une NADPH oxydase fonctionnelle mais ils sont également armés d'outils non-oxydant pour tuer les cellules cancéreuses ou autres agents infectieux (Forman et Torres, 2001). Par la suite l'enzyme superoxyde dismutase catalyse spontanément la conversion de O_2^- en H_2O_2 . Ces deux composés sont toxiques ainsi que les produits secondaires de la réaction : radicaux hydroxyles et singulets d'oxygène par exemple (Meltzer et Nacy, 1989).

Un des mécanismes d'action hypothétique soulevé lors d'une exposition au Be est que celui-ci est phagocyté principalement dans les voies poumons par les macrophages alvéolaires. Il est par la suite ré-exprimé à la surface des macrophages et présenté aux lymphocytes T en association avec le CMH de classe II. Il y a sécrétion de cytokines et

activation des macrophages et des lymphocytes T. Les macrophages jouent un rôle important lors d'une exposition au Be (Sawyer *et al.*, 2002).

2.4 Lymphocytes B

Lorsqu'il y a présence dans l'organisme d'un antigène, l'activation des cellules se fait de deux façons différentes, il y a premièrement activation des cellules afin d'accroître le nombre de cellules capable de réagir contre les substances antigéniques et il y a par la suite la différenciation de ces cellules afin d'obtenir des lymphocytes B matures. Les cellules B ont à leur surface des immunoglobulines (Igs) de membrane. Celles-ci sont produites par la cellule elle-même et jouent un rôle de récepteur spécifique pour l'antigène.

Une réponse immunitaire efficace et spécifique implique une coopération directe entre les lymphocytes B spécifiques et les lymphocytes T (Kincade et Gimble, 1993). Autant les lymphocytes B que T reconnaissent des composantes du même antigène. Les récepteurs de haute affinité, que sont les Igs, permettent aux lymphocytes B spécifiques de fixer les antigènes. Par contre cette étape ne permet pas toujours l'activation des cellules. L'antigène doit être transformé et ré-exprimé à la surface des cellules en association avec le CMH de classe II. Les lymphocytes T reconnaissent ce complexe et il y a par la suite activation des cellules et production de facteurs solubles.

Il est connu que le Be affecte les lymphocytes B en augmentant la quantité d'immunoglobulines dans le sérum. Le BeSO_4 agit comme mitogène en stimulant non spécifiquement les lymphocytes B (Berhehani *et al.*, 1985) (McHugh *et al.*, 2003).

3. RÉPONSE IMMUNITAIRE

Pour qu'il y ait une réponse immunitaire, il faut d'abord qu'il y ait eu reconnaissance d'une substance étrangère dans le but de l'éliminer. Il y a deux sortes de réponse

immunitaire : les réponses naturelles (non adaptatives) et les réponses adaptatives ou spécifiques. Les propriétés de ce dernier type de réponse sont la spécificité et la mémoire. Dans la réponse immunitaire spécifique, ce sont les lymphocytes qui assurent la reconnaissance. Les lymphocytes T ou B ne reconnaissent qu'un antigène particulier. Les cellules phagocytaires telles que les monocytes/macrophages et les neutrophiles utilisent des systèmes de reconnaissance primitifs, non spécifiques. Elles sont donc responsables des réponses immunitaires naturelles. Elles représentent en effet la première ligne de défense contre l'infection.

4. LE CYCLE CELLULAIRE

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases: G₀/G₁, S, G₂ (interphase) et M (mitose). Ces quatre phases représentent la préparation des cellules à la réplication de l'ADN (G₁), la réplication du matériel génétique (S), la préparation des cellules à la mitose (G₂) et la division cellulaire (M). Les phases S et G₂ considérées comme déterminantes dans la division et sont caractérisées par une durée relativement constante. Cependant, la durée de la phase G₁, largement fonction des types cellulaires, est souvent responsable de la variabilité de l'interphase et donc du cycle cellulaire (McHugh *et al.*, 2003). La mitose constitue le stade final dans la prolifération cellulaire. Pour accéder à cette phase, la cellule a deux impératifs: doubler sa masse, c'est-à-dire la quantité de ses constituants et assurer fidèlement la réplication de son matériel génétique: l'ADN. La phase S assure la réplication de l'ADN. Une teneur seuil en ARN ou en protéines est généralement nécessaire pour l'entrée des cellules en S. La phase G₂ est caractérisée par une augmentation des teneurs en ARN et en protéines et l'initiation des modifications dans la conformation chromatinienne précédant la mitose. Le contenu en protéines nucléaires permet une distinction des cellules localisées en début de G₂ ou en fin de G₂. La phase M comprend la prophase, la métaphase, l'anaphase, la télophase et la cytotèque. Les cellules filles issues de la mitose ont des teneurs en ARN et en protéines différentes, responsables de l'hétérogénéité cellulaire. La phase G₁ regroupe la majorité des cellules post-mitotiques dont le contenu en ARN ou en protéines est inférieur à celui des cellules en début de phase S. Dans ce compartiment, déterminant pour le cycle de réplication de

l'ADN, le métabolisme cellulaire consiste à accumuler les constituants (ARN, protéines) jusqu'à une concentration seuil (Dolnik *et al.*, 2003)

5. IMMUNOTOXICOLOGIE

L'immunotoxicologie étudie les effets des xénobiotiques sur le système immunitaire. Les organes lymphoïdes ou certaines sous-populations de cellules du système immunitaire sont souvent la cible des xénobiotiques. Les premières cibles de ceux-ci sont souvent les thymocytes, les monocytes/macrophages, les lymphocytes T, les lymphocytes B activés et les cellules hématopoïétiques.

Une exposition immunotoxique, qui se traduit par des dommages directs au système immunitaire, peut causer une suppression de celui-ci et diminuer la résistance aux infections. Certains contaminants environnementaux peuvent être immunosuppresseurs. Les quatre principales réactions du système immunitaire suite à l'exposition à un xénobiotique ou à un agent pathogène sont : l'élimination, une immunosuppression, une réaction d'hypersensibilité ou une réaction auto-immune (Kacmar *et al.*, 1999).

5.1 Immunosuppression

Lorsque le système immunitaire est immunosupprimé, la conséquence la plus sévère est une augmentation de l'incidence et de la sévérité des infections et/ou une augmentation de l'incidence et de la progression de certains cancers. Certains types d'infections qui touchent le système immunitaire peuvent en dire long sur les composantes du système immunitaire qui sont supprimées. Par exemple, la suppression de l'immunité humorale (c'est-à-dire la production d'anticorps) et/ou les effecteurs associés au système, comme par exemple les cellules phagocytaires (c'est-à-dire les macrophages et les neutrophiles), peuvent être caractérisés par des infections de pathogènes extracellulaires incluant des bactéries et des parasites. D'un autre côté, la suppression des cellules médiatrices de l'immunité et/ou certains autres effecteurs associés comme les cellules NK et l'interféron,

se caractérisent lors d'infections par des pathogènes intracellulaires, incluant des protozoaires, virus, quelques bactéries et également par l'augmentation de formation de tumeurs cancéreuses (Banerjee *et al.*, 1996).

En général, les métaux affectent différents organes de notre système et exercent leurs effets toxiques via l'interaction du métal libre avec la cible soit : le système enzymatique, les membranes ou les organelles cellulaires. Dans la plupart des cas, l'exposition aux métaux à forte dose engendre des effets immunosuppresseurs et d'un autre côté une exposition à de faible dose engendre des effets immunomodulateurs. Par exemple, une exposition au mercure peut activer les cellules B et ainsi augmenter la production d'IgE (Casarett et Doull's, 1996).

5.2 Hypersensibilité

On retrouve quatre groupes de réaction d'hypersensibilité. Une des caractéristiques communes aux quatre types c'est qu'il faut d'abord être exposé à un agent biologique ou toxique pour développer une réaction d'hypersensibilité. Les types I, II et III d'hypersensibilité produisent des anticorps spécifiques (IgE, IgM ou IgG) après une exposition à un antigène. Pour ce qui est du type IV d'hypersensibilité, il y a une production de cellules T mémoires après une exposition à un antigène.

5.2.1 Type I (Hypersensibilité immédiate)

Il y a une sensibilisation lorsqu'il y a une exposition à un antigène via les voies respiratoires, cutanées ou une exposition par la voie gastro-intestinale. À partir de ce moment, il y a une grande production d'IgE dirigées contre des antigènes de notre environnement sans toxicité propre, comme le pollen, les poussières de maison ou les poils des animaux. Une fois produites, les IgE se collent aux cellules mastocytes avant d'entrer dans la circulation. Les mastocytes sensibilisés par ces IgE libèrent des

histamines qui déclenchent une réaction aiguë comme de l'asthme (Roitt, Brostoff et Male, 1993).

5.2.2 Type II (Hypersensibilité anticorps-dépendant)

Chez ce type d'hypersensibilité, on retrouve des anticorps dirigés contre des antigènes portés par les cellules d'un individu (cellule-cible), ou contre des antigènes étrangers, comme des globules rouges transfusés. Ceci a comme effet d'induire une phagocytose, un phénomène de cytotoxicité par les cellules K ou une lyse dépendante du complément (Roitt, Brostoff et Male, 1993).

5.2.3 Type III

Ce type d'hypersensibilité se traduit par l'activation du complément et des polynucléaires déclenchée par la présence des complexes immuns dans les tissus. Le complément et les polynucléaires sont attirés par ces dépôts dans les tissus et lorsqu'ils sont en grande quantité, ils peuvent causer des lésions locales. C'est le cas par exemple de la maladie sérique. Lors de cette maladie, les complexes immuns circulants augmentent la perméabilité vasculaire et provoquent une maladie inflammatoire (Roitt, Brostoff et Male, 1993).

5.2.4 Type IV (Hypersensibilité à médiateurs cellulaires ou hypersensibilité retardée)

Pour qu'il y ait hypersensibilité de type IV, il faut d'abord qu'il y ait eu un premier contact avec l'antigène. Par la suite les cellules T mémoires (spécifiques d'antigène) libèrent des lymphokines. Une cascade d'événements immunitaires prend place par la suite. Les lymphokines induisent une réaction inflammatoire, les macrophages sont attirés et activés et il y a libération des médiateurs du système immunitaire. Il y a trois type d'hypersensibilité retardée : de contact, de type tuberculine et par réactions granulomateuses. Les granulomes sont formés par l'accumulation et la prolifération des

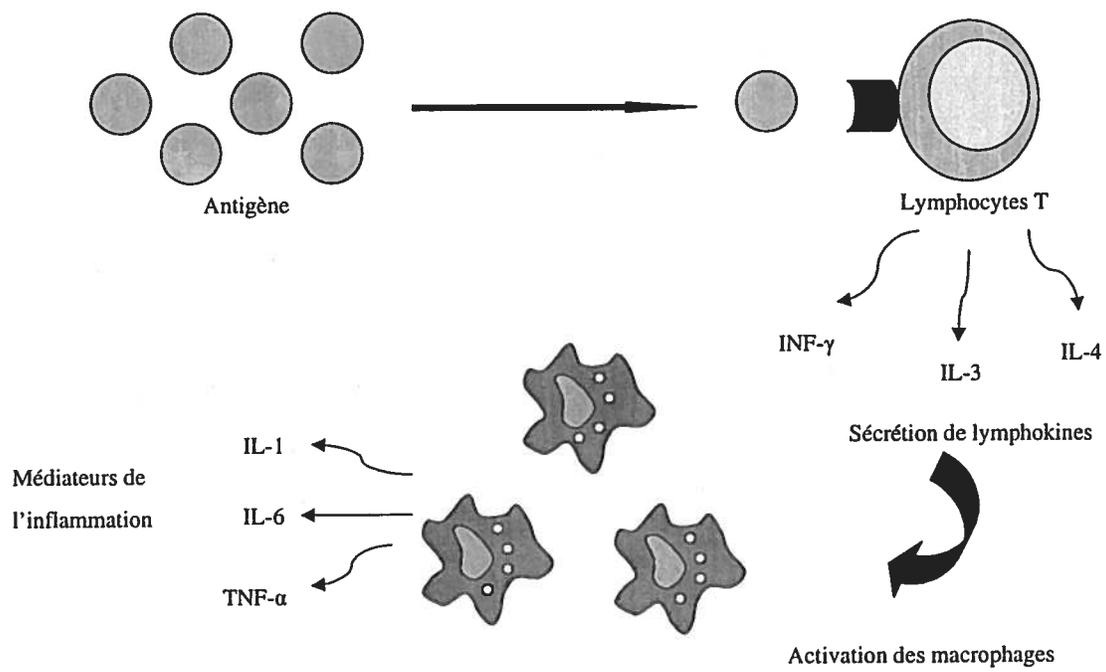
macrophages. Cette accumulation peut persister plusieurs semaines (Roitt, Brostoff et Male, 1993) (Figure 3).

Dans le cas de réaction d'hypersensibilité, se sont les antigènes qui activent le système immunitaire. De fortes réactions d'hypersensibilité peuvent provoquer de graves lésions à différents tissus. Ces réactions d'hypersensibilités sont dues à l'interaction entre les antigènes des produits chimiques et leurs anticorps spécifiques ou aux interactions entre les antigènes et les lymphocytes effecteurs. Elles entraînent ensuite une cascade d'évènements humoraux et cellulaires causant plusieurs problèmes au niveau du système immunitaire (Epstein *et al.*, 1982).

Les métaux et les substances métalliques, incluant les sels métalliques, sont responsables de plusieurs réactions d'hypersensibilité suite à un contact direct par exemple avec la peau ou les poumons. Les sels métalliques ont été impliqués dans plusieurs maladies pulmonaires immunologiques ou non immunologiques (Vial *et al.*, 1996).

FIGURE 3. Réaction d'hypersensibilité de type IV

Pour retrouver une réaction d'hypersensibilité de type IV, il faut qu'il y ait eu préalablement un premier contact avec l'antigène. Suite à un second contact, les lymphocytes T mémoires sécrètent des lymphokines qui induisent une réaction inflammatoire. Les macrophages sont activés et attirés sur les lieux de la réaction d'inflammation. À leur tour ils sécrètent des médiateurs de l'inflammation.



5.3 Auto-immunité

On entend par maladie auto-immune celle qui résulte de la non reconnaissance du soi par le système immunitaire. Lorsqu'il y a une réaction auto-immune, nos propres tissus peuvent être endommagés par notre système immunitaire. Ces maladies sont causées par la perte de la tolérance aux antigènes du soi. Il y a trois types de composantes impliquées dans la reconnaissance du soi: les Igs, le TCR et le produit du CMH. Les Igs et le TCR sont exprimés sur les cellules B et T respectivement et les molécules du CMH sont présentes sur toutes les cellules nucléées.

Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans les maladies auto-immunes : Premièrement, lorsque l'antigène est non disponible dans le thymus lors du développement embryonnaire et également lorsque la sélection négative des récepteurs au niveau du thymus ne se fait pas. Deuxièmement, lorsque la stimulation des cellules T se fait de façon chronique. Ce mécanisme ressemble beaucoup à une réaction d'hypersensibilité et finalement lorsqu'il y a une interférence avec l'immunorégulation par les cellules suppressives T CD8+ (Janeway, 2001).

Certains produits chimiques, drogues et métaux sont reconnus pour induire des maladies autoimmunes chez des personnes génétiquement prédisposées. Les mécanismes impliqués dans le développement de maladies auto-immunes sont encore imprécies. Par exemple, le mercure induit certaines maladies auto-immunes en stimulant la production d'anticorps contre des filaments de la matrice extracellulaire ce qui entraîne des dommages aux membranes du rein (Janeway, 2001).

Il n'y a pas de principe général pour expliquer la toxicité de tous les métaux, par contre quelques généralités sont possible. L'oxydation et la solubilisation des métaux sont des caractéristiques importantes pour définir la toxicité de certains métaux. Les métaux peuvent réagir avec des enzymes, des membranes cellulaires et plusieurs cellules de notre organisme. Ces réactions peuvent inhiber ou stimuler le rôle de certaines de ces cellules de notre organisme. Certains métaux circulent dans notre organisme et peuvent également

se concentrer à plusieurs endroits et entraîner de graves dommages aux organes. Le produit de la métabolisation des métaux détermine souvent les effets que peuvent avoir ces produits sur nos organes (Luster et al., 1990).

5.4 Réponse inflammatoire chronique

Une réponse inflammatoire chronique peut se développer lorsqu'il y a persistance d'un antigène. Plusieurs métaux, microorganismes ou autres produits ont des composantes particulières qui les empêchent d'être phagocytés. Ces produits induisent donc une inflammation chronique qui cause plusieurs dommages aux tissus. Les inflammations chroniques peuvent également se produire lors de maladies auto-immunes où un antigène stimule constamment les cellules T (Fraser et al., 2003).

L'accumulation et l'activation des macrophages est la cause même des inflammations chroniques. Les cytokines secrétées par les macrophages lors de leur activation chronique stimulent la prolifération de fibroblastes et la production de collagène en plus de plusieurs autres produits toxiques comme les intermédiaires oxygénés réactifs, le H_2O_2 et le $TNF-\alpha$. Ces inflammations chroniques peuvent entraîner la formation d'une fibrose. Cette fibrose est souvent associée à des dysfonctionnements au niveau des organes touchés (Stout *et al.*, 1997).

Plusieurs cytokines jouent un rôle important dans le développement des inflammations chroniques. Les principales cytokines impliquées dans une réponse inflammatoire sont l'IL-1, l'IL-6 et le $TNF-\alpha$. De plus l'IFN- γ est également responsable d'une réponse immunitaire. Il est responsable de l'attraction et l'activation des macrophages. Deux cytokines en particulier jouent un rôle important dans le développement d'inflammation chronique : le $TNF-\alpha$ et l'IFN- γ . Les cellules Th1, NK et les T cytotoxiques sécrètent de l'IFN- γ alors que les macrophages sécrètent du $TNF-\alpha$. Un des effets les plus importants de l'IFN- γ est sa capacité à activer les macrophages. L'activation des macrophages implique l'augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe II, l'augmentation de la production de cytokines et l'augmentation de la présentation des

antigènes. Dans une réponse inflammatoire chronique, les macrophages sont responsables en grande majorité des dommages causés aux tissus. En effet ces cellules relâchent des réactifs intermédiaires oxygénés (ROS) qui sont toxiques pour les cellules et qui causent également des dommages aux tissus lorsqu'ils sont retrouvés en grande quantité (Jeffery, 1998 ; Robinson *et al.*, 1994).

Les macrophages jouent un rôle important lors d'une réponse inflammatoire. Ils interviennent comme première ligne de défense non spécifique en phagocytant les microorganismes et en libérant des cytokines. Ce sont aussi des cellules effectrices, susceptibles d'être activées par les lymphokines libérées par les cellules T stimulées par l'antigène. C'est pour ces raisons que nous avons choisi de regarder l'implication des macrophages au niveau de la réponse immunitaire lors d'une exposition au Be.

6. LE BÉRYLLIUM

Le Be est un métal de faible poids moléculaire présent dans l'environnement et il détient plusieurs propriétés intéressantes qui font qu'il est très utilisé dans l'industrie automobile, aérospatiale, de l'énergie, médicale et électronique. C'est un métal qui a de bonnes propriétés de conductibilité de la chaleur et de l'électricité et il est résistant à la corrosion (Kolanz, M.E. 2001). La population en général est exposée naturellement au Be via l'air ambiant, l'eau et son alimentation. Par contre les plus grandes expositions au Be proviennent du travail des mineurs, du travail d'extraction, de raffinage et de recyclage du métal dans les industries (INSPQ, 2003).

Une exposition au Be et à ses poussières a longtemps été associée à des maladies pulmonaires (Powers, 1991). Une forte exposition au Be (excédant $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$) peut causer de graves pneumonies (Van Ordstrand *et al.*, 1943). Une exposition chronique au Be cause des désordres pulmonaires chroniques appelés maladies chroniques causées par le Be (MCB) ou béryllose (Tepper *et al.*, 1961). Cette réponse peut se transformer en

fibrose ou en troubles et obstruction des voies respiratoires allant même jusqu'à causer des cancers dans des cas extrêmes (Kolaniz *et al.*, 2001).

Les normes émises par la commission de l'énergie atomique pour l'exposition des gens travaillant avec le Be, ont été diminuées en 1949 à $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Sternier et Eisenbud, 1951), ce qui a permis d'éliminer en partie le développement de graves pneumonies dû aux expositions des travailleurs au Be. Par contre les MCB demeurent très présente chez les gens travaillant avec le Be (Kriebel *et al.*, 1988). L'IRSST (Comité provincial des médecins, 2003) propose un nouveau niveau d'exposition au Be de $0,01 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pondérée pour une exposition de 8 heures.

7. MÉCANISME D'ACTION DU BÉRYLLIUM

La MCB se traduit par une augmentation et une accumulation dans les poumons des lymphocytes T CD4+ spécifiques au Be (Saltini *et al.*, 1989). Nous supposons que lorsqu'il y a une exposition au Be, il y a également une augmentation des macrophages pulmonaires dans le but de neutraliser les particules de Be. Le Be lié est phagocyté, détruit et ré-exprimé sous forme d'haptène à la surface des cellules présentatrices d'antigènes associées au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Sawyer *et al.*, 2002). Ces molécules présentatrices d'antigènes présentent ceux-ci aux lymphocytes T. Au même moment, les cellules effectrices du système immunitaire comme les monocytes, les cellules mastocytes et d'autres lymphocytes sont recrutés, prolifèrent et/ou se différencient au site d'inflammation ce qui se traduit par une grande obstruction des voies respiratoires (Zelikoff *et al.*, 1998). La présence de ces cellules immunitaires au niveau des poumons peut, à long terme, entraîner certains dommages au niveau de cet organe qui occasionnent de graves problèmes respiratoires et parfois même des cancers. Bien que l'apparition de la MCB peut être très lente, lorsque celle-ci se déclare, elle peut entraîner de l'inflammation et de graves dysfonctionnement au niveau des poumons. La personne atteinte devra rapidement être traitée par thérapie avec des immunosuppresseurs et éventuellement devra recevoir une transplantation pulmonaire. Les plus gros problèmes

liés au Be pour le moment sont des inflammations persistantes aux niveaux des poumons (Comhair *et al.*, 1999).

Le Be a aussi des effets d'adjuvant, il y a ainsi augmentation de la présentation d'antigènes (Salvaggio *et al.*, 1965) qui est médiée par l'augmentation de sécrétions de l'interleukine-1 (IL-1) et du « tumeur necrosis facteur- α » (TNF- α) (Behbehani *et al.*, 1985).

Pour qu'il y ait MCB, il faut d'abord qu'il y ait eu sensibilisation au Be. Par contre toutes personnes sensibilisés ne développent pas nécessairement une MCB. La proportion des gens sensibilisés au Be varie entre 10 et 20% pour ceux qui sont exposés. L'incidence de la MCB chez les travailleurs sensibilisés se situe aux alentours de 1 à 6% (INSPQ, 2003).

Une exposition au Be se produit généralement via les voies respiratoires; cependant, des travaux récents tentent à démontrer que la peau serait aussi une voie d'exposition importante. Le Be est reconnu également pour avoir des propriétés anti-mitogéniques. Il inhibe sélectivement les phases G1 et pré-S du cycle cellulaire et n'a par contre aucun effet sur les phase S-G2/M ou G2/M-G0/G1. Witschi a démontré qu'une stimulation au Be inhibait l'activité d'importantes enzymes lors de la synthèse d'ADN (Witschi *et al.*, 1970).

8. ÉTUDES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

Des études laissent à penser que le mécanisme par lequel la MCB se développe est tel que le Be intervient lors de l'attachement d'un peptide antigénique aux chaînes alpha et bêta des molécules HLA-DP, présentes sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (macrophages, lymphocytes B...) Ce complexe CPA-Be-antigène serait reconnu par le TCR des lymphocytes T spécifiques. Ce processus de reconnaissance d'antigène activerait alors les lymphocytes T spécifiques. Les lymphocytes T activés entraînent une réponse immunitaire. Cette réponse immunitaire peut entraîner une MCB. Fontenot *et al.*

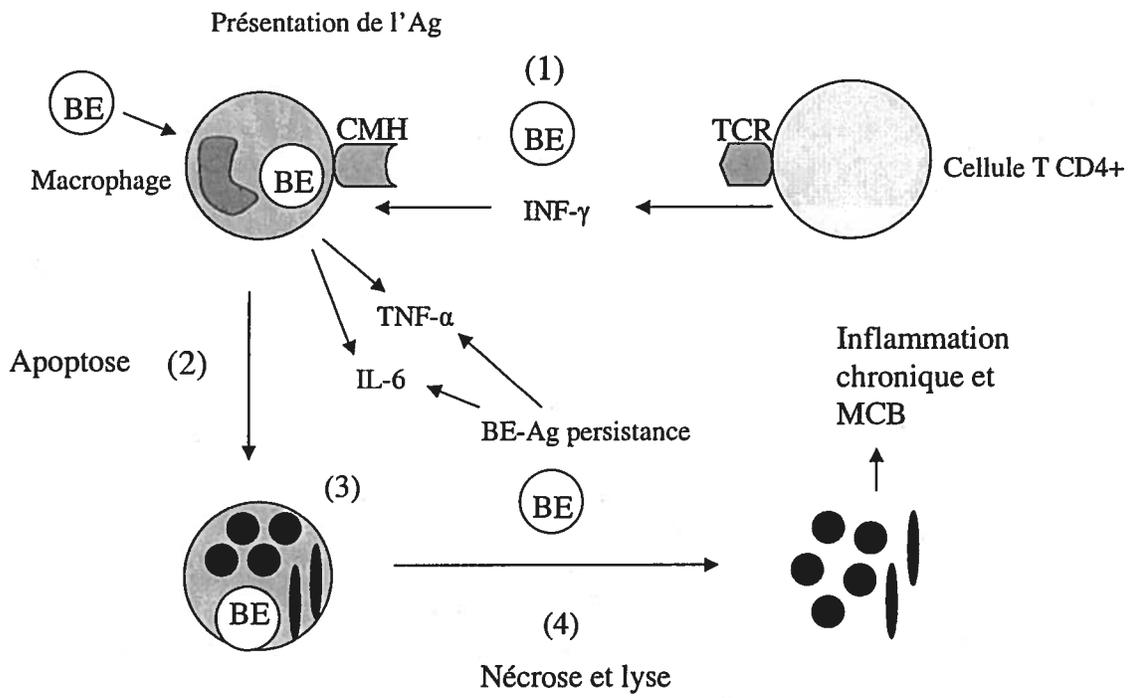
(1999) ont démontré que le Be induit l'expression du TCR chez les patients atteints de MCB.

Sawyer *et al.* ont conçu un modèle avec l'antigène, Be et sa présentation aux cellules T (Figure 4). Dans ce modèle le Be est phagocyté par les macrophages. Le métal est traité comme un antigène exogène et est ré-exprimé à la surface du macrophage associé avec le CMH de classe II. Le complexe CMH-Be est ensuite présenté aux cellules T portant le TCR approprié. Par la suite les cellules T prolifèrent et se différencient en lymphocytes T effecteur-Be. L'antigène Be stimule également la production de cytokines par les macrophages présentant l'antigène Be et par les cellules T activées. Ces cytokines vont augmenter la réponse immunitaire en activant et en recrutant d'autres cellules du système immunitaire comme les macrophages et les lymphocytes T (Sawyer *et al.*, 2002).

D'autres études ont démontré que le Be avait des effets sur l'immunité humorale. En fait il active les lymphocytes B et la production d'immunoglobulines chez les patients atteints de MCB (Deodhar *et al.*, 1973). Le Be a également un effet sur l'immunité cellulaire en induisant des réactions d'hypersensibilité. La reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T sensibilisés au Be et l'activation des macrophages induisent une cascade d'événements qui augmente la réponse cellulaire dans les poumons. Suite à l'activation et à la prolifération des lymphocytes T, il y a production et relargage de cytokines par les cellules effectrices des poumons au site d'inflammation. Dans la MCB, il y a production des cytokines IL-2 (activation des lymphocytes T) et d'interféron- γ (augmentation de la réponse inflammatoire et augmentation de l'activation des macrophages) par le Th 1. Par contre il n'y a pas de production de cytokine IL-4 (secrétées par le Th 2 et impliquées dans la production d'IgG1 et d'IgE et diminution de la production d'IgG2a) (Janes Kuby, 1997). D'autre part, les macrophages présents dans les poumons des patients atteints de MCB produisent une grande quantité de TNF- α et d'IL-6. Le TNF- α présent en grande quantité, a des effets cytotoxiques. Son rôle est d'induire la sécrétion de cytokines et il est associé à une inflammation chronique. L'IL-6 stimule la sécrétion d'anticorps et induit la synthèse de protéines de la phase aiguë qui sont des médiateurs chimiques présents aux sites d'inflammation.

FIGURE 4. Interaction entre le Be , les cellules présentatrices d'antigènes, les lymphocytes T CD4⁺ et les cytokines.

Premièrement (1) l'haptène Be est pris en charge par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et présenté spécifiquement aux cellules T CD4⁺ via le CMH et le TCR. Les cellules T prolifèrent et il y a production de cytokines. La présentation de l'antigène et la production d'IFN- γ induit la production de TNF- α et d'IL-6 par les CPA. Deuxièmement (2) la CPA va en apoptose et il y a lyse de la cellule. Troisièmement (3) le Be est relâché à nouveau dans les poumons ce qui induit à nouveau la production de cytokines et une deuxième lyse ou une nécrose (4). Ce processus induit une inflammation chronique au niveau des poumons (Sawyer *et al.*, 2002).



Le travail de Sterner et Eisenbud (1951) a démontré que l'incidence de la MCB n'est pas seulement dose-dépendant. Leurs études suggèrent que la maladie peut être due à une hypersensibilité au Be. Plusieurs évidences ont démontré que l'inflammation entretenue par les granulocytes au niveau des poumons est maintenue par une réaction entre les antigènes (haptènes)-spécifiques et les cellules T et le Be. Le sang ou les cellules T des poumons des gens avec une MCB réagissent avec le Be (Epstein *et al.*, 1982; Pinkston *et al.*, 1984).

Des études *in vitro* ont démontré que les PBMC et les cellules T des poumons de patients atteints de MCB proliféraient en réponse à une exposition avec le Be et que les PBMC et les cellules de patients normaux ne répondaient pas (Rossman *et al.*, 1988). Saltini *et al.* (1989) ont démontré par cytofluorométrie que 10% des individus sensibilisés au Be avaient des cellules T présents dans le liquide récolté lors d'un lavage bronchoalvéolaire et qui réagissaient spécifiquement au Be.

D'autres études soulèvent que les individus sensibilisés au Be pourraient développer à long terme une béryllose. La béryllose est définie comme étant la conséquence d'une réponse immunologique chronique à un antigène qui persiste. Les troubles se retrouvent au niveau de la lymphe, des poumons, des yeux et de la peau. Cette maladie peut également affecter le foie, la rate, les ganglions lymphatiques, les glandes salivaires, le cœur, le système nerveux et les muscles. Cette stimulation antigénique persistante peut entraîner de graves dommages aux tissus et causer le développement de fibrose pulmonaire irréversible (Semenzato *et al.*, 2001) (Bergeron *et al.*, 1997) (Aostini *et al.*, 2001).

Plusieurs études se sont attardées à la capacité du Be à induire la production de cytokines par les cellules récupérées des lavages bronchoalvéolaires. Tinkle *et al.*, (1997) ont trouvé que le Be et non les autres métaux, induisaient la production d'interféron- γ (IFN- γ). Ils ont également remarqué une augmentation dans la production d'IL-2. L'IL-2 est importante puisque le Be stimule et induit la prolifération des cellules T. La même équipe a prouvé cette dernière affirmation puisqu'en ajoutant des anticorps monoclonaux anti-IL-

2, ils ont remarqué une diminution de la prolifération des cellules suite à une exposition des cellules au Be. Par contre ils ont découvert que l'IL-4 et IL-7 n'étaient pas augmentées lors d'une stimulation des cellules de patients porteurs d'une MCB par le Be. Les cellules provenant d'individu sain, non sensibilisé au Be ne produisent pas de cytokines suite à une exposition au Be. Basé sur l'hypothèse que les cellules des patients sensibilisés au Be produisaient de l'IFN- γ mais pas d'IL-4 et ni d'IL-7, ils sont venus à la conclusion que les cellules T étaient dominées par des lymphocytes Th de type 1.

D'autres ont découvert que les cellules des personnes sensibilisées au Be produisaient également une grande quantité d'IL-6 et de facteur nécrosant (TNF)- α en présence de Be ainsi que d'IL-10, cette dernière cytokine serait impliquée dans la régulation de la synthèse des cytokines proinflammatoires. L'addition d'IL-10 aux cellules sensibilisées au Be diminue la production d'IFN- γ , d'IL-2 et de TNF- α mais n'a aucun effet sur la prolifération des cellules T sensibilisées au Be (Tinkle et Newman, 1997).

Maier *et al.*, (2001) ont démontré que les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) provenant de patients avec la MCB mimait la production de cytokines retrouvée chez les cellules d'individus sensibilisées au Be. En utilisant les PBMC d'individus porteurs d'une MCB, ils ont trouvé qu'un ajout d'IL-4 ne diminuait pas la stimulation des cytokines lors d'une exposition au Be. Ces résultats ont montré qu'une stimulation au Be peut avoir de graves effets sur les cellules T des gens porteurs d'une MCB résultant d'une expansion du nombre de cellules T et d'une augmentation de la production d'IFN- γ , un activateur des macrophages. Le Be crée donc un environnement propice pour les interactions entre les cellules du système de l'immunité innée et acquise et les cytokines qui induisent l'inflammation.

Des macrophages hybrides nommés H36.12J ont été utilisés lors de plusieurs expériences. Ces cellules proviennent de la fusion entre des macrophages péritonéaux de souris et les cellules P388D.1 qui sont des cellules cancéreuses de souris. Ces macrophages produisent du TNF- α après une stimulation au Be. Ils ont servi comme modèle *in vitro* pour plusieurs expériences sur la MCB. Sawyer *et al.*, (2000), ont soulevé l'hypothèse qu'une

production de TNF- α suite à une exposition des H36.12J au Be pouvait entraîner l'apoptose des cellules.

9. MODÈLE EXPÉRIMENTAL

Il y a peu d'études qui ont été faites sur le Be jusqu'à présent. Par contre beaucoup d'entre elles portent sur les effets de l'hypersensibilité que peut entraîner une exposition au Be. Lors de cette sensibilisation, les chercheurs ont constaté une augmentation du nombre de lymphocytes T (surtout des lymphocytes T CD4⁺) dans les cellules de lavages bronchoalvéolaires. Ces lymphocytes T CD4⁺ démontrent une réponse spécifique au Be lorsqu'ils sont mis en présence de CPA exprimant les molécules du CMH de classe II. Peu d'études ont été faites pour caractériser l'implication et le rôle des macrophages dans la défense immunitaire lors d'une exposition au Be. Parmi celles-ci nous retrouvons la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IFN- γ , l'IL-6 et l'IL-2. Les mécanismes par lesquels le Be stimule la production de cytokines par les cellules des patients atteint de MCB sont encore inconnus (Hamada *et al.*, 2000). D'autres études portent sur l'hypothèse de la production de TNF- α suite à une exposition au Be. Celle-ci pourrait induire l'apoptose chez les cellules de souris et d'humains. L'apoptose fut observée au microscope à fluorescence après le marquage à l'iodure de propidium (PI) (Sawyer *et al.*, 2000).

Nous avons décidé de concentrer nos recherches sur les macrophages puisque peu d'études portent sur leur implication lors d'une réponse immunologique suite à une exposition au Be. Nous avons donc choisi une lignée cellulaire, les H36.12J pour déterminer les effets du Be sur les macrophages. Nous avons testé plusieurs paramètres impliqués dans des études d'immunotoxicologie afin de voir les modulations causées au système immunitaire suite à une exposition des macrophages au Be. Les paramètres immunologiques les plus importants et étudiés ici sont: la phagocytose, la flambée oxydative, l'apoptose, la libération de NO, le phénotypage et le dosage de cytokines inflammatoires par ELISA.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. CULTURE CELLULAIRE

1.1 Origine de la lignée H36.12J

La lignée de cellules H36.12J provient de l'American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA). Cette lignée a été établie par P.A. Campbell et E.P. Canono en 1991. Des macrophages péritonéaux provenant de souris C57BL/6N ont été fusionnés avec la lignée cellulaire de lymphome de souris P388D1. Les H36.12J produisent du TNF- α après une stimulation avec le Be et elles sont utilisées dans les modèles *in vitro* pour l'étude de la MCB chez l'humain.

1.2 Culture des cellules

Les cellules H36.12J sont cultivées en milieu DMEM contenant 2 nM de L-glutamine (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) enrichi de 10% de sérum de veau fœtal (Gibco) et de 0.01M d'acide N-2-hydroxyéthyl-piperazine-N-2-éthanesulfonique (HEPES) (Gibco). Le dénombrement de cellules et la viabilité sont effectués par microscopie optique par l'épreuve d'exclusion du bleu de trypan 0.1% (Gibco) avec un hémacymètre (Scientific Instrument Division, Buffalo, NY, USA). La suspension cellulaire est ajustée à 5×10^4 cellules /ml dans un flacon de 25 cm² (Fisher, Montréal, Québec, Canada). La concentration cellulaire est ajustée à tous les 3 ou 4 jours avec l'ajout de milieu frais.

2. LA PHAGOCYTOSE CHEZ LES MACROPHAGES H36.12J

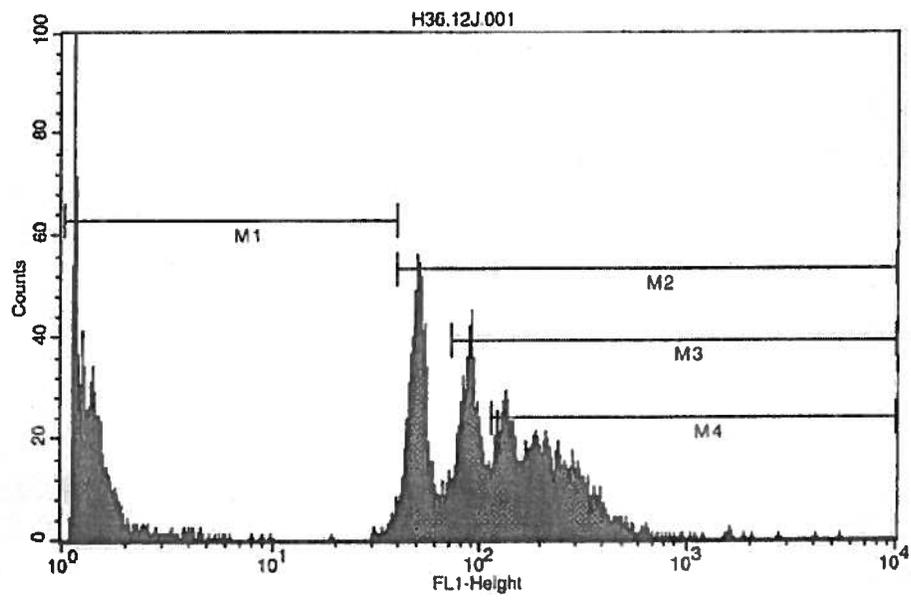
L'activité de la phagocytose est quantifiée en cytofluorométrie par l'ingestion de billes fluorescentes (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) par les cellules. Les H36.12J

sont préalablement exposées au Be (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) pour des durées de temps variable. Un témoin positif avec des billes fluorescentes et sans Be et un témoin négatif avec des billes fluorescentes et de l'azide de sodium (NaN₃) (Sigma-Aldrich) sont ajoutés à l'expérience. Par la suite, les cellules sont ajustées à une concentration de 1×10^6 cellules/ml. Deux aliquots de 0,5 ml sont préparés pour chaque condition d'exposition. À chaque échantillon, 5,6 µl de billes fluorescentes de 1.716 µ de diamètre est ajouté. Les cellules sont par la suite incubées à 37 °C pour 2 heures. Après l'incubation, les échantillons sont déposés sur un gradient de 3% de BSA (Sigma-Aldrich) dans 4 ml de RPMI (Gibco). Cette étape permet d'éliminer les billes non phagocytées. Les gradients de BSA sont centrifugés à 150 x g pendant 8 minutes à la température de la pièce. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 0,5 ml de FACSFlow (Becton Dickinson (BD), San Diego, CA, USA) contenant 0,5% de formaline (BDH, Toronto, Ontario, Canada). Les lectures sont faites avec un FACScan (BD) muni d'un laser en argon refroidi à l'air et procurant une excitation à 488 nm. La fluorescence est mesurée avec le détecteur FL1 à une longueur d'onde de 519 nm (Fournier *et al*, 2000).

Le pourcentage des cellules phagocytaires est obtenu en déterminant le nombre relatif de cellules rendues fluorescentes après phagocytose des microsphères de latex émettant de la fluorescence verte suite à une excitation à 488 nm. L'efficacité des macrophages à phagocyter est également mesurée en calculant les pourcentages de différents marqueurs. Le premier marqueur (M2) représente les macrophages qui phagocytent 1 bille et plus, le deuxième marqueur (M3) représente ceux qui phagocytent 2 billes et plus et le troisième marqueur représente ceux qui phagocytent 3 billes et plus (Figure 5).

FIGURE 5. Diagramme représentant la phagocytose chez les macrophages H36.12J

La représentation graphique exprime la valeur logarithmique de l'intensité de fluorescence (en abscisse) en fonction du nombre relatif des cellules (en ordonnée). Les pics représentent le nombre de billes phagocytées par les macrophages, M2=1 bille et plus, M3=2 billes et plus et M4=3 billes et plus.



3. MESURE D'INDUCTION DE L'APOPTOSE ET OBSERVATION DU CYCLE CELLULAIRE

L'induction de l'apoptose est observée par cytofluorométrie. Les cellules H36.12J sont exposées au Be pour 72 heures. Un témoin positif souvent utilisé dans le test d'apoptose, le trybutylétain (TBT) (Sigma) et un témoin négatif, les cellules seules, sont ajoutés au test. Nous avons évalué quatre concentrations de Be : 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} M. Les cellules sont mises en plateau de 6 puits (Fisher) à une concentration de 2×10^4 cellules/2ml. Elles sont incubées à 37°C pour 72 heures avec le Be et le TBT. Par la suite, les cellules sont récoltées dans des tubes à cytofluorométrie de 5 ml (BD). Elles sont centrifugées à 300 x g pendant 5 minutes à la température de la pièce et lavées 2 fois au PBS (Gibco). Elles sont par la suite lavées une fois avec du tampon Krishan (0.1% sodium citrate (sigma), 0.3% IGEPAL (ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA) et 50 µg/ml d'iodure de propidium (PI) (Sigma Aldrich)). Le culot de cellules est resuspendu dans 400 µl de Krishan buffer contenant 3.2 µl de RNase A (Amersham Biosciences Corp., Baie d'Urfée, Québec, Canada) à une concentration de 10 mg/ml. Les cellules sont incubées 30 minutes à 37°C et lues au cytofluoromètre en FL2 à une longueur d'onde de 578 nm.

L'analyse au PI permet également d'analyser le cycle cellulaire des cellules et de déterminer quel pourcentage de cellules se retrouve en G0/G1, S et en G2/M selon les différents pics obtenus. Le TBT agit sur les cellules en activant les caspases et en induisant l'apoptose chez les cellules. C'est un inducteur classique de l'apoptose couramment utilisé.

4. LA FLAMBÉE OXYDATIVE

Lorsque la sonde 2,7 dichlorofluorescéine diacétate (DCFH-DA) (Sigma Aldrich) est ajoutée aux cellules produisant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), il y a transformation du DCFH-DA en dichlorofluorescéine (DCFH) dans le cytoplasme. La molécule DCFH

devient fluorescente en présence d' H_2O_2 . La fluorescence verte (525 nm) produite est mesurée au cytofluoromètre et est proportionnelle au niveau de production d' H_2O_2 .

Les cellules sont préalablement exposées au Be pour des durées de temps de 1 heure et de 72 heures. Elles sont par la suite ajustées à une concentration de 500 000 cellules /400 μl de PBS-glucose (1 g/L) (Sigma) dans des tubes de polystyrène de 5 ml (BD). Une solution stock de la sonde DCFH-DA est préparée dans de l'éthanol 100% (Les alcools de commerce Inc., Brampton, Ontario, Canada) à une concentration de 5 mM. Le témoin positif phorbol myristate acétate (PMA) (Sigma Aldrich) est préparé à une concentration stock de $1 \times 10^{-5}\text{M}$ dans du PBS. Au 400 μl de cellules, 0.5 μl de la sonde et 50 μl de PMA sont ajoutés. Une lecture au temps zéro est faite et par la suite des lectures sont faites aux 15 minutes pendant 1 heure afin d'évaluer le déplacement du pic et la production d' H_2O_2 .

5. PRODUCTION D'OXYDE D'AZOTE

Les cellules sont exposées au Be et au LPS comme à la section 4. Après l'exposition, les surnageants sont récoltés dans des eppendorfs (Sarstedt, St-Léonard, Québec, Canada) et congelés à -20°C si l'expérience n'est pas effectuée immédiatement. Les échantillons sont distribués dans une plaque de 96 puits à fond plat (Fisher Scientifique) à raison de 100 μl par puits. Les échantillons sont testés en triplicata. On évalue la libération de nitrite en ajoutant 100 μl de réactif de Greiss (10% d'acide phosphorique (H_3PO_4) (BDH), 85%, 10mg/ml de sulfanilamide (BDH), 1 mg/ml de naphthyléthylène diamine dihydrochlorure (NDD) (BDH) dans un volume final de 100 μl d'eau distillée). Un témoin négatif contenant uniquement du milieu est ajouté. Les surnageants sont incubés 10 minutes à température de la pièce puis lu à 540 nm par un lecteur de plaque ELISA (Fisher Scientifique). Le NO_2^- libéré réagit avec le réactif de Greiss en formant un chromophore qui absorbe à 543 nm (Green et al, 1982).

Les concentrations de nitrite contenues dans les échantillons sont calculées en fonction de la courbe standard de NaNO_2 (Sigma Aldrich) obtenue avec des dilutions variant entre 1,6 μM et 200 μM .

6. PHÉNOTYPAGE AVEC LES ANTICORPS CD11b ET CD68

Le CD11b est utilisé comme marqueur lors d'une réponse inflammatoire. Il est surtout exprimé chez les macrophages, les cellules NK et les cellules myéloïdes. Sa principale fonction est de réguler la migration des macrophages et il est également impliqué dans l'adhésion de ceux-ci. L'expression du CD68 se fait principalement à l'intérieur du cytoplasme des cellules mais peut être décelée en plus faible quantité aussi à la surface des cellules. Il est retrouvé chez les macrophages, les neutrophiles, les basophiles et les cellules NK. Sa fonction est encore méconnue mais Ramprasad et son équipe (1996) ont suggéré qu'il pourrait avoir une fonction lors de la prise en charge et lors de la présentation de l'antigène aux cellules. Aussi le CD68 serait une composante de la membrane lysosomale et pourrait protéger celle-ci contre les attaques des enzymes hydrolytiques.

Les cellules sont exposées au Be tel que décrit à la section 4. Elles sont par la suite lavées deux fois avec du PBS sans Ca ni Mg (Gibco) additionné de 1% de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco) et de 0.2% d'azide de sodium (PBS complet) (Sigma Aldrich). La concentration cellulaire est ajustée à 500 000 cellules/ml. Deux témoins isotypiques sont ajoutés dépendant de l'isotype des anticorps et un témoin négatif contenant les cellules seules. Les anticorps CD11b et CD68 (BioCarta, San Diego, CA, USA) sont ajoutés suivant les concentrations suggérées par le manufacturier. Les cellules sont incubées 30 minutes avec les anticorps à la température de la pièce.

Les cellules marquées au CD68 doivent préalablement être perméabilisées pour permettre le marquage. La perméabilisation est effectuée au moyen d'une solution de perméabilisation (BD) diluée 10 fois. Les cellules sont par la suite incubées 10 minutes à la température de la pièce.

Suite au marquage, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS complet par centrifugation à 400 x g pendant 5 minutes à la température de la pièce et le culot resuspendu dans 400 µl de formaline 0.5% (BDH). Les lectures sont par la suite effectuées au FASCsan (BD) afin d'évaluer les pourcentages de cellules positives pour chacun des marqueurs à leur surface.

7. DOSAGE DE LA PRODUCTION D'IL-1 β , D'IL-6 ET DE TNF- α PAR ELISA

Le dosage de l'IL-1 β , IL-6 et le TNF- α est effectué par ELISA avec les kits OptEIA™ (BD). Les cellules sont préalablement traitées avec le Be (Sigma Aldrich) et le LPS de *E. coli* 0127 :B8 (Sigma Aldrich) pour 18 heures. Le surnageant est par la suite récolté et congelé à -80°C jusqu'au jour de l'expérience. La journée avant le test ELISA, les plaques sont adsorbées avec 100 µl d'anticorps monoclonal de capture dans un tampon phosphate 0.2M, pH 6.5 (11,8 g Na₂HPO₄, 16.1 g NaH₂PO₄ compléter à 1L) (Sigma Aldrich) ou d'un tampon carbonate 0.1M, pH 9.5 (8.40 g NaHCO₃, 3.56 g Na₂CO₃, compléter à 1L) (Sigma Aldrich) selon les cytokines, pour une période de 18 heures à 4 °C. Les puits sont par la suite vidés et lavés 3 fois avec une solution de lavage (PBS (Gibco), 0.05% tween-20 (Sigma Aldrich)) et bloqués avec 200 µl du diluent du test « Assay diluent » (BD) et incubé à la température de la pièce pour 1 heure. Les plaques sont à nouveau lavées 3 fois avec la solution de lavage. Les standards et les échantillons sont déposés dans les puits à raison de 100 µl/puits et incubés à la température de la pièce pour 2 heures. Les puits sont à nouveau lavés 5 fois avec la solution de lavage. Pour l'IL-1 β , 100 µl de l'anticorps de détection (anticorps monoclonal biotinylé) (BD) est ajouté et incubé 1 heure à la température de la pièce. Par la suite, 5 lavages sont effectués avant d'ajouter 100 µl de l'enzyme de réaction (peroxidase conjugué à l'avidine) (BD). Les plaques sont incubées 30 minutes à la température de la pièce. Pour ce qui est de l'IL-6 et du TNF- α , le "détecteur de travail" « working detector » (anticorps de détection+solution d'avidine-HRP) est ajouté à raison de 100 µl par puits et incubé une heure à la température de la pièce (BD). La suite est semblable pour toutes les cytokines. Après l'incubation, sept lavages sont effectués avec du PBS tween 0,5% et un volume de

100 μ l de la solution de substrat (TMB) (BD) est ajouté aux puits. Les plaques sont incubées 30 minutes dans le noir à la température de la pièce. Nous ajoutons 50 μ l de solution d'arrêt (2 N H₂SO₄) (BD). Les plaques sont par la suite lues avec un lecteur de plaque ELISA à une longueur d'onde de 450 nm dans les 30 minutes qui suivent.

8. TEST STATISTIQUE

Les résultats ont été analysés par un ANOVA à un facteur. Il s'agit d'un test paramétrique qui exige que les populations soient distribuées normalement et que les variances soient égales. Pour la normalité, le test Kolmogorov-Smirnov a été utilisé et pour l'équivariance, une évaluation de la variabilité autour des moyennes a été faite. Avec l'ANOVA, l'hypothèse nulle est qu'il n'y a pas de différences entre les populations dans lesquels nous avons obtenu les échantillons.

Lorsque des différences significatives étaient obtenues, le test de Dunnett a été utilisé afin d'identifier le ou les groupes statistiquement différents. Nous avons opté pour ce test puisqu'il permet de comparer plusieurs groupes à un groupe témoin. En tout temps nous avons utilisé une valeur de $P \leq 0.05$. Le programme SigmaStats, version 2.0, a été utilisé pour le traitement statistique.

RÉSULTATS

1. PHAGOCYTOSE CHEZ LES MACROPHAGES H36.12J

La phagocytose des billes fluorescentes par les macrophages H36.12J a été effectuée après une exposition au Be (concentrations 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M) d'une durée de 2 heures, 6 heures et de 72 heures. Les cellules sont par la suite déposées sur un gradient d'albumine de sérum de bovin (BSA) afin d'éliminer les billes non phagocytées. Les lectures sont faites au cytofluoromètre en FL1. Les macrophages ont une grande facilité à phagocyter les billes de latex fluorescentes (Figure 6). Nous avons compilé les résultats en regardant le nombre total de billes phagocytées (1 billes et plus) et l'efficacité de la phagocytose chez les macrophages H36.12J (3 billes et plus). Nous avons utilisé l'azide de sodium (NaN_3) (Sigma) comme témoin négatif qui diminue la capacité des cellules de macrophages H36.12J à phagocyter les billes en bloquant le cytosquelette. Préalablement, une courbe dose-réponse a été effectuée avec le NaN_3 afin d'évaluer la meilleure concentration pour effectuer les tests avec les billes fluorescentes. Comme témoin négatif, nous avons mis en contact les cellules H36.12J avec les billes de latex fluorescentes seulement.

Après 2 heures de contact avec les billes, 91% des cellules, maintenues dans un milieu sans Be, ont phagocyté 1 bille et plus et 71 % ont phagocyté 3 billes et plus. Pour les cellules mises en présence d'azide, seulement 36% des cellules ont phagocyté 1 bille et plus et 7 % ont phagocyté 3 billes et plus (Tableau 1).

Les résultats après l'exposition au Be sont présentés à la Figure 7. Nous présentons les résultats moyens obtenus lors de deux expériences. Après 2 heures d'exposition au Be, la capacité des macrophages à phagocyter les billes n'a pas été modifiée d'une manière significative. Suite à une exposition de 6 heures au Be, nous obtenons une diminution significative ($p \leq 0,05$) de la phagocytose de 1 et 3 billes de latex et ce à une concentration de 10^{-4} M. Après 72 heures d'exposition au Be, nous n'avons observé aucune modulation

de la phagocytose aux concentrations de 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} M, pour ce qui est de la concentration 10^{-4} M, aucune lecture n'a pu être obtenue car le graphique de dispersion de points ne nous permettait pas d'obtenir une population homogène.

FIGURE 6. Phagocytose de billes de latex fluorescentes par les H36.12J

Les cellules phagocytaires ont la capacité de capter des antigènes. Les antigènes sont alors englobés dans un phagosome formé par les pseudopodes du phagocyte. Une fois à l'intérieur, le phagosome fusionne avec les lysosomes pour former un phagolysosome. L'agent étranger est alors détruit. Lors de la phagocytose, il y a réexpression des antigènes à la surface des cellules.

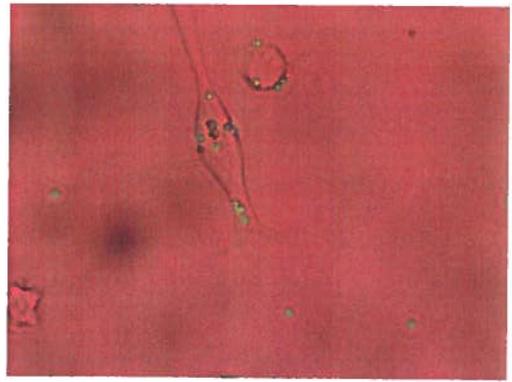
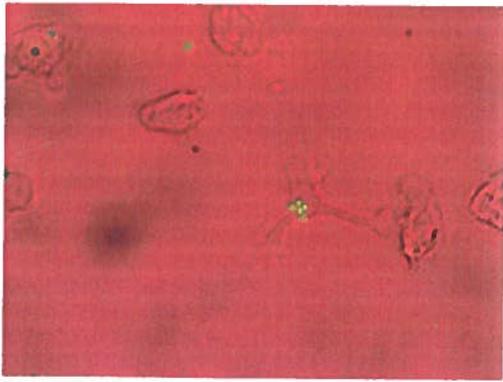
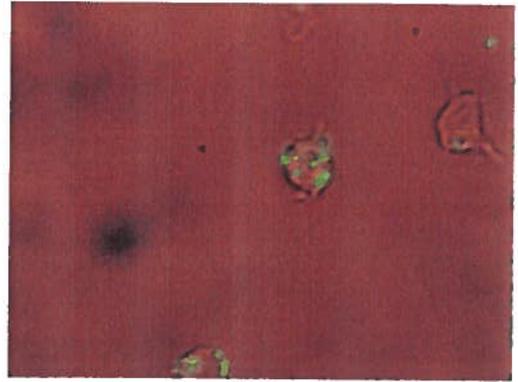
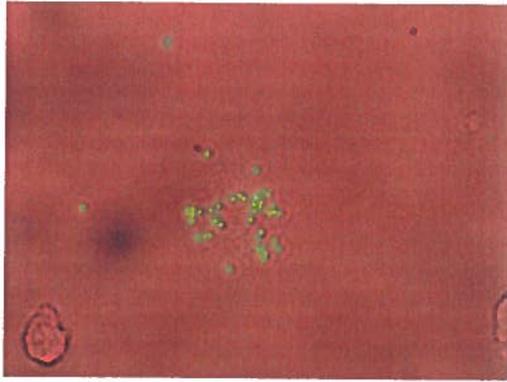


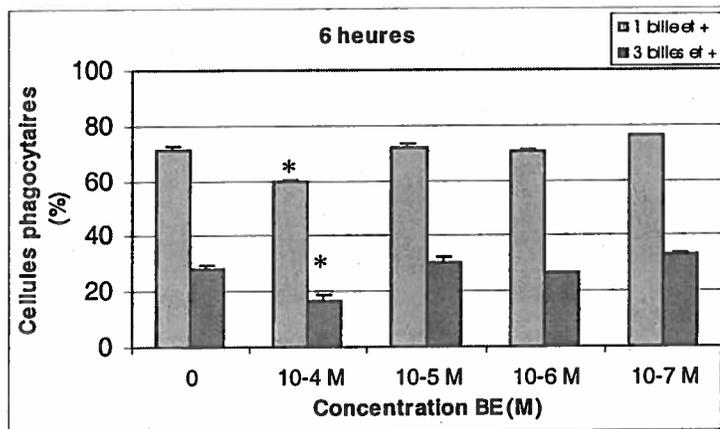
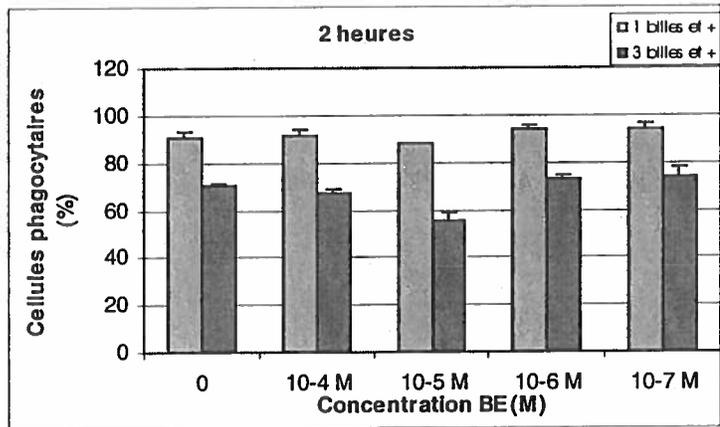
TABLEAU 1. Effet du NaN₃ sur la phagocytose de billes fluorescentes par les H36.12J après 2 heures d'exposition.

Temps d'exposition	Conditions	1 Bille et + (%)	3 Billes et + (%)
2 heures	Ctl +	94.20 ± 1.3	73.77 ± 5.3
	0.1% NaN ₃	39.80 ± 16.6	9.34 ± 7.5
	0.2% NaN ₃	52.39 ± 1.8	16.12 ± 2.3
	0.4% NaN ₃	53.83 ± 13.5	18.97 ± 10.1
	0.8% NaN ₃	50.87 ± 3.2	18.67 ± 4.9
	1.6% NaN ₃	26.11 ± 1.2	7.03 ± 0.3
	2.0% NaN ₃	25.94 ± 2.0	4.32 ± 0.0

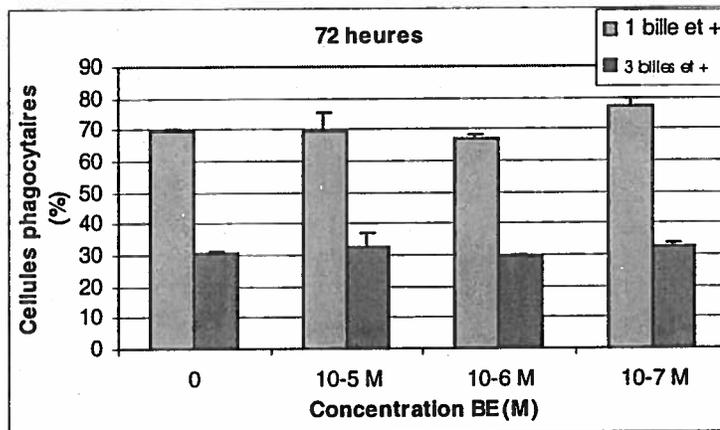
Légende : Les cellules H36.12J ont été incubées dans un milieu sans Be et en présence d'une concentration croissante d'azide de sodium afin de sélectionner la concentration optimale. La concentration de 2.0% a été choisie puisqu'à cette concentration la phagocytose a été inhibée à plus de 70% tout en conservant une viabilité acceptable (n=3).

FIGURE 7. Phagocytose chez les H36.12J après exposition au Be

La phagocytose a été évaluée chez les cellules H36.12J après 2, 6 et 72 heures d'exposition au Be et aux concentrations 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} M. Les valeurs représentées par colonne illustrent la moyenne du duplicata. Les écarts-type apparaissent pour chaque colonne. Les valeurs significatives ($p \leq 0.05$) sont représentées par un symbole (*) au dessus des colonnes.



$p \leq 0.05$



2. MESURE D'INDUCTION DE L'APOPTOSE ET OBSERVATION DU CYCLE CELLULAIRE

L'apoptose et le cycle cellulaire ont été étudiés selon la méthode utilisant le Krishan Buffer. Ce tampon contenant du PI, nous permet de distinguer les cellules apoptotiques des cellules viables. La figure 8 est une représentation typique de ces deux conditions. Les marqueurs M1 à M7 représentent respectivement : les débris cellulaires (M1), les cellules apoptotiques (M2), la phase G0/G1 (réplication de l'ADN) (M3), la phase S (réplication du matériel génétique) (M4), les cellules en G2/M (mitose et division cellulaire) (M5) et la cytotoxicité en M6 et M7.

Nous avons utilisé comme témoin positif le TBT (tributylétain). Le TBT agit sur les cellules en activant les caspases et en induisant l'apoptose chez les cellules. C'est un agent apoptotique couramment utilisé. Comme témoin négatif, nous avons fait le test avec le Krishan Buffer sur des cellules H36.12J non exposées au Be.

L'expérience sur l'apoptose des cellules H36.12J a été effectuée en duplicata. L'analyse des résultats pour la première expérience a permis d'observer que 5.18% ($\pm 2.0\%$) des cellules étaient en apoptose à la concentration 10^{-4} M de Be comparativement à 0.93% ($\pm 0.2\%$) pour le témoin négatif. Les résultats de la deuxième expérience, nous ont permis de confirmer l'augmentation significative de l'apoptose à une concentration de 10^{-4} M de Be. En effet, le test a permis d'évaluer que 2.98% ($\pm 0.2\%$) des cellules sont en apoptose après 72 heures d'exposition par rapport au témoin négatif qui est de 0.44% ($\pm 0.2\%$). Les résultats obtenus pour les autres concentrations ne démontrent pas d'augmentation significative du nombre de cellules en apoptose (Figure 9).

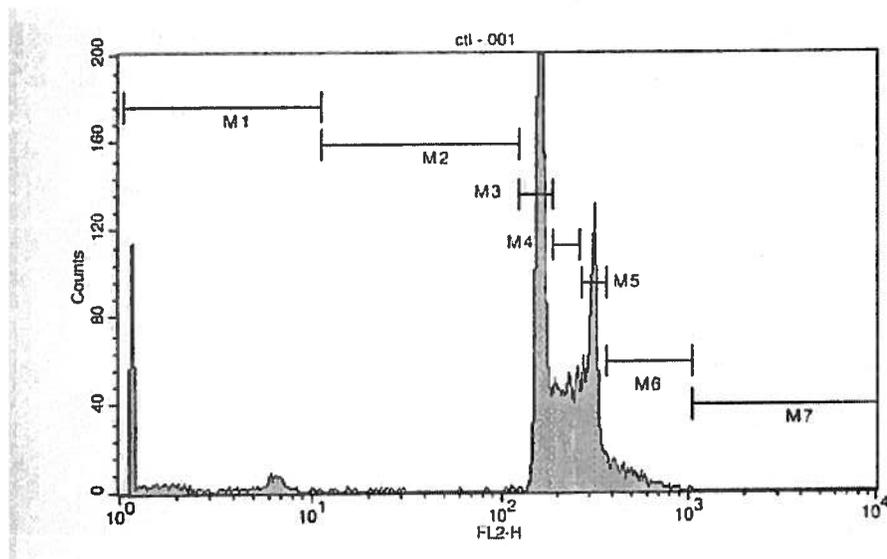
En ce qui concerne le cycle cellulaire, les résultats sont présentés à la figure 10. Le pourcentage de cellules dans la phase G0/G1, qui représente la réplication de l'ADN, est diminué de façon significative ($p \leq 0,05$) pour la concentration de 10^{-4} M de Be. Nous remarquons également une diminution significative du pourcentage de cellules dans la phase S pour les concentrations 10^{-4} et 10^{-5} M. Finalement la phase G2/M est affectée par

une augmentation significative du pourcentage de cellules en mitose et en division à une concentration de 10^{-4} M de Be .

FIGURE 8. Cytofluorogramme de l'apoptose et du cycle cellulaire des H36.12J

La représentation graphique exprime la valeur logarithmique de l'intensité de fluorescence (en abscisse) en fonction du nombre relatif de cellules (en ordonnée). M1 représente les débris cellulaires, M2 représente les cellules en apoptose, le premier pic (M3) représente le pourcentage de cellules en G0/G1 (réplication de l'ADN), le premier creux (M4) représente la phase S (réplication du matériel génétique) et le deuxième pic (M5) représente les cellules en G2/M (mitose et division cellulaire). M6 et M7 représentent la cytotoxicité. (a) : correspond au témoin négatif (cellules seules) et (b) correspond au témoin positif (cellules avec TBT à la concentration 0.8mM).

(a)



(b)

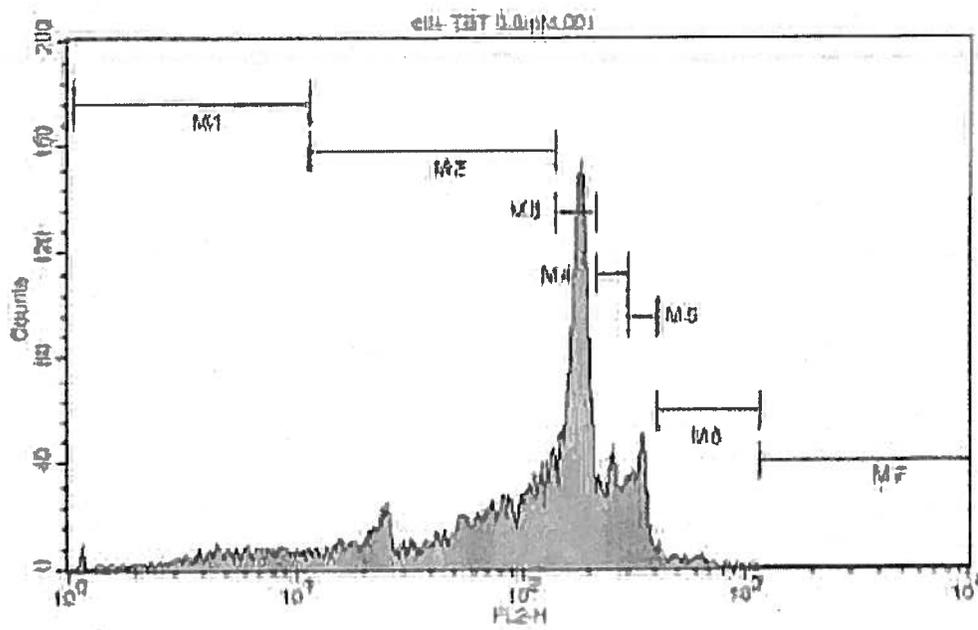
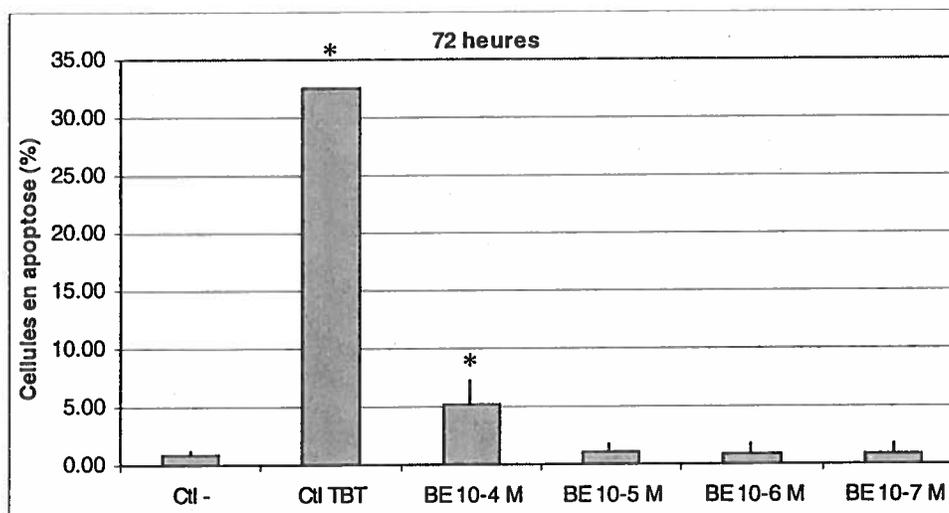


FIGURE 9. Apoptose chez les H36.12J après 72 heures d'exposition au Be

L'apoptose a été évaluée chez les cellules H36.12J après 72 heures d'exposition au Be aux concentrations 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} M. Les valeurs représentées par colonne illustrent la moyenne d'un duplicata. Les écarts-type apparaissent pour chaque colonne. Les deux expériences sont représentées indépendamment dans deux graphiques a = expérience 1 et b = expérience 2. Les différences entre les pourcentages des deux expériences peuvent être dues au fait que les cellules perdent de leurs propriétés lorsqu'elles sont maintenues longtemps en culture. Elles peuvent également être moins sensibles et perdre des récepteurs à leur surface. Il y a eu 16 jours entre les deux expériences. Les H36.12J ont un temps de division de 18 heures. Les valeurs significatives ($p \leq 0.05$) sont représentées par le symbole (*).

(a)

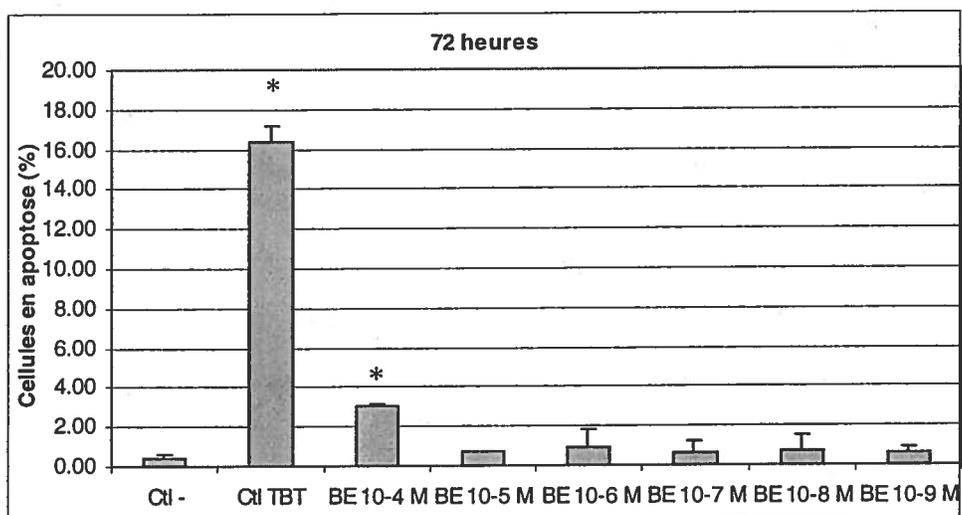
Expérience 1 :



* $p \leq 0.05$

(b)

Expérience 2 :



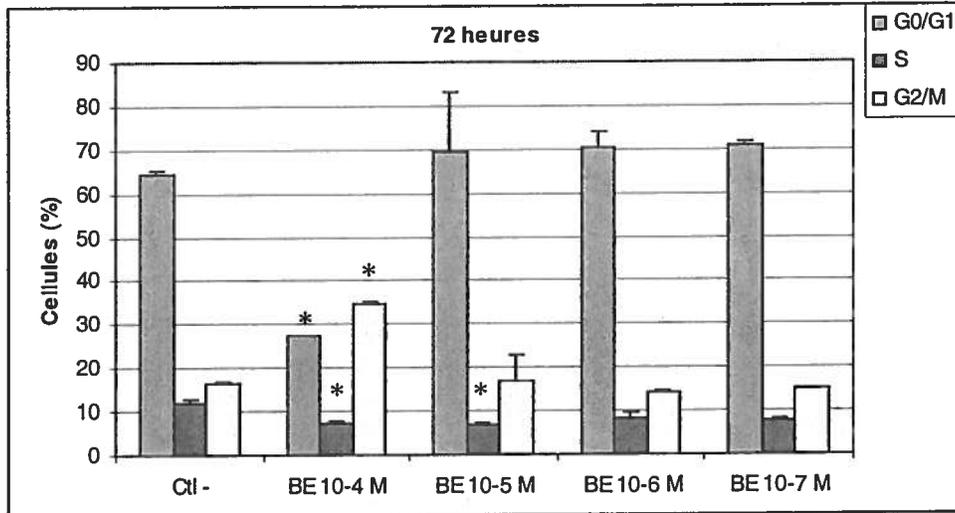
* $p \leq 0.05$

FIGURE 10. Cycle cellulaire chez les H36.12J après 72 heures d'exposition au Be.

Le cycle cellulaire chez les H36.12J a été évalué après 72 heures d'exposition au Be aux concentrations 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} M. Les pourcentages de cellules ont été obtenus en regardant les différents pics du cycle cellulaire (Figure 8). Les valeurs représentées par colonne illustrent la moyenne d'un duplicata. Les écarts-type apparaissent pour chaque colonnes. Les deux expériences sont représentées indépendamment dans deux graphiques a = expérience 1 et b = expérience 2. . Les valeurs significatives ($p \leq 0.05$) sont représentées par le symbole (*).

(a)

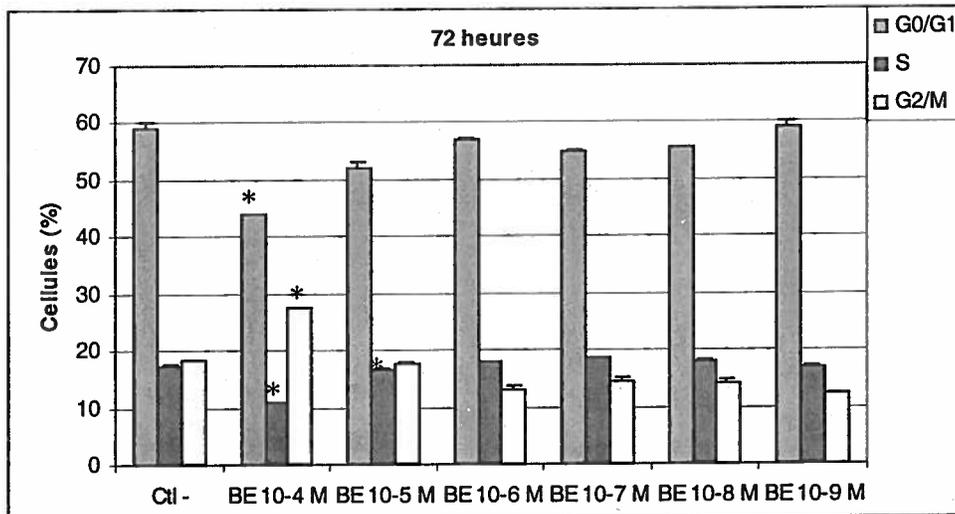
Expérience 1 :



* $p \leq 0.05$

(b)

Expérience 2 :



* $p \leq 0.05$

3. PRODUCTION DE PEROXYDE D'HYDROGÈNE

L'évolution dans le temps du pic de fluorescence démontre bien l'augmentation de l'intensité de fluorescence des cellules H36.12J après une exposition à la PMA. Cette augmentation de fluorescence se traduit par une plus grande production d'H₂O₂ qui se traduit par le déplacement du pic vers la droite (Figure 11). Les cellules ont été exposées au Be 1, 24 et 72 heures. Par la suite la sonde DCFH-DA a été ajoutée. Nous avons procédé à quatre lectures de l'intensité de fluorescence au cytofluoromètre sur une période d'une heure : temps 0, 20, 40 et 60 minutes après l'ajout de la sonde et du PMA. Nous avons utilisé la PMA comme témoin positif. Elle est reconnue pour induire la flambée oxydative. Pour le témoin PMA, nous avons observé une augmentation de 348% après 1 heure d'exposition. Comme témoin négatif, nous avons fait des lectures avec des cellules en présence de la sonde uniquement et des lectures avec les cellules H36.12J uniquement. Les lectures ont été faites une seule fois et l'expérience a été effectuée deux fois afin de confirmer les résultats obtenus lors de la première expérience.

La production de H₂O₂, indicateur de la flambée oxydative, a été évalué sur les cellules H36.12J en présence et en absence de la PMA et du Be. Les résultats sont présentés à la figure 12. Après une heure d'exposition au Be, nous ne retrouvons aucune augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène par les H36.12J en comparaison avec le témoin négatif ne contenant que la sonde. Une exposition au Be de 24 heures démontre une production de peroxyde d'hydrogène de l'ordre du PMA soit de 420% pour la concentration la plus élevée de Be, le PMA a été incubé seulement 1 heure avec les cellules. Et finalement, après 72 heures d'exposition, nous obtenons une très grande production d'H₂O₂ suite à l'exposition des H36.12J au Be. La production de peroxyde d'hydrogène est augmentée de l'ordre de 716%, 311% 281% et 273% pour les concentrations en Be de 10⁻⁴ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M et 10⁻⁷ M respectivement. La production de peroxyde d'hydrogène est exprimée en nombre de canaux moyens.

FIGURE 11. Cytofluorogramme de la production de peroxyde d'hydrogène par les H36.12J.

La représentation graphique exprime la valeur logarithmique de l'intensité de fluorescence (en abscisse) en fonction du nombre relatif des cellules (en ordonnée). Le déplacement dans le temps (0 =M1, 20=M2, 40=M3, 60=M4 minutes) des différents pics représente l'augmentation de l'intensité de fluorescence et donc l'augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène. Le graphique représente la production d'H₂O₂ par les cellules H36.12J suite à une exposition d'une heure à la PMA.

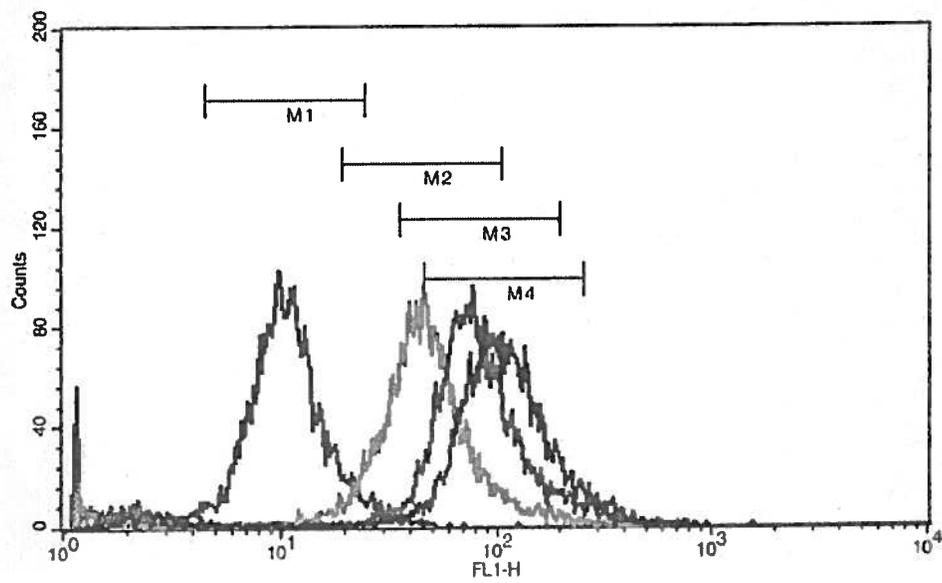
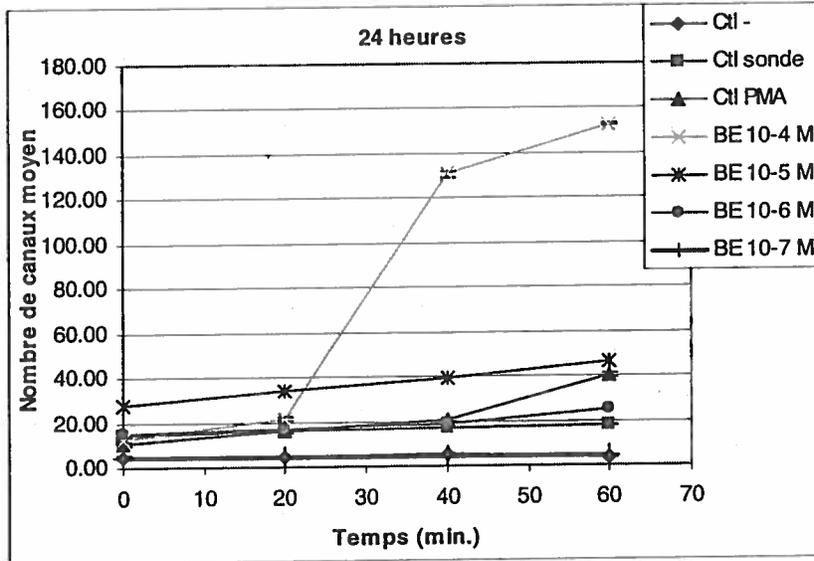


FIGURE 12. Flambée oxydative chez les H36.12J après 24 et 72 heures d'exposition au Be.

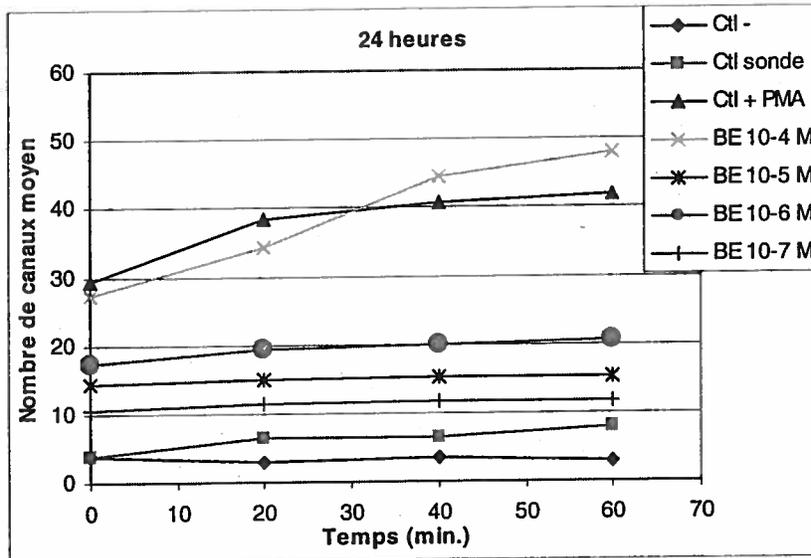
La quantité de fluorescence est exprimée en nombre de canaux moyens. Les cellules H36.12J ont préalablement été exposées au Be pour une durée de temps de 24 et 72 heures avant l'ajout de la sonde. Des lectures ont été effectuées par la suite aux temps 0, 20, 40 et 60 minutes après l'ajout de la sonde et de la PMA. Les lectures ont été effectuées une seule fois et l'expérience répétée deux fois. Les figures (a) représentent les résultats après 24 heures d'exposition (2 expériences) et (b) les résultats après 72 heures (2 expériences).

(a)

Expérience 1

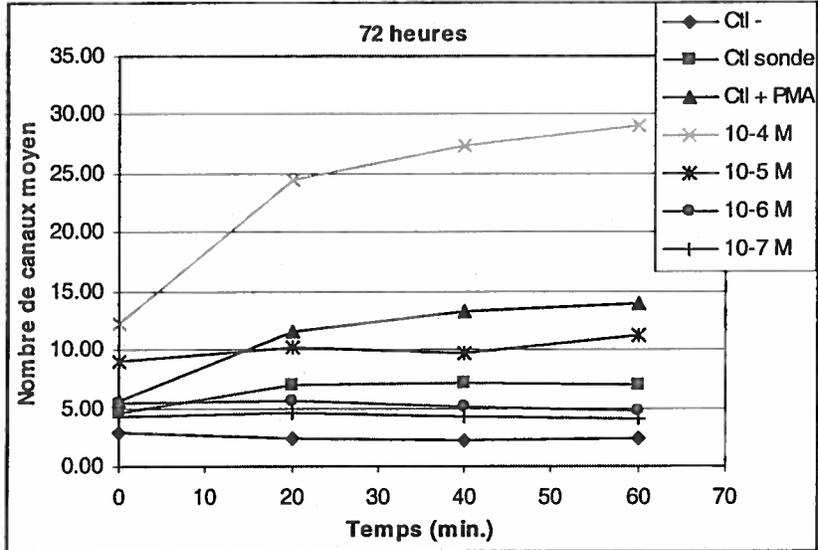


Expérience 2

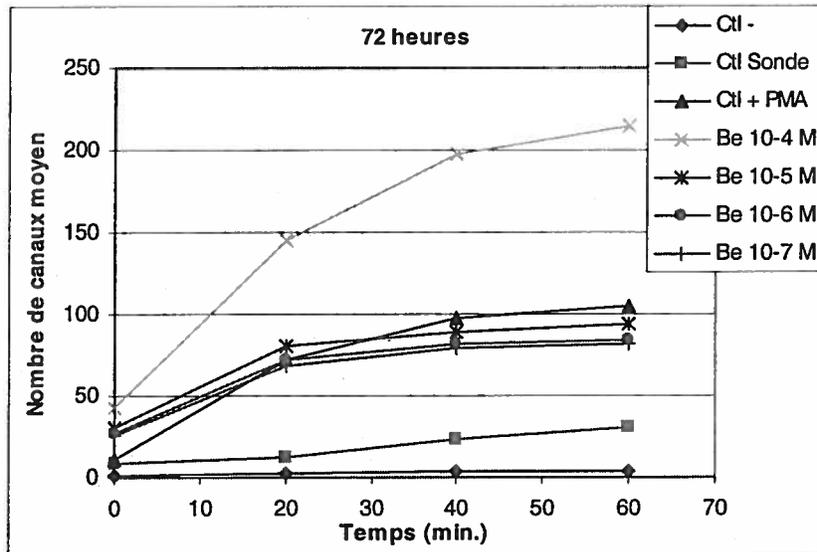


(b)

Expérience 1



Expérience 2



4. PRODUCTION D'OXYDE D'AZOTE

Les cellules H36.12J et Raw 264.7 ont été exposées au Be et au LPS (*E. coli* 0127) pour une durée de 1 et 72 heures. Les surnageants ont été récupérés et congelés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ puisque l'expérience n'a pas été effectuée immédiatement. L'évaluation de la libération d'oxyde d'azote a été effectuée en ajoutant le réactif de Greiss, ce réactif réagit en formant un chromophore qui absorbe à 453 nm. Les expériences ont été faites en triplicata et répétée deux fois. Une courbe standard de NaNO_2 a été effectuée aux concentrations variant entre $200\text{ }\mu\text{M}$ et $1.6\text{ }\mu\text{M}$ afin d'évaluer les concentrations d'oxyde d'azote contenues dans nos échantillons. Un témoin négatif contenant uniquement du milieu a été ajouté ainsi qu'un témoin positif avec LPS. Le LPS est reconnu pour induire la production de NO_2^- chez les macrophages Raw 264.7.

Nous n'avons mesuré aucune trace du dérivé du NO, le NO_2^- dans les surnageants des cellules H36.12J et Raw 264.7 en présence de Be. Par contre nous avons obtenu une faible production de NO_2^- en présence de LPS. Les résultats sont présentés dans le tableau 2. Les résultats positifs obtenus avec le témoin LPS démontrent que notre technique a bien fonctionné.

TABLEAU 2. Effet du Be et du LPS sur la production de NO₂⁻ par les cellules H36.12J et Raw 264.7 après 72 heures d'exposition.

Raw 264.7	
Concentration (X10 ⁻⁶ M)	
Ctl -	* -0.25
Ctl LPS	6.19
H36.12J	
Concentration (X10 ⁻⁶ M)	
Ctl -	* -0.51
Ctl LPS	2.75
Be 10 ⁻⁴ M	* -2.14
Be 10 ⁻⁵ M	* -0.55
Be 10 ⁻⁶ M	* -6.4
Be 10 ⁻⁷ M	* -6.55

Légende : * valeurs sous les valeurs de la courbe standard de NO₂⁻
 Les cellules ont été incubées 72 heures avec le Be et le LPS (*E. coli* 0127).
 L'évaluation de la libération de nitrite a été effectuée en ajoutant le réactif de Greiss, ce réactif réagit en formant un chromophore qui absorbe à 453 nm. Les expériences ont été faites en triplicata et répétée deux fois.

5. PHÉNOTYPAGE DES MARQUEURS CD11b ET CD68

Le phénotypage a été effectué sur les H36.12J après 1 heure et 72 heures d'exposition au Be et aux concentrations 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} M. La concentration cellulaire est ajustée à 500 000 cellules/ml et les anticorps CD11b et CD68 sont ajoutés suivant les concentrations suggérées par le manufacturier. Le CD68 est principalement exprimé à l'intérieur des cellules, nous avons donc préalablement perméabilisé celles-ci. Les cellules sont incubées 30 minutes avec les anticorps et des lavages sont effectués avant les lectures au cytofluoromètre. Deux témoins isotypiques ont été ajoutés en fonction des isotypes des anticorps utilisés et un témoin négatif contenant des cellules seules à également été ajouté.

Les résultats après 1 heure d'exposition ne démontre aucun changement significatif dans l'expression du marqueur CD11b et dans la quantité de récepteurs sur les cellules (intensité de fluorescence). Nous remarquons une diminution significative de la quantité du récepteur CD68 à une concentration de 10^{-4} M; 13% des cellules exprimant le récepteur par rapport à 16% pour le témoin ($p \leq 0.05$). Aussi, aux concentrations 10^{-6} M et 10^{-7} M, nous obtenons une augmentation significative ($p \leq 0.05$) passant de 23% et 20% respectivement par rapport au témoin qui est de 16% des cellules positives. Les résultats sont présentés à la figure 13.

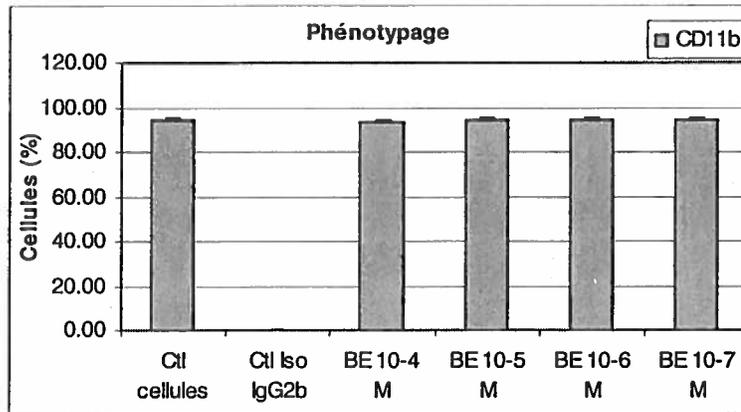
Après 72 heures d'exposition, nous n'avons retrouvé aucun changement significatif dans l'expression du récepteur CD11b et dans la quantité de récepteurs à la surface des cellules. Les cellules exposées au Be expriment beaucoup plus de CD68 à la concentration 10^{-4} M: 63% des cellules expriment le CD68 par rapport à 41% pour les cellules témoins (résultats significatifs: $p \leq 0.05$). Nous avons effectué une deuxième expérience afin de confirmer les résultats obtenus lors de la première: 63% des cellules expriment le CD68 par rapport à 11% pour les cellules témoins (résultats significatifs: $p \leq 0.05$). Aux autres concentrations, nous ne retrouvons pas de changements significatifs. Les résultats sont présentés à la figure 14.

L'intensité de fluorescence, qui représente la quantité de récepteurs CD68 chez les cellules, est augmentée significativement ($p \leq 0.05$) lors d'une exposition au Be aux concentrations 10^{-4} et 10^{-5} M : 94% et 60% des cellules ont davantage de CD68 comparativement à 47% pour le témoin. Nous avons confirmé ces résultats par une deuxième expérience qui nous a donné également une augmentation significative ($p \leq 0.05$) de l'expression de CD68 par les cellules : 62% à la concentration 10^{-4} M et 32% à la concentration 10^{-5} M par rapports à 28% pour le groupe témoin (Figure 14). La quantité des récepteurs CD11b à la surface des cellules n'a démontré aucune variation significative.

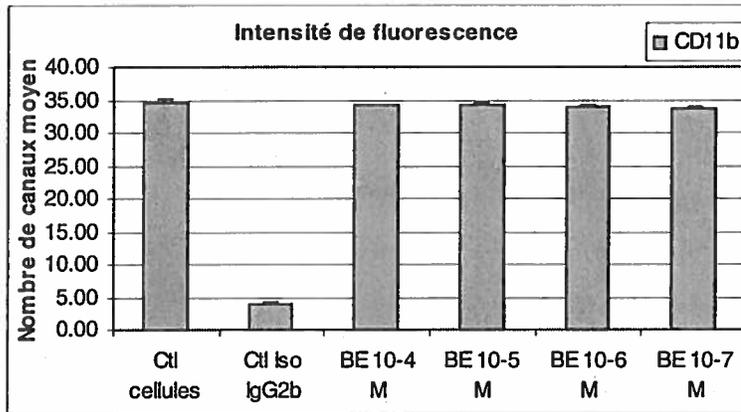
FIGURE 13. Effet du Be sur l'expression des récepteurs CD11b et CD68 par les cellules H36.12J après une heure d'exposition.

Les cellules H36.12J ont préalablement été exposées au Be pour une durée d'une heure avant le marquage avec les anticorps. Deux témoins isotypiques correspondant aux isotypes des deux anticorps ont été ajoutés au test afin d'éliminer les réactions non spécifiques. Le phénotypage représente le pourcentage de cellules exprimant les marqueurs CD11b et CD68 (Figure (a) et (c)). L'intensité de fluorescence est exprimée en nombre de canaux moyens (axe des y) et donne des proportions sur les quantités de récepteurs retrouvés chez les cellules (Figure (b) et (d)). L'expérience a été effectuée en duplicata et les moyennes des résultats sont présentées dans les graphiques. Les écarts-type apparaissent pour chaque colonne.

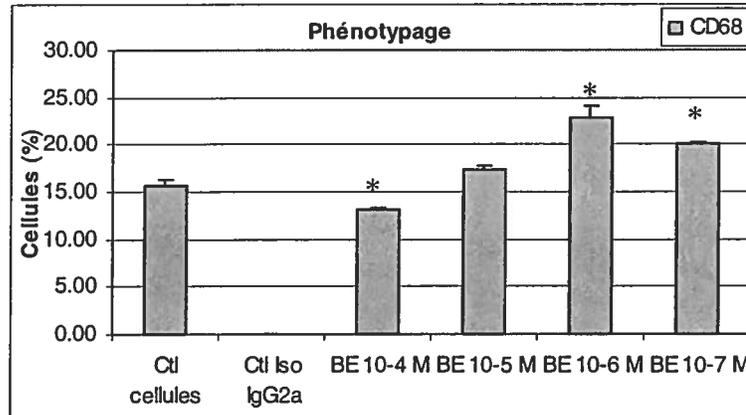
(a)



(b)



(c)



$p \leq 0.05$

(d)

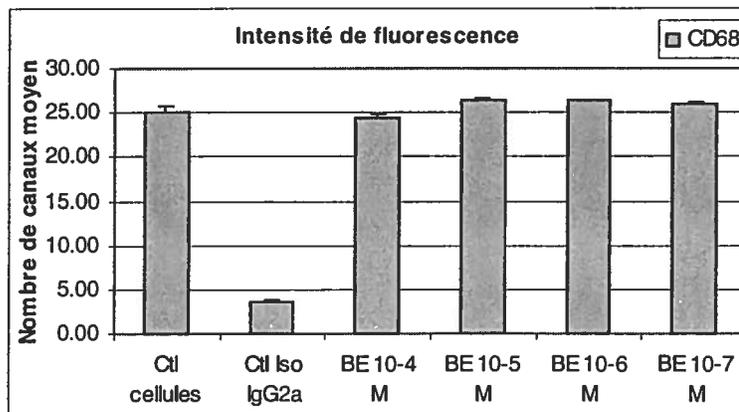
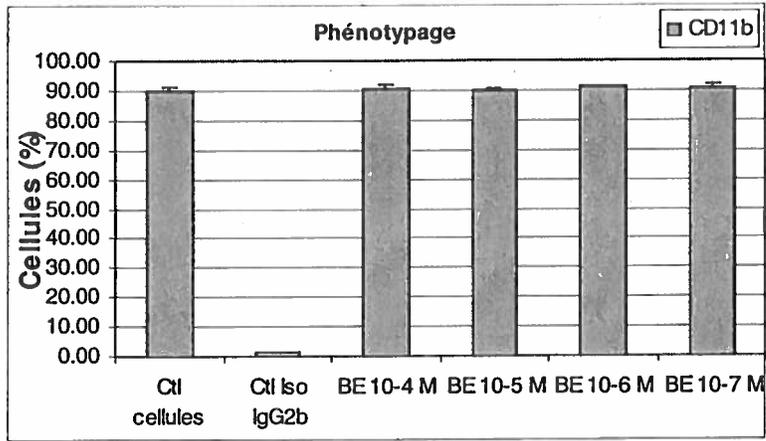


FIGURE 14. Effet du Be sur l'expression des récepteurs CD11b et CD68 chez les cellules H36.12J après 72 heures d'exposition.

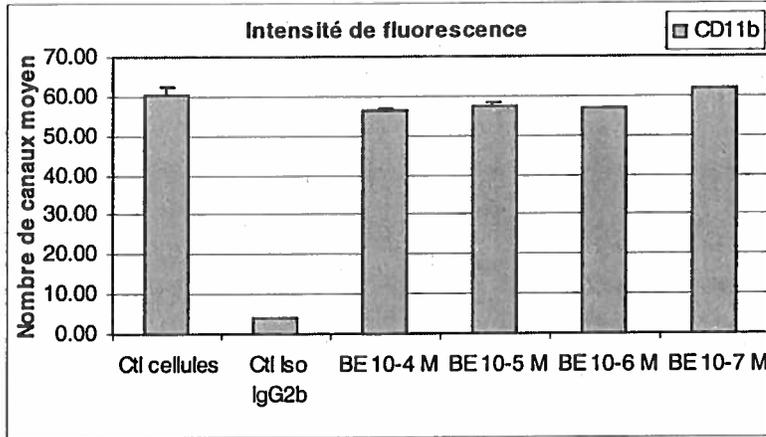
Les cellules H36.12J ont préalablement été exposées au Be pour une durée de 72 heures avant le marquage avec les anticorps. Deux témoins isotypiques correspondant aux isotypes des deux anticorps ont été ajoutés au test afin d'éliminer les réactions non spécifiques. Le phénotypage représente le pourcentage de cellules exprimant les récepteurs CD11b et CD68 (Figure (a) et (c)). L'intensité de fluorescence est exprimée en nombre de canaux moyens (axe des y) et donne des proportions sur les quantités de récepteurs retrouvés chez les cellules (Figure (b) et (d)). L'expérience a été effectuée en duplicata et les moyennes des résultats sont présentées dans les graphiques. Les écarts-types apparaissent pour chaque colonne. L'expérience a été effectuée deux fois afin de confirmer les résultats.

Expérience 1

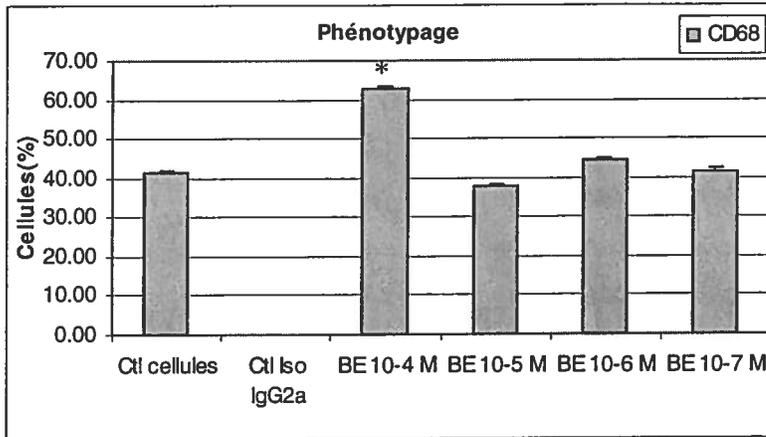
(a)



(b)



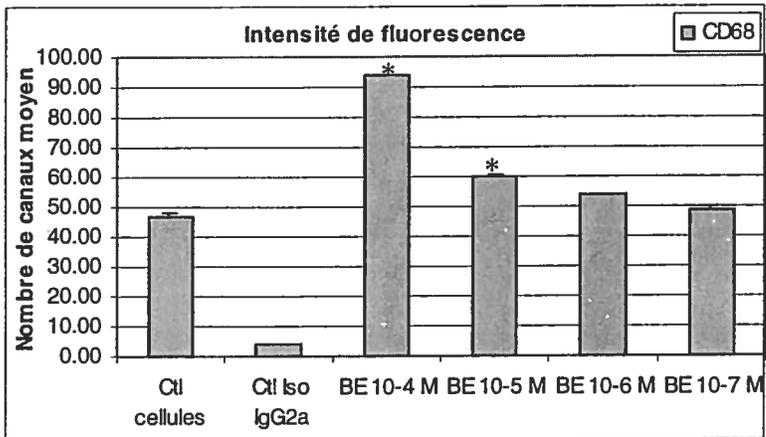
(c)



* $p \leq 0.05$

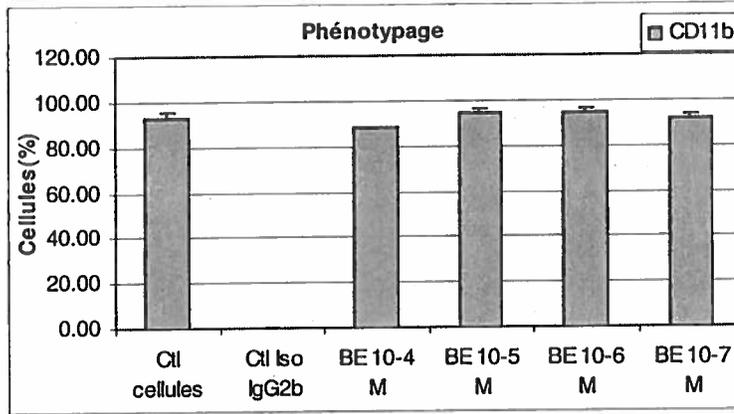
(d)

* $p \leq 0.05$

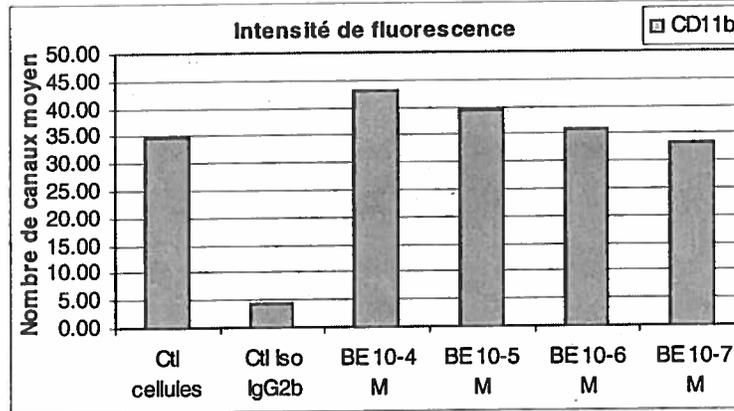


Expérience 2

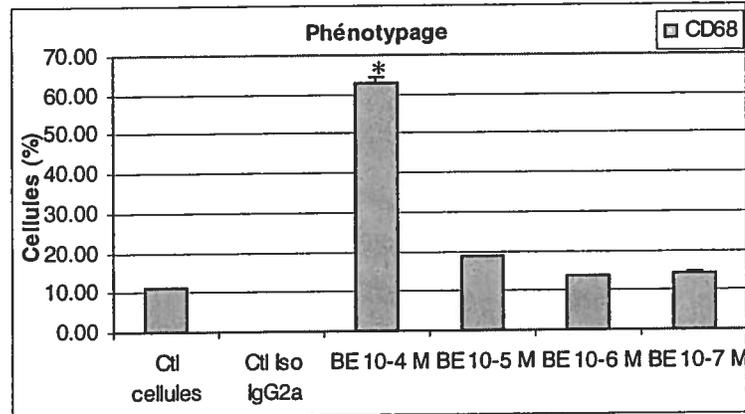
(a)



(b)



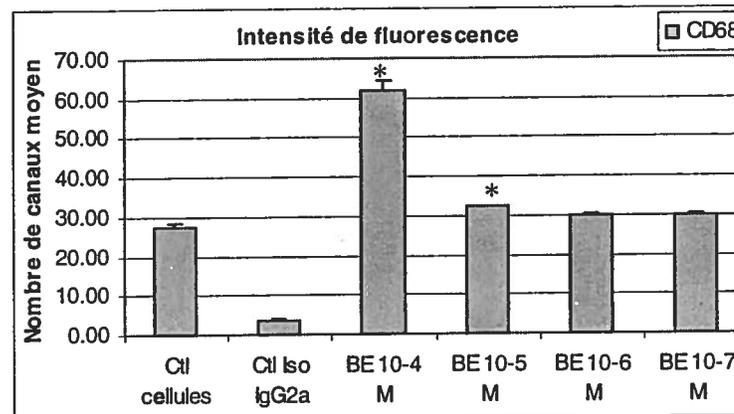
(c)



* $p \leq 0.05$

(d)

* $p \leq 0.05$



6. DOSAGE DE LA PRODUCTION D'IL-1 β , D'IL-6 ET DE TNF- α PAR ELISA

Le dosage de la production de cytokines par ELISA a été effectué sur les surnageants des cellules H36.12J suite à une exposition au Be et au LPS de 18 heures. Il y a deux cytokines qui ont été testées sur les surnageants de cultures des Raw 264.7 et des H36.12J : IL-6 et le TNF- α . Nous avons testé également la production de cytokines chez les cellules RAW 264.7 afin de comparer sur des macrophages normaux. Ces cellules sont reconnues pour produire ces cytokines en présence de LPS (Panilaitis *et al.*, 2003). Suite aux expériences effectuées sur les Raw 264.7, nous n'avons pas réussi à déceler la présence de la cytokine IL-1 β . Nous n'avons donc pas continué à tester cette cytokine. Nous avons utilisé comme témoin positif des cellules Raw 264.7 et H36.12J exposées au LPS et comme témoin négatif des cellules non exposées. Les expériences ont été faites en duplicata et répétées deux fois afin de confirmer les résultats obtenus. Les résultats sont compilés dans le tableau 3 et représentent les moyennes des résultats.

Nous n'avons décelé aucune production d'IL-1 β dans le surnageant des cellules Raw 264.7. Les valeurs se retrouvent sous le seuil de détection du test ELISA utilisé qui est de 10 ng/ml. L'exposition au LPS a permis de retrouver une concentration d'IL-6 dans les surnageants de Raw 264.7. Nous avons obtenu une production de l'ordre de 913 ng/ml ($p \leq 0.05$). Pour ce qui est de nos cellules H36.12J, nous avons eu une augmentation significative ($p \leq 0.05$) de la production d'IL-6 suite à l'exposition au LPS seulement. Aucune augmentation significative n'a été décelée suite à une exposition au Be. La production de TNF- α a été un peu plus marquée chez les cellules H36.12J. Nous avons obtenu une production de TNF- α de l'ordre de 53.74 ng/ml après exposition au LPS ($p \leq 0.05$). Nous avons également obtenu une augmentation significative ($p \leq 0.05$) de la production de cette cytokine après une exposition au Be à une concentration de 10^{-7} M. Nous avons remarqué que les concentrations de TNF- α chutent d'un facteur de 88% à la plus forte concentration de Be lors d'une exposition des cellules Raw 264.7. Le Be a un effet d'inhibition sur la production de TNF- α lors d'une exposition chez les cellules Raw 264.7.

TABLEAU 3. Dosage par ELISA des cytokines IL-6 ET TNF- α dans le surnageant des cellules Raw 264.7 et H36.12J après 18 heures d'exposition au Be.

	Concentration d'IL-6 (ng/ml)					
	Cil -	Cil LPS	BE 10-4 M	BE 10-5 M	BE 10-6 M	BE 10-7 M
RAW 264.7 Cells	# -	912.84 \pm 397.61	# -	# -	# -	# -
H36.12J Cells	4.29 \pm 1.32	* 12.41 \pm 0.68	3.80 \pm 0.15	4.51 \pm 1.16	4.08 \pm 1.31	4.01 \pm 0.00

	Concentration de TNF- α (ng/ml)					
	Cil -	Cil LPS	BE 10-4 M	BE 10-5 M	BE 10-6 M	BE 10-7 M
RAW 264.7 Cells	46.85 \pm 3.94	* 1077.89 \pm 283.55	5.32 \pm 1.31	5.11 \pm 1.01	9.25 \pm 1.85	12.9 \pm 2.06
H36.12J Cells	9.58 \pm 1.08	* 53.74 \pm 4.00	9.25 \pm 1.85	11.01 \pm 1.88	11.56 \pm 0.16	* 12.00 \pm 1.10

Légende : # valeurs obtenues sous le seuil de détection

* Valeurs significatives $p \leq 0.05$

Les cellules H36.12J et Raw 264.7 ont été incubées avec le LPS de *E. coli* 0127 et le Be pour une période de 18 heures . Les cytokines IL-6 et TNF- α ont été détectées utilisant le test ELISA OptEIA™ (BD). Les plateaux sont par la suite lus avec un lecteur ELISA à une absorbance de 450 nm.

DISCUSSION

Jusqu'à maintenant très peu de recherches ont été faites pour évaluer les effets du Be sur le système immunitaire. Les événements responsables de la progression de la maladie causée par le Be sont encore très méconnus dû au fait que la maladie se détecte à un niveau avancé. Afin d'élucider certains modes d'action du Be, nous avons effectué des tests de base en immunotoxicologie et nos études ont permis de mieux comprendre les effets du Be sur l'immunité naturelle ainsi que sur le développement de granulomes au niveau des poumons qui sont reliés aux maladies inflammatoires.

1. PHAGOCYTOSE CHEZ LES H36.12J

Les macrophages jouent un rôle important lors de la réponse immunitaire et ils sont impliqués dans l'inflammation. Leurs fonctions consistent à présenter l'antigène aux cellules T CD4⁺, à sécréter des cytokines responsables de l'activation de d'autres cellules du système immunitaire et ainsi influencer le déroulement de la réponse immunitaire. Un autre rôle important qu'ont les macrophages est de neutraliser par ingestion et de détruire les substances étrangères par leur fonction phagocytaire. Ils sont donc très important dans la neutralisation et l'élimination d'infections. Ainsi les macrophages produisent une variété de produits toxiques comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'anion superoxyde (O₂⁻) et l'oxyde d'azote (NO) dans le but de détruire les substances étrangères (Janeway, C.A. *et al.*, 2001). En exposant les macrophages H36.12J au Be, la fonction phagocytaire de ces cellules pouvait ainsi être évaluée.

Les cellules H36.12J ont une bonne capacité à phagocyter les substances étrangères. La fonction phagocytaire des macrophages est un bon marqueur de toxicité lors d'études en immunotoxicologie (Sanchez-Dardon *et al.*, 1999). Les métaux peuvent avoir des effets contradictoires sur la phagocytose comme une immunodépression ou une immunomodulation selon les métaux et leur utilisation ainsi que leurs concentrations (Fournier *et al.*, 2000). Ainsi en mettant les cellules H36.12J en présence de billes de latex fluorescentes, nous avons observé un pourcentage de phagocytose élevé. Après 2

heures d'exposition au Be, les cellules ont perdu leur capacité à phagocyter passant de 71% à 55% pour une concentration de Be de 10^{-5} M. Après 6 heures d'exposition les H36.12J ont également perdu leur capacité à phagocyter de façon significative passant de 71% à 60 % pour une bille et plus et l'efficacité de phagocytose a également diminué passant de 28% à 17% pour 3 billes et plus. Cette diminution peut-être due à la toxicité du Be bien que les mécanismes d'action du Be au niveau du système immunitaire sont encore inconnus. Par contre pour une concentration moins élevée de Be, nous avons remarqué une augmentation significative de la phagocytose de 3 billes et plus allant de 28% à 33 %. Aux plus faibles concentrations, le Be est moins toxique et c'est ce qui peut expliquer le fait que nous observons une augmentation de la phagocytose.

2. MESURE D'INDUCTION DE L'APOPTOSE ET OBSERVATION DU CYCLE CELLULAIRE

L'apoptose est une réponse cellulaire normale qui est importante afin de conserver l'intégrité cellulaire. Par la suite les cellules ou les tissus nécrotiques sont pris en charge par les cellules phagocytaires comme par exemple les macrophages afin d'être éliminés. Les cellules vont en apoptose lorsqu'elles sont endommagées, lors de la réplication cellulaire, par des substances chimiques ou bactériologiques ou encore lors d'une privation d'oxygène lors d'un arrêt cardiaque par exemple (Hart *et al.*, 2000) (Heerd *et al.*, 1994).

Sawyer *et al.* (2002) ont fait l'hypothèse que les antigènes de Be qui sont libérés lors de la mort cellulaire des macrophages étaient responsables de la réintroduction du Be dans les poumons. L'apoptose peut ainsi être responsable de la persistance d'une inflammation au niveau des poumons puisque les molécules Be ne sont pas correctement éliminées. Il est encore mal connu pourquoi certaines inflammations se résorbent et d'autres persistent (Sawyer *et al.*, 2000).

Nos résultats ont montré une augmentation significative du pourcentage de cellules apoptotiques après une exposition au Be, et ce à une concentration de 10^{-4} M. Nous avons

obtenu une augmentation de l'apoptose chez les H36.12J de 6 et 7 fois plus élevée par rapport au témoin négatif. Le Be cause ainsi l'induction de l'apoptose chez les macrophages et ceci suggère que l'inflammation chronique chez les travailleurs est causée par la présence prolongée des antigènes de Be au niveau des poumons (Srivastava *et al.*, 2002).

Le cycle cellulaire est également affecté par le Be. Nous avons observé une diminution du nombre de cellules dans la phase G0/G1. La phase de réplication de l'ADN est également affectée par une diminution de synthèse (S). Nous pourrions expliquer ceci par une inhibition de l'activité des enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN (Sawyer *et al.*, 2000). Par contre nous avons observé une augmentation de la phase G2/M. Il y aurait accumulation des cellules en G2 suite à un blocage des enzymes impliquées dans la synthèse du matériel nécessaire pour la division cellulaire (Brooks *et al.*, 1989) (Skilleter *et al.*, 1988) (Yang *et al.*, 2003).

3. PRODUCTION DE PEROXYDE D'HYDROGÈNE ET FLAMBÉE OXIDATIVE

Le test de flambée oxydative permet de doser la production d'intermédiaires oxygénés réactifs (ROS), comme par exemple le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'anion superoxyde (O₂⁻). Cette production de ROS permet de détruire les bactéries et autres matériels étrangers par les macrophages et peut être également impliquée dans les dommages causés aux tissus suite à une inflammation chronique. Pour tester la production de ROS suite à une exposition au Be ou autre activateur, les cellules sont mises en présence d'une sonde qui au contact de peroxyde d'hydrogène, devient fluorescente et peut être détectée par cytométrie à une longueur d'onde de 523 nm (Brousseau *et al.*, 1999). L'intensité de fluorescence correspond à la quantité de ROS libérée par les cellules. L'intensité de fluorescence augmente dans le temps et c'est ce que nous avons remarqué en faisant plusieurs lectures à différents temps.

L'exposition des cellules au Be a démontré une augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène de l'ordre de 420% après 24 heures d'exposition à la concentration

10^{-4} M. Une exposition au Be d'une durée de 72 heures a beaucoup plus d'impact sur les cellules et sur leur production de ROS. En effet nous avons obtenu des augmentations considérables de la production de H_2O_2 allant de 273% à la plus faible concentration jusqu'à 716% à la plus forte concentration. Ces augmentations de production de peroxyde d'hydrogène peuvent être la cause des dommages induits au niveau des poumons lors d'une longue exposition au Be et également du maintien des inflammations (Vrba *et al.*, 2002).

4. PRODUCTION D'OXYDE NITRITE

Le NO est un autre promoteur de l'inflammation produit par les macrophages activés. Lorsqu'il est retrouvé en grande quantité, il est également responsable de dommages causés aux tissus. Il augmente également la réponse immunitaire (Srivastava *et al.*, 2002).

Les expériences sur les macrophages H36.12J ont été effectuées en parallèle avec des macrophages non sensibilisées au Be, les RAW 264.7. Nous avons choisi ces cellules témoins puisque plusieurs recherches sur la production de NO ont déjà été effectuées auparavant (St-Denis *et al.*, 1998). Bien que la production de NO détectée dans les surnageants des RAW 264.7 fut faible, le fonctionnement de notre méthode fut testé. Les stimulations effectuées avec le Be pour ce test n'ont démontré aucune trace du dérivé du NO, le nitrate (NO_2^-), dans les surnageants des cellules H36.12J. Peut-être que les macrophages H36.12J ne sont pas aptes à sécréter le nitrate. Peut-être qu'une stimulation plus longue avec le LPS aurait permis de détecter une production de NO. Une stimulation de 18 heures a été effectuée en référence au travail de St-Denis *et al.*, (1998).

5. PHÉNOTYPAGE AVEC LES ANTICORPS CD11b ET CD68

Le phénotypage aide à caractériser les cellules. Il permet d'observer les modifications obtenues à la surface des cellules suite à l'exposition à un xénobiotique par exemple. Afin

de caractériser les cellules H36.12J et de voir les changements au niveau des marqueurs de surface, nous avons choisi deux récepteurs souvent utilisés chez les macrophages. Le premier marqueur, le CD11b est surtout exprimé sur les cellules NK, les cellules myéloïdes et les macrophages. Sa principale fonction est de réguler la migration des macrophages. Il est également impliqué dans l'adhésion des macrophages aux autres cellules (Buhling *et al.*, 2000). Le CD68 est principalement intracellulaire mais il est également exprimé en plus faible quantité à la surface des cellules. C'est une molécule de 110 KDa. On le retrouve chez les monocytes/macrophages, les neutrophiles, les basophiles et les cellules NK. Sa fonction est encore méconnue mais des chercheurs ont trouvé qu'il pourrait avoir une fonction lors de la prise en charge et de la présentation de l'antigène. Ce récepteur entre également dans la composition des membranes lysosomales et pourrait protéger celles-ci contre les attaques des enzymes hydrolytiques (Ramprasad *et al.*, 1996).

Les résultats obtenus au cours de ces recherches n'ont démontré aucune modification de l'expression du récepteur CD11b à la surface de la lignée cellulaire H36.12J. Il aurait été difficile d'observer une augmentation de l'expression de ce récepteur sur les macrophages puisqu'il est déjà exprimé à un haut pourcentage soit de 94%. Par contre nos expériences ont permis d'observer des modifications de l'expression du récepteur CD68 sur les cellules H36.12J suite aux expositions au Be. Premièrement nous avons observé une diminution du pourcentage de cellules exprimant le CD68 après 1 heure d'incubation avec le Be et ce à la concentration 10^{-4} M. La diminution obtenue après 1 heure d'exposition au Be à la concentration 10^{-4} M peut s'expliquer par le phénomène de « shedding » qui consiste dans le relargage des récepteurs des cellules. C'est une façon pour les cellules de se protéger ou encore une conséquence d'une toxicité causée par un xénobiotique. D'un autre côté, nous avons obtenu des augmentations significatives du pourcentage de cellules exprimant ce marqueur après 72 heures d'exposition au Be et également une augmentation de nombre de récepteurs à la surface des cellules qui se caractérise par une augmentation de l'intensité de fluorescence. Les différences obtenues entre l'augmentation du pourcentage de cellules exprimant le CD68 et la modulation des récepteurs après 72 heures et après 1 heure peuvent s'expliquer par le fait que les cellules

les plus fragiles sont mortes dès le début du contact avec le Be, par la suite après 72 heures d'exposition au Be, les plus résistantes sont toujours vivantes et elles peuvent avoir proliféré. Ces augmentations de récepteurs à la surface des cellules peuvent également s'expliquer par une activation cellulaire afin d'augmenter les réponses immunitaires (Kern *et al.*, 2000) (Kunjathoor *et al.*, 2002) (Matsumoto *et al.*, 2002).

Pour confirmer ces hypothèses, il faudrait, dans des recherches futures, examiner les mécanismes par lesquels l'expression des récepteurs est modifiée (Da Silva *et al.*, 1999) (Dello Sbarba *et al.*, 2002) (Hanneken *et al.*, 2002).

6. DOSAGE DE LA PRODUCTION D'IL-1 β , D'IL-6 ET DE TNF- α PAR ELISA.

Les macrophages activés relâchent des médiateurs proinflammatoires et cytotoxiques comme le peroxyde d'hydrogène, le NO, l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α . L'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α sont impliqués dans l'inflammation. Une exposition à un xénobiotique entraîne une cascade d'événements dont la sécrétion de cytokines qui augmente la réponse immunitaire en induisant la migration des cellules comme les macrophages. Elles permettent également l'attraction des cellules T (Bost *et al.*, 1994).

L'IL-1 β est le principal médiateur de l'inflammation. Il est produit par les macrophages activés. L'IL-6 est un facteur de différenciation des cellules B (Srivastava *et al.*, 2001). Il stimule les monocytes/macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales et il est produit par les cellules présentatrices d'antigène et contribue à l'activation des cellules T. L'IL-1 et l'IL-6 induisent l'expression des récepteurs d'IL-2 sur les cellules T au repos (Roitt *et al.*, 1994). Le TNF- α quant à lui augmente l'accumulation des macrophages et stimule la prolifération des cellules T activées et augmente également sa propre production (Maier *et al.*, 2001) (Vassalli *et al.*, 1992).

Nous avons utilisé le test ELISA avec un niveau de sensibilité de 10 ng/ml pour détecter la production des cytokines IL-1 β , IL-6 et TNF- α dans le surnageant des macrophages

Raw 264.7 ainsi que chez les macrophages sensibles au Be : les H36.12J avec le témoin positif nous avons obtenu une augmentation de la production d'IL-6 et de TNF- α chez les cellules Raw 264.7, ce qui confirme que notre test a fonctionné pour ces cytokines. Nous n'avons pas réussi par contre à détecter d'IL-1 β dans les surnageants des cellules Raw 264.7. Par la suite nous avons adapté la méthode aux cellules H36.12J. Nous avons obtenu une augmentation de la production d'IL-6 en présence de LPS chez les macrophages H36.12J et aucune production de cette cytokine en présence de Be. Nous avons également obtenu une augmentation de la production de TNF- α en présence de LPS chez les H36.12J et également une augmentation significative de sa production à la concentration de 10^{-7} M de Be. Ce dernier résultat confirme ceux obtenus par l'équipe de Sawyer et al., 2002, qui a utilisé un kit ELISA avec une sensibilité de 4 μ g/ml. Par contre, nous avons observé l'effet contraire chez les cellules Raw 264.7 en présence de Be. Nous avons obtenu une diminution de la production de TNF- α en présence des 4 concentrations de Be en comparant avec le témoin négatif. Le Be inhiberait la production de TNF- α par les macrophages normaux.

Newman *et al.*, (1996) et Fontenot *et al.*, (1998) ont soulevé l'hypothèse que le Be peut stimuler les macrophages à produire des cytokines. Ces cytokines sont connues pour participer à la prolifération des cellules T CD4⁺ sensibilisées au Be et dans les effets pathogènes à la formation des granulomes impliqués dans la MCB.

Le Be pourrait stimuler la production du TNF- α via le même facteur de transcription que le LPS et l'IFN- γ (Hamada *et al.*, 2000). Plusieurs hypothèses ont été soulevées pour expliquer la production du TNF- α : premièrement le Be peut se lier à un récepteur de surface comme le CD14 ou un récepteur à IFN- γ qui stimule la synthèse du TNF- α . Deuxièmement le Be peut interagir directement avec l'ADN ou des protéines associées à l'ADN qui jouent un rôle dans la transcription des facteurs impliqués dans la liaison du TNF- α . Le Be interagit directement avec les protéines des acides nucléiques, les protéines G et les protéines kinase (Parker and Steven (1979); Kaser *et al.*, (1980); Cummings *et al.*, (1982); Bigay *et al.*, (1987)).

CONCLUSION

Le Be est un métal qui cause bien des problèmes chez les individus qui y sont exposés. Les conséquences d'une exposition peuvent se traduire par des sensibilisations au Be ainsi que par des inflammations chroniques qui peuvent dégénérer en béryllose. La béryllose se caractérise par une accumulation de granulomes au niveau des poumons qui diminue beaucoup les fonctions respiratoires des individus souffrant de cette maladie. Les granulomes consistent en une accumulation de lymphocytes T. Les gens souffrant de béryllose ne peuvent pas guérir de cette maladie, ils peuvent seulement être soulagés en prenant des médicaments anti-inflammatoires.

Les macrophages jouent un grand rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire suite à une exposition à un métal. Nos recherches effectuées sur les macrophages ont permis de mieux comprendre leur grande importance dans l'initiation de maladies inflammatoires. Leur fonction phagocytaire diminuée suite à une exposition au Be pourrait avoir une conséquence sur l'accumulation du Be au niveau des poumons puisqu'il est moins éliminé. Aussi, l'augmentation du pourcentage de macrophages en apoptose que nous avons observé à la plus forte concentration de Be pourrait permettre la ré-introduction du Be dans l'organisme, comme le suggérait le mécanisme d'action proposé par Sawyer et son équipe (2002). Lors de l'étude du cycle cellulaire chez les macrophages sensibles au Be, nous avons observé des modifications aux phases G0/G1, S et G2/M. Ces changements nous démontrent que les macrophages H36.12J ne se comportent pas comme des macrophages normaux. Ensuite l'augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène que nous avons remarquée suite à une exposition au Be confirmerait le rôle qu'il joue dans le maintien de l'inflammation. Les modifications de l'expression du récepteur CD68 pourraient jouer un rôle dans la prise en charge et dans la présentation de l'antigène comme le suggérait l'équipe de Ramprasad (1996). Le CD68 entre dans la composition des membranes lysosomales. L'augmentation de ce marqueur observée suite à une exposition au Be protégerait les lysosomes contre les attaques des enzymes hydrolitiques et diminuerait ainsi l'élimination des molécules de Be lors de la phagocytose. Finalement l'augmentation de la production de TNF- α lors de l'exposition

au Be pourrait être impliquée dans l'activation et dans la migration des cellules T au niveau des poumons. Le TNF- α favoriserait également l'accumulation des macrophages.

Il est important de poursuivre les recherches sur les effets du Be sur le système immunitaire afin de déterminer les mécanismes d'action de ce métal puisqu'il induit de graves problèmes chez les individus qui y sont exposés. Nous pourrions évaluer comment se fait la prise en charge et l'attachement du Be. Le Be est un haptène donc il doit être lié à une autre molécule afin d'être présenté. Il serait également important de regarder si le Be subit le même traitement qu'un antigène. Nous pourrions également étudier les processus d'activation cellulaire suite à une exposition au Be. Finalement il serait important de mettre au point un modèle animal afin d'étudier les sensibilisations au Be *in vivo* et également la béryllose. Des études ont déjà été effectuées sur des souris exposées au Be mais les chercheurs ont éprouvé des problèmes à retrouver les mêmes effets que chez les humains.

RÉFÉRENCES

- AL-SARIREH, B., Eremin, O., 2000, "Tumor-associated macrophages (TAMS): disordered function, immune suppression and progressive tumor growth", J.R. Coll. Surg. Edinb., Vol. 45: 1-16.
- AOSTINI, C., Facco, M., Chilosi, M., Semenzato, G., 2001, "Alveolar Macrophage-T Cell Interactions During Th1-Type Sarcoid Inflammation", Microscopy research and technique Vol. 53 p: 278-287.
- BARNERJEE, B.D., Koner, B.C., Ray, A., 1996, "Immunotoxicity of pesticides: perspectives and trends", Indian Journal of Experimental Biology, Vol. 34: 723-733.
- BEHBEHANI, K., Beller, D.I., Unanue, E.R., 1985, "The effects of beryllium and other adjuvants on Ia expression by macrophages", J. Immunol., Vol.134: 2047-2049.
- BERGERON, A., Bonay, M., Kambouchner, M., Lecossier, D., Riquet, M., Soler, P., Hance, A., Tazi, A., 1997, "Cytokine patterns in tuberculosis and sarcoid granulomas", J. Immunol, Vol. 159: 3034-3043.
- BIGAY, J., Deterre, P., Pfister, C., Chabre, M., 1987, "Fluoride complexes of aluminium or beryllium act on G-proteins as reversibly bound analogues of the gamma phosphate of GTP", EMBO J, Vol. 6: 2907-2913.
- BOST, T.W., Riches, D.W., Schumacher, B., Carre, P.C., Khan, T.Z., Martinez, J.A., Newman, L.S., 1994, "Alveolar macrophages from patients with beryllium disease and sarcoidosis express increased levels of mRNA for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 but not interleukin-1 beta", Am J Respir Cell Mol Biol., Vol. 10(5):506-13.
- BROOKS, A.L., Griffith, W.C., Johnson, N.F., Finch, G.L., Cuddihy, R.G., 1989, "The induction of chromosome damage in CHO cells by beryllium and radiation given alone and in combination", Radiat Res., Vol. 120(3):494-507.
- BROUSSEAU, P., Payette, Y., Ttyphonas, H., Blakley, B., Boermans, H., Flipo, D., Fournier, M., 1999, "Manual of Immunological Methods", CRC Press, Boca Raton, FL, 141 pp.
- BUHLING, F., Ittenson, A., Kaiser, D., Tholert, G., Hoffmann, B., Reinhold, D., Ansoerge, S., Welte, T., 2000, "MRP8/MRP14, CD11b and HLA-DR expression of alveolar macrophages in pneumonia", Immunol. Lett., Vol. 1; 71(3): 185-190.

CASARETT, Doull's, 1996, "Toxicology", 5^e édition, Health Professions Division, Chapitre 12.

COMHAIR, S.A., Lewis, M.J., Bhatena, P.R., Hammel, J.P., Erzurum, S.C., 1999, "Increased glutathione and glutathione peroxidase in lungs of individuals with chronic beryllium disease", Am J Respir Crit Care Med., Jun., Vol. 159(6):1824-9.

Comité provincial des médecins (INSPQ), 2003, "Guide d'utilisation du BeLPT chez les travailleurs exposés au Béryllium", Institut National de la Santé, 11 pp.

CRAWFORD, R.M., Finbloom, D.S., Ohara, J., Paul, W.E., Meltzer, M.S., 1987, "B-cell stimulatory factor-1 (interleukin-4) activates macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens". J Immunol, Vol. 139: 135-141.

CUMMINGS, B., Kaser, K., Wiggings, G., Ord, M.G., Stocken, L.A., 1982, "Beryllium toxicity: the selective inhibition of casein kinase 1", Biochem J, Vol. 208:141-146.

DA SILVA, R.P. Gordon, S., 1999, "Phagocytosis stimulates alternative glycosylation of macrofialin (mouse CD68), a macrophage-specific endosomal protein", Biochem J, Vol. 338:687-94.

DELLO SBARBA, P., Rovida, E., 2002, "Transmodulation of cell surface regulatory molecules via ectodomain shedding", Biol. Chem., Vol. 383: 69-83.

DEODHAR, S.D., Barna, B., Van Ordstrand, H.S., 1973, "A study of the immunologic aspects of chronic berylliosis", Chest, Vol. 63: 309-313.

DOLNIK, A.V., Kuznetsova, I.S., Voronin, A.P., Podgornaya, O.I., 2003, "Telomere-binding TRF2/MTBP localization during mouse spermatogenesis and cell cycle of the mouse cells L929", J Anti Aging Med., Vol. 6(2):107-21.

EPSTEIN PE, Dauber JH, Rossman MD and Daniele RP, 1982, "Bronchoalveolar lavage in a patient with chronic berylliosis: evidence for hypersensitivity pneumonitis". Annals of Internal Medicine Vol. 97 p. 213-216.

FONTENOT, A.P., Falta, M.T., Newman, L.S., Kotzin, B.L., 1999, "Identification of pathogenic T cells in patients with beryllium-induced lung disease", Journal of immunology, Vol. 163: 1019-1026.

FONTENOT, A.P., Kotzin, B.L., Comment, C.E., Newman, L.S., 1998, "Expansions of T-Cell subsets expressing particular T-Cell receptor variable regions in chronic beryllium disease", Am J Respir Cell Mol Biol, Vol. 18: 581-589.

FONTENOT, A.P., Canavera, S.J., Gharavi, L., Newman, L.S., 2002, "Target organ localization of memory CD4⁺ T cells in patients with chronic beryllium disease", J. Clin. invest, Vol. 110: 1473-1482.

FORMAN, H.J., Torres, M., 2001, "Signaling by the respiratory burst in macrophages", Life, Vol. 51: 365-371.

FOURNIER, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Brousseau, P., 2000, "Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics", Amer. Zool., Vol. 40: 412-420.

FRASER, A., Fearon, U., Billingham, R.C., Ionescu, M., Reece, R., Barwick, T., Emery, P., Poole, A.R., Veale, D.J., 2003, "Turnover of type II collagen and aggrecan in cartilage matrix at the onset of inflammatory arthritis in humans: relationship to mediators of systemic and local inflammation", Arthritis Rheum., Vol. 48(11):3085-95.

GREES, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982, "Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids". Anal. Biochem. Vol. 126: 131-138.

HAMADA, H., Sawyer, R.T., Kittle, L.A., Newman, L.S., 2000, "Beryllium-stimulation does not activate transcription factors in a mouse hybrid macrophage cell line", Toxicology Vol. 143: 249-261.

HANNEKEN, A., Mercado, M., 2002, "Regulated ectodomain shedding of fibroblast growth factor receptor 1", TSRI Scientific Report.

HART, S.P., Ross, J.A., Ross, K., Haslett, C., Dransfield, I., 2000, "Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: implications for functional downregulation and recognition by phagocytes", Cell Death Differ., Vol. 7(5):493-503.

HEERDT, B.G., Houston, M.A., Augenlicht, L.H., 1994, "Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines", Cancer Res., Jun. 15, Vol. 54(12):3288-93.

HIBBS, J.B., Taintor, Jr. R.R., Vavrin, Z., Rachlin, E.M., 1988, "Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophages effector molecule", Biochem Biophys Res Commun. Vol. 157: 87-94.

JANEWAY, C.A., Travers, P., Walport, M., Sholomchik, M., 2001, "Immunobiology 5", Garland publishing, New York, NY, 732 pp.

JEFFERY, P.K., 1998, "Investigation and Assessment of airway and lung inflammation: we now have tools, what are the question?", Eur Respir J, Vol. 11:524-528.

JONDAL, M., 1987, "The human NK cell: A short overview and a hypothesis on NK recognition", Clin Exp Immunol, Vol. 70: 255-262.

KACMAR, P., Pisti, J., Mikula, I., 1999, "Immunotoxicology and veterinary medicine", ACTA Vet. BRNO, Vol. 68: 57-79.

KASER, M.R., Ord, M.G., Stoken, L.A., 1980, "The effects of beryllium on histone phosphorylation in liver, Biochem Intern, Vol. 1: 148-150.

KERN, P.M., Keilholz, L., Forster, C., Stach, C., Beyer, T.D., Gaipf, U.S., Kalden, J.R., Hallmann, R., Herrmann, M., 2000, "UVB-irradiated T-cells undergoing apoptosis lose L-selectin by metalloprotease-mediated shedding", Int J Radiat Biol., Vol. 76(9):1265-71.

KINCADE, P.W., Gimble, J.M., 1993, "B lymphocytes" Fundamental Immunology, New York, Raven Press LTD., p. 43-74.

KOLANZ ME, Madl AK, Kelsh MA, Kent MS, Kalmes RM, Paustenbach DJ., 2001, "A comparison and critique of historical and current exposure assessment methods for beryllium: implications for evaluating risk of chronic beryllium disease", Appl Occup Environ Hyg, Vol. 16(5):593-614.

KOLANZ ME., 2001, "Introduction to beryllium: uses, regulatory history, and disease", Appl Occup Environ Hyg, Vol. 16(5):559-67.

KRIEBEL D, Brain JD, Sprince NL and Kakemi H, 1988. "The pulmonary toxicity of beryllium". American Review of Respiratory Disease, Vol. 137, p. 464-73.

KUBY, J., "Immunology", 1997, Third edition, W.H. Freeman and company, New York, Chapter 13.

KUNJATHOOR, V.V., Febbarao, M., Podrez, E.A., Moore, K.J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J.S., Silverstein, R., Hoff, H.F., Freeman, W., 2002, "Scavenger receptors class A-II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low

density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages, The Journal of Biological Chemistry, Dec 20; Vol. 277(51): 49982-49988.

LUSTER, M.I., Germolec, D.R., Rosenthal, G.J., 1990, "Immunotoxicology: review of current status", Annals of allergy, Vol. 64: 427-432.

MAIER, L.A., Kittle, L.A., Sawyer, R.T., Newman, L.S., 2001, "IL-4 fails to regulate in vitro beryllium-induced cytokines in berylliosis". European Respiratory Journal, Vol. 17: 403-415.

MAIER, L.A., Sawyer, R.A., Bauer, R.A., Kittle, L.A., Lympany, P., McGrath, D., Dubois, R., Daniloff, E., Rose, C.S., Newman, L.S., 2001, "High Beryllium-stimulated TNF- α is associated with the 308 TNF- α promoter polymorphism and with clinical severity in chronic beryllium disease", American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, Vol. 164:1192-1199.

MATSUMOTO, K., Hirano, K-I, Nozaki, S., Takamoto, A., Nishida, M., Nakagawa-Toyama, Y., Janabi, M.Y., Ohya, T., Yamashita, S., Matsuzawa, Y., 2000, "Expression of macrophage scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor- γ , which regulates gain of macrophage-like phenotype *in vitro*, and its implication in atherogenesis", Arterioscler thromb Vasc Biol., Vol. 20:1027-1032.

MCHUGH, B., Heck, M.M., 2003, "Regulation of chromosome condensation and segregation", Curr Opin Genet Dev., Vol. 13(2):185-90.

MELTZER, M.S., Nacy, C.A., 1989, "Delayed-type hypersensitivity and the induction of activated, cytotoxic macrophages" dans Paul W.E. (ed): Fundamental immunology, New York, Raven Press Ltd, 765-777.

MOSMANN, T.R., Coffman, R.L., 1987. "Two types of mouse helper T-cell clones: Implications for immune regulation". Immunol. Today Vol. 8: 223-227.

NEWMAN, L.S., Lloyd, K., Daniloff, E.A., 1996, "The natural history of beryllium sensitization and chronic beryllium disease", Environ Health Perspect, Vol. 104: 937-943.

OLIVER, J.D., Roberts, R.A., 2002, "Receptor-mediated hepatocarcinogenesis: role of hepatocyte proliferation and apoptosis", Pharmacol Toxicol., Vol. 91(1):1-7.

ORTALDO, J.R., Herberman, R.B., 1984, "Heterogeneity of natural killer cells", Annu Rev Immunol, Vol. 2: 359-394.

PALLARDY, M., Biola, A., Lebrec, H., Breard, J., 1999, "Assessment of apoptosis in xenobiotic-induced immunotoxicity", Methods., Vol. 19(1):36-47.

PANILAITIS, B., Altman, G.H., Chen, J., Jin, H.J., Karageorgiou, V., Kaplan, D.L., 2003, "Macrophage responses to silk", Biomaterials., Vol. 24(18):3079-85.

PARKER, V.H., Steven, C., 1979, "Binding of beryllium to nuclear acidic proteins", Chem Biol Interact, Vol. 26: 167-177.

PINKSTON P, Bitterman P and Crystal RG, 1984, "Interleukine-2 in the alveolitis of beryllium induced lung disease". American Review of respiratory Diseases Vol. 129 p. A161.

POWERS MB, "History of beryllium", 1991, in Beryllium. Biomedical and environnement aspects. M.D. Rossman, O.P. Preuss and M.B. Powers, eds. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 9-24.

RAMPRASAD, M.P., Terpstra, V., Kondratenko, N., Quehenberger, O., Steinberg, D., 1996, "Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein", Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 10, Vol. 93(25):14833-8.

ROBINSON, J.P., Carter, W.O., Narayanan, P.K., 1994, "Oxidative product formation analysis by flow cytometry", Methods Cell Biol., Vol. 41:437-47.

ROITT/Brostoff/Male, 1993, "Immunologie", 3^e édition, De Boeck Université, Chapitre 19.

ROSSMAN, M.D., Kern, J.A., Elias, M.R., Cullen, P.E., Epstein, O., Preuss P, Markham, T.N. and Daniele, R.P., 1988, "Proliferative response of bronchoalveolar lymphocytes to beryllium". Annals of Internal Medicine Vol. 108: 687-693.

SALTINI, C., Winestock, K., Kirby, M., Pinkston, P., 1989, "Maintenance of alveolitis in patients with chronic beryllium disease by beryllium-specific helper T-cells", N. Eng. J. Med., Vol. 320: 1103-1109.

SALVAGIO, J.E., Flax, M.H., Leskowitz, S., 1965, "Studies in immunisation : III. The use of beryllium as a granuloma-producing agent in Freund's adjuvant", J. Immunol., Vol. 95: 846-854.

SANCHEZ-DARDON, J., Voccia, I., Hontela, A., Chilmonczyk, S., Dunier, M., Boermans, H., Blakley, G., Fournier, M., 1999, "Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout *oncorhynchus mykiss* exposed *in vivo*", Env Tox Chem, Vol. 18 (7): 1492-1497.

SAWYER, R.T., Maier, L., Kittle, L.A. and Newman, L.S., 2002, "Chronic beryllium disease: a model interaction between innate and acquired immunity", International Immunopharmacology, Vol. 2: 249-261.

SAWYER, R.T., Fadok, V.A., Kittle, L.A., Maier, L.A., Newman, L.S., 2000 "Beryllium-stimulated apoptosis in macrophage cell lines", Toxicology Vol. 149: 129-142.

SAWYER, R.T., Kittle, L.A., Hamada, H., Newman, S.L., Cambell, P.A., 2000, "Beryllium-stimulated production of tumor necrosis factor- α by a mouse hybrid macrophages cell line", Toxicology, Vol 143: 235-247.

SCHEURICH, P., Thoma, B., Ucer, U., Pfizenmaier, K., 1987, "Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)-alpha: Induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha mediated enhancement of T cell responses", J of Immunol, Vol. 138: 1786-1790.

SEMENZATO, G., Agostini, C., 2001, "Interstitial lung diseases: what next?", Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis., Vol. 18(3):239-41.

SKILLETER, D.N., Mattocks, A.R., Neal, G.E., 1988, "Sensitivity of different phases of the cell cycle to selected hepatotoxins in cultured liver-derived (BL9L) cells", Xenobiotica, Jun. Vol. 18(6):699-705.

SRIVASTAVA, K.D., Rom, W.N., Jagirdar, J., Yie, T.A., Gordon, T., Tchou-Wong, K.M., 2001, "Crucial role of interleukin-1beta and nitric oxide synthase in silica-induced inflammation and apoptosis in mice", Am J Respir Crit Care Med., Vol. 165(4):527-533.

ST-DENIS, A., Chano, F., Tremblay, P., St-Pierre, Y., Descoteaux, A., 1998, "Protein Kinase C- α Modulates Lipopolysaccharide-induced functions in a Murine Macrophage cell line", The journal of Biological Chemistry, Vol. 273 (49): 32787-32792.

STERNER, J., Eisenbud, M., 1951, "Epidemiology of beryllium intoxication". Archives of industrial hygiene and occupational medicine, Vol. 4: 123-157.

STOUT, R.D., Suttles, J., 1997, "T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease" Front Biosci., Vol. 2:d197-206.

STUER, D.J., Nathan, C.F., 1989, "Nitric oxide: A macrophage product responsible for cytostatis and respiratory inhibition in tumor target cells", J Exp Med., Vol. 169: 1543-1555.

TEPPER, LB, Hardy HL, and Chamberlin RI, 1961, Toxicology of beryllium compounds. Amsterdam, Elsevier Publishing Company.

TINKLE, S.S., Kittle, L.A., Schumacher, B., Newman, L.S., 1997, "Beryllium induces IL-2 and INF- γ in berylliosis", J Immunol., Vol. 158: 518-526.

TINKLE, S.S., Newman, L.S., 1997, "Beryllium-stimulated release of tumor necrosis factor- α , interleukine-6 and their soluble receptors in chrinic beryllium disease", Am J Respir Crit Care Med, Vol. 156: 1884-1891.

VAN ORDSTRAND, H.S., Hugues R. And Carmody M.G., 1943. "Chemical pneumonia in workers extracting beryllium oxide". Cleveland Clinical Quarterly, Vol. 10, p.10-18.

VASSALLI, P., 1992, "The pathophysiology of tumor necrosis factors", Annu Rev Immunol, Vol. 10: 411-452.

VIAL, T., Nicolas, B., Descotes, J., 1996, "Clinical Immunotoxicity of pesticides", Journal of Toxicology and Environmental Health, Vol. 48: 215-229.

VRBA, J., Modriansky, M., 2002, "Oxidative burst of Kupffer cells: target for liver injury treatment" Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub., Vol. 146(2):15-20.

WEISS, A., 1993, "T lymphocytes activation" Paul, W.E., (ed) Fundamental Immunology, New York, Raven Press Ltd, 467-504.

WHITESIDE, T.L., Herberman, R.B., 1989, "The role of natural killer cells in human disease" Clin Immunol and Immunopath, Vol. 53: 1-23.

WITSHI, H.P., 1970, "Effects of Beryllium on deoxyribonucleic acid-synthesizing enzymes in regenerating rat liver". Biochem J, Vol. 120: 623-634.

YANG, Y., Sharma, R., Sharma, A., Awasthi, S., Awasthi, Y.C., 2003, "Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling", Acta Biochim Pol., Vol. 50(2):319-336.

YOKOTA, S., Geppert, T.D., Lipsky, P.E., 1988, "Enhancement of Antigen and mitogen induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor-alpha", J of Immunol, Vol. 140: 531-536.

ZELIKOFF J.T., Thomas P.T., 1998, "Immunology of environmental and occupational metals", Tayler and Francis, pp 27-35.