

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÉPONSE IMMUNITAIRE DES LYMPHOCYTES MURINS
EXPOSÉS À DES MÉTAUX LOURDS

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
MARLÈNE FORTIER

AVRIL 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Premièrement, j'aimerais remercier mon directeur de recherche M. Gaston Chevalier, ainsi que mon co-directeur M. Michel Fournier pour leur appui, leur compréhension ainsi que leur aide apportés lors de mes recherches ainsi que pendant la rédaction de ce mémoire.

Je tiens également à remercier :

Mme Pauline Brousseau pour ses conseils et commentaires constructifs.

Toute l'équipe de laboratoire du Pr. Michel Fournier et plus particulièrement Mme Julie De Gagné, qui en plus d'être devenue une amie, a été d'une grande aide et d'un grand support lors des expériences et des cours.

Je tiens aussi à remercier ma famille, mon copain Daniel et mon fils Nicolas pour leur patience et leur soutien.

À tous, un gros merci!

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vi
RÉSUMÉ	viii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES	
1.1 Le système immunitaire	4
1.2 Les métaux lourds.....	5
1.2.1 Le mercure	5
1.2.1A Le méthylmercure.....	7
1.2.1B Le chlorure de mercure	8
1.2.2 Le cadmium	11
1.2.3 Le zinc	14
1.2.4 Le sélénium.....	15
1.3 Activation des lymphocytes et thiols intracellulaires	18
1.4 Apoptose.....	21
1.5 Différence entre les lymphocytes et les macrophages	21
1.6 Hypothèses de travail	22
1.7 Objectifs de travail.....	22
CHAPITRE II	
ARTICLE SOUMIS ET ACCEPTÉ POUR PUBLICATION	
Cellular Response of Mouse Splenocytes to Heavy Metals Exposure	25
CHAPITRE III	
Discussion	75
Conclusion	88
Perspectives futures	89
CHAPITRE IV	
Résultats non-soumis pour publication.....	90

APPENDICE A

Courbe dose-réponse avec la concanavaline A..... 94

RÉFÉRENCES..... 95

LISTE DES FIGURES

- Figure 1: Courbe dose-réponse du pourcentage d'apoptose des lymphocytes pré-activés et non pré-activés en présence de chlorure de mercure (HgCl_2) page: 90.
- Figure 2: Courbe dose-réponse du pourcentage d'apoptose des lymphocytes pré-activés et non pré-activés en présence de chlorure de cadmium (CdCl_2) page: 91.
- Figure 3: Courbe dose-réponse du pourcentage d'apoptose des lymphocytes pré-activés et non pré-activés en présence de tétrachlorure de sélénium (SeCl_4) page: 92.
- Figure 4: Détermination de la concentration optimale de concanavaleine A page: 94.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BSA	Bovine serum albumine
CdCl ₂	Chlorure de cadmium
CI ₅₀	Concentration provoquant 50% d'inhibition
CMF	5-Chlorométhylfluorescéine
CMFDA	5-Chlorométhylfluorescéine diacétate
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
Con A	Concanavoline A
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
DMSO	Sulfoxyde de diméthyle
DPM	Désintégrations par minute
EROs	Espèces réactives de l'oxygène
FBS	Sérum de veau fœtal (Fœtal bovine serum)
GSH	Glutathion
GSH-Px	Enzyme glutathion peroxydase
GSSG	Glutathion sous sa forme oxydée
GST	Glutathion S-transférase
Hg	Mercure élémentaire
HgCl ₂	Chlorure de mercure (mercure inorganique)
IgA	Immunoglobuline chaîne α (alpha)
IgE	Immunoglobuline chaîne ε (epsilon)
IgG	Immunoglobuline chaîne γ (gamma)
IgG1	Immunoglobuline chaîne γ -1 (gamma-1)
IgM	Immunoglobuline chaîne μ (mu)
IL-2	Interleukine-2
IL-4	Interleukine-4
LDH	Lactate déshydrogénase
MeHgCl	Chlorure de méthylmercure (mercure organique)

MT	Métallothionéine
NEM	N-éthylmaleimide
NK	Cellules tueuses naturelles (Natural Killer Cells)
PBS	Tampon phosphate en solution saline (Phosphate buffer saline)
PHA	Phytohémagglutinine
PI	Iodure de propidium (<i>Propidium iodide</i>)
PMA	4 β -Phorbol 12 β -myristate 13 α -acétate
Se	Sélénium
SEA	Antigène d'œuf de Schistosome (Schistosome Egg Antigen)
SeCl ₄	Tétrachlorure de sélénium
SH	Groupements sulfhydryles
SOD	Superoxyde dismutase
TCR	Récepteur de cellules T (T-cell receptor)
ZnCl ₂	Chlorure de zinc

RÉSUMÉ

Parmi les contaminants environnementaux reconnus pour leur toxicité et leur propagation à travers le monde, les métaux lourds sont certainement d'une première préoccupation. Des études démontrent que les métaux lourds peuvent altérer différents systèmes dont le système immunitaire. Ils peuvent induire des effets immunomodulateurs qui pourront avoir comme conséquences, l'augmentation de la susceptibilité à des agents infectieux, l'apparition de maladies néoplasiques et de maladies auto-immunes. Afin de se protéger de cette agression, les cellules immunitaires induisent des thiols (cystéines, glutathion, métalloprotéines) qui sont des molécules capables de neutraliser les métaux en s'y liant et ainsi protéger l'organisme des effets néfastes. La pré-activation de ces cellules augmenterait leur contenu intracellulaire en thiols et les rendrait donc plus résistantes à l'effet néfaste des métaux lourds. Dans cette étude, nous avons voulu démontrer, l'effet de la pré-activation des lymphocytes avec la concanavaline A sur la toxicité de certains métaux lourds tels que le mercure (organique et inorganique), le cadmium, le zinc et le sélénium. Nous avons mesuré la prolifération lymphoblastique, la viabilité, l'apoptose ainsi que le niveau de thiols intracellulaires dans ces cellules pré-activées ou non pré-activées. Pour la prolifération lymphoblastique, les cellules pré-activées ont été significativement plus résistantes que les cellules au repos pour les deux formes de mercure, le cadmium et le zinc. Le niveau de thiols a été significativement augmenté chez les lymphocytes pré-activés de même que la viabilité, alors que l'apoptose a été augmentée dans les lymphocytes pré-activés par rapport à leur contrôle respectif en présence de mercure inorganique, de zinc et de sélénium. Les résultats suggèrent que la pré-activation des lymphocytes entraîne une augmentation du niveau de thiols intracellulaires leur procurant une meilleure protection contre l'effet néfaste des métaux lourds.

INTRODUCTION

Parmi les contaminants environnementaux reconnus pour leur toxicité et leur propagation à travers le monde, les métaux lourds sont certainement d'une première préoccupation. L'industrialisation a provoqué une augmentation remarquée de ceux-ci dans l'environnement. Ils provoquent un changement dans l'homéostasie de plusieurs systèmes physiologiques spécialement le système immunitaire. Les métaux lourds diffèrent des autres substances toxiques car ils sont ni créés, ni détruits par l'humain (Goyer, 2001). Les métaux lourds, dont le mercure, le cadmium et le plomb, sont des éléments chimiques naturellement présents dans notre environnement. Toutefois, l'exposition à ces éléments a été augmentée considérablement suite à des activités humaines (médicales ou industrielles) (Foulkes, 2000;Goyer, 2001) à un point tel que les niveaux dangereux sont certainement atteints dans un nombre croissant d'écosystèmes (Foulkes, 2000;Lawrence & McCabe, 2002). Les métaux lourds tels que le mercure, le cadmium et le zinc sont aussi d'importants polluants des systèmes aquatiques qui peuvent altérer les réponses immunitaires chez plusieurs espèces de poissons (Sanchez-Dardon et al., 1999). Ils peuvent causer des dommages cellulaires par différents mécanismes incluant des effets directs sur la membrane cellulaire et certains organelles altérant ainsi la transduction du signal ou affectant les systèmes enzymatiques à l'intérieur de la cellule (Tsangaris & Tzortzatou-Stathopoulou, 1998). Les métaux lourds peuvent induire des immunosuppressions (Fournier et al., 2000) rendant l'organisme plus susceptible à des infections ou des cancers (Schuppe et al., 1998). Ils peuvent provoquer le déclenchement de réactions immunitaires anormales telles que des allergies, des réactions dites d'hypersensibilité ou de l'auto-immunité (Lawrence, 1985;Lawrence et al., 1996;Selgrade, 1999). De plus, certains d'entre eux peuvent agir sur le système immunitaire à des doses ne provoquant aucune autre manifestation de toxicité (Exon, 1984). Cette action néfaste des métaux lourds a été démontrée sur le système immunitaire et d'autres systèmes physiologiques chez l'humain et les animaux (Foulkes, 2000;Worth et al., 2001).

La fonction du système immunitaire est de reconnaître et d'éliminer rapidement les agents pathogènes potentiellement dangereux pour l'hôte. Lorsque le

système immunitaire répond adéquatement, les substances étrangères sont éliminées rapidement et efficacement (Zelikoff et al., 1994).

Les réponses immunitaires sont essentiellement dûes à l'action des leucocytes dont il existe différents types. Un premier groupe important de leucocytes est formé par les cellules phagocytaires telles que les monocytes, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Un deuxième groupe important de leucocytes est constitué par les lymphocytes. Ces cellules sont à l'origine des réponses immunitaires adaptatives car elles reconnaissent des microorganismes de façon spécifique, que ceux-ci soient à l'intérieur des cellules de l'hôte ou à l'extérieur dans les liquides biologiques. Tous les lymphocytes sont dérivés de cellules souches de la moelle osseuse, mais on distingue les lymphocytes T, qui se différencient dans le thymus, et les lymphocytes B, qui se différencient dans la moelle osseuse (chez les mammifères adultes) (Roitt et al., 1997).

Afin de se protéger contre l'effet néfaste des métaux lourds, la cellule induit des thiols (cystéines, glutathion, métalloprotéines), qui sont des molécules capables de neutraliser les métaux en s'y liant (Dickinson & Forman, 2002a; Dickinson & Forman, 2002b). Il existe deux classes de thiols, les petites molécules non enzymatiques ayant des groupements sulfhydryles et des protéines qui immobilisent et empêchent les métaux de dénaturer les protéines de haut poids moléculaire en se liant directement aux métaux (Hultberg et al., 2001; Dickinson & Forman, 2002a; Dickinson & Forman, 2002b). En pré-activant la cellule, que ce soit avec un mitogène: phytohémagglutinine (PHA) ou concanavaline A (Con A), nous augmentons le contenu intracellulaire en thiols et plus spécifiquement en glutathion (GSH) ce qui a pour effet de protéger cette cellule contre l'effet néfaste des métaux lourds (Hamilos et al., 1989; Lawrence et al., 1996; Dickinson & Forman, 2002b).

Ce mémoire sera divisé en quatre chapitres. Le premier chapitre se veut une revue de la littérature exposant l'état actuel des connaissances. Le deuxième chapitre consiste en un article qui a été soumis et accepté pour publication. Le troisième chapitre consiste en une discussion sur les résultats obtenus qui mettra l'accent sur la signification de ces résultats par rapport aux données de la littérature et l'analyse de ces résultats dans leur ensemble. Enfin, le quatrième chapitre contient les résultats

non soumis pour publication suivis de la bibliographie. Tous les résultats proviennent de mes travaux de recherche et constituent le corpus principal de ce mémoire.

Chapitre I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Le système immunitaire

La fonction du système immunitaire est de protéger l'organisme en reconnaissant et éliminant rapidement et efficacement les agents pathogènes potentiellement dangereux pour l'hôte (Zelikoff et al., 1994; Sanchez-Dardon et al., 1999). Toute réponse immunitaire implique d'abord la reconnaissance du pathogène ou de toute autre substance étrangère, puis le développement d'une réaction destinée à les éliminer. Les réponses immunitaires sont induites par différentes cellules et par les molécules qu'elles secrètent. Les principales cellules impliquées dans les réactions immunitaires sont les lymphocytes (cellules B, T, LGL), les phagocytes (phagocytes mononucléés, neutrophiles, éosinophiles, etc) et les cellules accessoires (basophiles, mastocytes, plaquettes, etc) (Roitt et al., 1997). Les réponses immunitaires peuvent être classées en deux grandes catégories: les réponses naturelles (ou non-adaptatives) et les réponses immunitaires spécifiques (ou adaptatives).

Un premier groupe important de leucocytes est formé par les cellules phagocytaires telles que les monocytes, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Ces cellules captent les microorganismes, les internalisent puis les détruisent. Ces cellules sont très actives car elles répondent aux signaux cellulaires et hormonaux et participent à une grande variété de réactions physiologiques et pathologiques (Unanue & Allen, 1987). Comme elles utilisent des systèmes de reconnaissance primitifs, non spécifiques qui leur permettent de s'attacher à des produits microbiens très divers, elles sont responsables des réponses immunitaires naturelles. Elles représentent, en fait, la première ligne de défense des infections (Roitt et al., 1997). Les macrophages interviennent comme première ligne de défense non spécifique en phagocytant les microorganismes et en libérant des cytokines. Ils jouent le rôle de cellule présentatrice d'antigène (CPA) (Unanue, 1984). Ce sont aussi des cellules effectrices susceptibles d'être activées par les lymphokines libérées par les cellules T stimulées par l'antigène.

Un deuxième groupe important de leucocytes est constitué par les lymphocytes. Les lymphocytes sont responsables de la reconnaissance spécifique des micro-organismes, de sorte qu'ils engendrent des réponses immunitaires adaptatives. Tous les lymphocytes sont dérivés de cellules souches de la moelle osseuse, mais on distingue les lymphocytes T, qui se différencient dans le thymus, et les lymphocytes B, qui se différencient dans la moelle osseuse (chez les mammifères adultes) (Roitt et al., 1997). Les lymphocytes T jouent un rôle clé dans le système immunitaire, en orchestrant les mécanismes de défense de l'hôte, en relâchant différents produits dans le système tels que des interleukines et de l'interféron-gamma. Un dysfonctionnement des lymphocytes est considéré être un facteur d'une déficience du système immunitaire (Unoshima et al., 2001).

1.2 Les métaux lourds

Les métaux lourds présents dans l'environnement peuvent altérer les fonctions immunitaires et en particulier celles des lymphocytes (Schuppe et al., 1998;Goyer, 2001). Les lymphocytes mis en présence de différents métaux, peuvent se comporter différemment selon le type de métal, la dose (Tsangaris & Tzortzatou-Stathopoulou, 1998) et l'espèce animale étudiée: de fortes concentrations de plomb et de cadmium ont des effets immunosuppresseifs sur la réponse des anticorps tandis que de faibles doses augmentent cette même réponse chez les souris adultes et les lapins (Borella & Giardino, 1991).

Le type de métal est aussi à prendre en considération. Des analyses *in vitro* de la toxicité des métaux sur la réponse immunitaire humorale classifient les métaux comme suit : Hg>Cu>Cd>Co>Cr>Mn>Zn>Sn démontrant hors de tout doute que le mercure est le métal le plus toxique pour le système immunitaire (Lawrence, 1985).

1.2.1 Le mercure

Le mercure possède 3 formes chimiques: le mercure élémentaire (Hg), le mercure inorganique (HgCl₂) et le mercure organique (MeHgCl). Il est très largement répandu dans l'environnement mais sa principale source est le dégazage naturel de la croûte terrestre, incluant les masses terrestres, les rivières et les océans (Zelikoff & Thomas, 1998;Goyer, 2001). Cette source est estimée à produire entre 2700 et 6000

tonnes par année de mercure (Goyer, 2001). Les niveaux en mercure peuvent aussi augmenter, conséquence des rejets des déchets des secteurs industriels, médicaux et scientifiques. De plus, les vapeurs de mercure larguées par les amalgames (plombages dentaires) peuvent être une source majeure de présence de mercure inorganique chez l'humain (Zelikoff & Thomas, 1998). Les reins possèdent les plus fortes concentrations en mercure après une exposition au mercure inorganique ainsi qu'aux vapeurs de mercure tandis que le cerveau, en particulier, le cortex postérieur a une plus grande affinité pour le mercure organique (Goyer, 2001). Il a été démontré dans certaines expériences chez les animaux (rats et souris) et chez l'humain qu'une exposition aux mercures organiques et/ou inorganiques entraîne l'activation du système immunitaire menant à des effets néfastes comme des réactions allergiques (augmentation des IgE dans le sérum) et des maladies auto-immunes (activation polyclonale des lymphocytes B sous contrôle des lymphocytes auxiliaires CD4⁺) (Lawrence, 1981;Dieter et al., 1983;Pelletier et al., 1994;Dantas & Queiroz, 1997). De plus, les différentes formes de mercure reconnues pour être cytotoxiques peuvent contribuer à développer des infections récurrentes et/ou chroniques (Aten et al., 1995;Osorio et al., 1995;Koropatnick & Zalups, 1997).

Les surdoses de mercure entraînent aussi des empoisonnements. Le cas le plus connu d'empoisonnement par le méthylmercure a été découvert en 1956 dans des localités de la baie de Minamata, au Japon, où le mercure rejeté par une usine de produits chimiques s'était accumulé dans le poisson. Les milliers de personnes qui vivaient dans la région et mangeaient du poisson et des crustacés de la baie ont commencé à avoir des symptômes de ce qu'on a appelé la maladie de Minamata. Les symptômes de ce trouble, qui s'attaque au système nerveux et au cerveau, incluent l'engourdissement des membres et de la région péribuccale, la faiblesse musculaire, une démarche instable, une vision tubulaire, l'empâtement de la parole, la perte de l'ouïe et un comportement anormal (Gochfeld, 2003;Davidson et al., 2004).

Lorsque nous voulons évaluer la toxicité du mercure ainsi que son potentiel d'altérer les fonctions immunitaires, nous devons prendre en considération la source de mercure, la voie d'exposition, sa bio-disponibilité, sa distribution à travers

l'organisme, son métabolisme et ses modes d'action (Shenker et al., 1999; Sweet & Zelikoff, 2001).

1.2.1A Méthylmercure (MeHgCl), forme organique

Lorsque le mercure est rejeté dans les cours d'eau, les lacs et d'autres environnements aquatiques, des bactéries peuvent le transformer en sa forme organique très toxique: le méthylmercure. Sous cette forme, il peut-être absorbé par la faune aquatique (poissons, mammifères marins), qui en augmente la concentration (bio-accumulation) à mesure qu'il monte dans la chaîne alimentaire jusqu'aux poissons et ensuite aux êtres humains (Jannalagadda & Prasada Rao, 1993; Thompson et al., 1998). Les niveaux environnementaux de méthylmercure dépendent donc de l'équilibre entre la méthylation et la déméthylation par les bactéries (Jannalagadda & Prasada Rao, 1993).

Tous les composés de mercure sont capables de franchir la barrière placentaire mais la forme organique traverse plus librement que la forme inorganique. La haute solubilité lipidique du mercure organique fait en sorte qu'il diffuse plus aisément à travers les membranes (Wild et al., 1997). On associe les effets toxiques du méthylmercure en premier sur son organe cible le cerveau mais ses effets toxiques ont aussi des répercussions sur d'autres organes tels les reins, les poumons, le cœur, les intestins et les yeux chez les adultes exposés (Thompson et al., 1998). Dans les différentes études précédentes, on a observé qu'une exposition par voie orale au mercure organique chez les lapins diminuait significativement les titres des anticorps à la suite d'inoculation par des virus. Une exposition prolongée au méthylmercure affectait aussi la sensibilité des souris Webster à des virus. Les niveaux d'IgG, d'IgG1 et d'IgE dans le sérum de souris étaient aussi augmentés chez les souris exposées au méthylmercure (Wild et al., 1997). On a aussi noté une diminution du poids du thymus et une diminution du nombre de cellule dans le thymus, une diminution de la réponse lymphocytaire en présence de Con A (lymphocytes T) et de LPS (lymphocytes B) et une diminution de la réponse des cellules NK (natural killer cells) (Thompson et al., 1998). Par contre, on a noté une augmentation de la prolifération des lymphocytes T chez les rats Sprague-Dawley après 8 semaines d'exposition orale et, par la suite, une diminution après 16 semaines d'exposition continue au méthylmercure contenu dans l'eau que l'on donnait à boire

(Wild et al., 1997). On a aussi remarqué que dépendamment du genre et de l'espèce, le méthylmercure peut s'avérer plus ou moins toxique. Les souris mâles Balb/C seraient plus sensibles au mercure organique (MeHgCl) que les souris mâles C57Bl/6 et les souris femelles C57Bl/6 seraient plus sensibles que les souris mâles de cette même espèce (Thompson et al., 1998). Le mercure organique a aussi le potentiel de modifier la structure des organes lymphoïdes: il augmente le poids du thymus et de la rate et provoque aussi des changements dans la cellularité (Wild et al., 1997).

Le méthylmercure se lie aux groupements sulfhydryls (SH) dans les tissus comme les reins, les poumons, le cœur, les intestins et les yeux d'humains exposés; l'accumulation de mercure organique dans ces tissus est reliée à la concentration de glutathion (GSH) dans ces mêmes tissus. Les niveaux élevés de GSH protégeraient donc la cellule contre les effets toxiques du mercure organique *in vitro*.

Des études antérieures ont démontré que la réponse de la prolifération lymphocytaire était directement corrélée avec le taux de GSH. Le contenu en GSH était plus abondant dans les sous populations CD4/CD8 de cellules de rates qui sont en prédominance des lymphocytes B. Ceci indique donc une toxicité plus marquée du MeHgCl pour cette sous population. On a aussi remarqué qu'un changement dans la concentration de GSH intracellulaire affecte aussi le flux calcique dans les lymphocytes T. Une diminution du niveau de GSH entraîne une diminution du calcium intracellulaire et diminue la phosphorylation de la phospholipase C- γ tyrosine. Ceci suggère qu'il se produit un événement au début de la signalisation des cellules T qui est dépendant du glutathion intracellulaire (GSH) qui est lui-même diminué par les effets néfastes du mercure organique (Thompson et al., 1998). Le MeHgCl réduirait la concentration de GSH et diminuerait l'activité de l'enzyme glutathion S-transférase, cette diminution de GSH entraînerait une perte du potentiel de membrane mitochondriale et par conséquent une production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) (Shenker et al., 1999).

1.2.1B Chlorure de mercure (HgCl₂), forme inorganique

Cette forme de mercure est aussi largement répandue dans l'environnement découlant principalement d'usages industriels ou faisant partie d'amalgame dentaire (Shenker et al., 1992). Elle est la deuxième forme la plus toxique de mercure (fig 1a). Les composés inorganiques de mercure ne franchissent pas aisément la barrière

hémato-encéphalique et la barrière placentaire, mais s'accumulent dans les reins provoquant quelquefois des insuffisances rénales. Le mercure inorganique induit aussi des lésions gastro-intestinales. Hautement irritant, il peut provoquer des cloques et des ulcères sur les lèvres et la langue. Les éruptions cutanées, la transpiration excessive, l'irritabilité, la fibrillation musculaire, la faiblesse et l'hypertension artérielle sont autant de symptômes de l'exposition à des niveaux élevés de composés inorganique du mercure (Santé Canada, 2004). Le chlorure de mercure peut causer des maladies auto-immunes et induire la synthèse d'IgE qui joue un rôle primordial dans la manifestation d'allergies. Cette immunomodulation par le HgCl_2 a été démontrée, chez les rongeurs, par l'augmentation de la sécrétion d'IL-4 par les mastocytes qui provoquent le développement de lymphocytes TH2 (sous-population de T CD4^+). Le relargage de l'histamine varie en fonction de la concentration de mercure retrouvée dans le milieu dans les expériences faites *in vitro* avec des basophiles provenant de sang humain (Strenzke et al., 2001). L'histamine est un médiateur chimique libéré par les basophiles et les mastocytes lors de la dégranulation qui peut-être responsable des symptômes de l'allergie (Roitt et al., 1997). Une étude a démontré que les lymphocytes T ont proliféré après une exposition de $30\mu\text{M}$ au mercure inorganique après 5 à 6 jours (Zelikoff & Thomas, 1998), tandis que d'autres chercheurs ont observé une diminution de la stimulation des lymphocytes *in vitro* en présence de PHA et Con A lorsque les cellules sont exposées au mercure inorganique (Sharma & Dugyala, 1996). Des expériences antérieures utilisant une lignée cellulaire de cellules transfectées (NIH 3T3), ont démontré que les ions Hg^{2+} ont formé des complexes très stables non seulement avec les groupements sulfhydryles (SH) des protéines mais aussi avec des molécules de faibles poids moléculaires comme le glutathion (GSH) et les métallothionéines (MTs). Ce qui fait qu'une exposition au Hg^{2+} , mais à de faibles concentrations ($0.1\text{-}5\mu\text{M}$), augmente la concentration cellulaire de GSH et induit la synthèse de MTs. Cependant, des doses plus élevées de HgCl_2 ($10\text{-}1000\mu\text{M}$) diminuent la quantité de GSH (qui est un important éliminateur des radicaux libres) provoquant l'oxydation du milieu. La synthèse des MTs a été induite mais cette induction a pris un certain temps

et les MTs ne se sont pas liées assez rapidement pour freiner les effets nocifs et toxiques du HgCl_2 *in vitro* (Schurz et al., 2000).

On a aussi remarqué que des formes chimiques différentes de mercure peuvent aussi avoir différents effets sur le système immunitaire. Le sulfure de méthylmercure semble avoir des effets très différents sur le système immunitaire que la forme chlorée. En effet, le sulfure de méthylmercure affecte seulement le poids du thymus et n'a pas d'effet sur l'activité des cellules NK (Natural killer cells) (Wild et al., 1997). Par contre le méthylmercure chloré augmente la prolifération lymphocytaire tandis que la forme sulfureuse la diminue (Thompson et al., 1998).

Lorsque nous voulons étudier les effets du mercure sur le système immunitaire, nous devons vraiment prendre en considération, la forme de mercure, le genre d'exposition, la durée de l'exposition, l'espèce animale étudiée et le sexe de l'animal.

Le mercure sous ses deux formes (organique et inorganique) déclenche des réactions en cascade qui finissent par l'apoptose des cellules. Des recherches précédentes sur la voie apoptotique des cellules lymphoïdes humaines ont démontré que les deux formes de mercure (organique et inorganique) sont des inducteurs d'apoptose mais par des mécanismes très différents. Le processus d'apoptose est régulé par des changements progressifs au niveau cellulaire. Un de ces changements majeurs est la perte d'intégrité de la membrane cellulaire entraînant une perte du potentiel trans-membranaire mitochondrial, la génération des espèces réactives de l'oxygène (EROs) et un relâchement du cytochrome *c* du cytosol. Dans les études antérieures, il a été démontré que le méthylmercure augmente la présence du cytochrome *c* dans le cytosol après 8 heures d'exposition, tandis que le chlorure de mercure n'affecte en rien son niveau. Une explication possible a été que le relâchement du cytochrome *c* est stabilisé par certaines protéines anti-apoptotiques qui contrôlent les pores mitochondriaux dont la Bcl-2. On a retrouvé des niveaux de Bcl-2 beaucoup plus élevés dans les lymphocytes T exposés au HgCl_2 ce qui fait penser que ce métal pourrait auto-réguler cette protéine et par le fait même diminuer le phénomène d'apoptose (Shenker et al., 2000).

1.2.2 Le cadmium

Le cadmium, métal blanc argenté, est un contaminant environnemental très envahissant. La source primaire d'exposition de la population est par l'eau potable contaminée, la nourriture (viande, poisson, fruits) (Leffel et al., 2003) et la fumée de cigarette (Goyer, 2001; Misra et al., 2002). Les concentrations en cadmium ont été fortement augmentées dues à l'industrialisation (exploitation minière et extraction par fusion) (Misra et al., 2002) et aux pratiques intenses de l'agriculture (Foulkes, 2000).

Aux États-Unis, la nourriture peut contenir des concentrations en cadmium variant de 2 à 40 ppb, tandis que la fumée de cigarette atteint des niveaux de 1000 à 3000 ppb. Les poumons sont les organes cibles du cadmium lors d'une toxicité aiguë tandis que les reins et les os sont les cibles lors d'une exposition prolongée. Le cadmium influence l'homéostasie des systèmes en particulier le système immunitaire en développant des effets toxiques sur les reins, sur le système reproducteur, endocrinien et en influençant le développement de maladies cancéreuses et tératogènes (Fels et al., 1994; Coles et al., 1995). Les formes les plus solubles de cadmium sont généralement les plus toxiques. Parmi celles-là, le chlorure de cadmium est la forme la plus soluble et donc par-dessus tout la plus toxique (Zelikoff & Thomas, 1998). À cause de ces effets toxiques, le cadmium est associé avec les risques élevés de cancers, comme celui des poumons et de la prostate (Misra et al., 2002). Le cadmium tend à s'accumuler dans les viscères spécialement dans le foie et les reins (Tsangaris & Tzortzatou-Stathopoulou, 1998) où les plus fortes concentrations sont généralement retrouvées dans les organismes âgés (Jannalagadda & Prasada Rao, 1993).

Un cas d'empoisonnement chronique a été rapporté dû à l'ingestion chronique de cadmium. Cette maladie appelée itai-itai a été observée en premier lieu au Japon. La rivière Jinzu servant d'eau de consommation et à l'agriculture, dont la culture du riz, a été contaminée pendant de nombreuses années, par les déchets provenant de minerais de zinc, de cuivre et de plomb dans lesquels il y avait de fortes concentrations en cadmium. Des gens buvant cette eau et consommant du riz ont été ainsi contaminés par le cadmium et ont souffert de symptômes très douloureux comme des douleurs lombaires et musculaires, des fractures spontanées

accompagnées de déformation osseuse (El Azzouzi et al., 1994). Des études antérieures ont aussi démontré que la prise de suppléments de zinc et de calcium pouvait jouer un rôle important dans l'absorption du cadmium au niveau des intestins. Un apport journalier en zinc induit la biosynthèse des métallothionéines (MTs) qui lient le cadmium dans les cellules intestinales diminuant ainsi sa toxicité (Jannalagadda & Prasada Rao, 1993).

Plusieurs études sur le cadmium et ses effets sur le système immunitaire ont été réalisées dans le passé avec les animaux et plus spécifiquement avec les rongeurs. Plusieurs des résultats obtenus apparaissent souvent contradictoires quoiqu'il est clair que le cadmium module les réponses immunitaires que ce soit au niveau de la réponse immunitaire humorale (lymphocytes B) ou à médiation cellulaire (lymphocytes T) (Descotes, 1992). Les réponses humorales semblent augmentées ou non affectées par des doses faibles d'exposition aiguë au cadmium tandis qu'inversement la production d'anticorps est supprimée chez les animaux exposés à des doses modérées ou fortes en cadmium (Descotes, 1992; Zelikoff & Thomas, 1998). L'immunité à médiation cellulaire est soit augmentée ou supprimée par le cadmium, dépendant des indices mesurés. Il en va de même pour l'immunité non spécifique qui démontre aussi beaucoup de variations dans les réponses immunologiques suivant une exposition au cadmium (Zelikoff & Thomas, 1998). On a aussi déterminé que si les résultats sont si conflictuels cela dépend de la voie d'exposition du cadmium ainsi que de la dose administrée (Leffel et al., 2003).

Des exemples d'études comme cette étude *in vitro* qui a démontré qu'une exposition au cadmium à des concentrations de 10^{-1} à 10^{-8} M pendant une heure a réduit significativement la phagocytose des macrophages péritonéaux. Après 20 heures d'exposition, l'activité phagocytaire est revenue à la normale. La flambée oxydative par ces mêmes macrophages a aussi été diminuée suivant l'exposition au cadmium pendant 15 minutes. Le cadmium a inhibé la consommation d'oxygène, le métabolisme du glucose et le relâchement des espèces réactives de l'oxygène (EROs) lesquels ont inhibé l'activité antibactérienne dans les macrophages alvéolaires. Cependant le métabolisme oxydatif des macrophages péritonéaux a été augmenté lorsque ces cellules ont été exposées au cadmium (10^{-4} à 10^{-8} M) pour une heure. Une

exposition au cadmium a aussi altéré la mobilité des macrophages, la sensibilité des cytokines ainsi que l'activité cytotoxique (Zelikoff & Thomas, 1998).

Les réponses engendrées par les lymphocytes varient en fonction des doses de cadmium utilisées. Il a été observé une stimulation à des faibles doses et une suppression à des doses plus élevées (Krocova et al., 2000). Dans les études *in vivo* et *in vitro*, il a été démontré que des faibles concentrations en cadmium augmentent légèrement les réponses humorales tandis que les fortes doses sont immunosuppressives (Lawrence, 1981; Ohsawa et al., 1986; Otsuka & Ohsawa, 1991). Le cadmium diminue les titres des anticorps, les plages de lyse ainsi que la mémoire immunologique (Koller, 1982). Au niveau cellulaire, il inhibe la synthèse de l'ADN et de l'ARN des lymphocytes B chez la souris. Il provoque l'arrêt du cycle cellulaire des lymphocytes B et de l'expression des antigènes de surface (Daum et al., 1993). Le cadmium interfère avec les réponses immunitaires en supprimant la prolifération des lymphocytes (Wayland et al., 2002), il inhibe l'activité des cellules NK (Sgagias et al., 1989) et des macrophages (Burchiel et al., 1987), abolissant ainsi les défenses naturelles. Le cadmium induit l'apoptose dans plusieurs types cellulaires (lymphocytes T, B hépatocytes...) (Tsangaris & Tzortzatou-Stathopoulou, 1998; Shen et al., 2001).

L'accumulation de cadmium dans les reins sans effet toxique apparent est rendue possible grâce à la formation de cadmium-thionéine ou métallothionéine (MT), un complexe métal-protéine de faible poids moléculaire (~ 6500) (Goyer, 2001). L'induction de MTs, dans une lignée de cellules provenant de cellules rénales humaines, a été démontrée après une exposition au cadmium. En effet, l'induction de MTs provenant de la lignée cellulaire LCPK₁ s'est produite seulement après 6 heures d'exposition au cadmium. Ce qui fait dire à plusieurs chercheurs que les dommages faits aux reins par le cadmium sont souvent influencés par le niveau de MTs intracellulaires ainsi que par les concentrations des autres composés thiols dont le glutathion (GSH) qui sont eux-mêmes très variés d'un individu à un autre (Rodilla et al., 1998). Les MTs seraient aussi induites de façon très variée dans les leucocytes humains suivant une exposition au cadmium. D'après certaines études, les monocytes seraient les plus sensibles au cadmium et induiraient le plus de MTs, les lymphocytes seraient aussi sensibles à ce métal et déclencheraient la production de

MTs mais à un degré moindre que les monocytes tandis que les granulocytes demeureraient insensibles au traitement avec le cadmium (Yurkow & DeCoste, 1999). Ce déclenchement aussi varié de MTs dans les différentes populations cellulaires affecte aussi la toxicité du cadmium face à ces cellules. L'expression de MTs dans les cellules éloigne aussi la mort cellulaire programmée de ces cellules : l'apoptose. Une étude réalisée sur des lignées cellulaires mises en présence de cadmium démontrait des concentrations très variables de cadmium nécessaires pour induire l'apoptose dans ces cellules suggérant que la dose mortelle de cadmium était liée au nombre de transcriptions de MTs intracellulaires pour chacune de ces lignées (Tsangaris & Tzortzatos-Stathopoulou, 1998).

1.2.3 Le zinc

Le zinc est reconnu pour jouer un rôle central dans le système immunitaire (Shankar & Prasad, 1998). C'est un élément essentiel au bon maintien de la fonction immunitaire (Unoshima et al., 2001). Il est omniprésent dans plusieurs aliments, en particulier, les fruits de mer, la viande, les graines, les produits laitiers, les noix et les légumes, dans l'eau et dans l'air. L'apport quotidien en zinc d'un Américain peut varier entre 12 et 15 mg, la plupart venant de la nourriture (Goyer, 2001). Des études sur les animaux en 1930, les premières documentées, ont rapporté la nécessité du zinc pour la survie et le développement animal. Malheureusement, ce n'est que vers 1960 que les travaux de Prasad sur l'importance du zinc dans les populations furent appréciés. Depuis ce temps on sait que le zinc exerce des effets omniprésents sur le système immunitaire, sur la résistance à la maladie et sur la santé en général (Shankar & Prasad, 1998). Le corps humain contient entre 2 et 4 grammes de zinc mais dans le plasma sa concentration est seulement entre 12 et 16 $\mu\text{mol/L}$. Bien que la concentration plasmatique est très infime, le zinc est très mobile et immunologiquement très important. Dans le sérum, il est majoritairement lié à des protéines en prédominance l'albumine, l' α_2 -macroglobuline et la transferrine, mais seulement, les ions de zinc libres semblent biologiquement actifs (Ibs & Rink, 2003; Tapiero & Tew, 2003). Plus de 200 métalloenzymes requièrent la présence de zinc comme co-facteur (Shankar & Prasad, 1998) car il est essentiel pour les facteurs de transcription et de réplication (Ibs & Rink, 2003). Le zinc modifie la composition de

l' α 2-macroglobuline et augmente ses interactions avec les cytokines et les protéases qui indirectement influencent les fonctions immunitaires (Tapiero & Tew, 2003). Le zinc joue un rôle fonctionnel et structural dans plusieurs protéines impliquées dans la réplication et la transcription inverse de l'ADN (Mocchegiani et al., 2000).

Le zinc protège les structures biologiques contre les radicaux libres en maintenant un niveau adéquat de MTs, en étant un composé essentiel de la superoxyde dismutase (SOD), en étant un agent protecteur pour les thiols et en prévenant les interactions entre des groupes chimiques et le fer pour former des radicaux libres (Tapiero & Tew, 2003). Une déficience en zinc entraîne un large éventail d'effets cliniques. Une déficience sévère en zinc est caractérisée par une fonction immunitaire fortement supprimée qui entraîne des infections fréquentes, des dermatites, de la diarrhée, perte des cheveux et des troubles mentaux (Kay & Tasman-Jones, 1975; Walsh et al., 1994).

Les fonctions de l'immunité naturelle sont altérées par des changements dans les concentrations en zinc. *In vitro* ces changements se traduisent par une activité homéostatique perturbée dans les granulocytes tandis qu'*in vivo*, l'activité des cellules NK, la phagocytose produite par les macrophages et la flambée oxydative produite par les neutrophiles sont aussi affectées par une diminution des niveaux de zinc (Allen et al., 1983; Keen & Gershwin, 1990; Vallee & Falchuk, 1993).

Une déficience en zinc augmente la fragilité osmotique des globules rouges, diminue l'homéostasie cellulaire, le nombre de cellule-T et la réponse des cellules T aux mitogènes provenant des plantes. En fait, le zinc est considéré comme un mitogène naturel pour la prolifération des lymphocytes T (Tapiero & Tew, 2003). Une déficience en zinc entraîne aussi une atrophie du thymus, l'organe central des lymphocytes en développement (Shankar & Prasad, 1998).

Par contre une surdose a entraîné une immunostimulation des lymphocytes T et des macrophages chez la souris. Un supplément de zinc améliore la réponse immunitaire en modulant la production de cytokines (Unoshima et al., 2001).

1.2.4 Le sélénium

Le sélénium (Se) est un élément trace retrouvé dans la nourriture, en particulier les céréales, les grains, les légumes (Tapiero et al., 2003), les fruits de mer, en particulier, les crevettes, la viande, ainsi que les produits laitiers (Goyer,

2001). La dose quotidienne recommandée est d'environ 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ du poids corporel. Les formes alimentaires du sélénium sont variables selon les espèces de plantes ou la nature des protéines animales ingérées. On retrouve aussi du sélénium en quantité variable dans les sols et les sédiments des différentes régions à travers le monde, ce qui affecte beaucoup le niveau de Se chez les animaux ainsi que chez les humains qui consomment les produits locaux (Arthur et al., 2003). La teneur en sélénium dans les plantes peut varier selon que le sol est riche ou pas de cet élément (Tapiero et al., 2003). La disponibilité du Se, ainsi que ses composés, est reliée à leur forme chimique ainsi qu'à leur solubilité. On retrouve le sélénium dans la nature et dans les systèmes biologiques sous forme de sélérate (Se^{6+}), de sélénite (Se^{4+}), de sélénium élémentaire (Se^0) et séléride (Se^{2-}). Les sélérates sont relativement solubles, tandis que les sélénites et le Se élémentaire sont très peu solubles (Goyer, 2001). Le sélénium est converti par les plantes en Se-méthionine qui représente un taux supérieur de 50% de tout le Se contenu dans les plantes, tandis que la sélélocystine (Se-Cys), la méthyl-sélénium-cystine (méthyl-Se-Cys) et la γ -glutamyl-Se-méthyl-Cys représentent des quantités négligeables de Se (Tapiero et al., 2003). Le sélénium est distribué dans tous les organes mais s'accumule principalement dans le foie, les reins, le sang, le cerveau, le muscle cardiaque, la peau et les testicules. En cas d'intoxication, il s'accumule dans les reins beaucoup plus que dans le foie. Il se trouve dans les ongles et les cheveux en cas d'administration prolongée.

En pathologie humaine, il y a peu d'intoxication au Se, par contre les carences sont fréquentes. Un exemple frappant de la carence en sélénium est la maladie de Keshan, qui affecte les résidents de la république de Chine, chez les enfants de moins de 15 ans ainsi que les femmes en âge de procréer. Cette maladie est caractérisée par une insuffisance cardiaque sévère, une dégénération des fibres du myocarde et leur remplacement par de la fibrose ainsi que des cicatrices (Yang et al., 1983;Goyer, 2001).

La toxicité environnementale du Se chez les humains est rare. Cependant lorsque ces effets sont présents, ils peuvent causer de l'anémie hypochromique et une leucopénie. On a rapporté aussi des cas d'intoxication aiguë et subaiguë d'empoisonnement chez l'humain lors de l'ingestion accidentelle d'acide séléni-

(30g/L) ou de comprimés vitaminiques renfermant des fortes concentrations en sélénium. Ces ingestions de fortes doses en Se provoquent des troubles gastro-intestinaux (vomissements, diarrhée), des changements capillaires, au niveau des ongles, des manifestations neurologiques incluant l'acroparesthésie (douleur sous forme de brûlures, de picotements affectant surtout les mains et les pieds), de faiblesses, de convulsions et une diminution des fonctions cognitives (Tinggi, 2003). Contrairement aux autres métaux qui diminuent les fonctions du système immunitaire, le sélénium a le pouvoir de stimuler les fonctions des cellules immunitaires plutôt que de les supprimer (Koller, 1980).

Les effets antioxydants du Se seraient médiatisés par l'enzyme glutathion-peroxydase qui est localisée dans le cytosol et la matrice mitochondriale des cellules où elle exerce un rôle fondamental dans la réduction et l'inactivation du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes lipidiques. En tout 5 de ces peroxydases ont été identifiées comme opérant dans différents tissus et cellules (Arthur et al., 2003).

Plusieurs études ont démontré qu'une déficience en sélénium est accompagnée d'une diminution de la compétence des cellules immunitaires. L'immunité à médiation cellulaire, qui comprend entre autres les lymphocytes T et la fonction des cellules B (lymphocytes B), serait altérée. Par contre en supplémentant les individus en sélénium, il a été observé des effets immunostimulants tels qu'une augmentation de la prolifération des lymphocytes T en réponse à une stimulation antigénique, de par le fait même une augmentation des lymphocytes T cytotoxiques et une diminution des cellules cancéreuses. Les cellules NK (Natural Killer Cells) seraient aussi augmentées. La prise de suppléments de Se a en effet augmenté de 118% les lymphocytes T-cytotoxiques et de 82% les cellules NK. Le mécanisme semble de très près lié à la facilité du Se de régulariser à la hausse l'expression des récepteurs de l'interleukine-2 (IL-2) à la surface des lymphocytes activés et des cellules NK facilitant leur interaction avec l'IL-2. Cette interaction est cruciale pour l'expansion clonale et la différenciation dans les lymphocytes T-cytotoxiques (Rayman, 2000). Des lymphocytes déficients en Se vont proliférer moins bien en réponse à un mitogène tandis que dans les macrophages, la synthèse des leucotriènes B4 va aussi être perturbée par une déficience en sélénium. La réponse humorale est aussi affectée par une diminution (chez les rats) d'IgM, d'IgG et d'IgA et chez

l'humain par une diminution d'IgM suivant une déficience en sélénium (Arthur et al., 2003).

Basé sur des expériences animales, le sélénium provoquerait des effets tératogènes, une perte de fertilité et des problèmes congénitaux (Hogberg & Alexander, 1986), quoiqu'il ait un effet protecteur contre les agents cancérogènes. Il serait un antidote des effets toxiques des métaux en particulier le cadmium, le mercure, le cuivre et le thallium (Luster et al., 1987; Wang et al., 2001). Des études suggèrent que le sélénium pourrait jouer un rôle de protection des mammifères marins contre leur intoxication au mercure (Burk et al., 1977; Lindh et al., 1996; Wang et al., 2001). Le Se est un élément essentiel qui peut prévenir la nécrose du foie dans une déficience en vitamine E (Tinggi, 2003). Il a été identifié comme un important composé de l'enzyme glutathion peroxidase laquelle est importante dans les mécanismes de défense contre l'oxydation cellulaire par les espèces réactives de l'oxygène (EROs) (Mueller et al., 2003; Tapiero et al., 2003; Tinggi, 2003).

Malgré toute l'immense recherche qui se fait sur la toxicité du sélénium chez l'animal et l'humain, les modes d'action des niveaux de sélénium moléculaire et cellulaire ne sont pas tous bien compris. Par contre, on sait que la toxicité du sélénium ne dépend pas seulement de la forme et de la quantité ingérées mais aussi d'une multitude d'autres facteurs tels que l'espèce, l'âge, l'état physiologique, les interactions entre les aliments et la voie d'administration (Tinggi, 2003).

1.3 Activation des lymphocytes et thiols intracellulaires

Au cours des réponses immunitaires, une activation des cellules T (et B et CPA) survient à différents endroits et à des moments différents. L'activation des lymphocytes conduit à leur prolifération et à leur différenciation en cellules effectrices. Les mitogènes (dont la Con A) sont une catégorie de molécules qui activent les cellules B et T de façon non spécifique de l'antigène. La plupart des cellules T peuvent être stimulées par la phytohémagglutinine (PHA) extraite du haricot rouge, et la concanavaline A (Con A) extraite d'un autre haricot. Ces lectines végétales multivalentes se lient à des résidus oligosaccharidiques des glycoprotéines membranaires impliquées dans l'activation des cellules T, par exemple le TCR et le

CD2. La stimulation par le mitogène entraîne alors une activation du lymphocyte qui se transforme en lymphoblaste. Cette activation prends environ 18 heures, par la suite le lymphoblaste entreprend une expansion clonale par la répétition de sa division, suivie par la différenciation des nouvelles cellules en cellules effectrices (Hamilos et al., 1991; Janeway et al., 1997; Roitt et al., 1997). En pré-activant les lymphocytes avec la Con A, nous les faisons progresser de la phase G0 vers la phase G1 du cycle cellulaire. Cette progression est caractérisée par l'expression du récepteur de l'IL-2, par la production d'IL-2 et quelques synthèses d'ARN. En pré-activant les lymphocytes avec la Con A, nous augmentons aussi leur contenu en thiols intracellulaires, dont le plus abondant est le glutathion (GSH). Des études antérieures ont démontrées que le glutathion est essentiel à la prolifération des lymphocytes, car une diminution en GSH entraîne une profonde inhibition de cette prolifération (Hamilos et al., 1991).

La pré-activation de nos cellules ainsi que la présence de métaux lourds dans les milieux de culture ont induit la production de thiols intracellulaires (cystéines, glutathion, métallothionéines). Les thiols sont aussi connus pour jouer un rôle essentiel dans l'activation et la prolifération cellulaire. Les thiols intracellulaires, dont le plus abondant est le glutathion, protègent la cellule contre les effets néfastes des métaux lourds (Hultberg et al., 2001) et des stress oxydatifs qu'ils provoquent. La réponse cellulaire à un stress provoque des changements dans son contenu en thiols et plus particulièrement en glutathion. Le glutathion est un thiol, non protéique, le plus abondant dans les organismes vivants (Dickinson & Forman, 2002a; Dickinson & Forman, 2002b). Il est présent majoritairement à l'état réduit (GSH) dans les cellules; une augmentation de la forme oxydée (GSSG) traduit un stress oxydant (Dickinson & Forman, 2002b). Cependant, ce n'est pas le glutathion qui répond à toutes ces formes d'agression, mais plutôt son enzyme la glutathion-peroxydase (GSH-Px) laquelle est mise en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène (EROs). En effet, le concept selon lequel l'oxygène, molécule indispensable pour la vie aérobie peut entraîner des dommages cellulaires importants par formation de dérivés oxygénés (les radicaux libres) est de mieux en mieux établi. De nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont plus que suggéré le rôle de ces EROs dans le développement de nombreux processus pathologiques comme

l'artériosclérose et la cancérogenèse. Pour se protéger des effets toxiques de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense antioxydants composés d'enzymes comme la glutathion peroxydase. En situation physiologique, ces systèmes antioxydants ont la capacité de réguler parfaitement la production des EROs. Un stress oxydant surviendra lorsqu'il y aura un déséquilibre dans cette balance pro-oxydants/ anti-oxydants en faveur des EROs (De La Fuente et al., 2002). Une exposition aux EROs ou aux composés qui génèrent des EROs (métaux lourds) peut augmenter le contenu intracellulaire en glutathion en augmentant le taux de synthèse de celui-ci (Dickinson & Forman, 2002a).

Plusieurs conditions différentes sont reconnues pour provoquer des changements intracellulaires en GSH. Ceci inclut la présence de métaux lourds, de fortes concentrations en glucose ainsi que des chocs thermiques (Dickinson & Forman, 2002b). Dans la cellule, le glutathion forme des conjugués avec une grande variété de composés électrophiles via l'action de la glutathion S-transférase (GST). Le glutathion ainsi conjugué est alors excrété de la cellule (Dickinson & Forman, 2002a). Le glutathion, considéré comme un important co-facteur de l'activation et de la prolifération des lymphocytes, est aussi reconnu pour réguler l'expression des gènes ainsi que l'induction d'apoptose dans les lymphocytes T (Hamilos et al., 1991; Zurgil et al., 1999; Knight, 2000).

Le glutathion forme des complexes avec plusieurs métaux lourds et peut protéger la cellule contre la toxicité des métaux. Il est aussi connu que la diminution du glutathion cellulaire augmente la toxicité des métaux. Le métabolisme du glutathion semble aussi différer dépendamment des métaux. Les ions de cuivre font voir principalement des effets très différents de ceux du mercure et du cadmium (Hultberg et al., 1998).

Outre son rôle d'antioxydant, le GSH est impliqué pour jouer un rôle important dans l'initiation et la progression de l'activation cellulaire dans la population lymphocytaire. Par contre, une diminution du GSH intracellulaire inhibe l'activation par les mitogènes. Le 2-mercaptoéthanol, qui est un thiol de faible poids moléculaire et une riche source de cystéine peut augmenter aussi le GSH intracellulaire et par le fait même augmenter la prolifération des cellules. Dans une étude précédente, il a été déterminé que les changements dans le contenu

intracellulaire en GSH peuvent altérer l'activation et la prolifération cellulaire (Fidelus et al., 1987). Lorsqu'une cellule est activée par une lectine ou un antigène, plusieurs réactions biochimiques interviennent à l'intérieur de celle-ci que ce soit les processus de transport membranaire, la synthèse des protéines, la synthèse de l'ADN et de l'ARN : tous ces phénomènes augmentent l'activité dans les cellules activées. Une augmentation des thiols intracellulaires et par conséquent une résistance accrue aux métaux lourds a aussi été observé chez des lymphocytes stimulés avec la phytohémagglutinine (PHA) (Lawrence et al., 1996).

1.4 Apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire programmée procédant par différentes phases soit une phase d'induction, une phase de régulation et une phase effectrice. Différente de la nécrose, cette mort cellulaire est un processus essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire pathologique et physiologique (Saikumar et al., 1999). Les changements détectés au cours de la mort cellulaire par apoptose sont une fragmentation de l'ADN, une rupture du noyau et des altérations de la morphologie de la cellule dont la condensation de la chromatine. La cellule se détruit alors de l'intérieur, se rétractant et se dégradant jusqu'à ce qu'il n'en reste plus rien (Wyllie et al., 1980; Janeway et al., 1997; Shen et al., 2001). L'apoptose des cellules immunitaires peut avoir des conséquences sérieuses sur l'homéostasie et l'immunité cellulaires (Unoshima et al., 2001). Beaucoup de lymphocytes meurent par apoptose dans le thymus lorsqu'ils ne peuvent bénéficier d'une sélection positive ou lorsqu'ils sont négativement sélectionnés après avoir reconnu un antigène du Soi. L'apoptose est aussi le mécanisme majeur qui contrôle la sélection des lymphocytes T, la différenciation et le développement de ceux-ci (Shen et al., 2001).

1.5 Différences entre les lymphocytes et les macrophages

Les macrophages sont très différents des lymphocytes de par leurs fonctions mais aussi morphologiquement. Les macrophages ont un noyau plus petit que les lymphocytes et un espace cytoplasmique plus volumineux (Roitt et al., 1997). Étant

donné leurs cytoplasmes plus volumineux, les macrophages possèdent plus de cystéine et de glutathion que les lymphocytes. (Droge et al., 1995). Les macrophages interviennent comme première ligne de défense non spécifique en phagocytant les microorganismes et en libérant des cytokines. Ils jouent le rôle de cellule présentatrice d'antigène (CPA). Ce sont aussi des cellules effectrices susceptibles d'être activées par les lymphokines libérées par les cellules T stimulées par l'antigène (Roitt et al., 1997). Il a été démontré que les macrophages activés ont la capacité de donner des quantités substantielles de cystéines aux lymphocytes et ainsi d'augmenter par le fait même le glutathion intracellulaire dans les lymphocytes (Droge et al., 1995).

1.6 Hypothèses de travail

Pour faire suite à ces connaissances, les hypothèses de travail pour mon projet de maîtrise étaient que :

- 1- La pré-activation des cellules offre une meilleure protection contre l'action toxique des métaux lourds: les agents mitogéniques, tels que la concanavaleine A, augmentent la résistance des lymphocytes T.
- 2- La pré-activation des cellules augmente le contenu intracellulaire en thiols. Le glutathion, un des thiols les plus abondants, est considéré comme un cofacteur important dans l'activation des lymphocytes (Fidelus et al., 1987).
- 3- Les lymphocytes pré-activés produisent moins de thiols que les macrophages pré-activés.

1.7 Ojectifs de travail:

Pour vérifier ces hypothèses de travail, les objectifs ont été :

- . Évaluer la toxicité des métaux lourds (MeHgCl, HgCl₂, ZnCl₂, CdCl₂, SeCl₄) suite à des expositions *in vitro* avec des lymphocytes.
- . Déterminer l'effet de la pré-activation, avec la concanavaleine A, des lymphocytes sur la courbe de toxicité.

- . Déterminer si l'effet protecteur de la pré-activation est lié à des différences de niveaux intracellulaires en thiols.
- . Mesurer l'indice d'apoptose dans les lymphocytes pré-activés et non pré-activés.
- . Faire une brève comparaison entre les lymphocytes et les macrophages pré-activés et non pré-activés en mesurant leur différence de sensibilité vis-à-vis les 5 métaux à l'étude.

CHAPITRE II

ARTICLE SOUMIS POUR PUBLICATION

L'article "Cellular Response of Mouse Splenocytes to Heavy Metals Exposure" a été soumis et accepté pour publication dans la revue Toxicological and Environmental Chemistry.

La rédaction de cet article a été réalisée conjointement avec Mme Julie De Gagné, étudiante à la maîtrise à l'INRS-IAF, car cet article inclut les résultats des lymphocytes et des macrophages murins. Mme De Gagné a réalisé les expériences et les analyses sur les macrophages tandis que ma contribution consiste à la réalisation complète des expériences portant sur les lymphocytes ainsi qu'à l'analyse des résultats des lymphocytes murins.

Title: Cellular Response of Mouse Splenocytes to Heavy Metals Exposure

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

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, 245 boul. Hymus, Pointe-Claire, Qc, Canada, H9R 1G6.

² Université du Québec à Montréal, TOXEN and Département des sciences biologiques, 1200 St-Alexandre, Montréal, Qc, Canada, H3B 3H5.

*Both authors contributed equally to this study

* To whom all correspondence should be addressed :

Michel Fournier

INRS-Institut Armand-Frappier

245 Hymus Boul. Pointe-Claire,

Québec, Canada, H9R 1G6

Tel: (514) 630-8824

Fax: (514) 630-8850

E-mail: Michel.Fournier@iaf.inrs.ca

Key Words: immunotoxicity, activation, heavy metals, thiols

ABSTRACT

Among environmental contaminants recognised for their toxicity and global presence, heavy metals are certainly a major concern. They can elicit a number of immunomodulatory effects leading ultimately to an enhanced susceptibility (sensitivity) of immune cells to microbial agents and appearance of neoplastic diseases and autoimmune phenomena. Heavy metals also provoke changes in the function(s) of immune cells. A striking biological effect of heavy metals is the induction of intracellular thiols (cysteine, glutathione, metallothioneins). Thiols are involved in many physiological processes, including protection from free radical damage, and detoxification of chemicals. The purpose of this study was to assess the differences of susceptibility (sensitivity) in both pre-activated (concanavalin A was used) and non pre-activated cells in the presence of heavy metals. 5 were evaluated on murine splenocytes. The lymphoblastic proliferation test was performed for lymphocytes and a phagocytosis test for macrophages. Data showed that the levels of thiols in the pre-activated cells are greater than non pre-activated cells following exposure to various heavy metals; macrophages were more resistant than lymphocytes to the toxic effects of heavy metals and pre-activated cells are more resistant than cells at rest. One possible explanation is that macrophages produce more thiols than lymphocytes and this provides increased protection from deleterious effects of heavy metals.

INTRODUCTION

Among environmental contaminants recognized for their toxicity and world-wide presence, heavy metals are certainly a major concern. Certain heavy metals are essential for life in trace amounts but exert toxic effects under certain conditions (e.g. zinc and selenium). Others, for which no biological function has been established, produce toxicity even at very low levels (e.g. mercury and cadmium) (DeMoor & Koropatnick, 2000). Heavy metals are persistent and ubiquitous in the environment and they originate both from natural sources and from human activities. Laboratory research and epidemiological data of human cohorts occupationally exposed to these chemicals indicate that metals affect several physiological systems of the body. Metals modulate the activities of immunocompetent cells by a variety of mechanisms (Lawrence & McCabe, 2002). One mechanism whereby metals alter health is through modulation of immune homeostasis (Zelikoff et al., 1994). Depending on the particular metal, its concentration and biologic availability, and a host of other factors, the outcome of this modulation may be either immunoenhancement or immunosuppression. The general premise and object of concern is that metals, by modulating immunoregulatory activities, may disrupt immune homeostasis, leading to either immunodeficient or autoimmune state (Lawrence & McCabe, 2002). Immunomodulation can change the defence capacity of the immune system against different infectious and tumours, or can promote the development of allergic reactions and/or autoimmune diseases (Institoris et al., 1999). Elemental mercury is disseminated in the environment due to natural events and human activities. In aquatic environments, mercury is primarily converted to methylmercury (MeHg) by microbial action and accumulates in certain species of fish and marine mammals (Thompson et al., 1998; Jannalagadda & Prasada Rao, 1993). Exposure to mercury results mainly from the ingestion of prey contaminated with MeHg (Thompson et al., 1998). Exposure to low concentrations of mercury (in its various chemical forms) can depress or stimulate the immune system and even induce autoimmune disease in various animal species

(Zelikoff & Thomas, 1998). Exposure to both organic and inorganic mercury results in immune activation leading to adverse outcomes related to allergy and autoimmune disease (Lawrence, 1981; Dieter et al., 1983; Pelletier et al., 1994; Dantas & Queiroz, 1997). Mercurial species have been shown to be cytotoxic and to possibly contribute to chronic and/or recurrent infection (Aten et al., 1995; Osorio et al., 1995; Koropatnick & Zalups, 1997).

Cadmium is also ubiquitous in the environment due to natural events and human activities. The industrial uses of Cd^{2+} have increased dramatically in the last several decades and now include nickel/cadmium batteries, electroplating, pigments, and plastic. Cd^{2+} also enters the environment as a result of mining and smelting of various other metals (Misra et al., 2002). For the general population, cadmium exposure occurs primarily through contaminated drinking water, food supplies (Leffel et al., 2003) and cigarette smoking (Misra et al., 2002; Goyer, 2001). Cadmium tends to be accumulated in the viscera of vertebrates, especially the liver and the kidneys (Tsangaris & Tzortzatou-Stathopoulou, 1998). Cadmium may exert toxic effects on organisms, including nephrotoxicity, carcinogenicity, teratogenicity and endocrine and reproductive toxicities, either by direct action on specific body tissues or more generally, by influencing homeostatic mechanisms, such as the immune system (Fels et al., 1994; Coles et al., 1995). Mostly from *in vivo* animal models, cadmium is able to damage both the humoral immune response and cell-mediated immunity (Descotes, 1992). Cadmium toxicity has been implicated in alterations of the immune system which include reduce antibody titers, reduced plaque-forming cell (PFC) numbers, and depressed immunological memory (Koller, 1982). *In vitro* and *in vivo* studies have shown that low concentrations of cadmium slightly enhanced humoral immune responses, whereas, high doses were immunosuppressive (Lawrence, 1981; Ohsawa et al., 1986; Otsuka & Ohsawa, 1991).

Selenium is an essential trace element for animals and humans that is obtained from dietary sources such as cereals, grains and vegetables. The nutritional importance of selenium is thought to be attributable to its function as a component of the active site of the enzyme glutathione peroxidase (GSH-Px)

(Tapiero et al., 2003). Selenium has the potential to produce adverse health effects from both excess and deficiency (Goyer, 2001). Selenium produces loss of fertility and congenital defects and is considered embryotoxic and teratogenic on the basis of animal experiments (Hogberg & Alexander, 1986). The most extensively documented deficiency of selenium in humans is Keshan disease. This is an endemic cardiomyopathy that occurs most frequently in children under 15 years of age and in women of child-bearing age (Yang et al., 1983). Not all metals suppress the immune response. Selenium is unique among metals in that it generally potentiates the immune response rather suppressing it (Koller, 1980). Selenium enhances the primary immune response and hemagglutinating titers of mice immunized with sheep red blood cells (Spallholz et al., 1973a Spallholz et al., 1973b; Spallholz et al., 1975). There are several studies that shown that selenium has protective effect against mercury toxicity, from both organic and inorganic mercury compounds (Lindh et al., 1996; Burk et al., 1977).

Zinc is an essential micronutrient that is involved in the regulation of cellular functions and the maintenance of immune function (Unoshima et al., 2001). Zinc is ubiquitous in the environment so that it is present in most food sources, water and air. Zinc toxicity from excessive ingestion is uncommon, but a deficiency results in a wide spectrum of clinical effects because more than 200 metalloenzymes require zinc as a cofactor (Goyer, 2001). Zinc is known to play a central role in the immune system, and zinc-deficient persons experience increased susceptibility to a variety of pathogens. Zinc exerts its ubiquitous effects on immune function disease resistance, and general health. Severe zinc deficiency is characterized by severely depressed immune function, frequent infections, diarrhea and mental disturbances (Shankar & Prasad, 1998). The major impairment in zinc-deficient organisms appears to arise from effects on T lymphocytes whose numbers are reduced, and on macrophages, whose function is altered (Vallee & Falchuk, 1993).

When immune cells are affected by foreign products, cells respond to extracellular signals through a variety of mechanisms, including immune cell stimulation, i.e. immune induction initiated by interaction of extracellular

ligands such as cytokines and other signaling molecules. Most of the major intracellular pathways including membrane transport processes, protein, RNA, and DNA synthesis show increased activity in lectin-stimulated cells (Hamilos et al., 1991). Thiols-containing compounds are involved in the function of many enzymes, structural proteins and receptors, and heavy metals may severely disturb many metabolic functions in the cell (Hultberg et al., 1998). Glutathione is considered an important cofactor in lymphocyte activation and proliferation (Knight, 2000). This would suggest that modulation of cellular thiols may contribute to the immunomodulatory effects of heavy metals. The intracellular level in thiols was measured with the CMFDA which is a non-fluorescent probe that diffuses through membranes. An advantage of using CMFDA to measure intracellular thiol levels is its ability to facilitate quantitative measurements of living cells (Zurgil et al., 1999). Since the induction of metallothionein biosynthesis by metal ions is relatively slow, considerable toxicity by metal ions could occur before the establishment of effective levels of metallothionein (Hultberg et al., 1998). Hultberg et al., (1998) suggested that glutathione could possibly function as a primary defense against metal ion toxicity during this period. Since the exposure time with the heavy metals was 3 hr, GSH may be in part, the principal component that was measured. Furthermore, it was previously demonstrated that GSH was the dominant thiol inside the cell and that cysteine is largely found on the outside of the cell (Hultberg et al., 2001).

Glutathione (GSH), a ubiquitous tripeptide is the most abundant (millimolar range) intracellular non-proteinic thiol. Glutathione forms complexes with several heavy metal ions and may thus function in the protection against metal toxicity (Hultberg et al., 1998; Dickinson & Forman, 2002; Hultberg et al., 2001). It is well known that lymphocyte proliferation in response to mitogenic lectins is directly dependant upon glutathione availability. There is a correlation between GSH levels and activation but the precise role for GSH in the activation process remains unclear (Hamilos et al., 1989).

Apoptosis is a distinct form of cell death with characteristic morphological and biochemical changes including cell shrinkage, plasma membrane blebbing,

nuclear chromatin condensation, and DNA fragmentation (Wyllie et al., 1980). Different from necrosis, apoptosis is a genetically controlled active cell death process and has been implicated as a critical physiological or pathological process in development and tissue homeostasis as well as in many diseases (Saikumar et al., 1999).

The purpose of our study was to evaluate the toxicity of 5 selected heavy metals found in the environment on pre-activated (with Con A) and non pre-activated immune cells from different cell populations: lymphocytes and macrophages. The immune competence of cells was determined using the phagocytosis assay for macrophages and blastogenesis for lymphocytes. In each cell population the levels of intracellular thiols and apoptosis were assessed. Concentration-response curves were used to study the immunotoxic potential of each metal for each population of cells.

MATERIAL AND METHODS

Substances under investigation

The following 5 heavy metal were selected: cadmium chloride (CdCl_2), mercuric chloride (HgCl_2), methylmercuric chloride (MeHgCl), selenium tetrachloride (SeCl_4) and zinc chloride (ZnCl_2) from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). A stock solution of MeHgCl and ZnCl_2 was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and anhydrous ethyl alcohol (Commercial Alcohols Inc.; Brampton, Ontario, Canada) respectively. For the other metals, the stock solutions were prepared in distilled water. The chemicals were diluted in a culture media, RPMI 1640, (Gibco Life Technologies; Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, and 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin (Gibco Life Technologies; Grand Island, NY, USA) so that the final DMSO or anhydrous ethyl alcohol concentration in the culture did not exceed 0.1%.

Preparation of cell suspensions

C57BL/6 female mice were obtained from Charles River Canada Inc (Qc, Canada). Mice arrived at the animal facility at 3-4 weeks of age, weighing between 12 to 15 g, and were placed in an exposure room with an automatic 12hr light/dark cycle and fed with a standard rodent diet and tap water *ad libitum*. After 2 weeks of acclimation, the mice were killed by CO_2 inhalation and the spleen was aseptically removed and place in RPMI 1640 medium. The cell suspensions were then filtered through nylon wool into Pasteur pipettes, washed two times in RPMI, and then retrieved by centrifugation at 1200 rpm for 10 min. Cells were resuspended in supplemented RPMI 1640 (Brousseau et al., 1998). The concentration of murine macrophages was adjusted to 1×10^6 cells/ml in culture medium and lymphocytes were adjusted to 5×10^6 cells/ml in the same medium. Viability of cells was determined by trypan blue dye exclusion using a light microscope before culturing the cells.

Cell pre-activation

The cells were pre-activated by exposure to concanavalin A (Con A) from Sigma Aldrich (St-Louis, MO, USA) to a final concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$ for macrophages and 2.5 $\mu\text{g/ml}$ for lymphocytes and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for up to 30 min and 18 hr respectively. The non pre-activated cells (without Con A) were exposed to supplemented RPMI for the same time under the same conditions. After the exposure, cells were washed and then resuspended in supplemented RPMI.

Exposure protocol

Lymphocytes and macrophages were exposed to individual metals (CdCl₂, MeHgCl, HgCl₂, SeCl₄ or ZnCl₂) to final concentrations of 10⁻⁹ to 10⁻³M in order to obtain concentration-response curves. Except for the lymphocyte proliferation where we incubated together the pre-activated lymphocytes and non pre-activated with metals for 48 hr, both cells populations were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for up to 3 hr with concentration-response curve of each metal. After exposure, the cells were washed and then resuspended in RPMI medium for viability (lymphocytes and macrophages), phagocytosis (macrophages), apoptosis (lymphocytes and macrophages) assays, as well as, in PBS containing 1% of glucose (PBS-G) for the evaluation of intracellular levels of thiols (lymphocytes and macrophages).

Cell viability using flow cytometry

Viability of lymphocytes and macrophages was assessed after a 3 hr exposure to the metals. Both cells populations were cultured in two replicates per treatment group at 5x10⁵ cells per tubes. Propidium iodide (PI) was added to each tube to a final concentration of 1.5 $\mu\text{g/ml}$. Cytolethality and viability were determined after PI staining, measuring the PI fluorescence of 5000 cells at 600 nm by flow cytometry.

Determination of macrophages phagocytic activity

Phagocytosis was assessed by determining the ingestion of latex fluorescent beads by flow cytometry. After the pre-activation (with Con A) or not (with RPMI), and exposure with metals, macrophages were cultured in two replicates

per treatment group at 5×10^5 cells per tubes. They were incubated under constant agitation at 37°C for 90 min (optimal time for assay) with latex fluorescent beads at an approximate ratio of 100:1 beads/cells. At the end of the exposure period, the cells were layered over a 3% bovine serum albumin (BSA) gradient and centrifuged at $150 \times g$ for 8 min at 4°C to remove free beads or beads which adhered to the surface of the cells. The cell pellets were then re-suspended in 0.5 ml of 0.5% phosphate-buffered formalin, and the number of engulfed beads was determined using a FACSCalibur flow cytometer.

Determination of lymphocyte proliferation

100 μl of (5×10^5) pre-activated and non pre-activated lymphocytes, 100 μl of Con A (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, final concentration) and 10 μl of each concentrations of different metals (10^{-2}M to 10^{-8}M) were plated in flat bottom 96 well-plates under sterile conditions. The parent solutions of each metal was 21-times the final concentration since the step of preparation involved a 1:21 the final dilution to get the 10^{-3} - 10^{-9}M . The cells were incubated for 48 hr at 37°C with 5% CO_2 . 0.5 μCi of [^3H]-tritiated thymidine (6.7 Ci/mmol; ICN, Mississauga, Ontario) was then added to each well, and the plates were further incubated for 18 hr at 37°C with 5% CO_2 . The cells were filtered using a Titertech cell harvester, and the incorporation of ^3H -methyl-thymidine was measured using a RackBeta from LKB (Turku, Finland) scintillation counter. The results were expressed in disintegration per minute (DPM). And triplicates were averaged (Brousseau et al., 1998)

Evaluation of intracellular thiol levels with CMFDA

A 5 mM stock solution of the 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) probe from Molecular Probe (Eugene, Oregon, USA) was prepared in DMSO and stored at 4°C in the dark. After the pre-activation (with Con A) or not (with RPMI) and exposure with metals, lymphocytes and macrophages were cultured in two replicates per treatment group at 5×10^5 cells per tubes in PBS containing 1% of glucose (PBS-G). Both cells populations were incubated at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere for up to 45 minutes with the fluorescent CMFDA probe to a final concentration of 5 μM . CMFDA penetrates the cell, esterase hydrolysis

converts it to fluorescent 5-chloromethyl fluorescein (CMF) via a process called fluorochromasia. Intracellular CMF reacts with thiols on proteins and peptides to form an impermeant, fluorescent aldehyde-conjugate product (SH-F) (Zurgil et al., 1999). After the exposure period, the cells were washed and suspended in 0.5 ml of PBS. The more thiols a cell possesses, the more the cell fluoresces and this fluorescence can be measured using a FACSCalibur (Becton Dickinson) flow cytometer. A negative control group was included using N-ethylmaleimide (NEM) to block intracellular thiol groups. The cells were treated with 100 μ M of NEM for 10 min, then washed before staining with CMFDA.

Apoptosis assay using YO-PRO-1 and PI dyes

The assay was performed using the Vybrant[®] Apoptosis Assay kit from Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA) which detects apoptosis on the basis of changes that occur in the permeability of cell membranes. After the pre-activation (with Con A) or not (with RPMI) and exposure with metals, lymphocytes and macrophages were cultured in two replicates per treatment group at 1×10^6 cells per tubes. One μ l of the YO-PRO-1 stock solution and 1 μ l of the PI stock solution were added to each tube and the cells were incubated on ice for up to 30 min. At the end of the incubation period, the stained cells were analyzed by flow cytometry, using an excitation wavelength of 488 nm and measuring the fluorescent emission at 530 nm (FL1) and > 575 nm (FL3).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation. The results were tested for homogeneity using an analysis of variance (ANOVA). Significant differences between treatment and control and between the activated and non-activated cultures were determined by Tukey test using the JMP IN computer software (SAS institute Inc, Cary, NC, USA). Differences between treatment means were considered significant when $p < 0.05$. Determination of IC_{50} values was performed by linear regression ($y = a + bx$) with at least 3 points chosen in a linear section of the concentration-response curve with Excel (Microsoft Inc.).

RESULTS

Mice splenocytes cell viability after heavy metals exposure

For lymphocyte's viability, illustrated in Figure 1a, inorganic and organic mercury induced a cytotoxic effect on this population of cells. Organic mercury was more cytotoxic than inorganic mercury. There was a significant decrease (70%) in lymphocytes viability cultured in the presence of organic mercury at concentrations ranging from 10^{-5} to 10^{-3} M, compared to the inorganic mercury, where the viability of cells decrease of 80 % at concentrations ranging from 10^{-4} to 10^{-3} M. Cadmium induced a significant decrease (90%) in lymphocyte viability at concentrations ranging from 10^{-5} to 10^{-3} M. Zinc decreased significantly (90%) the lymphocyte viability at concentration ranging 10^{-4} to 10^{-3} M. For selenium, we observed a significant decrease in viability at concentrations ranging 10^{-5} to 10^{-3} M.

For macrophage's viability, illustrated in Figure 1b, inorganic and organic mercury induced a significant decrease in viability. Organic mercury decreased significantly the macrophage viability (from 41 to 73% compared to the control) at concentrations ranging 10^{-5} to 10^{-3} M. The inorganic mercury obtained a same significant decrease (47 to 65% compared to the control) but for the range between 10^{-4} to 10^{-3} M. Cadmium induced a significant decrease (20% compared to 10^{-4} M) in macrophage viability at a concentration of 10^{-3} M. There was no significant difference in macrophage viability when cultured in the presence of selenium or zinc.

Determination of IC_{50} value for lymphocytes and macrophages

Linear regressions were performed on the data in order to obtain IC_{50} values for the lymphocytes proliferation and macrophages phagocytosis assays (i.e. 50% suppression of phagocytosis and proliferation). These data are presented in Table 1. Our results show that for all heavy metals an effect was observed in both lymphocytes and macrophages. IC_{50} was calculated for all heavy metals except for selenium in macrophages due to lack of measurable effect. Organic mercury was the most toxic compound towards lymphocyte proliferation and phagocytosis assay, with IC_{50} values of 3.66×10^{-7} M for non pre-activated lymphocytes and 7.46×10^{-5} M for non pre-activated macrophages. IC_{50} values

were in the range of 10^{-7} to 10^{-5} M for the non pre-activated lymphocytes and of 10^{-7} to 10^{-4} M for the pre-activated lymphocytes. IC_{50} values were in the range of 10^{-5} to 10^{-4} M for the non pre-activated macrophages and 10^{-4} M for the pre-activated macrophages. The IC_{50} values for the pre-activated cells were significantly higher than the non pre-activated cells when exposed to cadmium, inorganic mercury and zinc for lymphocytes and organic mercury for both populations when exposed.

Macrophages phagocytic activity

Figure 2 represents an example of a concentration-response curve of phagocytic activity obtained with macrophages exposed to various concentrations of cadmium. The phagocytosis % was higher in pre-activated cells than in non pre-activated and significant differences were observed at all concentrations (except 10^{-3} M), as well as, in cells not exposed to cadmium. Also, we observed a significant increase of phagocytosis with pre-activated cells were exposed to a low concentration (10^{-7} M) of cadmium. At the highest concentration tested (i.e. 10^{-3} M), cadmium impaired phagocytic activity. Differences between pre-activated cells and non pre-activated cells were observed when the macrophages were exposed to selenium (Fig. 3) and inorganic mercury (Fig. 4).

Lymphocytes proliferation

Figure 5 represents an example of a concentration-response curve of lymphocytes proliferation obtained when cells were exposed to various concentrations of cadmium. There were significant differences at all concentrations between the non pre-activated and pre-activated cells except at 10^{-7} , 10^{-4} and 10^{-3} M. There was a significant decrease of proliferation at 10^{-8} M for both pre-activated and non pre-activated cells. In pre-activated cells at 10^{-7} M and in non pre-activated at 10^{-6} M whereas a significant rise occurred in non pre-activated cells at 10^{-7} M. As cadmium concentration increased, there was a trend was toward immunosuppression. Indeed at 10^{-5} M and higher, cadmium markedly impaired lymphocyte proliferation. Similar results were obtained for mercury compounds (Figs. 6 and 7), selenium (Fig. 8) and zinc (Fig. 9).

Evaluation of intracellular level of thiols

Figure 10 represents an example of a concentration-response curve of intracellular levels of thiols in lymphocytes and macrophages obtained when cells were exposed to various concentrations of organic mercury. Pre-activated splenocytes displayed a significant increase in intracellular thiols levels compared to their non pre-activated counterparts when exposed to organic mercury at concentrations ranging from 10^{-9} to 10^{-6} M. There was also a significant rise in thiols levels in pre-activated cells than non pre-activated when they were not exposed to metal. There was a significant fall in both pre-activated and non pre-activated cells compared to the control when exposed to higher concentrations of organic mercury (i.e. from 10^{-5} to 10^{-3} M).

Figure 11 represents an example of a concentration-response curve of intracellular levels of thiols in lymphocytes and macrophages obtained when cells were exposed to various concentrations of selenium. There was a significant difference in thiols levels between non pre-activated and pre-activated splenocytes at concentrations ranging 10^{-9} to 10^{-4} M even for cells that were not exposed to selenium. There was a significant increase of intracellular thiols in pre-activated lymphocytes compared to the non pre-activated when exposed to selenium at concentrations ranging from 10^{-9} to 10^{-4} M. However, a higher concentration of selenium (i.e. 10^{-3} M) induced a significant decrease in intracellular thiols levels in pre-activated macrophages and in both pre-activated and non pre-activated lymphocytes. Moreover, when compared to the non pre-activated cells, pre-activated showed a significant increased in intracellular thiols content following exposure to inorganic mercury (Fig. 12), zinc (Fig.13) and cadmium (Fig. 14). The intracellular thiols content of both pre-activated and non pre-activated macrophages was significantly higher than in lymphocytes when exposed to heavy metals (Figs. 10, 11, 12, 13 and 14).

Apoptosis in splenocytes after heavy metals exposure

Figure 15 represents an example of a concentration-response curve of lymphocyte and macrophage apoptosis obtained when cells were exposed to various concentrations of organic mercury. There was a significant increase in apoptosis of mouse splenocytes when cultured with organic mercury at

concentrations ranging from 10^{-5} to 10^{-3} M compared to the control. However, low concentrations of organic mercury (i.e. from 10^{-8} to 10^{-7} M) induced a significant decrease in apoptosis in pre-activated macrophages compared to the control. There was a significant difference between non pre-activated and pre-activated cells at all concentrations for macrophages and at concentrations ranging from 10^{-5} to 10^{-3} M for lymphocytes. Pre-activated macrophages showed a higher % apoptosis than non pre-activated when cultured with low concentration of organic mercury (i.e. from 10^{-9} to 10^{-6} M and even in the control). In contrast, non pre-activated macrophages showed a higher % apoptosis than pre-activated when cultured with the higher concentrations of organic mercury (i.e. 10^{-5} to 10^{-3} M). Contrary to macrophages, pre-activated lymphocytes showed a higher % apoptosis than non pre-activated lymphocytes when cultured with higher concentrations of organic mercury (i.e. 10^{-5} to 10^{-3} M). Non pre-activated lymphocytes showed a higher apoptosis than pre-activated lymphocytes when cultured with low concentration of organic mercury, except for 10^{-6} M (not significant).

Figure 16 represents an example of a concentration-response curve of lymphocyte and macrophage apoptosis obtained when cells were exposed to various concentrations of zinc. There was a significant rise in apoptosis of mouse splenocytes when cultured with zinc at a concentration of 10^{-3} M compared to the control. Pre-activated lymphocytes showed a significantly higher % apoptosis than non pre-activated lymphocytes at 10^{-7} , 10^{-4} and 10^{-3} M. Zinc induced a significant increase in apoptosis at 10^{-8} and 10^{-5} and 10^{-3} M in non pre-activated lymphocytes compared to the control. At 10^{-7} , 10^{-4} and 10^{-3} M, in pre-activated lymphocytes and at 10^{-7} M in non pre-activated macrophages, we observed an increase of apoptosis also, compared to the control. There was a significant difference between non pre-activated and pre-activated macrophages at all concentrations (except 10^{-3} M) as well as in cells that were not exposed to zinc and at concentrations of 10^{-7} , 10^{-4} and 10^{-3} M for lymphocytes.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Toxic Substances Research Initiative of Canada and Canada Research Chair in Environmental Immunotoxicology.

DISCUSSION

Animal studies have been useful in uncovering mechanisms of metal modulation of immunity. *In vitro* studies are an alternative approach to study mechanisms of metal modulation of human lymphocyte reactivities (Lawrence & McCabe, 2002). In experimental animals, toxicological effects of xenobiotics on the immune system may be manifest as changes in the weight and histological appearance of lymphoid organs such as thymus, spleen and lymph nodes, in altered numbers of blood leukocytes, and in impairment of immune cell function (Vos et al., 1989). Moreover, *in vitro* models allow the use of specific endpoints to determine the targets of toxic effects with great precision and reproducibility (Olabarrieta et al., 2001).

Heavy metals toxicity

Heavy metals consist of a group of environmental threats with strongly toxic effects. The mechanism producing cellular damage depends on the type of metal, its subcellular distribution and also on the concentration of the exposure (Tsangaris & Tzortzatou-Stathopoulou, 1998). Our results demonstrate that the sensitivity of lymphoid cells varies considerably with metal species as well as between cell populations (i.e. lymphocytes or macrophages) and treatments (pre-activation or non pre-activated). Quantification of the sensitivity using IC_{50} indicates that organic mercury was the most potent inhibitor of macrophage phagocytosis and lymphocyte proliferation (Table 1). Organic mercury was the most cytotoxic compound with a cytotoxic concentration of $\geq 10^{-5}M$ followed by inorganic mercury with a cytotoxic concentration of $\geq 10^{-4}M$ (Figs. 1a and 2b). Thus, cytotoxic potential of methylmercury for splenocyte cells appeared to be at least 10-fold greater than the cytotoxicity of mercury chloride (Voccia et al., 1994). The cytotoxic concentration of cadmium to lymphocytes was $\geq 10^{-4}M$, followed by selenium $\geq 10^{-4}M$ and by zinc $\geq 10^{-3}M$ (Fig. 1A). Zinc appeared to be more cytotoxic than selenium at a concentration of $10^{-3}M$. For macrophages, the cytotoxic concentration of cadmium was $\geq 10^{-3}M$ and was lower for zinc. *In vitro* analysis of metal toxicity on humoral immunity ranked some metals as follows: $Hg > Cu > Cd > Co > Cr > Mn > Zn > Sn$

(Lawrence, 1985). Our results also demonstrate that lymphocytes are more sensitive to heavy metals studied than macrophages.

Pre-activation

The effectiveness of Con A to pre-activate macrophages and lymphocytes when exposed to heavy metals was confirmed. When macrophages were in the presence of Con A (pre-activated) there was an increase in the expression of I-A molecule (CMH II) when compared to the cells that were cultured in the absence of Con A (non pre-activated). The expression of the histocompatibility II major complex by macrophages which was increased in the activation phase was clearly associated with the presence of lymphocyte T antigens (Adams & Hamilton, 1984; Adams, 1982). Furthermore, studies found an increased expression of the molecule I-A in activated macrophages (Adams & Hamilton, 1984; Unanue & Allen, 1987). The membrane expression of the I-A molecule (CMH II) was therefore reliable expression marker for macrophages in an activated state (Unanue, 1984). In the case of lymphocytes, the incorporation of tritiated thymidine in the pre-activated cells was more evident than in cells at rest (non pre-activated). Lymphocytes normally exist as resting cells in the G₀ phase of the cell cycle and when activated with Con A rapidly enter G₁ and progress through the cell cycle (Janeway et al., 1997). Analysis of the incorporation of ³H-thymidine into the DNA of cells when cultured in presence of Con A demonstrated the activating properties of Con A.

Phagocytosis

Macrophages, and their phagocytic function, play an important role in the non-specific cellular immune response. These cells function to protect the host by phagocytizing foreign material (Ellis, 1977). Phagocytic activity of macrophages has been shown to be a sensitive biological marker of toxicity in both vertebrate and invertebrate (Dunier, 1994; Wong et al., 1992; Zelikoff, 1993). In this study, all macrophages pre-activated with Con A showed a phagocytic activity higher than macrophages at rest. We observed a significant increase (19%) of phagocytosis compared to the control when the pre-activated cells are with 10⁻⁷M of cadmium and a light increase of phagocytosis for macrophages at lower concentration (10⁻⁵M to 10⁻⁸M) for both pre-activated

and non pre-activated cells (Fig.2). A same phenomena was observed with haemocytes when exposed to cadmium . *In vitro* studies have shown that the phagocytic ability of haemocytes was observed when exposed to cadmium. Cadmium appears to stimulate phagocytic and lysosomal activities in haemocytes *in vitro* (Olabarrieta et al., 2001).

With selenium we found an increase in the phagocytosis for all concentrations, excepted 10^{-4} and 10^{-3} M, for macrophages pre-activated and non pre-activated (Fig. 3). One of the possible explanation is that selenium is a component of the active site of the enzyme glutathione peroxidase (GSH-Px). This enzyme is one of several mammalian scavenging systems which protect cells and membranes from damage by injurious oxygen radicals (Parnham et al., 1983). Selenium deficiency, resulting in decreased GSH-Px activity in neutrophils, has been reported to depress the phagocytic and microbiological activities of neutrophils from rats and cattle (Serfass & Ganther, 1975; Boyne & Arthur, 1979).

We observed a significant suppressive effect on phagocytosis in pre-activated cells at all concentrations for the inorganic mercury (Fig.4). That is confirmed by other study where the inorganic mercury was reported to have inhibitory effects on the production of superoxide and free radicals and on phagocytosis (Zelikoff & Smialowicz, 1996).

Lymphocytes Proliferation

Heavy metals can induce immunopotentiating or immunosuppressive effects which could result in immunopathologic effects on numerous tissues. Alteration of immune responsiveness has been related to the toxicity of heavy metals (Vos, 1977). Like macrophages all lymphocytes pre-activated with Con A showed an increase in the proliferation, doesn't matter the heavy metal used. We observed a significant increase (49.5%) compared to the control for the proliferation of lymphocytes (for the non pre-activated cells) when exposed to cadmium at 10^{-7} M (Fig. 5). Same results was observed *in vitro*, where low doses of Cd^{2+} stimulated DNA synthesis, cell multiplication, and malignant transformation (Misra et al., 2002). An other study shown a rise level of metallothionein in pre-activated cells which protect cells against the

immunotoxic effects of Cd (Sgagias et al., 1989). Mercury enhanced human lymphocyte stimulation after 6 days of culture and also stimulated the production of β_2 -microglobulin by lymphocytes (Ohsawa & Kimura, 1979). However, other investigators have reported inhibitory effects; *in vitro* exposure of human and murine lymphocytes to mercury compounds decreased their response to phytohemagglutinin (PHA) and concanavalin A (ConA) stimulation (Sharma & Dugyala, 1996). That is the phenomena that we observed with inorganic mercury. In both pre-activated and non pre-activated cells, HgCl_2 decreased the proliferation of cells after 3 days of incubation (Fig.7). However, we obtained a huge proliferation on T lymphocytes in presence of organic mercury at all concentrations for pre-activated cells (Fig. 6). We observed, in other experiments in our lab, that organic mercury at lower concentrations increases the proliferation of lymphocytes. Same results was confirmed by other authors who they shown that the lymphoproliferative response to T cell mitogens, in Sprague-Dawley rats is enhanced after 8 weeks of oral exposure and depressed after 16 weeks of continuous oral exposure to methyl mercury in the drinking water. But several investigators have reported the effect of mercury compounds on the lymphoproliferative response. Some have shown an increase in lymphocyte response after mitogen stimulation (Ortega et al., 1994); other have reported a decrease in the lymphocyte (T & B cell) response after exposure *in vivo* and *in vitro* (van der Meide et al., 1993). It is possible that these differences in lymphocyte response depend on many variables that include time of exposure (acute or chronic), route of exposure (intraperitoneal, oral, etc.), form, and concentration of the compound (Wild et al., 1997).

Excepted for 10^{-8}M (and 10^{-4} & 10^{-3}M (cytotoxicity) of selenium, we obtained an increase in the proliferation with lymphocytes when the cells are pre-activated (Fig. 8). The pre-activation with Con A increase thiols contents inside the cells and we know that the lymphocyte proliferation in response to mitogenic lectins is directly dependent upon glutathion (GSH) availability (Hamilos et al., 1989). Selenium is "unique" among the metals in that it generally potentiates the immune response rather than suppressing (Koller, 1980). That is the effect that we obtained for intermediate concentrations of

selenium (10^{-8} , 10^{-7} and 10^{-6} M) in non pre-activated cells. These concentrations of selenium enhanced the proliferation of lymphocytes T.

The proliferation of lymphocytes T was increased for all concentrations with zinc chloride in cells pre-activated with Con A compared to the control (Fig. 9). The same results was obtained on response of lymphocytes to mitogens PHA, Con A, LPS and SEA when animals are fed with a supplementation of zinc (Koller, 1980). Generally, a zinc deficiency results not only in decreased lymphocyte concentrations, but in depressed T and B lymphocyte function. Some data suggest that the primary effect of zinc deficiency is deletion of T and B lymphocytes with little loss of function in the surviving cells (Shankar & Prasad, 1998).

Thiols measurement

Metals such as mercury and cadmium are know to exhibit a high affinity for thiol groups and may therefore severely disturb many metabolic functions in the cell (Hultberg et al., 1998). Glutathione (GSH) is the most abundant, non-protein thiol, being found in the millimolar range in most cells. The response of a cell to a stressor, such as heavy metals, involves changes in thiol content (Dickinson & Forman, 2002).

Many different conditions are known to change intracellular glutathione content including heavy metals. Exposure to compounds that generate reactive species such as heavy metals increase the content of GSH by enhancing the rate of GSH synthesis (Dickinson & Forman, 2002). There was a significant decrease in glutathione levels in both pre-activated and non pre-activated cells when exposed to higher concentrations of organic mercury (i.e. from 10^{-5} M to 10^{-3} M) (Fig. 10). Decrease in intracellular glutathione levels was demonstrated in *in vitro* and *in vivo* studies involving heavy metals (Yasutake & Hirayama, 1994). Even a partial depletion of intracellular GSH pool has a dramatic consequence on the process of blast transformation and proliferation, as well as for the generation of cytotoxic T cells (Zurgil et al., 1999). Non pre-activated macrophages showed a significant decrease in intracellular thiols levels when exposed to low a concentration of organic mercury (i.e. 10^{-8} M) which

demonstrates that non pre-activated macrophages may be more sensitive (Fig. 10).

These results demonstrated that pre-activated cells are more resistant than non pre-activated cells since % viability of pre-activated cells is greater than non pre-activated. It was demonstrated that the pre-activation of cells by a mitogen such as Con A or PHA significantly increased the content of intracellular in GSH (Lawrence et al., 1996). Most intracellular mechanisms such as membrane transport, protein synthesis and RNA and DNA synthesis display activity increase following an activation of lectin (Hamilos et al., 1991). In this sense, activation protects the cells since cellular activity is increased as well as the thiols content allowing for the sequestration of a greater quantity of metals (Figs. 10,11,12,13 and 14).

Apoptosis

Apoptosis was identified as the major mechanism by which inflammatory cells are removed during an inflammatory injury (MA, 2003). Our results demonstrate the difference in susceptibility present in both cellular populations, and that lymphocytes were more sensitive than macrophages when exposed to heavy metals. High concentrations of metals also induced a higher % apoptosis in lymphocytes than macrophages. That was the case for the pre-activated cells and the non pre-activated when exposed to organic mercury and pre-activated cells when exposed to zinc (Figs. 15 and 16) and as well as for cadmium, inorganic mercury and selenium (results not shown). Previous work showed that low levels of organic mercury (0.6 to 5 μM) induce apoptosis in human T-cells (DeMoor & Koropatnick, 2000). Our results demonstrate that pre-activated macrophages underwent a higher % apoptosis at concentrations ranging from 10^{-9}M to 10^{-6}M when exposed to organic mercury and from 10^{-9}M to 10^{-4}M when exposed to zinc. This was also true for cells that were not exposed to heavy metals. A low level of apoptosis induced by Con A was noted in macrophages at concentrations where metals are not cytotoxic. Con A, normally a mitogen of T-lymphocytes, was found to be a cell-cycle-independent apoptosis inducing agent in cultured murine macrophage PU5-1.8 cells (Suen et al., 2000). Pre-activated lymphocytes displayed a higher %

apoptosis than non pre-activated when cultured with high concentrations of organic mercury and zinc. Impairment of apoptosis activity leads to an accumulation of activated cell in the body which in turn leads to auto-immune phenomena or inflammation.

Our results demonstrate the difference in susceptibility present in both cellular populations, and that lymphocytes are more sensitive than macrophages when exposed to heavy metals.

This study confirms and extends these observations showing that pre-activation of macrophages and lymphocytes are also sensitive to the effect of heavy metals than the non pre-activated cells.

Legends of figures

Figure 1a. Percentage of viability of mouse lymphocytes after 3 hr exposure to heavy metals (cadmium chloride, methylmercuric chloride, mercuric chloride, selenium tetrachloride and zinc chloride) at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M. * denotes a significant difference when compared to the control with $p < 0.05$.

Figure 1b. Percentage of viability of mouse macrophages after 3 hr exposure to heavy metals at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M. * denotes a significant difference when compared to the control with $p < 0.05$.

Figure 2. Effect of a 3 hr exposure to cadmium chloride in both pre-activated and non pre-activated mouse macrophages phagocytosis. * denotes a significant difference when compared to the non pre-activated cells with $p < 0.05$. • (non pre-activated), ◆ (pre-activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0.05$.

Figure 3. Effect of a 3 hr exposure to selenium chloride in both pre-activated and non pre-activated mouse macrophages phagocytosis. * denotes a significant difference when compared to the non pre-activated cells with $p < 0.05$. • (non pre-activated), ◆ (pre-activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0.05$.

Figure 4. Effect of a 3 hr exposure to mercury chloride in both pre-activated and non pre-activated mouse macrophages phagocytosis. * denotes a significant difference when compared to the non pre-activated cells with $p < 0.05$. • (non pre-activated), ◆ (pre-activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0.05$.

Figure 5. Effect of a 3 hr exposure to cadmium chloride on cell proliferation in both pre-activated and non pre-activated mouse lymphocytes identified by ^3H -methyl-thymidine incorporation. * denotes a significant difference when compared to the non pre-activated cells with $p < 0.05$. • (non pre-activated), ◆ (pre-activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0.05$.

Figure 6. Effect of a 3 hr exposure to methylmercuric chloride on cell proliferation in both pre-activated and non pre-activated mouse lymphocytes identified by ^3H -methyl-thymidine incorporation. * denotes a significant difference when compared to

the non pre-activated cells with $p < 0.05$. • (non pre-activated), ◆ (pre-activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0.05$.

Figure 7. Effect of a 3 hr exposure to mercury chloride on cell proliferation in both pre-activated and non pre-activated mouse lymphocytes identified by ^3H -methylthymidine incorporation. * denotes a significant difference when compared to the non pre-activated cells with $p < 0.05$. • (non pre-activated), ◆ (pre-activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0.05$.

Figure 8. Effect of a 3 hr exposure to selenium chloride on cell proliferation in both pre-activated and non pre-activated mouse lymphocytes identified by ^3H -methylthymidine incorporation. * denotes a significant difference when compared to the non pre-activated cells with $p < 0.05$. • (non pre-activated), ◆ (pre-activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0.05$.

Figure 9. Effect of a 3 hr exposure to zinc chloride on cell proliferation in both pre-activated and non pre-activated mouse lymphocytes identified by ^3H -methylthymidine incorporation. * denotes a significant difference when compared to the non pre-activated cells with $p < 0.05$. • (non pre-activated), ◆ (pre-activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0.05$.

Figure 10. Determination of intracellular levels of thiols in both pre-activated and non pre-activated mouse splenocytes after a 3 hr methylmercuric chloride exposure. * denotes a significant difference when compared to the non pre-activated cells with $p < 0.05$. • (non pre-activated), ◆ (pre-activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0.05$.

Figure 11. Determination of intracellular levels of thiols in both pre-activated and non pre-activated mouse splenocytes after a 3 hr selenium tetrachloride exposure. * denotes a significant difference when compared to the non pre-activated cells with $p < 0.05$. • (non pre-activated), ◆ (pre-activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0.05$.

Figure 12. Determination of intracellular levels of thiols in both pre-activated and non pre-activated mouse splenocytes after a 3 hr mercury chloride exposure. * denotes a significant difference when compared to the non pre-activated cells with

$p < 0.05$. • (non pre-activated), ✦ (pre-activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0.05$.

Figure 13. Determination of intracellular levels of thiols in both pre-activated and non pre-activated mouse splenocytes after a 3 hr zinc chloride exposure. * denotes a significant difference when compared to the non pre-activated cells with $p < 0.05$. • (non pre-activated), ✦ (pre-activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0.05$.

Figure 14. Determination of intracellular levels of thiols in both pre-activated and non pre-activated mouse splenocytes after a 3 hr cadmium chloride exposure. * denotes a significant difference when compared to the non pre-activated cells with $p < 0.05$. • (non pre-activated), ✦ (pre-activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0.05$.

Figure 15. Percentage of apoptosis in mouse splenocytes after 3 hr exposure to methylmercuric chloride at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M. * denotes a significant difference when compared to the control with $p < 0.05$. • (non pre-activated), ✦ (pre-activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0.05$.

Figure 16. Percentage of apoptosis in mouse splenocytes after 3 hr exposure to zinc chloride at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M. * denotes a significant difference when compared to the control with $p < 0.05$. • (non pre-activated), ✦ (pre-activated), denotes a significant difference when compared to the control group with $p < 0.05$.

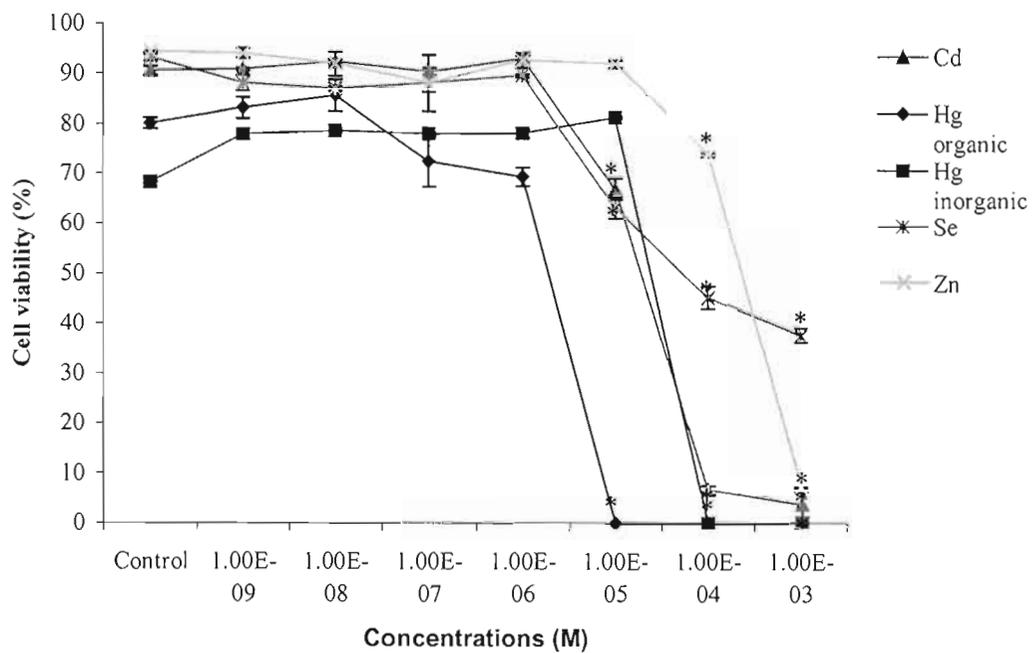


Figure 1a.

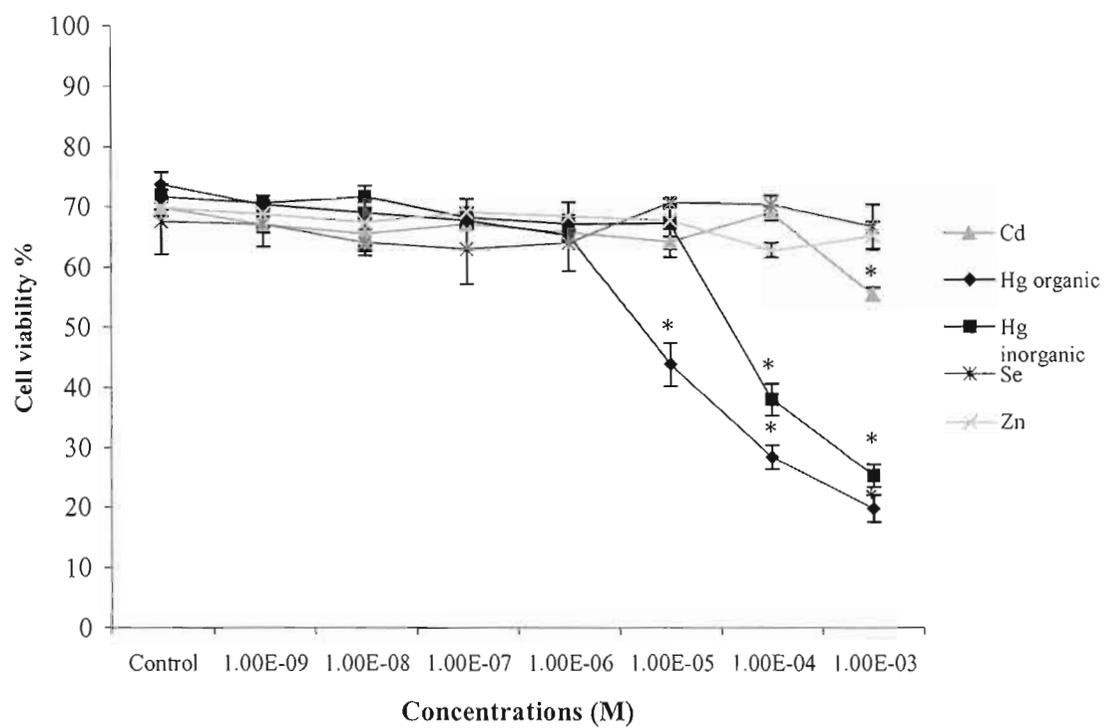


Figure 1b.

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

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

* denotes a significant difference when compared to the non pre-activated cells with $p < 0.05$.

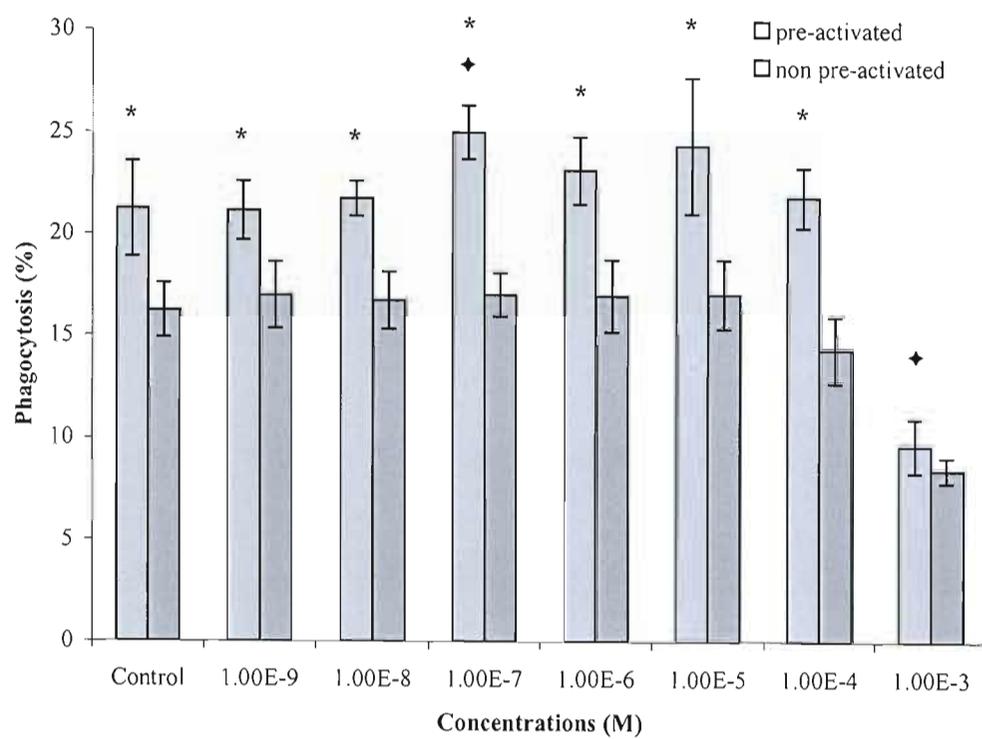


Figure 2.

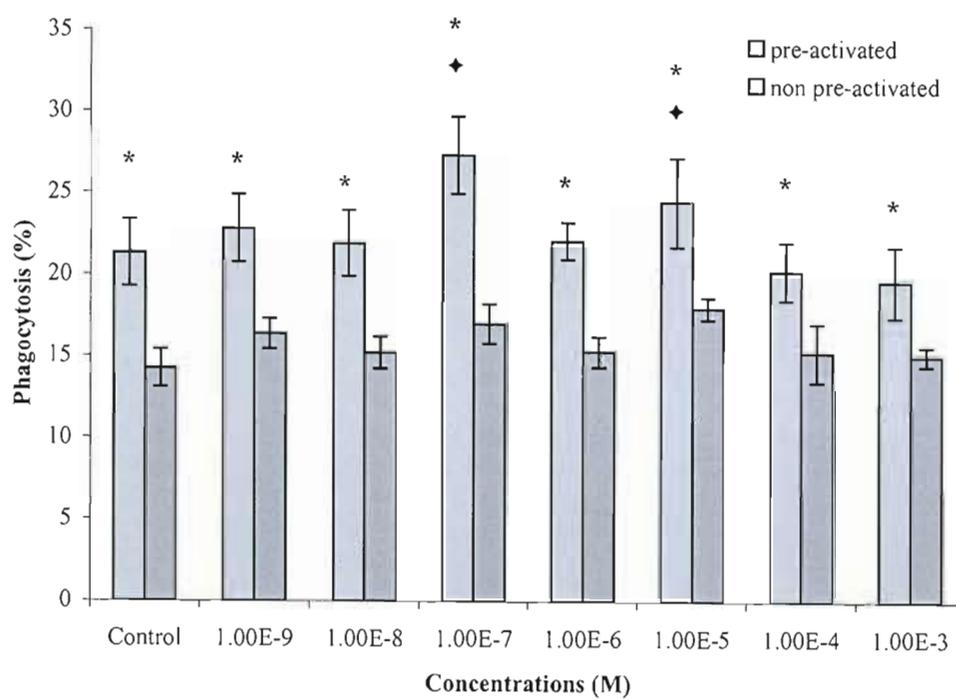


Figure 3.

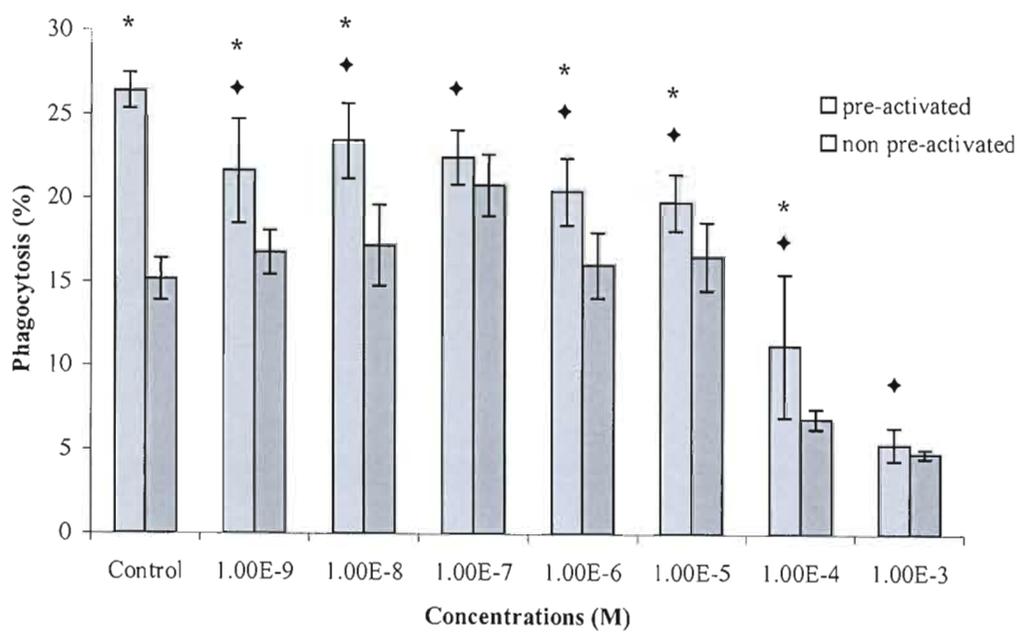


Figure 4.

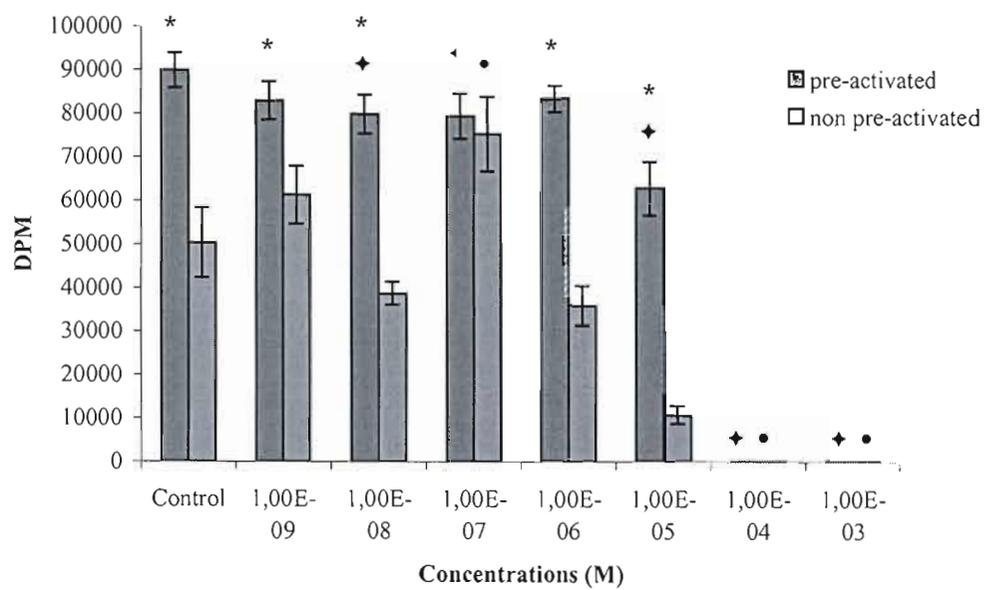


Figure 5.

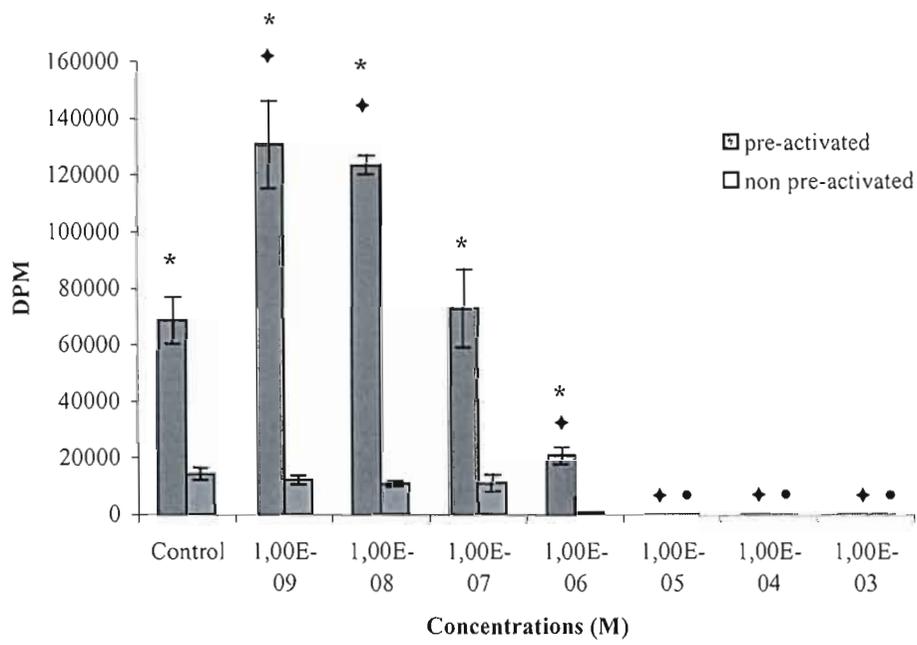


Figure 6.

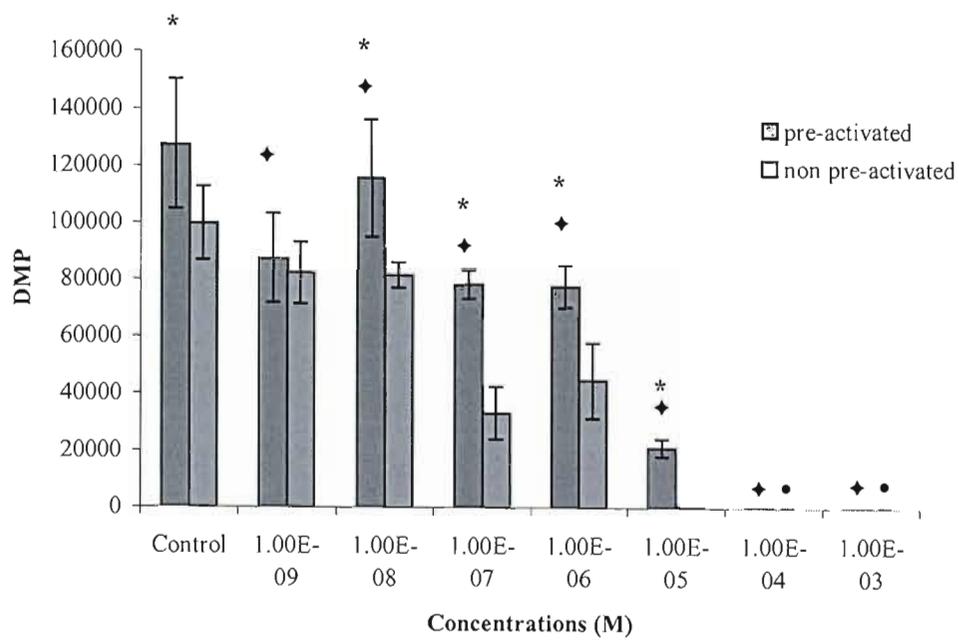


Figure 7.

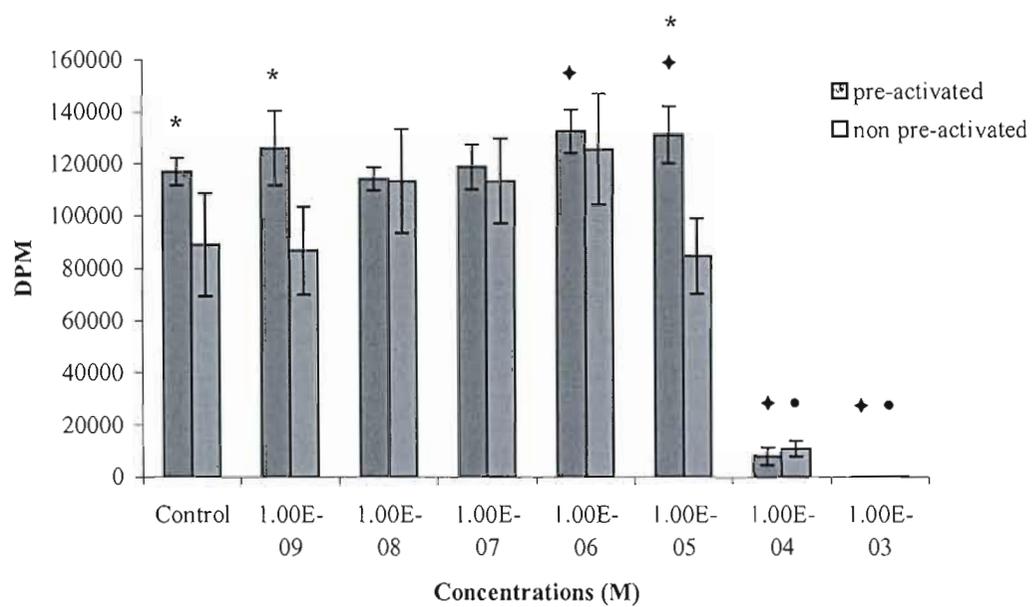


Figure 8.

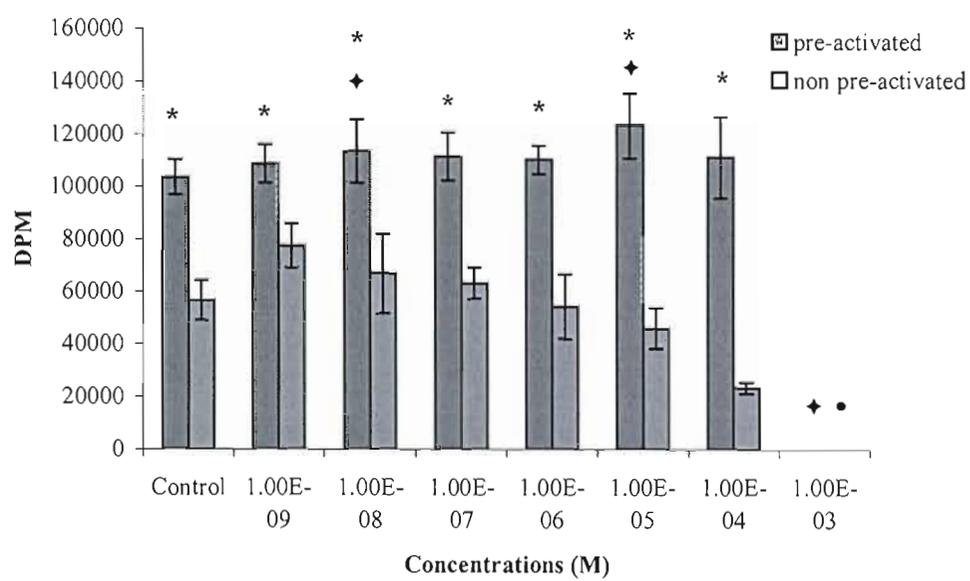


Figure 9.

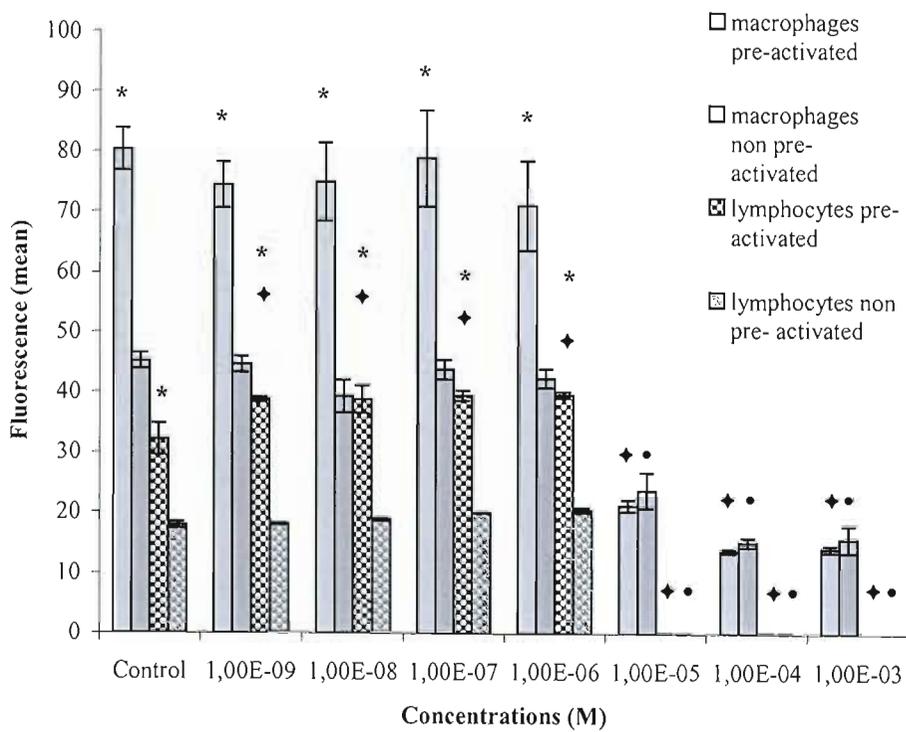


Figure 10.

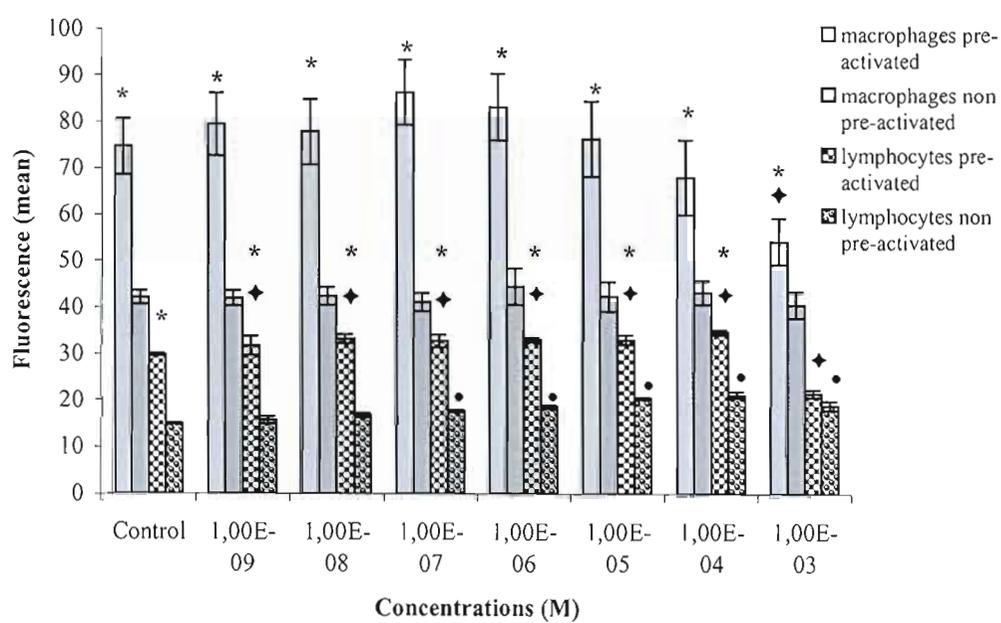


Figure 11.

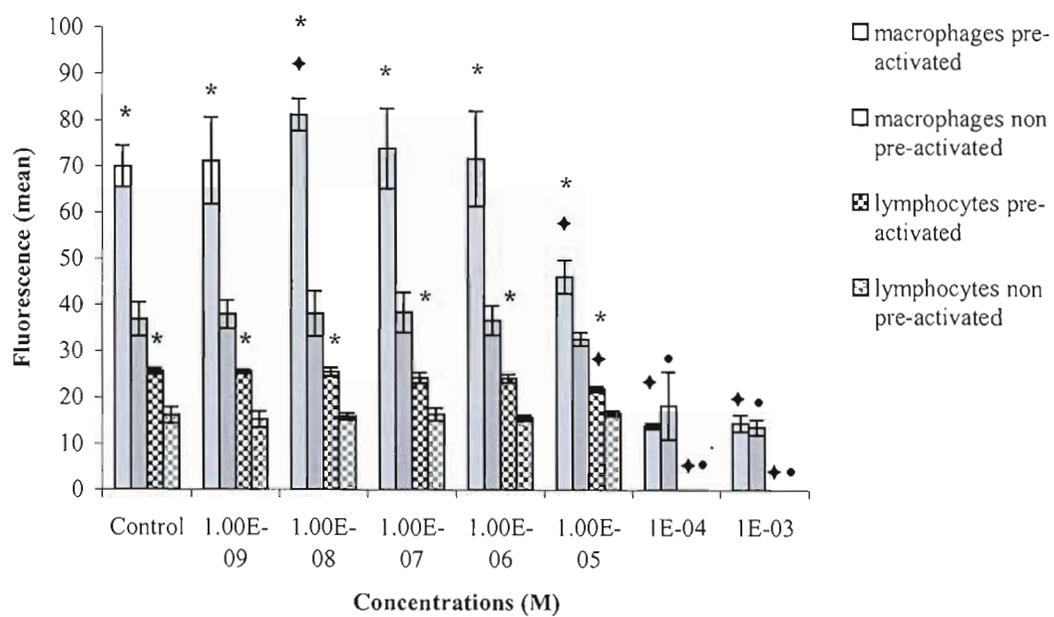


Figure 12.

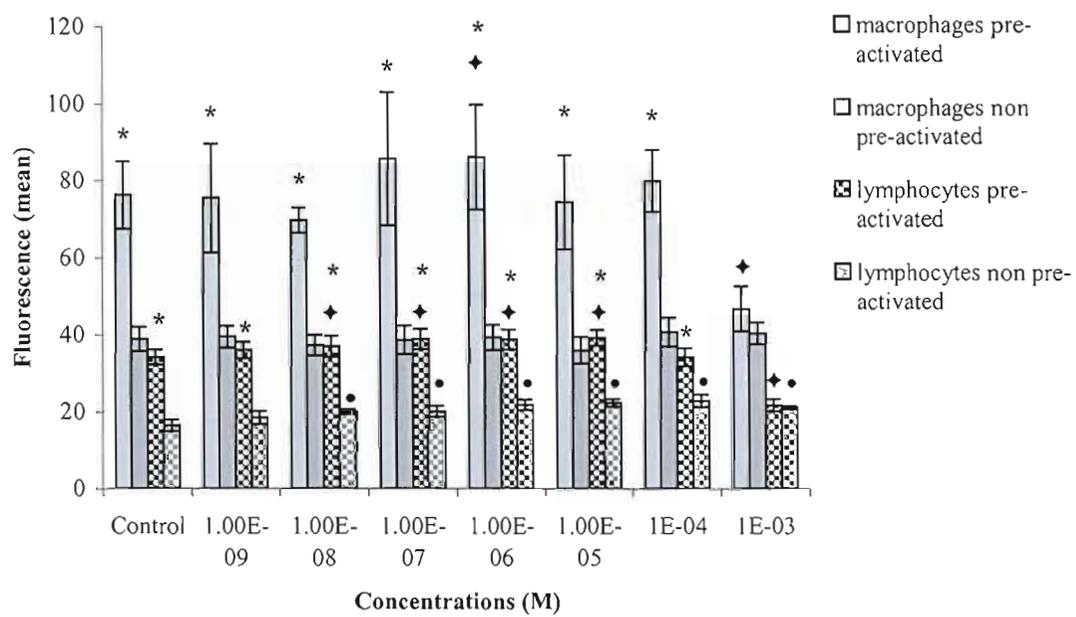


Figure 13.

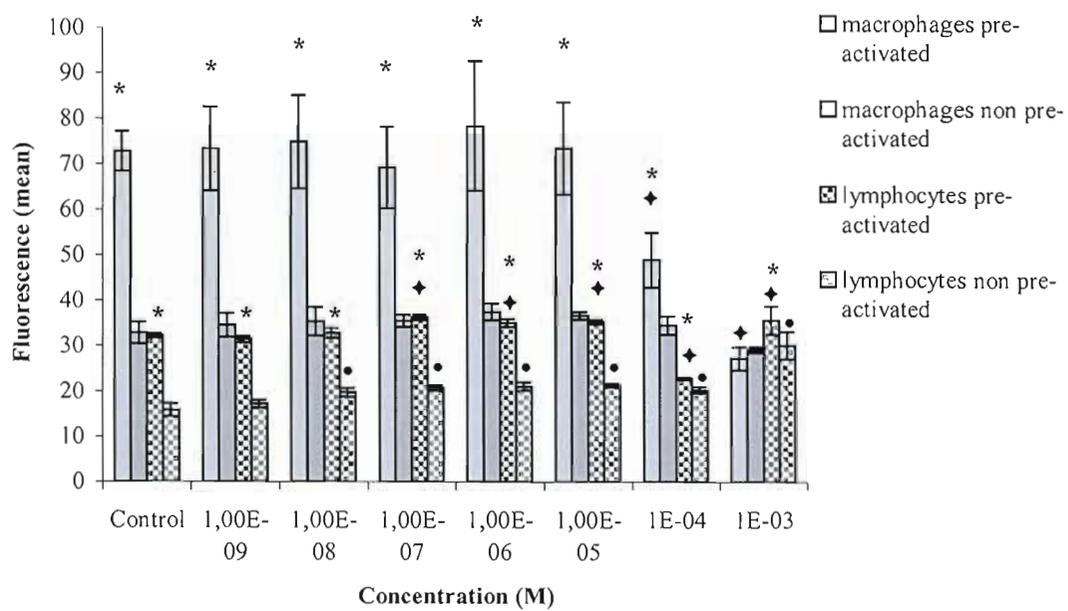


Figure 14.

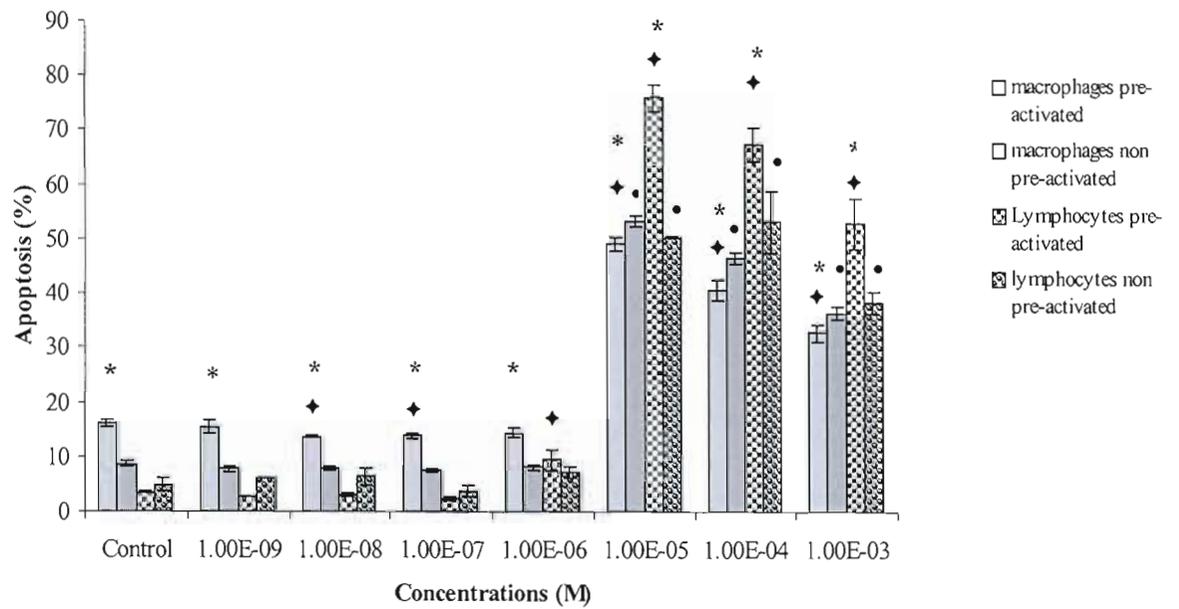


Figure 15.

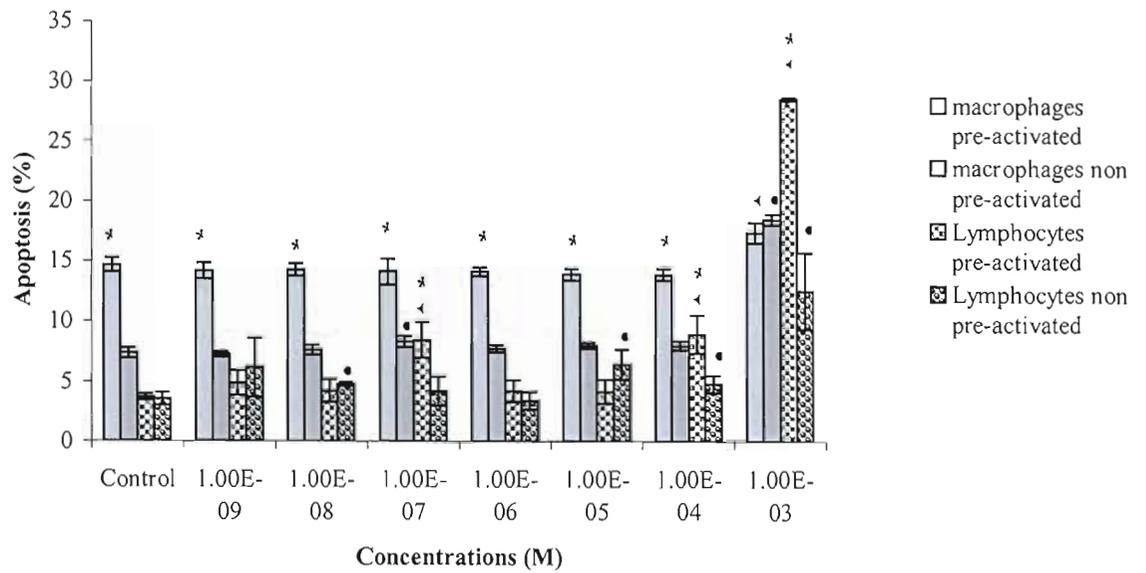


Figure 16.

REFERENCES

- Adams, D.O. 1982. Molecules, membranes and macrophages activation. *Immunol. Today* 3: 285-287.
- Adams, D.O. and Hamilton, T.A. 1984. The cell biology of macrophages activation. *Ann. Rev. Immunol* 2:283-318.
- Aten, J., Prigent, P., Poncet, P., Blanpied, C., Claessen, N., Druet, P. and Hirsch, F. 1995. Mercuric chloride-induced programmed cell death of a murine T cell hybridoma. I. Effect of the proto-oncogene Bcl-2. *Cell Immunol* 161:98-106.
- Boyne, R. and Arthur, J.R. 1979. Alterations of neutrophil function in selenium-deficient cattle. *J Comp Pathol* 89:151-158.
- Brousseau, P., Payette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boermans, H., Flippe, D. and Fournier, M. 1998. *Manual of Immunological Methods*. Boston, USA,
- Burk, R.F., Jordan, H.E. Jr and Kiker, K.W. 1977. Some effects of selenium status on inorganic mercury metabolism in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 40:71-82.
- Coles, J.A., Farley, S.R. and Pipe, R.K. 1995. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Diseases of Aquatic Organisms* 22:59-65.
- Dantas, D.C. and Queiroz, M.L. 1997. Immunoglobulin E and autoantibodies in mercury-exposed workers. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 19:383-392.
- DeMoor, J.M. and Koropatnick, D.J. 2000. Metals and cellular signaling in mammalian cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46:367-381.
- Descotes, J. 1992. Immunotoxicology of cadmium. *IARC Sci Publ* 118:385-390.
- Dickinson, D.A. and Forman, H.J. 2002. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci* 973:488-504.
- Dieter, M.P., Luster, M.I., Boorman, G.A., Jameson, C.W., Dean, J.H. and Cox, J.W. 1983. Immunological and biochemical responses in mice treated with mercuric chloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 68:218-228.
- Dunier, M. 1994. Effects of environmental contaminants (pesticides and metal ions) on fish immune system. In *Modulators of Fish immune response*, vol.1 SOS Publishers, City ST, pp 122-139.
- Ellis, A.E. 1977. The leucocytes of fish. A review. *J Fish Bio* 11:453-491.
- Fels, L.M., Bundschuh, I., Gwinner, W., Jung, K.I., Pergand, M., Graubaum, H.J., Price, R.P., Taylor, S.A., De Brue, M.E., Nuyts, A., Gelphi, E., Rosello, J.,

- Hohu, G., Stolte, H. 1994. Early urinary markers of target nephron segments as studied in cadmium toxicity. *Kidney International* 46 (Suppl 47) S81-S88.
- Goyer, R.A. 2001. Toxic effects of metals. In *Casarett and Doull's Toxicology* (Klaassen, C.D., Amdur, M.O., Doull, J. and Casarett, L.J., eds.) 5th Edition 691-736.
- Hamilos, D.L., Mascali, J.J. and Wedner, H.J. 1991. The role of glutathione in lymphocyte activation--II. Effects of buthionine sulfoximine and 2-cyclohexene-1-one on early and late activation events. *Int J Immunopharmacol* 13:75-90.
- Hamilos, D.L., Zelarney, P. and Mascali, J.J. 1989. Lymphocyte proliferation in glutathione-depleted lymphocytes: direct relationship between glutathione availability and the proliferative response. *Immunopharmacology* 18:223-235.
- Hogberg, J. and Alexander J. 1986. «Selenium» In : L. Friberg., G. Nordberg et V.B. Vouk. (éds). *Handbook on the toxicology of metals, 2d ed. Specific metals. Amsterdam: Elsevier.* P. 482-512.
- Hultberg, B., Andersson, A. and Isaksson, A. 1998. Alterations of thiol metabolism in human cell lines induced by low amounts of copper, mercury or cadmium ions. *Toxicology* 126:203-212.
- Hultberg, B., Andersson, A. and Isaksson, A. 2001. Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol. *Toxicology* 156:93-100.
- Institoris, L., Siroki, O., Undeger, U., Desi, I. and Nagymajtenyi, L. 1999. Immunotoxicological effects of repeated combined exposure by cypermethrin and the heavy metals lead and cadmium in rats. *Int J Immunopharmacol* 21:735-743.
- Janeway, C.A., Travers, J. and Travers P. 1997. *Immunobiologie.* De Boeck & Larcier Paris, Bruxelles,
- Jannalagadda, S.B. and Prasada Rao, P.V.V. 1993. Toxicity, bioavailability and metal speciation. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C:585-595.
- Knight, J.A. 2000. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30:145-158.
- Koller, L.D. 1980. Immunotoxicology of heavy metals. *Int. J. Immunopharmacology* 2:269-279.
- Koller, L.D. 1982. In vitro assessment of humoral immunity following exposure to heavy metals. *Environ Health Perspect* 43:37-39.
- Koropatnick, J. and Zalups, R.K. 1997. Effect of non-toxic mercury, zinc or cadmium pretreatment on the capacity of human monocytes to undergo

lipopolysaccharide-induced activation. *Br J Pharmacol* 120:797-806.

- Lawrence, D.A. 1981. Heavy metal modulation of lymphocyte activities. 1. In vitro effects of heavy metals on primary humoral immune responses. *Toxicol Appl Pharmacol* 57:439-451.
- Lawrence, D.A. 1985. Immunotoxicology of heavy metals. In *Immunotoxicology and Immunopharmacology* 341-353.
- Lawrence, D.A. and McCabe, M.J. 2002. Immunomodulation by Metals. *International Immunopharmacology* 2:293-302.
- Lawrence, D.A., Song, R. and Weber, P. 1996. Surface thiols of human lymphocytes and their changes after in vitro and in vivo activation. *J Leukoc Biol* 60:611-618.
- Leffel, E.K., Wolf, C., Poklis, A. and White, K.L. 2003. Drinking water exposure to cadmium, an environmental contaminant, results in the exacerbation of autoimmune disease in the murine model. *Toxicology* 188:233-250.
- Lindh, U., Danersund, A. and Lindvall, A. 1996. Selenium protection against toxicity from cadmium and mercury studied at the cellular level. *Cell Mol Biol* 42:39-48.
- MA, J.T., Mandelin, J., Ceponis, A., Miller, N.E., Hukkanen, M., Ma, G.F. and Kontinen, Y.T. 2003. Regulation of macrophage activation. *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* 60:2334-2346.
- Misra, U.K., Gawdi, G., Akabani, G. and Pizzo, S.V. 2002. Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: the role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms. *Cell Signal* 14:327-340.
- Ohsawa, M. and Kimura, M. 1979. Enhancement of beta 2-microglobulin formation induced by phytohemagglutinin and mercuric ion in cultured human leucocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 91:569-574.
- Ohsawa, M., Masuko-Sato, K., Takahashi, K. and Otsuka, F. 1986. Strain differences in cadmium-mediated suppression of lymphocyte proliferation in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 84:379-388.
- Olabarrieta, I., L'Azou, B., Yuric, S., Cambar, J. and Cajaraville, M.P. 2001. In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicol In Vitro* 15:511-517.
- Ortega, H., Lopez, M. and Salvagio, J. 1994. Effect of interferon gamma production after *in vitro* exposure to methylmercury chloride. *J. Invest. Med* 43:67
- Osorio, R., Toledano, M., Liebana, J., Rosales, J.I. and Lozano, J.A. 1995. Environmental microbial contamination. Pilot study in a dental surgery. *Int*

Dent J 45:352-357.

- Otsuka, F. & Ohsawa, M. 1991. Differential susceptibility of T- and B-lymphocyte proliferation to cadmium: relevance to zinc requirement in T-lymphocyte proliferation. *Chem Biol Interact* 78:193-205.
- Parnham, M.J., Winkelmann, J. and Leyck, S. 1983. Macrophage, lymphocyte and chronic inflammatory responses in selenium deficient rodents. Association with decreased glutathione peroxidase activity. *Int J Immunopharmacol* 5:455-461.
- Pelletier, L., Castedo, M. Bellon, B. and Druet, P. 1994. Mercury and autoimmunity. 2nd ed., In *Immunotoxicology and Immunopharmacology* (Dean, J.H. and Luster, M.I. Eds), Raven Press, New-york:539-552.
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J.M. and Venkatachalam, M.A. 1999. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 107:489-506.
- Serfass, R.E. and Ganther, H.E. 1975. Defective microbicidal activity in glutathione peroxidase-deficient neutrophils of selenium-deficient rats. *Nature* 255:640-641.
- Sgagias, M., Balter, N.J. and Gray, I. 1989. Uptake and subcellular distribution of cadmium in resting and mitogen-activated lymphocytes and its relationship to a metallothionein-like protein. *Environ Res* 49:262-270.
- Shankar, A.H. and Prasad, A.S. 1998. Zinc and Immune Function: the Biological Basis of Altered Resistance to Infection. *American Journal of Clinical Nutrition* 68:447S-463S.
- Sharma, R.P. and Dugyala, R.R. 1996. Effects of metals on cell-mediated immunity and biological response modulators. In *Toxicology of metals*, ed. L.W. Chang, pp.785-796. Boca Raton, FL:CRC Press.
- Spallholz, J.E., Martin, J.L., Gerlach, M.L. and Heinzerling, R.H. 1973a. Immunologic responses of mice fed diets supplemented with selenite selenium. *Proc Soc Exp Biol Med* 143:685-689.
- Spallholz, J.E., Martin, J.L., Gerlach, M.L. and Heinzerling, R.H. 1973b. Enhanced immunoglobulin M and immunoglobulin G antibody titers in mice fed selenium. *Infect Immun* 8:841-842.
- Spallholz, J.E., Martin, J.L., Gerlach, M.L. and Heinzerling, R.H. 1975. Injectable selenium: effect on the primary response of mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 148:37-40.
- Suen, Y.K., Fung, K.P., Choy, Y.M., Lee, C.Y., Chan, C.W. and Kong, S.K. 2000. Concanavalin A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells

through clustering of mitochondria and release of cytochrome c. *Apoptosis* 5:369-377.

- Tapiero, H., Townsend, d.M. and Tew, K.D. 2003. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed. Pharmacother* 57:134-144.
- Thompson, S.A., Roellich, K.L., Grossmann, A., Gilbert, S.G. and Kavanagh, T.J. 1998. Alterations in immune parameters associated with low level methylmercury exposure in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 20:299-314.
- Tsangaris, G.T. and Tzortzatou-Stathopoulou, F. 1998. Cadmium induces apoptosis differentially on immune system cell lines. *Toxicology* 128:143-150.
- Unanue, E.R. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Ann. Rev. Immunol* 2:395-428.
- Unanue, E.R. and Allen, P.M. 1987. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 236:551-557.
- Unoshima, M., Nishizono, A., Takita-Sonoda, Y., Iwasaka, H. and Noguchi, T. 2001. Effects of zinc acetate on splenocytes of endotoxemic mice: enhanced immune response, reduced apoptosis, and increased expression of heat shock protein 70. *J Lab Clin Med* 137:28-37.
- Vallee, B.L. and Falchuk, K.H. 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 73:79-118.
- van der Meide, P.H., de Labie, M., Botman, C., van Bennekom, W.P., Olsson, T., Aten, J. and Weening, J.J. 1993. Mercuric chloride down-regulates T cell interferon-gamma production in brown Norway but not in Lewis rats; role of glutathione. *Eur J Immunol* 23:675-681.
- Voccia, I., Krzystyniak, K., Dunier, M., Flipo, D., and Fournier, M. 1994. In vitro mercury-related cytotoxicity and functional impairment of the immune cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 29:37-48.
- Vos, J., Van Loveren, H., Wester, P. and Vethaak, D. 1989. Toxic effects of environmental chemicals on the immune system. *Trends Pharmacol Sci* 10:289-292.
- Vos, J.G. 1977. Immune suppression as related to toxicology. *CRC Crit Rev Toxicol* 5:67-101.
- Wild, L.G., Ortega, H.G., Lopez, M. and Salvaggio, J.E. 1997. Immune system alteration in the rat after indirect exposure to methyl mercury chloride or methyl mercury sulfide. *Environ Res* 74:34-42.
- Wong, S., Fournier, M., Coderre, D., Banskaand, W., Krzystyniak, K. 1992.

Environmental immunotoxicology. In *Animal biomarkers as pollution indicators*, ed. D. Peakall, pp.167-281. New-York: Chapman & Hall.

- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306.
- Yang, G., Wang, S., Zhou, R. and Sun, S. 1983. Endemic selenium intoxication of humans in China. *Am J Clin Nutr* 37:872-881.
- Yasutake, A. and Hirayama, K. 1994. Acute effects of methylmercury on hepatic and renal glutathione metabolism in mice. *Arch Toxicol* 68:512-516.
- Zelikoff, J.T. 1993. Metal pollution-induced immunomodulation in fish. *Annual Rev. Fish Disease* 2:305-325.
- Zelikoff, J.T., Smialowicz, R., Bigazzi, P.E., Goyer, R.A., Lawrence, D.A., Maibach, H.I. and Gardner, D. 1994. Immunomodulation by metals. *Fundam Appl Toxicol*, vol.22. no.1,p.1-7.
- Zelikoff, J.T. and Smialowicz, R.J. 1996. Metal-induced alterations in innate immunity. In *Toxicology of metals*, ed. L.W.Chang, pp.811-820. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Zelikoff, J.T. and Thomas, P.T. 1998. *Immunotoxicology of environmental and occupational metals*. London, Angleterre,
- Zurgil, N., Kaufman, M., Solodiev, I. and Deutsch, M. 1999. Determination of cellular thiol levels in individual viable lymphocytes by means of fluorescence intensity and polarization. *J Immunol Meth* 229:23-34.

CHAPITRE III

DISCUSSION

Les études, *in vitro*, chez les animaux sont des approches alternatives nous permettant d'étudier les mécanismes de modulation des métaux lourds sur le système immunitaire humain et en particulier, en ce qui nous intéresse dans cette recherche, sur les lymphocytes (Lawrence & McCabe, 2002). Dans les modèles animaux, les effets toxicologiques des métaux lourds, sur le système immunitaire se manifestent par des changements dans le poids et l'apparence histologique des organes lymphoïdes tels le thymus, la rate et les ganglions lymphatiques. On dénote aussi un nombre modifié de globules blancs ainsi que des changements dans les fonctions des cellules immunitaires (Vos et al., 1989). De plus avec les modèles animaux *in vitro*, nous pouvons utiliser des doses limites pour mesurer la toxicité d'un produit avec une grande précision et reproductibilité (Olabarrieta et al., 2001).

Les métaux lourds étudiés dans cette recherche (mercure (organique et inorganique), cadmium, zinc et le sélénium) peuvent affecter le système immunitaire à différents degrés selon leur toxicité (Lawrence, 1985). Ils peuvent altérer aussi bien la réponse immunitaire non-adaptative (naturelle) en augmentant le risque des infections ainsi que la réponse adaptative (spécifique) en augmentant le développement de maladies néoplasiques et auto-immunes (Vos et al., 1989).

Toxicité des différents métaux

Les métaux lourds sont une menace environnementale possédant des effets très toxiques sur le système immunitaire et en particulier sur les lymphocytes. Les mécanismes par lesquels les effets des métaux sont induits dans la cellule dépendent en effet du type de métal, sa distribution et sa concentration intracellulaire (Tsangaris & Tzortzatou-Stathopoulou, 1998). Afin de mesurer le degré de toxicité de chacun des métaux à l'étude, nous avons fait pour chaque métal une courbe dose-réponse en présence de lymphocytes de rate de souris. Comme le démontre la figure 1a de l'article, le chlorure de méthylmercure s'est avéré le métal le plus toxique suivi du chlorure de mercure. La

cytotoxicité du mercure organique s'est produite à une concentration de 10^{-5} M et celle du mercure inorganique à une concentration de 10^{-4} M, ce qui fait dire que le chlorure de méthylmercure est dix fois plus toxique que le chlorure de mercure (Voccia et al., 1994). Le mercure et ses congénères sont des substances extrêmement toxiques. Les différentes formes de mercure que ce soit organique ou inorganique ainsi que les vapeurs de mercure peuvent altérer le système immunitaire même à de très faibles doses. Le mercure est capable de provoquer des maladies auto-immunes et de promouvoir des infections chroniques. Ces insuffisances immunitaires peuvent déclencher le développement et la progression de cancers (Shenker et al., 2000).

Le chlorure de cadmium s'est avéré le troisième métal le plus toxique, diminuant la viabilité des lymphocytes de 80% après 48 heures d'incubation pour une concentration de 10^{-4} M. La toxicité du cadmium dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'administration du métal, la dose, l'espèce étudiée ainsi que des facteurs environnementaux et nutritionnels. Des études antérieures ont démontré que le cadmium n'affecte pas la viabilité des cellules de moules (*Mytilus galloprovincialis*) à des doses où la viabilité des cellules d'une lignée cellulaire LLC-PK1 (cellules provenant du tube rénal proximal) est significativement diminuée. Ceci indique que les cellules de la lignée sont plus sensibles au cadmium que les cellules de moules (Olabarrieta et al., 2001). On a noté le même genre d'observation où les macrophages murins ont été plus résistants à l'effet du cadmium que les lymphocytes. Ceci est probablement dû au fait que les macrophages produisent plus de thiols (voir fig.14 de l'article) dont les métallothionéines (MTs) qui éliminent rapidement le cadmium hors de la cellule. Les sévères dommages du cadmium sur les lymphocytes peuvent être dûs au bas taux de MTs avec une forte accumulation de cadmium intracellulaire (Olabarrieta et al., 2001).

Le chlorure de zinc a causé de la cytotoxicité au niveau des lymphocytes à des concentrations de 10^{-3} M seulement. Le zinc n'est pas reconnu comme étant très toxique car il est aussi considéré comme un antioxydant contre les effets néfastes du cadmium. Les interactions du zinc avec le cadmium et le plomb peuvent modifier la toxicité de ces métaux (Goyer, 2001). Il a été démontré auparavant que la toxicité du zinc après administration, *in vivo*, était relativement faible parce que ce métal était redistribué très rapidement dans le corps. Plusieurs études ont démontré que les cellules mises en culture provenant de rongeurs, d'humains (en particulier de la prostate), de fibroblastes, ou de

lignée cellulaire Hela démontrent une sévère toxicité en présence de concentrations de zinc plus grandes que 100 μM (10^{-4}M). Le traitement des hépatocytes de rats en présence de concentrations de zinc plus grandes que 50 μM a aussi démontré une cytotoxicité. Par contre d'autres chercheurs n'ont rapporté aucune toxicité chez les cultures de cellules rénales de rats ainsi que des monocytes humains en utilisant les mêmes doses. Ce qui fait dire qu'il y a deux facteurs importants à prendre en considération lorsque nous exposons des cellules *in vitro* en présence de zinc : (1) que la distribution du zinc *in vivo* est régulée par des mécanismes homéostatiques qui jouent principalement un rôle dans le niveau de métal absorbé par le foie et que (2) sous des conditions normales, le degré d'excrétion du zinc par l'urine peut-être relativement élevé. Ces deux systèmes de régulation sont absents des expériences faites *in vitro* et peuvent être difficilement simulés (Rodilla et al., 1998).

Le tétrachlorure de sélénium s'est avéré le métal le moins toxique en diminuant la viabilité de seulement 56% par rapport au contrôle. Le sélénium est considéré comme jouant un rôle d'antioxydant grâce à son enzyme glutathion peroxydase (Tinggi, 2003). Dans une étude antérieure, les effets antioxydants du sélénium ont protégé la lignée cellulaire K-562 des effets toxiques du cadmium en augmentant sa viabilité (Frisk et al., 2002). Le sélénium a aussi eu un effet protecteur sur les lignées cellulaires des cellules de dauphins contre la toxicité du mercure inorganique (Wang et al., 2001).

En général, les analyses, *in vitro*, démontre une toxicité des métaux lourds sur la réponse humorale selon l'ordre suivant : $\text{Hg} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Co} > \text{Cr} > \text{Mn} > \text{Zn} > \text{Sn}$ (Lawrence, 1985). Nos résultats démontrent aussi que les lymphocytes sont plus sensibles que les macrophages à l'effet toxique des métaux lourds étudiés (figures 1a et ab de l'article).

Pré-activation des lymphocytes

La pré-activation des lymphocytes avec la concanavaline A (Con A) avait pour but de les faire progresser de la phase G0 vers la phase G1 du cycle cellulaire (Janeway et al., 1997) sans pour autant provoquer leur mitose et leur prolifération. Nous avons donc laissé la Con A en présence des lymphocytes pour une durée de 18 heures seulement. Il a été démontré que la stimulation ou l'activation des cellules T avec un antigène ou avec des

mitogènes polyclonaux (Con A) transforme ces cellules T, (en deçà de quelques heures) d'apparences petites avec un petit cytoplasme, en un large lymphoblaste avec un cytoplasme abondant (Hamilos et al., 1991; Droge et al., 1995). L'activation des cellules est représentée dans les graphiques, par tous les contrôles, où les désintégrations par minute (DPM), des contrôles pré-activés, sont supérieures à ceux non pré-activés (figures 5,6,7,8 et 9 de l'article). Cet état d'activation provoque une augmentation du volume cellulaire, un cytoplasme volumineux contenant divers organites, en particulier les mitochondries et les polyribosomes libres (Roitt et al., 1997). Ce processus génère une demande extrême pour plusieurs métabolites et ce, aux limites des capacités du transport membranaire (Droge et al., 1995). Des études ont démontré qu'en diminuant le niveau de glutathion intracellulaire, nous inhibons l'activation des lymphocytes T induite par un mitogène tel la Con A (Hamilos et al., 1991). Plusieurs études ont aussi démontré qu'une première partie de la prolifération des lymphocytes T (i.e. l'activation) est affectée par une diminution en glutathion (GSH). Ce qui fait qu'en activant (nous parlerons dans le mémoire d'une pré-activation, car cette étape technique précède toutes les autres étapes qui cherchent à évaluer la réponse des lymphocytes pré-activés ou pas (au repos) face à 5 métaux lourds) les lymphocytes avec la Con A, nous augmentons leur contenu intracellulaire en thiols et plus spécifiquement en GSH, qui est le thiol le plus abondant dans la cellule. Le glutathion maintient le système d'oxydo-réduction (REDOX) dans la cellule en éliminant les radicaux libres. Il se conjugue aux substances toxiques (métaux lourds) et les élimine (Kavanagh et al., 1990).

L'activation des macrophages par la Con A a provoqué une augmentation de l'expression de la molécule I-A à leur surface comparée aux macrophages non pré-activés (Adams & Hamilton, 1984; Unanue & Allen, 1987). L'expression de l'Ia est en relation avec leur pouvoir de présenter l'antigène aux lymphocytes (Adams, 1982; Adams & Hamilton, 1984). Une perte de l'expression de l'Ia se traduit par une réduction de la présentation de l'antigène tandis qu'une augmentation de l'acquisition de l'Ia à la surface des macrophages par la Con A se traduit par une augmentation de leur fonction de cellules accessoires (Unanue, 1984).

Effet de la pré-activation sur la courbe de toxicité et effet protecteur de la pré-activation

La transformation lymphoblastique est un test très utilisé en immunologie car elle permet de quantifier la prolifération lymphocytaire suite à une stimulation avec un antigène ou un mitogène. Par ce test, nous avons voulu démontrer les effets de la pré-activation avec la Con A sur les courbes de toxicité des 5 métaux à l'étude. Pour quantifier cet effet, nous avons fait des courbes dose-réponse avec des lymphocytes pré-activés et non pré-activés en présence de ces métaux lourds (figures 5,6,7,8 et 9 de l'article). Nous avons calculé les concentrations inhibitrices 50 (CI₅₀) qui sont les concentrations qui inhibent 50% de la prolifération des lymphocytes (Table 1 de l'article). Comme on a pu le constater tous les lymphocytes pré-activés ont proliféré beaucoup plus que ceux non pré-activés et ce, peu importe le métal utilisé et dans les plages de concentrations où il n'y a pas eu de mortalité cellulaire. La pré-activation des lymphocytes a aussi augmenté leur CI₅₀, les rendant plus résistantes à l'effet néfaste des métaux lourds étudiés. Les lymphocytes pré-activés ont été entre 1.2 et 6.7 fois plus résistants que les lymphocytes non pré-activés (table 1 de l'article). Nous avons vu que la pré-activation des lymphocytes par la concanavoline A augmentait le contenu intracellulaire en glutathion et favorisait une augmentation de la prolifération ainsi qu'une résistance accrue des lymphocytes face aux métaux lourds (figures 5,6,7,8 et 9 de l'article).

Tous les lymphocytes pré-activés avec la Con A ont démontré un niveau plus élevé de thiols que ceux non pré-activés et ce pour tous les métaux aux concentrations où il n'y a pas eu de cytotoxicité (figures 10,11,12,13 et 14 de l'article).

Mercure organique et inorganique

Une augmentation de la prolifération des lymphocytes pré-activés pour les plus faibles concentrations en mercure organique (10^{-9} à 10^{-7} M) a été observée lors de notre recherche (figure 6 de l'article). Dans les recherches antérieures, il a été démontré que le mercure a augmenté la stimulation des lymphocytes humains après 6 jours de culture et a stimulé aussi la production de β_2 -microglobuline (Ohsawa & Kimura, 1979). Les lymphocytes pré-activés ont démontré un niveau de thiols plus élevé que ceux non pré-activés en présence de mercure organique (figure 10 de l'article). D'autres études ont aussi rapporté que le mercure organique influence le métabolisme du GSH à l'intérieur de la cellule lors d'exposition *in vivo*. Ses chercheurs ont remarqué une augmentation de la

synthèse de la GSH dans le foie et les reins des souris exposées *in vivo* au MeHgCl. Ils ont conclu que le mercure organique induisait l'altération du métabolisme de la GSH via l'enzyme γ -glutamylcystéine synthétase qui se trouve augmentée dans les groupes traités au mercure organique. Ce qui laisse supposer que les fortes concentrations en GSH dans les cellules pré-activées ont fait en sorte qu'il y a eu une inhibition de l'effet toxique du mercure sur les cellules aux concentrations où il ne provoque pas de mort cellulaire (de 10^{-9} à 10^{-6} M).

Cette augmentation de GSH aurait pour effet de protéger l'organisme contre l'action toxique et néfaste du méthylmercure (Yasutake & Hirayama, 1994). C'est aussi ce que nous avons observé lors du dosage des thiols intracellulaires, en particulier le GSH, en présence de mercure organique. Nos concentrations (représentées par la moyenne de fluorescence) en thiols intracellulaires ont augmenté par rapport au contrôle aux mêmes concentrations où il y a eu augmentation de la prolifération (figure 10 de l'article) dans les cellules pré-activées. Nous avons aussi observé, dans notre labo, lors de multiples expériences antérieures, *in vitro*, que le mercure organique favorise la prolifération des lymphocytes T aux doses non toxiques (résultats non publiés). Ce qui est aussi confirmé par d'autres chercheurs qui ont démontré que la prolifération des lymphocytes T est augmentée après 8 semaines d'exposition orale chez les rats au mercure organique pour par la suite être diminuée après 16 semaines de traitement (Wild et al., 1997).

En présence de mercure inorganique, nous avons observé une diminution de la prolifération des lymphocytes T pré-activés et non pré-activés avec la Con A (figure 7 de l'article). D'autres chercheurs ont rapporté des résultats similaires lorsqu'une exposition *in vitro* des lymphocytes humains et murins avec le chlorure de mercure a diminué leur réponse à la phytohéماغglutinine (PHA) et leur stimulation à la Con A (Sharma & Dugyala, 1996).

Plusieurs études sur le mercure organique et inorganique ont démontré une augmentation de la stimulation (Ortega et al., 1994), tandis que d'autres ont démontré un effet inhibiteur après des expositions *in vitro* et *in vivo* (van der Meide et al., 1993). Il est possible que les différences dans ces résultats dépendent de plusieurs variables comme le temps d'exposition (aigu ou chronique), la voie d'exposition (intra-péritonéale, orale etc...), la forme de mercure utilisée ainsi que sa concentration (Wild et al., 1997).

Cadmium

Pour le chlorure de cadmium, nous avons observé une augmentation significative de la prolifération des lymphocytes non pré-activés avec la Con A à la concentration 10^{-5} M et une augmentation non significative pour ce même groupe de cellules à la concentration 10^{-8} M (figure 5). Des résultats similaires ont aussi été observés, *in vitro*, antérieurement où des faibles doses de cadmium ont provoqué une stimulation de la synthèse de l'ADN, la multiplication cellulaire et des transformations malignes (Misra et al., 2002). Par contre, les lymphocytes pré-activés ont proliféré moins que leur contrôle respectif et ce, pour toutes les concentrations, comme si l'effet de les avoir pré-activés au début les rendait plus sensibles au cadmium même à faible dose. Une autre étude a aussi démontré une élévation des MTs dans les cellules pré-activées qui les ont protégées contre les effets immunotoxiques du cadmium (Sgagias et al., 1989).

Zinc

La prolifération des lymphocytes T a été augmentée pour toutes les concentrations en zinc (sauf 10^{-3} M où il y a cytotoxicité) dans les cellules pré-activées avec la Con A (figure 9 de l'article). Des résultats similaires ont été obtenus avec des lymphocytes en réponse à la PHA, Con A, LPS et SEA chez des animaux supplémentés en zinc (Koller, 1980). Un supplément de zinc augmente le nombre de cellules T ($CD4^{+}$ et $CD8^{+}$ cytotoxiques), le nombre de cellules NK et élève la production d'IL-2 et son récepteur (Ibs & Rink, 2003). Ceci est aussi confirmé par d'autres études où une augmentation en zinc dans la diète augmente la réponse et les fonctions des lymphocytes et des macrophages chez la souris et le rat (Shankar & Prasad, 1998).

Le niveau de glutathion intracellulaire a aussi été augmenté dans les concentrations de 10^{-9} à 10^{-5} M dans les lymphocytes pré-activés (figure 13 de l'article). Nous pouvons remarquer qu'en augmentant les concentrations en zinc, nous augmentons aussi le niveau de thiols dans les cellules pré-activées ou non par la Con A. Les métallothionéines (MTs) qui font parties de la grande famille des thiols ont beaucoup d'affinité pour le zinc. En augmentant les concentrations en zinc, nous augmentons par le fait même le niveau de MTs intracellulaires qui lient le métal et protège la cellule des effets toxiques. Le zinc lié aux MTs joue un rôle clé dans l'homéostasie de la cellule et par le fait même dans la protection du système immunitaire (Mocchegiani et al., 2000).

Sélénium

Toutes les concentrations sauf 10^{-8} , 10^{-4} (cytotoxicité) et 10^{-3} M (cytotoxicité) en sélénium ont augmenté la prolifération des lymphocytes T dans les cellules pré-activées avec la Con A (figure 8 de l'article). Dans les cellules non pré-activées, il y a eu aussi augmentation de la prolifération pour les concentrations intermédiaires: 10^{-8} , 10^{-7} et 10^{-6} M. Les niveaux de prolifération sont aussi similaires dans les 2 séries de cellules, ce qui fait dire que le sélénium est très peu toxique, qu'il est un élément essentiel, un anti-oxydant cellulaire, jouant un rôle de désintoxication cellulaire (Soares et al., 2003; Tapiero et al., 2003). Le sélénium est un métal unique (parmi les métaux) qui généralement augmente les réponses immunitaires plutôt que de les supprimer (Koller, 1980). Les effets antioxydants du Se seraient médiés par l'enzyme glutathion-peroxydase des cellules. Cet enzyme joue un rôle fondamental dans la réduction et l'inactivation du peroxyde d'hydrogène.

Une augmentation du GSH intracellulaire dans les lymphocytes pré-activés et non pré-activés a aussi été mesurée lors de cette recherche (figure 11 de l'article). Toutes les concentrations en sélénium ont augmenté le niveau de thiols intracellulaires, exceptées pour la concentration 10^{-3} M dans les lymphocytes pré-activés.

Apoptose dans les lymphocytes pré-activés et non pré-activés

Nous avons mesuré l'apoptose dans les lymphocytes activés et non activés en faisant des courbes dose-réponse avec différents métaux.

Mercure organique

Pour les faibles concentrations de mercure organique (10^{-9} , 10^{-8} et 10^{-7} M), nous avons obtenu un pourcentage d'apoptose légèrement plus élevé dans les lymphocytes non pré-activés que ceux pré-activés avec la Con A (figure 15 de l'article). Pour les autres concentrations, les lymphocytes pré-activés ont démontré un indice d'apoptose beaucoup plus prononcé que ceux non pré-activés. Le pourcentage le plus élevé (75%) a même été atteint à une concentration où on dénote beaucoup de mortalité lymphocytaire (10^{-5} M). Des études antérieures sur l'apoptose et le mercure organique ont démontré que lorsque le mercure entre dans la cellule, il y a immédiatement une baisse en thiols et cette baisse entraîne une production des EROs et l'oxydation des lipides mitochondriaux. Cette combinaison EROs et diminution des thiols provoque une activation de la caspase qui

s'esquisse en mort cellulaire (Shenker et al., 1999). Dans notre expérience, il n'y a pas eu de baisse en thiols intracellulaires au contact du mercure organique (figure 10 de l'article) sauf, aux concentrations cytotoxiques (10^{-5} à 10^{-3} M). Tous les lymphocytes pré-activés ont eu une augmentation significative ($p < 0.05$) du niveau de thiols intracellulaires tandis que les cellules non pré-activées ont eu un niveau égal ou légèrement supérieur en thiols comparé à leur contrôle respectif. Ces valeurs en thiols correspondent aux valeurs de l'apoptose, car lorsque nous avons des valeurs élevées en thiols, comme dans les lymphocytes pré-activés, les pourcentages d'apoptose sont plutôt faibles, excepté pour 10^{-6} M, où il y a eu augmentation non significative de l'indice d'apoptose.

Mercure inorganique

Pour le mercure inorganique, le pourcentage d'apoptose a augmenté avec les concentrations croissantes de mercure pour les lymphocytes pré-activés avec la Con A. Pour les cellules non pré-activées, le pourcentage d'apoptose a légèrement diminué dans les valeurs 10^{-9} à 10^{-6} M pour augmenter significativement à partir de 10^{-5} jusqu'à 10^{-3} M où on observe de la mortalité. Des études précédentes ont démontré que le fait de pré-activer des lymphocytes humains avec de la PHA ou de la PMA augmentait leur résistance au mercure et diminuait l'apoptose. Leur proposition était que les cellules pré-activées génèrent du GSH intracellulaire qui lui contrôlait la formation des EROs dans la cellule et réduisait par le fait même le phénomène d'apoptose. En regardant nos données de thiols intracellulaires pour le mercure inorganique (figure 12 de l'article), nous observons que le niveau de GSH est relativement le même pour le contrôle et pour toutes les concentrations de mercure dans les lymphocytes pré-activés. Le niveau va diminuer significativement à partir des concentrations 10^{-5} jusqu'à 10^{-3} M. Par contre pour les lymphocytes non pré-activés, les concentrations de GSH sont à peu près les mêmes que le contrôle excepté, aux concentrations 10^{-4} et 10^{-3} M. En regardant ces données, on s'aperçoit que le niveau de thiols intracellulaires n'est pas très élevé que l'on soit en présence de fortes concentrations de mercure ou non, ce qui fait dire que le mercure a quand même exercé sa toxicité peut importe le fait que les cellules étaient pré-activées ou non. Le plus haut taux d'apoptose a été obtenu à la concentration 10^{-5} M, concentration qui précède la concentration où on observe la cytotoxicité du mercure inorganique. Avec la concentration cytotoxique (10^{-4} M), les cellules non pré-activées ont eu un plus haut taux d'apoptose que les cellules pré-activées, ce qui vient corrélérer ici les données des autres

chercheurs qui ont trouvé que les cellules non pré-activées avaient un plus haut taux d'apoptose que les cellules pré-activées (Close et al., 1999).

Cadmium

Plusieurs études ont démontré qu'une exposition au cadmium *in vitro* ou *in vivo* induisait l'apoptose dans différents organes : foie, poumons, rein, prostate ainsi que dans différentes cellules immunitaires incluant les lymphocytes T et B (Dong et al., 2001). Dans notre recherche, le cadmium a induit l'apoptose pour toutes les concentrations (excepté 10^{-5} M pour les lymphocytes pré-activés) dans les cellules pré-activées et non pré-activées. Nous avons remarqué que le phénomène d'apoptose était plus marqué dans les cellules pré-activées que celles non pré-activées. Des études antérieures ont aussi démontré que le cadmium induisait l'apoptose mais à des degrés différents selon l'espèce cellulaire. Les lignées cellulaires Raji, qui sont des cellules cellulaires de lymphocytes B ont été beaucoup plus sensibles à l'apoptose que les lignées CCRF-CEM (lymphocytes T) et Molt-3 (lymphoblastes) qui ont démontré une résistance accrue au cadmium (Tsangaris & Tzortzatou-Stathopoulou, 1998). C'est le phénomène que nous avons aussi observé avec nos lymphocytes, pré-activés ou non, faisant augmenter l'apoptose de 115% dans les cellules pré-activées par rapport à celles non pré-activées. Il faut mentionner ici que l'indice élevé d'apoptose que nous avons obtenu est attribuable principalement à la forte cytotoxicité du cadmium sur les lymphocytes qui se produit généralement à cette concentration (figure 1a de l'article). Même à faible dose (10^{-7} M), nous avons eu une augmentation significative des lymphocytes pré-activés avec la Con A. Des résultats similaires ont été obtenus auparavant, par d'autres chercheurs, où on a démontré que le cadmium à faible dose déclenche le phénomène d'apoptose chez les lignées de cellules -T (El Azzouzi et al., 1994). Un des mécanismes, exploré par d'autres recherches, a été celui qu'une exposition au cadmium provoquerait un changement cytoplasmique de la concentration en Ca^{2+} qui activerait la caspase-3 qui est un médiateur crucial dans le phénomène d'apoptose (Shen et al., 2001). D'autres études ont démontré que le cadmium augmenterait le calcium intracellulaire qui déclencherait l'activation de la caspase-3 provoquant ainsi la fragmentation de l'ADN ainsi que le relâchement du cytochrome *c* de la mitochondrie (Crompton, 1999). Plusieurs de ces mécanismes restent cependant à être élucidés.

Zinc

Toutes les concentrations en zinc ont démontré un pourcentage d'apoptose supérieur au contrôle et ce pour les lymphocytes pré-activés et non pré-activés exceptées, pour une concentration seulement où le pourcentage est légèrement inférieur au contrôle (10^{-6} M pour les lymphocytes non pré-activés (figure 16 de l'article). Ces résultats obtenus sont cependant contradictoires avec ceux obtenus lors d'expériences précédentes par d'autres chercheurs. Plusieurs études faites, *in vitro*, antérieurement ont démontré qu'une déficience en zinc augmente l'apoptose dans les lignées cellulaires lymphoïdes et myéloïdes (Provinciali et al., 1995). Des concentrations aussi élevées que $600 \mu\text{M}$ (6×10^{-4} M) ont diminué le pourcentage d'apoptose de 12% tandis que nous avons eu une augmentation de 33%. Par contre pour les concentrations de $15 \mu\text{M}$, les études antérieures ont démontré une augmentation de 455% du pourcentage d'apoptose tandis que nous avons obtenu une augmentation de 80%. Une explication possible est que l'espèce de cellules étudiées était différente pour ces expériences (thymocytes vs splénocytes) ainsi que le temps d'exposition avec le zinc (20 minutes vs 3 heures). Par ailleurs, ces mêmes chercheurs, lors d'une expérience subséquente, ont augmenté leur temps d'exposition à 8 heures et ensuite à 20 heures et leur pourcentage d'apoptose a été augmenté de 157% seulement comparé à 455% obtenu auparavant. Ce qui laisse peut-être supposer qu'en augmentant le temps d'incubation du zinc avec les cellules, nous diminuons la viabilité des cellules et augmentons peut-être plus la nécrose que l'apoptose pour des doses plus élevées en zinc. En pré-activant les lymphocytes, nous avons eu sensiblement la même réponse qu'avec les cellules non pré-activées sauf à la concentration la plus élevée en zinc où on a obtenu un indice d'apoptose plus élevé.

Sélénium

Pour les cellules pré-activées, l'indice d'apoptose à augmenter de façon graduelle avec les concentrations croissantes en sélénium, pour atteindre son maximum à 10^{-3} M. Par contre pour les cellules non pré-activées le taux d'apoptose est demeuré soit égal (10^{-9} M), a légèrement diminué (10^{-8} et 10^{-7} M) ou a légèrement augmenté (10^{-6} et 10^{-5} M) pour augmenter significativement aux concentrations 10^{-4} et 10^{-3} M (figure 3 du mémoire). Il est bien connu que le glutathion, qui est l'anti-oxydant majeur de la cellule est de très près relié au métabolisme et à la bio-activité du sélénium. Lorsque nous pré-activons les cellules avec la Con A, nous augmentons son contenu intracellulaire en thiols et plus

particulièrement en glutathion (GSH) (Fig. 11 de l'article). Mais le GSH peut jouer 2 rôles en présence de sélénium: il peut jouer le rôle de pro-oxydant en augmentant la formation des EROs, induire un stress oxydatif et augmenter l'apoptose. Il peut par contre jouer le rôle d'anti-oxydant en provoquant une augmentation de la lactate déhydrogénase (LDH), une inhibition de la croissance cellulaire et une diminution de l'apoptose (Shen et al., 2000). Nous pouvons conclure selon nos résultats que le glutathion en présence de sélénium a joué un rôle de pro-oxydant en augmentant l'apoptose chez les lymphocytes pré-activés par rapport à ceux non activés et ce pour toutes les concentrations.

Comparer les niveaux de thiols entre les lymphocytes et les macrophages pré-activés et non pré-activés

En terminant cette étude, nous avons voulu faire une comparaison des niveaux de thiols entre les deux populations, lymphocytes et macrophages, pré-activées et non pré-activées. Le fait d'activer les deux populations a eu comme résultat que les niveaux de glutathion et de cystéine de part et d'autre ont été augmentés. Par la suite, nous avons mis ces deux populations respectives (cellules pré-activées et non pré-activées) en présence des cinq métaux à l'étude. Comme le démontre les figures 10,11,12,13 et 14 de l'article tous les macrophages pré-activés et non pré-activés ont obtenu un niveau de thiols intracellulaires plus élevé que les lymphocytes et cela peu importe le métal présent (sauf avec le CdCl_2 à la concentration 10^{-3}M (figure 14 de l'article)).

Très peu de chercheur ont mesuré les niveaux de thiols intracellulaires dans les deux populations à l'intérieur de la même recherche et, ceux qui l'ont expérimentée, ont utilisé des unités de mesure différentes pour les deux populations (Fay et al., 1994). Comme nos résultats le démontrent les niveaux de thiols intracellulaires ont été plus élevés dans les macrophages que dans les lymphocytes. En effet, les macrophages ont une quantité considérable de cystéine qui leur permet de synthétiser du glutathion et même de participer à la formation du glutathion chez les lymphocytes. Il a été démontré que les macrophages activés transféraient un grand nombre de cystéine réduite pour ainsi augmenter le niveau intracellulaire en glutathion des cellules T activées se situant aux alentours (Droge et al., 1995).

Les travaux de Droge et al., ont démontré que les thiols produits par les macrophages augmentent le contenu intracellulaire en GSH dans les lymphocytes régularisant par le fait même leur prolifération (Droge et al., 1995; Gmunder et al., 1990). L'interaction entre les macrophages et les lymphocytes est donc essentielle afin de répondre aux changements immunologiques qui s'effectuent lorsque la cellule est prise avec différentes agressions. La réponse des lymphocytes à une grande variété de stimuli requière la participation des macrophages comme cellules accessoires (Rosenberg & Lipsky, 1979).

Une autre étude a démontré qu'en stimulant les macrophages avec un lipopolysaccharide (LPS), nous induisons chez les macrophages la production de plusieurs facteurs à effets protecteurs contre les effets néfastes des EROs. En effet, les macrophages activés par le LPS vont relarguer des thiols, spécialement de la cystéine, qui est un précurseur majeur du GSH, et réguler le GSH à l'intérieur des lymphocytes, les protégeant par le fait même des stress oxydatifs engendrés par les métaux lourds (Fay et al., 1995).

Une autre étude a aussi démontré que le contact avec un contaminant comme le diésel provoque une libération de thiols des macrophages et des lymphocytes mais de façon très différente. Le niveau de thiols va être augmenté dans les deux populations mais on va retrouver plus de GSH au niveau des macrophages et plus de cystéine au niveau des lymphocytes, ce qui fait dire qu'une exposition à différents contaminants altère le métabolisme des thiols dans les deux populations mais de façon très différente (Al-Humadi et al., 2002).

En soumettant nos deux populations pré-activées et non pré-activées à différents métaux lourds, nous avons observé que les macrophages produisent plus de thiols que les lymphocytes, par des mécanismes différents, les rendant plus résistants à l'effet néfaste de ces contaminants sur le système immunitaire.

CONCLUSION

Au cours de cette recherche, nous avons évalué l'effet de cinq métaux lourds présents dans l'environnement mis en contact *in vitro* avec des cellules de rates de souris, pré-activées ou non pré-activées afin d'obtenir des données immunotoxicologiques dans le but d'évaluer le risque associé à ces expositions.

Notre premier objectif, qui était de déterminer la toxicité de ces cinq métaux lourds suite à des expositions *in vitro* avec des lymphocytes murins, nous a permis d'observer que le chlorure de méthylmercure était le métal le plus toxique suivi par le chlorure de mercure, le premier s'avérant dix fois plus toxique que le deuxième. Le chlorure de cadmium a été le troisième métal le plus toxique suivi du chlorure de zinc. Le tétrachlorure de sélénium s'est avéré le métal le moins toxique en diminuant la viabilité des lymphocytes de seulement 56% par rapport au contrôle.

Notre deuxième objectif, qui était de déterminer l'effet de la pré-activation des lymphocytes murins, avec la Con A sur la courbe de toxicité, s'est avéré, en effet, très concluant. La pré-activation des lymphocytes a augmenté les concentrations inhibitrices 50 (CI₅₀) rendant ces cellules plus résistantes à l'effet néfaste des métaux lourds étudiés. Les lymphocytes pré-activés ont été entre 1.2 et 6.7 fois plus résistants que les lymphocytes non pré-activés en présence des différents métaux (Table 1 de l'article).

Nous avons aussi démontré avec notre troisième objectif que tous les lymphocytes pré-activés avec la Con A ont démontré un niveau plus élevé de thiols intracellulaires que ceux non pré-activés et ce pour tous les métaux aux concentrations où, il n'y a pas eu de cytotoxicité.

Avec le quatrième objectif, qui était de mesurer l'indice d'apoptose dans les lymphocytes pré-activés et non pré-activés, les réponses obtenues ont été différentes selon le métal étudié. Nous avons observé un pourcentage d'apoptose légèrement plus élevé chez les lymphocytes non pré-activés que ceux pré-activés avec la Con A pour les faibles concentrations de mercure organique. Avec les plus fortes concentrations, les lymphocytes pré-activés ont démontré un phénomène d'apoptose beaucoup plus prononcé que ceux non pré-activés. Pour le mercure inorganique, le pourcentage d'apoptose a augmenté avec les concentrations croissantes de mercure pour les lymphocytes pré-activés avec la Con A. Le cadmium a induit l'apoptose pour toutes les concentrations dans les cellules pré-activées

et non pré-activées. L'apoptose a cependant été plus marquée dans les lymphocytes pré-activés que ceux non pré-activés. Pour le zinc, toutes les concentrations ont démontré un pourcentage d'apoptose supérieur au contrôle et ce pour les lymphocytes pré-activés et non pré-activés exceptées, pour une concentration seulement où l'indice d'apoptose est légèrement inférieur au contrôle (10^{-6} M pour les lymphocytes non pré-activés). Avec les cellules pré-activées, le taux d'apoptose a augmenté de façon graduelle avec les concentrations croissantes en sélénium, pour atteindre son maximum à 10^{-3} M. Par contre pour les cellules non pré-activées le taux d'apoptose est demeuré soit égal (10^{-9} M), a légèrement diminué (10^{-8} et 10^{-7} M) ou a légèrement augmenté (10^{-6} et 10^{-5} M) pour augmenter significativement aux concentrations 10^{-4} et 10^{-3} M (figure 3 du mémoire).

Enfin, le dernier objectif qui était de comparer les niveaux de thiols entre les macrophages et les lymphocytes pré-activés et non pré-activés, comme le démontre les figures 10,11,12,13 et 14 de l'article, tous les macrophages pré-activés et non pré-activés ont obtenus un niveau de thiols intracellulaires plus élevés que les lymphocytes et cela peu importe le métal présent (sauf avec le CdCl_2 à la concentration 10^{-3} M (figure 14 de l'article)).

En général, les études *in vitro* et *in vivo* chez les animaux sont très utiles et comparables aux études faites chez l'humain. Cette étude chez les souris *in vitro* nous a permis de découvrir des mécanismes d'immunomodulation par les métaux qui pourraient se retrouver chez l'humain: les systèmes murin et humain ayant des réactivités face aux métaux très similaires (Lawrence & McCabe, 2002). Cette étude nous a permis de vérifier que la pré-activation des cellules avec la concanavaleine A offre une meilleure protection de la cellule contre l'action toxique des métaux lourds, qu'elle augmente le contenu intracellulaire en thiols et que les macrophages ont un contenu intracellulaire en thiols plus élevé que les lymphocytes.

PERSPECTIVES FUTURES

Après ces études *in vitro*, il serait intéressant de faire des expérimentations *in vivo* chez la souris avec l'ingestion de ces mêmes métaux lourds via la nourriture. Il serait aussi intéressant de faire des expérimentations *in vivo* en pré-traitant les souris avec des substances anti-oxydantes telles que le sélénium et le zinc.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS NON-SOUMIS POUR PUBLICATION

Les prochains graphiques (3) représentent les résultats obtenus pour le test d'apoptose réalisé avec les lymphocytes pré-activés et non pré-activés. Ces graphiques non pas été inclus dans l'article.

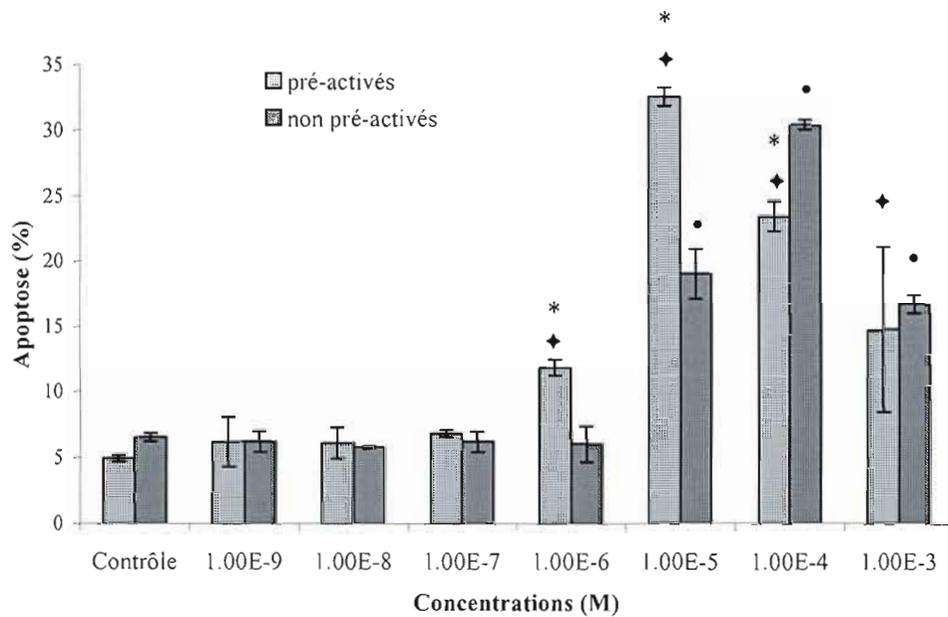


Figure 1. Courbe dose-réponse du % d'apoptose des lymphocytes pré-activés et non pré-activés en présence de chlorure de mercure (HgCl_2). Les résultats sont exprimés en % d'apoptose en fonction de la concentration en HgCl_2 et sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur-type. * signifie une différence significative entre les lymphocytes pré-activés et non pré-activés. ◆ (pré-activés) ● (non pré-activés), signifie une différence significative entre les lymphocytes pré-activés et non pré-activés par rapport à leur groupe contrôle respectif. $P < 0.05$.

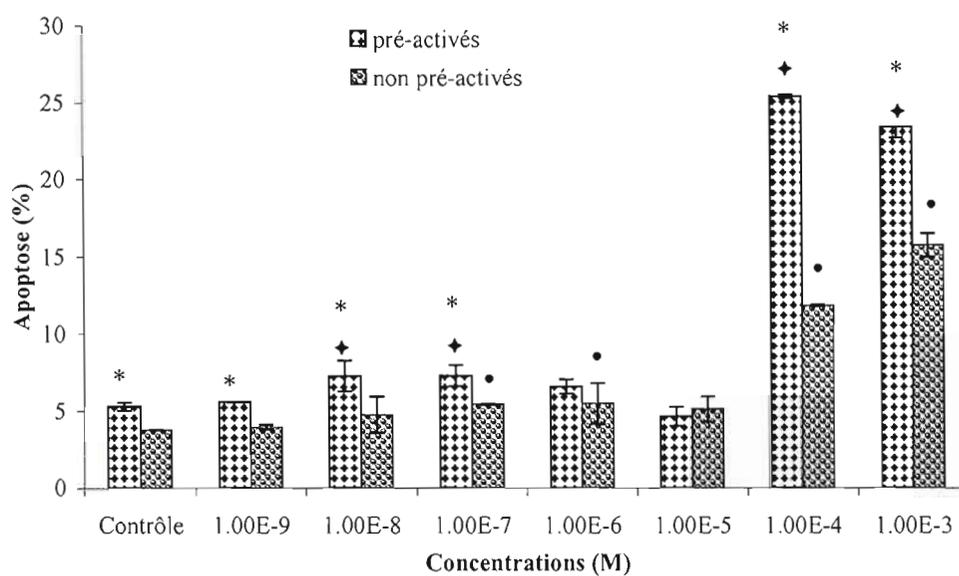


Figure 2. Courbe dose-réponse du % d'apoptose des lymphocytes pré-activés et non pré-activés en présence de chlorure de cadmium (CdCl_2). Les résultats sont exprimés en % d'apoptose en fonction de la concentration en CdCl_2 et sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur-type. * signifie une différence significative entre les lymphocytes pré-activés et non pré-activés. ◆ (pré-activés) • (non pré-activés), signifie une différence significative entre les lymphocytes pré-activés et non pré-activés par rapport à leur groupe contrôle respectif. $P < 0.05$.

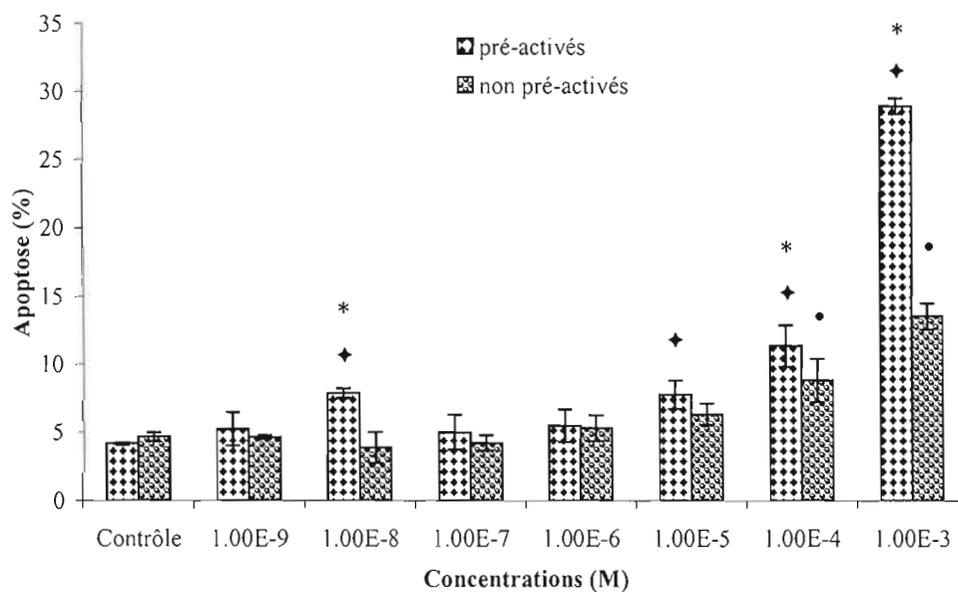


Figure 3. Courbe dose-réponse du % d'apoptose des lymphocytes pré-activés et non pré-activés en présence de tétrachlorure de sélénium (SeCl_4). Les résultats sont exprimés en % d'apoptose en fonction de la concentration en SeCl_4 et sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur-type. * signifie une différence significative entre les lymphocytes pré-activés et non pré-activés. ◆ (pré-activés) ● (non pré-activés), signifie une différence significative entre les lymphocytes pré-activés et non pré-activés par rapport à leur groupe contrôle respectif. $P < 0.05$.

APPENDICE A

Avant d'effectuer les proliférations lymphoblastiques avec les substances à tester, la concentration optimale de mitogène à utiliser doit être déterminée. Cette concentration optimale correspond à la concentration de mitogène la plus élevée avant celle provoquant l'effet maximal sur un graphique représentant les désintégrations par minute (DPM) en fonction de la concentration de mitogène. La figure 4 nous montre un exemple d'un tel graphique dans le cas d'une détermination de concentration optimale de mitogène.

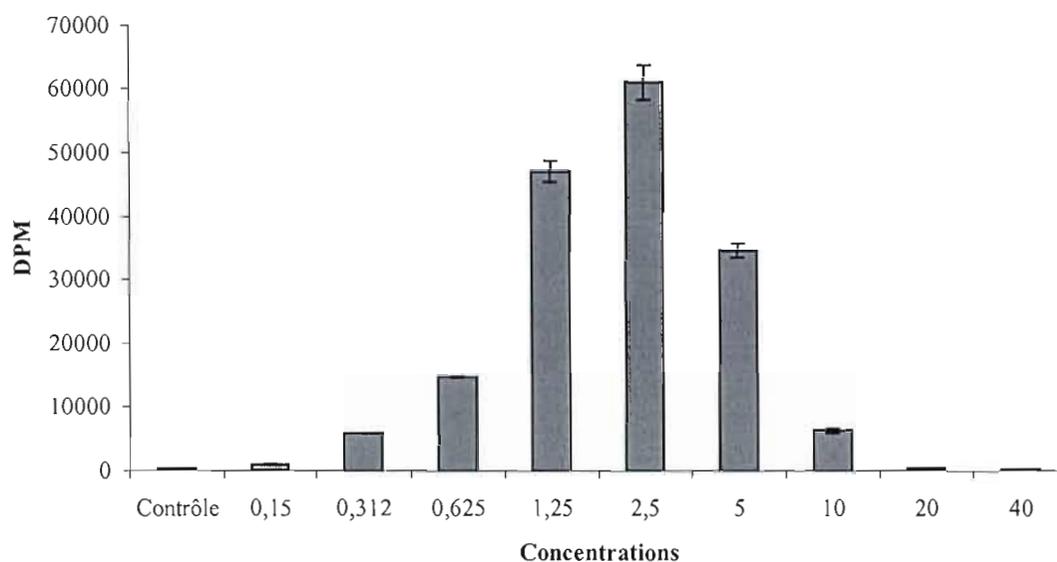


Figure 4. Détermination de la concentration optimale de mitogène. Dans le cas présent, la concentration optimale pour la concanavaleine A serait de 1.25 $\mu\text{g/ml}$.

RÉFÉRENCES

- Adams, D.O. 1982. Molecules, membranes and macrophages activation. *Immunol. Today* 3:285-287.
- Adams, D.O. and Hamilton, T.A. 1984. The cell biology of macrophages activation. *Ann. Rev. Immunol* 2:283-318.
- Al-Humadi, N.H., Siegel, P.D., Lewis, D.M., Barger, M.W., Ma, J.Y., Weissman, D.N. and Ma, J.K. 2002. Alteration of intracellular cysteine and glutathione levels in alveolar macrophages and lymphocytes by diesel exhaust particle exposure. *Environ Health Perspect* 110(4):349-353.
- Allen, J.I., Perri, R.T., McClain, C.J. and Kay, N.E. 1983. Alterations in human natural killer cell activity and monocyte cytotoxicity induced by zinc deficiency. *J Lab Clin Med* 102: 577-589.
- Arthur, J.R., McKenzie, R.C. and Beckett, G.J. 2003. Selenium in the immune system. *J Nutr* 133:1457S-1459S.
- Aten, J., Prigent, P., Poncet, P., Blanpied, C., Claessen, N., Druet, P. and Hirsch, F. 1995. Mercuric chloride-induced programmed cell death of a murine T cell hybridoma. I. Effect of the proto-oncogene Bcl-2. *Cell Immunol* 161:98-106.
- Borella, P. and Giardino, A. 1991. Lead and cadmium at very low doses affect in vitro immune response of human lymphocytes. *Environ Res* 55:165-177.
- Burchiel, S.W., Hadley, W.M., Cameron, C.L., Fincher, R.H., Lim, T.W., Elias, L. and Stewart, C.C. 1987. Analysis of heavy metal immunotoxicity by multiparameter flow cytometry: correlation of flow cytometry and immune function data in B6CF1 mice. *Int J Immunopharmacol* 9:597-610.
- Burk, R.F., Jordan, H.E. Jr and Kiker, K.W. 1977. Some effects of selenium status on inorganic mercury metabolism in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 40:71-82.
- Close, A.H., Guo, T.L. and Shenker, B.J. 1999. Activated human T lymphocytes exhibit reduced susceptibility to methylmercury chloride-induced apoptosis. *Toxicol Sci* 49:68-77.
- Coles, J.A., Farley, S.R. and Pipe, R.K. 1995. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Diseases of Aquatic Organisms* 22:59-65.
- Crompton, M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341:233-249.
- Dantas, D.C. and Queiroz, M.L. 1997. Immunoglobulin E and autoantibodies in mercury-exposed workers. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 19:383-392.

- Daum, J.R., Shepherd, D.M. and Noelle, R.J. 1993. Immunotoxicology of cadmium and mercury on B-lymphocytes--I. Effects on lymphocyte function. *Int J Immunopharmacol* 15:383-394.
- Davidson, P.W., Myers, G.J. and Weiss, B. 2004. Mercury exposure and child development outcomes. *Pediatrics* 113:1023-1029.
- De La Fuente, M., Miquel, J., Catalan, M.P., Victor, V.M. and Guayerbas, N. 2002. The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve several immune functions is higher in aged than in adult mice. *Free Radic Res* 2:2119-2126.
- Descotes, J. 1992. Immunotoxicology of cadmium. *IARC Sci Publ* 118:385-390.
- Dickinson, D.A. and Forman, H.J. 2002a. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64:1019-1026.
- Dickinson, D.A. and Forman, H.J. 2002b. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci* 973:488-504.
- Dieter, M.P., Luster, M.I., Boorman, G.A., Jameson, C.W., Dean, J.H. and Cox, J.W. 1983. Immunological and biochemical responses in mice treated with mercuric chloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 68:218-228.
- Dong, S., Shen, H.M. and Ong, C.N. 2001. Cadmium-induced apoptosis and phenotypic changes in mouse thymocytes. *Mol Cell Biochem* 222:11-20.
- Droge, W., Kinscherf, R., Mihm, S., Galter, D., Roth, S., Gmunder, H., Fischbach, T. and Bockstette, M. 1995. Thiols and the immune system: Effect of N-acetylcysteine on the T cell system in human subjects. *Methods in enzymology* 251:255-270.
- El Azzouzi, B., Tsangaris, G.T., Pellegrini, O., Manuel, Y., Benveniste, J. and Thomas, Y. 1994. Cadmium induces apoptosis in a human T cell line. *Toxicology* 88:127-139.
- Exon, J.H. 1984. The immunotoxicity of selected environmental chemicals, pesticides and heavy metals. *Prog Clin Biol Res* 161:355-368.
- Fay, M., Jampy-Fay, M., Akarid, K. and Gougerot-Pocidalo, M.A. 1995. Protective effect of LPS and poly A:U against immune oxidative injury: role of thiols released by activated macrophages. *Free Radic Biol Med* 18(4):649-654.
- Fels, L.M., Bundschuh, I., Gwinner, W., Jung, K.I., Pergand, M., Graubaum, H.J., Price, R.P., Taylor, S.A., De Brue, M.E., Nuyts, A., Gelphi, E., Rosello, J., Hohu, G. and Stolte, H. 1994. Early urinary markers of target nephron segments as studied in cadmium toxicity. *Kidney International* 46 (Suppl 47):S81-S88.
- Fidelus, R.K., Ginouves, P., Lawrence, D. and Tsan, M.F. 1987. Modulation of intracellular glutathione concentrations alters lymphocyte activation and proliferation. *Exp Cell Res* 170:269-275.

- Foulkes, E.C. 2000. Transport of toxic heavy metals across cell membranes. *Proc Soc Exp Biol Med* 223:234-240.
- Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H. and Brousseau, P. 2000. Phagocytosis as a Biomarker of Immunotoxicity in Wildlife Species Exposed to Environmental Xenobiotics. *American Zoologist* 40:412-420.
- Frisk, P., Yaqob, A. and Lindh, U. 2002. Indications of selenium protection against cadmium toxicity in cultured K-562 cells. *Sci Total Environ* 296:189-197.
- Gmunder, H., Eck, P., Benninghoff, B., Roth, S. and Droge, W. 1990. Macrophages regulate intracellular glutathione levels of lymphocytes: Evidence for an immunoregulatory role of cysteine. *Cell Immunol* 129:32-46.
- Gochfeld, M. 2003. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicol Environ Saf* 56:174-179.
- Goyer, R.A. 2001. Toxic effects of metals. In *Casarett and Doull's Toxicology* (Klaassen, C.D., Amdur, M.O., Doull, J. and Casarett, L.J., eds.), New York, pp. 691-736.
- Hamilos, D.L., Zelarney, P. and Mascali, J.J. 1989. Lymphocyte proliferation in glutathione-depleted lymphocytes: direct relationship between glutathione availability and the proliferative response. *Immunopharmacology* 18:223-235.
- Hamilos, D.L., Mascali, J.J. and Wedner, H.J. 1991. The role of glutathione in lymphocyte activation--II. Effects of buthionine sulfoximine and 2-cyclohexene-1-one on early and late activation events. *Int J Immunopharmacol* 13:75-90.
- Hogberg, J. and Alexander, J. 1986. "Selenium" In L. Friberg., G. Nordberg and V.B. Vouk. (eds). *Handbook on the toxicology of metals* 2d ed. Specific metals. Amsterdam:Elsevier. p. 482-512.
- Hultberg, B., Andersson, A. and Isaksson, A. 1998. Alterations of thiol metabolism in human cell lines induced by low amounts of copper, mercury or cadmium ions. *Toxicology* 126:203-212.
- Hultberg, B., Andersson, A. and Isaksson, A. 2001. Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol. *Toxicology* 156:93-100.
- Ibs, K.H. and Rink, L. 2003. Zinc-altered immune function. *J Nutr* 133:1452S-1456S.
- Janeway, C.A., Travers, J. and Travers P. 1997. *Immunobiologie*. De Boeck & Larcier Paris, Bruxelles.
- Jannalagadda, S.B. and Prasada Rao, P.V.V. 1993. Toxicity, bioavailability and metal speciation. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C:585-595.

- Kavanagh, T.J., Grossmann, A., Jaecks, E.P., Jinneman, J.C., Eaton, D.L., Martin, G.M. and Rabinovitch, P.S. 1990. Proliferative capacity of human peripheral blood lymphocytes sorted on the basis of glutathione content. *J Cell Physiol* 145:472-480.
- Kay, R.G. and Tasman-Jones, C. 1975. Acute zinc deficiency in man during intravenous alimentionation. *Aust N Z J Surg* 45:325-330.
- Keen, C.L. and Gershwin, M.E. 1990. Zinc deficiency and immune function. *Annu Rev Nutr* 10:415-431.
- Knight, J.A. 2000. Review: Free Radicals, Antioxidants, and the Immune System. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 30:145-158.
- Koller, L.D. 1980. Immunotoxicology of heavy metals. *Int. J. Immunopharmacology* 2:269-279.
- Koller, L.D. 1982. In vitro assessment of humoral immunity following exposure to heavy metals. *Environ Health Perspect* 43:37-39.
- Koropatnick, J. and Zalups, R.K. 1997. Effect of non-toxic mercury, zinc or cadmium pretreatment on the capacity of human monocytes to undergo lipopolysaccharide-induced activation. *Br J Pharmacol* 120:797-806.
- Krocova, Z., Macela, A., Kroca, M. and Hernychova, L. 2000. The immunomodulatory effect(s) of lead and cadmium on the cells of immune system in vitro. *Toxicol In Vitro* 14:33-40.
- Lawrence, D.A. 1981. Heavy metal modulation of lymphocyte activities. 1. In vitro effects of heavy metals on primary humoral immune responses. *Toxicol Appl Pharmacol* 57:439-451.
- Lawrence, D.A. 1985. Immunotoxicity of heavy metals. *Immunotoxicology and immunopharmacology* 341-353.
- Lawrence, D.A., Song, R. and Weber, P. 1996. Surface thiols of human lymphocytes and their changes after in vitro and in vivo activation. *J Leukoc Biol* 60:611-618.
- Lawrence, D.A. and McCabe, M.J. 2002. Immunomodulation by Metals. *International Immunopharmacology* 2:293-302.
- Leffel, E.K., Wolf, C., Poklis, A. and White, K.L. 2003. Drinking water exposure to cadmium, an environmental contaminant, results in the exacerbation of autoimmune disease in the murine model. *Toxicology* 188:233-250.
- Lindh, U., Danersund, A. and Lindvall, A. 1996. Selenium protection against toxicity from cadmium and mercury studied at the cellular level. *Cell Mol Biol* 42:39-48.

- Luster, M.I., Blank, J.A. and Dean, J.H. 1987. Molecular and cellular basis of chemically induced immunotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 27:23-49.
- Misra, U.K., Gawdi, G., Akabani, G. and Pizzo, S.V. 2002. Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: the role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms. *Cell Signal* 14:327-340.
- Mocchegiani, E., Muzzioli, M. and Giacconi, R. 2000. Zinc, metallothioneins, immune responses, survival and ageing. *Biogerontology* 1:133-143.
- Mueller, A.S., Pallauf, J. and Rafael, J. 2003. The chemical form of selenium affects insulinomimetic properties of the trace element: investigations in type II diabetic dbdb mice. *Journal of nutritional biochemistry* 14:637-647.
- Ohsawa, M. and Kimura, M. 1979. Enhancement of beta 2-microglobulin formation induced by phytohemagglutinin and mercuric ion in cultured human leucocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 91:569-574.
- Ohsawa, M., Masuko-Sato, K., Takahashi, K. and Otsuka, F. 1986. Strain differences in cadmium-mediated suppression of lymphocyte proliferation in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 84:379-388.
- Olabarrieta, I., L'Azou, B., Yuric, S., Cambar, J. and Cajaraville, M.P. 2001. In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicol In Vitro* 15:511-517.
- Ortega, H., Lopez, M. and Salvagio, J. 1994. Effect of interferon gamma production after *in vitro* exposure to methylmercury chloride. *J. Invest. Med* 43 :67
- Osorio, R., Toledano, M., Liebana, J., Rosales, J.I. and Lozano, J.A. 1995. Environmental microbial contamination. Pilot study in a dental surgery. *Int Dent J* 45:352-357.
- Otsuka, F. and Ohsawa, M. 1991. Differential susceptibility of T- and B-lymphocyte proliferation to cadmium: relevance to zinc requirement in T-lymphocyte proliferation. *Chem Biol Interact* 78:193-205.
- Pelletier, L., Castedo, M. and Druet, P. 1994. Autoimmunity and toxic agents. *Rev Prat* 44:86-92.
- Provinciali, M., Di Stefano, G. and Fabris, N. 1995. Dose-dependent opposite effect of zinc on apoptosis in mouse thymocytes. *Int J Immunopharmacol* 17:735-744.
- Rayman, M.P. 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet* 356:233-41.
- Rodilla, V., Miles, A.T., Jenner, W. and Hawksworth, G.M. 1998. Exposure of cultured human proximal tubular cells to cadmium, mercury, zinc and bismuth: toxicity and metallothionein induction. *Chem Biol Interact* 115:71-83.

- Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. 1997. *Immunologie*. DeBoeck Université Paris, Bruxelles.
- Rosenberg, S.A., Lipsky, P.E. 1979. Monocyte dependence of pokeweed mitogen-induced differentiation of immunoglobulin-secreting cells from human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 122:929-931.
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J.M. and Venkatachalam, M.A. 1999. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 107:489-506.
- Sanchez-Dardon, J., Voccia, I., Hontela, A., Chilmonczyk, S., Dunier, M., Boermans, H., Blakley, B. and Fournier, M. 1999. Immunomodulation by Heavy Metals Tested Individually or in Mixtures in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Exposed in Vivo. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18:1492-1497.
- Santé Canada. 2004. Le mercure et la santé humaine. *Votre santé et vous*. P.1-5.
- Schuppe, H.C., Ronnau, A.C., Von Schmiedeberg, S., Ruzicka, T., Gleichmann, E. and Griem, P. 1998. Immunomodulation by Heavy Metal Compounds. *Clinics in Dermatology* 16:149-157.
- Schurz, F., Sabater-Vilar, M. and Fink-Gremmels, J. 2000. Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defence: the role of metal-binding proteins. *Mutagenesis* 15:525-530.
- Selgrade, M.K. 1999. Use of immunotoxicity data in health risk assessments: uncertainties and research to improve the process. *Toxicology* 133:59-72.
- Sgagias, M., Balter, N.J. and Gray, I. 1989. Uptake and subcellular distribution of cadmium in resting and mitogen-activated lymphocytes and its relationship to a metallothionein-like protein. *Environ Res* 49:262-270.
- Shankar, A.H. and Prasad, A.S. 1998. Zinc and Immune Function: the Biological Basis of Altered Resistance to Infection. *American Journal of Clinical Nutrition* 68:447S-463S.
- Sharma, R.P. and Dugyala, R.R. 1996. Effects of metals on cell-mediated immunity and biological response modulators. In *Toxicology of metals*, ed. L.W. Chang, Boca Raton, FL:CRC Press. PP. 785-796.
- Shen, H., Yang, C., Liu, J. and Ong, C. 2000. Dual role of glutathione in selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma cells. *Free Radic Biol Med* 28:1115-1124.
- Shen, H.M., Dong, S.Y. and Ong, C.N. 2001. Critical Role of Calcium Overloading in Cadmium-Induced Apoptosis in Mouse Thymocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 171:12-19.

- Shenker, B.J., Rooney, C., Vitale, L. and Shapiro, I.M. 1992. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. I. Suppression of T-cell activation. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 14:539-553.
- Shenker, B.J., Guo, T.L., O, I. and Shapiro, I.M. 1999. Induction of apoptosis in human T-cells by methyl mercury: temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve. *Toxicol Appl Pharmacol* 157:23-35.
- Shenker, B.J., Guo, T.L. and Shapiro, I.M. 2000. Mercury-Induced Apoptosis in Human Lymphoid Cells: Evidence That the Apoptotic Pathway Is Mercurial Species Dependent. *Environmental Research* 84:89-99.
- Soares, J.C.M., Folmer, V. and Rocha, J.B.T. 2003. Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzymes in mice. *Basic nutritional investigation* 19:627-632.
- Strenzke, N., Grabbe, J., Plath, K.E.S., Rohwer, J., Wolff, H.H. and Gibbs, B.F. 2001. Mercuric Chloride Enhances Immunoglobulin E-Dependent Mediator Release From Human Basophils. *Toxicology and Applied Pharmacology* 174:257-263.
- Suen, Y.K., Fung, K.P., Choy, Y.M., Lee, C.Y., Chan, C.W. and Kong, S.K. 2000. Concanavalin A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells through clustering of mitochondria and release of cytochrome *c*. *Apoptosis* 5:369-377.
- Sweet, L.I. and Zelikoff, J.T. 2001. Toxicology and immunotoxicology of mercury: a comparative review in fish and humans. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 4:161-205.
- Tapiero, H. and Tew, K.D. 2003. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother* 57:399-411.
- Tapiero, H., Townsend, D.M. and Tew, K.D. 2003. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57:134-144.
- Thompson, S.A., Roellich, K.L., Grossmann, A., Gilbert, S.G. and Kavanagh, T.J. 1998. Alterations in immune parameters associated with low level methylmercury exposure in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 20:299-314.
- Tinggi, U. 2003. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicol Lett* 137:103-110.
- Tsangaris, G.T. and Tzortzatou-Stathopoulou, F. 1998. Cadmium induces apoptosis differentially on immune system cell lines. *Toxicology* 128:143-150.
- Unanue, E.R. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Ann. Rev. Immunol* 2:395-428.
- Unanue, E.R. and Allen, P.M. 1987. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 236:551-557.

- Unoshima, M., Nishizono, A., Takita-Sonoda, Y., Iwasaka, H. and Noguchi, T. 2001. Effects of zinc acetate on splenocytes of endotoxemic mice: enhanced immune response, reduced apoptosis, and increased expression of heat shock protein 70. *J Lab Clin Med* 137:28-37.
- Vallee, B.L. and Falchuk, K.H. 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 73:79-118.
- van der Meide, P.H., de Labie, M.C., Botman, C.A., van Bennekom, W.P., Olsson, T., Aten, J. and Weening, J.J. 1993. Mercuric chloride down-regulates T cell interferon-gamma production in brown Norway but not in Lewis rats; role of glutathione. *Eur J Immunol* 23:675-681.
- Voccia, I., Krzystyniak, K., Dunier, M., Flipo, D. and Fournier, M. 1994. In vitro mercury-related cytotoxicity and functional impairment of the immune cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 29:37-48.
- Vos, J., Van Loveren, H., Wester, P. and Vethaak, D. 1989. Toxic effects of environmental chemicals on the immune system. *Trends Pharmacol Sci* 10:289-292.
- Walsh, C.T., Sandstead, H.H., Prasad, A.S., Newberne, P.M. and Fraker, P.J. 1994. Zinc: health effects and research priorities for the 1990s. *Environ Health Perspect* 102 (Suppl 2):5-46.
- Wang, A., Barber, D. and Pfeiffer, C.J. 2001. Protective effects of selenium against mercury toxicity in cultured Atlantic spotted dolphin (*Stenella plagiodon*) renal cells. *Arch Environ Contam Toxicol* 41:403-409.
- Wayland, M., Gilchrist, H.G., Marchant, T., Keating, J. and Smits, J.E. 2002. Immune function, stress response, and body condition in arctic-breeding common eiders in relation to cadmium, mercury, and selenium concentrations. *Environ Res* 90:47-60.
- Wild, L.G., Ortega, H.G., Lopez, M. and Salvaggio, J.E. 1997. Immune system alteration in the rat after indirect exposure to methyl mercury chloride or methyl mercury sulfide. *Environ Res* 74:34-42.
- Worth, R.G., Esper, R.M., Warra, N.S., Kindzelskii, A.L., Rosenspire, A.L., Todd, R.F. 3rd and Petty, H.R. 2001. Mercury inhibition of neutrophil activity: evidence of aberrant cellular signalling and incoherent cellular metabolism. *Scand J Immunol* 53:49-55.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306.
- Yang, G.Q., Wang, S.Z., Zhou, R.H. and Sun, S.Z. 1983. Endemic selenium intoxication of humans in China. *Am J Clin Nutr* 37:872-881.

- Yasutake, A. and Hirayama, K. 1994. Acute effects of methylmercury on hepatic and renal glutathione metabolisms in mice. *Arch Toxicol* 68:512-516.
- Yurkow, E.J. and DeCoste, C.J. 1999. Effects of cadmium on metallothionein levels in human peripheral blood leukocytes: a comparison with zinc. *J Toxicol Environ Health A* 58:313-327.
- Zelikoff, J.T., Smialowicz, R., Bigazzi, P.E., Goyer, R.A., Lawrence, D.A., Maibach, H.I. and Gardner, D. 1994. Immunomodulation by metals. *Fundam Appl Toxicol* 22:1-7.
- Zelikoff, J.T. and Thomas, P.T. 1998. *Immunotoxicology of environmental and occupational metals*. London, Angleterre,
- Zurgil, N., Kaufman, M., Solodiev, I. and Deutsch, M. 1999. Determination of cellular thiol levels in individual viable lymphocytes by means of fluorescence intensity and polarization. *J Immunol Methods* 229:23-34.